

A.G.C. 20 - Assistenza Sanitaria - **Deliberazione n. 398 del 23 marzo 2010 – PROGETTO: Ricerca di markers molecolari per l'ottimizzazione del processo diagnostico terapeutico dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare**

### **ATTESO**

che il carcinoma epatocellulare rappresenta la più frequente neoplasia primitiva del fegato ed una importante causa di morte in molti paesi;

che costituisce in termini di frequenza il sesto tipo di tumore, ma per esito infausto rappresenta la terza causa di morte dei pazienti oncologici,

che trattasi in definitiva di un tumore maligno ad alta incidenza, alta aggressività e cattiva prognosi,

### **VALUTATO**

che le infezioni croniche da virus dell'epatite C e B sono i principali fattori favorevoli all'insorgenza di tale patologia,

che in Regione Campania l'incidenza dell'epatite C è molto elevata, raggiungendo nella popolazione valori compresi tra il 12 ed il 16% con picchi di prevalenza nelle province di Napoli e Caserta,

che le patologie indotte da HCV cronicizzano in oltre il 70% dei casi ed una percentuale compresa tra il 20 ed il 40% va incontro nel tempo a cirrosi epatica,

che proprio le province di Napoli e Caserta presentano i più alti tassi di mortalità per cirrosi epatica rispettivamente 64.7 e 55.5 % rispetto alla media italiana del 26,7%,

### **TENUTO CONTO**

che la diagnosi dell' HCC è abitualmente tardiva,

che l'incapacità di diagnosticare l' HCC in fase precoce è in gran parte causa dell'esito infausto della patologia,

che pertanto vanno fatti i massimi sforzi necessari per individuare metodiche in grado di definire precocemente l'insorgere della malattia,

### **PRESO ATTO**

della proposta avanzata dal Dipartimento di Biologia strutturale e funzionale del Polo delle Scienze e delle Tecnologie dell' Università Federico II di Napoli di un progetto denominato "Ricerca di markers molecolari per l'ottimizzazione del processo diagnostico terapeutico dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare" che si prefigge l'obiettivo di sperimentare tecniche innovative in grado di definire tempestivamente la diagnosi,

### **VALUTATO**

che il progetto appare rispondere pienamente alle esigenze del sistema sanitario regionale aderendo perfettamente alle indicazioni dei Piani sanitari regionali vigenti nonché alle indicazioni del Piano sanitario nazionale,

che non esistono allo stato attuale analoghi progetti in corso o proposti alla Regione Campania.

che la spesa appare congrua ed in linea con gli obiettivi del progetto stesso

Per i motivi espressi in premessa che qui si intendono integralmente riportati, l'Assessore alla Sanità propone e la Giunta a voto unanime

### **DELIBERA**

di approvare il progetto di durata triennale denominato "Ricerca di markers molecolari per l'ottimizzazione del processo diagnostico terapeutico dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare." presentato dal Dipartimento di Biologia strutturale e funzionale del Polo delle Scienze e delle Tecnologie dell'Università Federico II di Napoli

di stabilire che l'acquisizione di risorse umane per la realizzazione delle attività del progetto avvenga nel rispetto delle vigenti disposizioni in materia nonché dei provvedimenti adottati dal Commissario ad Acta per l'attuazione del piano di rientro

di prelevare la somma di euro 540.000,00 dal capitolo di bilancio 7092 (UPB 4.15.38.) esercizio finanziario 2010 che presenta sufficienti disponibilità precisando che il finanziamento è riferito ai tre anni di attività.

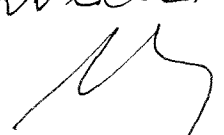
di trasmettere la presente delibera all'Area 20 per i provvedimenti di conseguenza

di trasmettere la presente delibera al BURC per la successiva pubblicazione

Il Segretario  
*Cancellieri*

Il Presidente  
*Bassolino*

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II  
POLO DELLE SCIENZE E DELLE TECNOLOGIE  
Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale

x il dott. Vasco  
provveder  


All' Assessore alla Sanità  
Prof. Mario Luigi Santangelo

Oggetto: Richiesta finanziamento per il progetto: *Ricerca di markers molecolari per l'ottimizzazione del processo diagnostico-terapeutico dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare, una patologia ad alta incidenza nella regione Campania.*

Chiarissimo Assessore,

nell' ambito dell' attività assistenziale e di ricerca sul carcinoma epatocellulare (HCC) è stato elaborato dall' UOC di Chirurgia Generale ed Epato-Bilio-Pancreatica dell' Ospedale S. Maria di Loreto Nuovo, ASL NA1-Centro, in collaborazione con l' Università degli Studi Federico II di Napoli, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, un progetto per individuare markers biomolecolari rivolti ad identificare le varie tipologie di carcinoma epatocellulare sia ai fini prognostici che terapeutici.

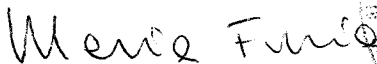
Il progetto che si allega in copia è programmato nell'arco di un triennio e necessiterebbe di un finanziamento ad hoc. L'importanza dell' argomento, che tende ad aprire nuovi percorsi diagnostici-terapeutici per pazienti affetti da tumori primitivi del fegato, nonché la documentata serietà delle strutture coinvolte nel progetto inducono a sperare in una tempestiva accettazione da parte di codesto Assessorato.

In relazione a tale progetto, l'attività assistenziale con il relativo percorso diagnostico terapeutico e di follow-up sarà effettuato presso l'UOC di Chirurgia Generale ed Epato-Bilio-Pancreatica dell'Ospedale Loreto Nuovo, ASL NA1-Centro, mentre l'attività di ricerca biomolecolare sarà eseguita presso il Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Sarebbe pertanto opportuno che il finanziamento venisse assegnato alla Prof. Maria Furia, responsabile scientifica del progetto presso il suddetto Dipartimento.

Napoli, 11/03/2010

Responsabile scientifico  
Prof.ssa Maria Furia



Il Direttore del Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale





**Titolo del Progetto:** *Ricerca di markers molecolari per l'ottimizzazione del processo diagnostico-terapeutico dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare, una patologia ad alta incidenza nella regione Campania.*

**Parole chiave**

*Oncogenesi; carcinoma epatocellulare (HCC); marker tumorali; marcatori diagnostici; tipizzazione di cellule; Laser microdissection; Regolazione dell'espressione genica; Genomica e trascrittomica*

**Responsabili Scientifici del Progetto:**

**Prof. Maria Furia,**

*Vicepresidente del Polo delle Scienze e Tecnologie  
Professore Ordinario di Genetica,  
Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale,  
Università degli Studi di NAPOLI "Federico II"  
Via Cinthia 80126  
Tel: +/39/081/679072 (studio)  
+/39/081/679071 (lab)  
Cell: 3332462827  
[mfuria@unina.it](mailto:mfuria@unina.it)*

**Prof. Giulio Belli**

*Direttore della Chirurgia Generale ed EpatoBilioPancreatica  
Ospedale S.Maria di Loreto Nuovo ASL NA1  
Via A.Vespucci, 15  
80142 Napoli  
Tel/Fax 0812542735  
Cell: 3389459676  
[chirurgia.loretonuovo@tin.it](mailto:chirurgia.loretonuovo@tin.it)*

## **BREVE CURRICULUM SCIENTIFICO DEL CORESPONSABILE DEL PROGETTO**

**PROF. MARIA FURIA**

### **POSIZIONE ATTUALE**

- A partire dal 2006 a tutt'oggi la Prof. Furia è Vice-Presidente del Polo delle Scienze e delle Tecnologie, che raggruppa le Facoltà di Scienze, Architettura ed Ingegneria dell' Università di Napoli Federico II.
- Professore Ordinario di Genetica presso il Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell' Università Federico II di Napoli;
- Docente del Dottorato di Genetica e Medicina Molecolare dell'Università di Napoli Federico II.
- Titolare del Corso di Genetica avanzata della Laurea Specialistica in Scienze Biologiche, Indirizzo Biomolecolare e del Corso di Genomica e Trascrittomica della Laurea Specialistica in Scienze Biotecnologiche, Indirizzo Industriale e Biomolecolare

### **ATTIVITA' ORGANIZZATIVE PRECEDENTI**

- Nel periodo 2001-2004 Direttore del Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e Molecolare dell'Università di Napoli Federico II.
- Nel 2003 ha organizzato, in qualità di delegato del Rettore, la Mostra divulgativa "La doppia elica del DNA cinquant'anni dopo - I geni del golfo", che si è svolta a Napoli dall' 8 novembre al 10 dicembre nell'ambito delle manifestazioni promosse dal MIUR.
- Consigliere dell' Associazione Italiana di Genetica per il periodo 1992-94.

### **INCARICHI DI RICERCA:**

- Ricercatore ospite presso la Stazione Zoologica "Anton Dohrn", Napoli, per il periodo 1972-1976;
- Titolare di un incarico di ricerca presso il Laboratorio di Embriologia Molecolare del CNR, Arco Felice, Napoli, per il periodo 1980-1982;
- Titolare di un incarico di ricerca presso il Laboratorio Internazionale di Genetica e Biofisica del CNR, Napoli, per il periodo 1982-1987
- Titolare di un incarico di ricerca presso il Laboratorio di Biochimica delle Proteine ed Enzimologia del CNR, Napoli, per il periodo 1987-1991.

### **ATTIVITA' DI RICERCA PRESSO LABORATORI ESTERI:**

- 1983: Vincitrice di una "Short term" FEBS fellowship trimestrale, presso il laboratorio del prof. D. M. Glover, Department of Biochemistry, Imperial College, University of London.
- 1983/84: Vincitrice di una "Long term" EMBO fellowship annuale, usufruita presso il laboratorio del prof. D. M. Glover, Department of Biochemistry, Imperial College, University of London.
- 1992: Visiting Professor presso il laboratorio del Prof. Peter Cherbas, Department of Biology, Indiana University, Bloomington, USA

## BREVE CURRICULUM SCIENTIFICO DEL CORESPONSABILE DEL PROGETTO

### PROF. GIULIO BELLI

**Direttore della Chirurgia Generale ed Epatobiliopancreatica  
Ospedale S.Maria di Loreto Nuovo  
Via A.Vespucci,15  
80142 Napoli  
Italia**

Data di nascita 30 Maggio 1951

Indirizzo: Via Cimarosa 2/A 80127 Napoli - Italia

Tel/ Fax 0039 081 2542731

e-mail [chirurgia.loretonuovo@tin.it](mailto:chirurgia.loretonuovo@tin.it)

e-mail personale [giubelli@unina.it](mailto:giubelli@unina.it)

**1975** Laurea in Medicina e Chirurgia con 110 e lode

**1980** Specializzazione in Chirurgia Generale con il Massimo dei voti e la lode

**1983** Specializzando presso la Liver Unit, **Hammersmith Hospital RPMS Londra Inghilterra** (Capo Dipartimento Prof. L.H. Blumgart)

**1986** Membro fondatore del **WAHPBS ( World Association of HPB Surgery)**  
Successivamente trasformato in **IHPBA ( International HPB Association)**

**1987** Membro fondatore del Capitolo Italiano dell' **IHPBA**

**1990** Visitatore presso il **Department of Transplantation of the University of Pittsburgh - USA** (Capo dipartimento Prof. T.E. Starzl)

**1992** Coordinatore dell'unità epatobiliopancreatica del dipartimento di Chirurgia Generale e dei **Trapianti dell' Università di Napoli, Italia**

**1993** Coinvolto nel primo **trapianto epatico effettuato nel Sud Italia**

**2000** Membro del **Comitato scientifico internazionale dell' IHPBA**

**2004** Vice-Presidente della **Società Napoletana di Chirurgia ( SNaC)**

## **Posizione attuale**

**Primario della Chirurgia Generale ed Epatobiliopancreatica Ospedale S.Maria di Loreto Nuovo ASL NA 1 Napoli**

Precedente **membro del consiglio del Capitolo Italiano dell'IHPBA**

Membro effettivo del consiglio dell' **European HPB Association**

Membro effettivo del Consiglio della **SICE ( Società italiana di Chirurgia Endoscopica e di Nuove Tecnologie)**

Professore di Chirurgia presso la scuola di specializzazione dell' **“Università Federico II di Napoli**

Insegnante presso **la Scuola di Chirurgia della Società Italiana di Chirurgia (SIC)**

Insegnante presso **la Scuola Internazionale di Chirurgia Oncologica**

Insegnante al **Master Universitario di II livello in Chirurgia Mininvasiva e Nuove Tecnologie presso l' Università di Catania- Italia 2007-2008**

Insegnante al **Master Universitario di II Livello in Colon-Proctologia Seconda Università di Napoli (SUN) 2008-2009**

Insegnante –esperto al **Corso MasterClass in Chirurgia Epatica Laparoscopica Parigi 17-18 Marzo 2008, 2009, 2010**

Membro effettivo del **Comitato Etico** della ASL NA1 Centro Napoli-Italia

Membro effettivo del **Comitato Scientifico (CTS)** per il Network Oncologico del Sud Italia

Membro effettivo del Consiglio dell' **Union Europeenne des Medecins Specialistes (UEMS) working group for HPB Surgery**

Professore esaminatore al I test di ammissione dell' **UEMS**. Brussels 27 Novembre 2009

Professore Onorario di chirurgia oncologica presso il **'Carol Davila' University of Medicine and Pharmacy of Bucharest**

Membro dell' Editorial Board and Reviewer della rivista **HPB** Giornale ufficiale dell' IHPBA (International HepatoPancreaticBiliary Association)

Editor del numero tematico del giornale **HPB** (2004, 6.4) focalizzato sulla **chirurgia epatica laparoscopica**

Membro dell' Editorial Board and Reviewer di **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery** (Giornale ufficiale della Japanese Society of HBP Surgery, the Asian Society of HPB Surgery, and the Japanese Pancreatic Surgery Club )

Membro dell' Editorial Board della rivista **Hepatogastroenterology** Giornale ufficiale della IASG (International Association of Surgeons & Gastroenterologists)

Membro del comitato revisori degli abstract al **6° Congresso dell' EHPBA** 25-28 Maggio 2005 Heidelberg, Germania

Membro del comitato revisori degli abstract al **7° World Congress of HPBA Settembre 2006** Edinburgh Inghilterra

Membro del comitato revisori degli abstract della **15a<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week** 27-31 Ottobre 2007 Parigi, Francia

Membro del comitato revisori degli abstract della **16<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week** Vienna 2008

Membro del comitato revisori degli abstract dell' **8th World Congress of IHPBA** 27 Febbraio- 2 Marzo 2008 Mumbai, India

Membro del comitato revisori degli abstract del **7<sup>th</sup> Congress of EHPBA** 18-20 Giugno 2009 Atene, Grecia

Reviewer per la rivista **Annals of Surgery**

Reviewer per la rivista **Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques** (Giornale ufficiale della Society of Laparoendoscopic Surgeons USA)

Reviewer per la rivista **Journal of Hepatology** (Giornale ufficiale della EASL ( European Association for the Study of the Liver)

Membro invitato della **International Consensus Conference for the management of acute cholecystitis and cholangitis**, Tokyo 1-2 Aprile 2006  
J Hepato-Biliary-Pancreatic Surg 2007;14(1): 1-121

Speaker invitato ( **Keynote Lecture** : Management of Liver Metastases ) al **Third Scientific & Annual Meeting European Society of Coloproctology( ESCP)** Nantes, Francia Settembre, 24-27,2008

Membro invitato dell' **International Consensus Conference on Laparoscopic Liver Surgery** Louisville, Kentucky USA, Novembre 7-8, 2008

**Piu di 200 articoli pubblicati su riviste di Chirurgia con interesse speciale per la Chirurgia Epatica Resettiva Laparoscopica Ed Open**



**Titolo del Progetto:** *Ricerca di markers molecolari per l'ottimizzazione del processo diagnostico-terapeutico dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare, una patologia ad alta incidenza nella regione Campania.*

#### **Composizione del Gruppo di ricerca:**

-Prof. Maria Furia, Prof. Mimmo Turano, Dr. Alberto Angrisani, Rosario Vicidomini,  
Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II

- Prof. Giulio Belli, Primario; Dr. Alberto D'Agostino, Dr Corrado Fantini - Reparto di Chirurgia Epatobiliopancreatica, Ospedale Loreto Mare, ASL1, Napoli

**Collaborazioni scientifiche:** Dr. Lorenzo Montanaro, Professore di Patologia Sperimentale, Università di Bologna; prof. P J Mason, Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA.

#### **Premessa**

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta la più frequente neoplasia primitiva del fegato ed un'importante causa di morte nella maggior parte dei paesi. Secondo le recenti statistiche, a livello mondiale esso costituisce in termini di frequenza il sesto tipo di tumore, ma la sua cattiva prognosi fa sì che esso rappresenti la terza causa di morte dei pazienti oncologici (1, 2, 3). L'HCC è infatti un tumore maligno che non solo presenta alta incidenza, ma soprattutto alta aggressività e cattiva prognosi. Benchè i carcinogeni ambientali, l'obesità e le abitudini alimentari possano svolgere un certo ruolo nel favorire l'insorgenza dell'HCC, questo tipo di neoplasia insorge raramente nel fegato sano, mentre si sviluppa prevalentemente in pazienti con cirrosi o epatite virale cronica di lunga durata. E' infatti ben noto che le infezioni croniche da virus dell'epatite B e C sono i principali fattori favorevoli all'insorgenza di tale neoplasia. L'infezione cronica da virus dell'epatite B (HBV) è ampiamente responsabile dell'elevata prevalenza dell'HCC nelle aree endemiche e l'incidenza di questa neoplasia generalmente va di pari passo con la prevalenza geografica di questo virus. Nei portatori dell' HBV, che sono in prevalenza asintomatici, il DNA virale viene, alla fine, incorporato nel genoma ospite degli epatociti infetti. Ciò porta spesso ad una trasformazione maligna, anche se il meccanismo preciso è sconosciuto. Più recentemente, anche l'epatite cronica da infezione da virus C (HCV) è stata riconosciuta come un importante fattore di rischio per la genesi del carcinoma epatocellulare. In questo caso il meccanismo della carcinogenesi è sconosciuto, perché l'HCV è un RNA virus e, diversamente dall'HBV, non viene incorporato nel genoma dell'ospite. E' possibile che il tumore possa evolvere dalla fibrogenesi piuttosto che dall'infezione da HCV in sé, dato che la cirrosi si sviluppa in quasi tutti i casi.

E' importante notare che Nel Nord America, in Europa e in altre aree a bassa prevalenza, la maggior parte dei pazienti presenta una cirrosi di base non correlata all'infezione da HBV o da HCV, bensì di tipo alcolico, criptogenetico o emocromatosico, tutte con tendenza alla trasformazione maligna. In Italia, invece, il carcinoma epatocellulare è nella quasi totalità dei casi associato a cirrosi epatica da infezione da virus dell'epatite C e B, ed il rischio di insorgenza dell'HCC sale notevolmente nel caso di copresenza di entrambi i virus.

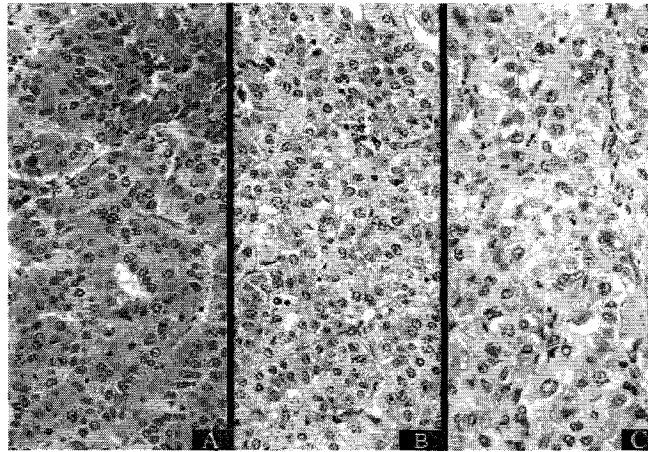
In particolare, nella regione Campania l'incidenza dell'epatite C è molto elevata, raggiungendo nella popolazione valori compresi fra il 12 ed il 16%, con picchi di prevalenza che riguardano soprattutto le provincie di Napoli e Caserta. Tale elevata incidenza ha pesanti conseguenze, dato che

le patologie indotte dall'HCV cronicizzano in oltre il 70% dei casi, ed una percentuale compresa fra il 20 ed il 40 % dei pazienti va incontro nel tempo a cirrosi epatica. Non sorprende quindi che tra le provincie italiane, quelle di Napoli e Caserta presentino i tassi più elevati di mortalità per cirrosi (rispettivamente 64.7 e 55.5 %, rispetto alla media italiana del 26.7%) e per HCC.

Benchè l'uso del vaccino contro il HBV dovrebbe avere, nel tempo, un effetto benefico specie nelle aree endemiche, l'infezione da epatite B rimane ancora responsabile di una sostenuta proporzione di casi. La particolare rilevanza epidemiologica dell'HCC nella nostra regione e nella provincia di Napoli richiede e giustifica quindi un'intenso sforzo teso a migliorare e rendere più precoce le tecniche di diagnosi e terapia.

## Razionale

A tutt'oggi, la diagnosi dell'HCC è tardiva ed il trattamento insoddisfacente, così che il numero totale dei pazienti che sopravvivono nel medio e lungo termine rimane molto basso. L'HCC non è radiosensibile ed i risultati della chemioterapia solitamente sono scarsi, anche quando vengono usate l'infusione diretta nell'arteria epatica o la chemoembolizzazione. La resezione chirurgica fornisce quindi la speranza migliore, ma è possibile soltanto in alcuni casi (4, 5). Benchè la prognosi infausta sia in buona parte dovuta all'aggressività di questo tipo di tumore, l'incapacità di diagnosticare l'HCC nelle sue fasi iniziali contribuisce significativamente alla negatività della prognosi. Infatti, poichè l'HCC insorge solitamente su un organo già malato (epatite cronica o cirrosi), all'inizio esso è spesso del tutto asintomatico. In più, in alcuni casi la presenza di sintomi o segni viene sottovalutata o più semplicemente correlata alla progressione della sottostante epatopatia di base. Dal punto di vista diagnostico, tranne che per la presenza dell' $\alpha$ -fetoproteina nel siero, i cui aumenti diventano indicativi se  $> 200$  mg/l, gli esami biochimici sono di scarso aiuto. D'altronde, significativi aumenti del livello di  $\alpha$ -fetoproteina nel siero si verificano solo nel 50% dei casi e negli stadi iniziali della malattia i valori sono spesso normali. Questo quadro d'insieme spiega perché la maggioranza dei casi di HCC viene diagnosticata solo in stadio avanzato e sottolinea l'urgente necessità di identificare nuovi parametri molecolari utili per effettuare una diagnosi precoce nonché una precisa definizione della specifica prognosi. Una più vasta conoscenza di questa neoplasia ed un più attento follow-up dei pazienti a rischio potrebbero permettere di giungere alla diagnosi più precocemente, consentendo in molti casi di attuare procedimenti terapeutici mirati e più efficaci e promettendo di cambiare alcuni aspetti della realtà di questa patologia. La definizione di criteri che consentano un'accurata ed affidabile stadiazione dell'HCC nelle biopsie è cruciale per stabilire la prognosi e l'opportuno trattamento terapeutico. Ai classici parametri clinico patologici di classificazione, basati sulla dimensione del tumore, l'inclusione di noduli e la presenza di metastasi (TNM staging) si affianca la valutazione del grado di vascolarizzazione e di funzionalità epatica. Il grado di perdita di differenziamento cellulare delle cellule tumorali, valutato secondo i criteri istologici di Edmondson-Steiner (6), è oggi ritenuto essere di grande valore prognostico, aumentando sensibilmente l'accuratezza della prognosi basata esclusivamente sui criteri di stadiazione clinico patologici dei linfonodi e la presenza di metastasi a lunga distanza (TNM) e la pianificazione del trattamento terapeutico. I gradi di classificazione di Edmondson-Steiner, il cui intervallo varia da I a V, sono basati sulla valutazione del grado di differenziamento cellulare dell'epatocita. La perdita del differenziamento viene definita essenzialmente attraverso parametri isto-morfologici quali l'aumento del rapporto Nucleo/Citoplasma (N/C) e della dimensione dei nucleoli e la perdita di vacuolizzazione e densa granularità dell'epatocita; negli stadi più tardivi, la perdita del differenziamento si accompagna alla presenza di necrosi cellulare (vedi Figura 1). Per i tumori precoci, spesso caratterizzati da elevato grado di differenziamento, la classificazione Edmondson-Steiner è stata raccomandata come la tecnica d'elezione per un'accurata valutazione prognostica dell'HCC (7, 8).

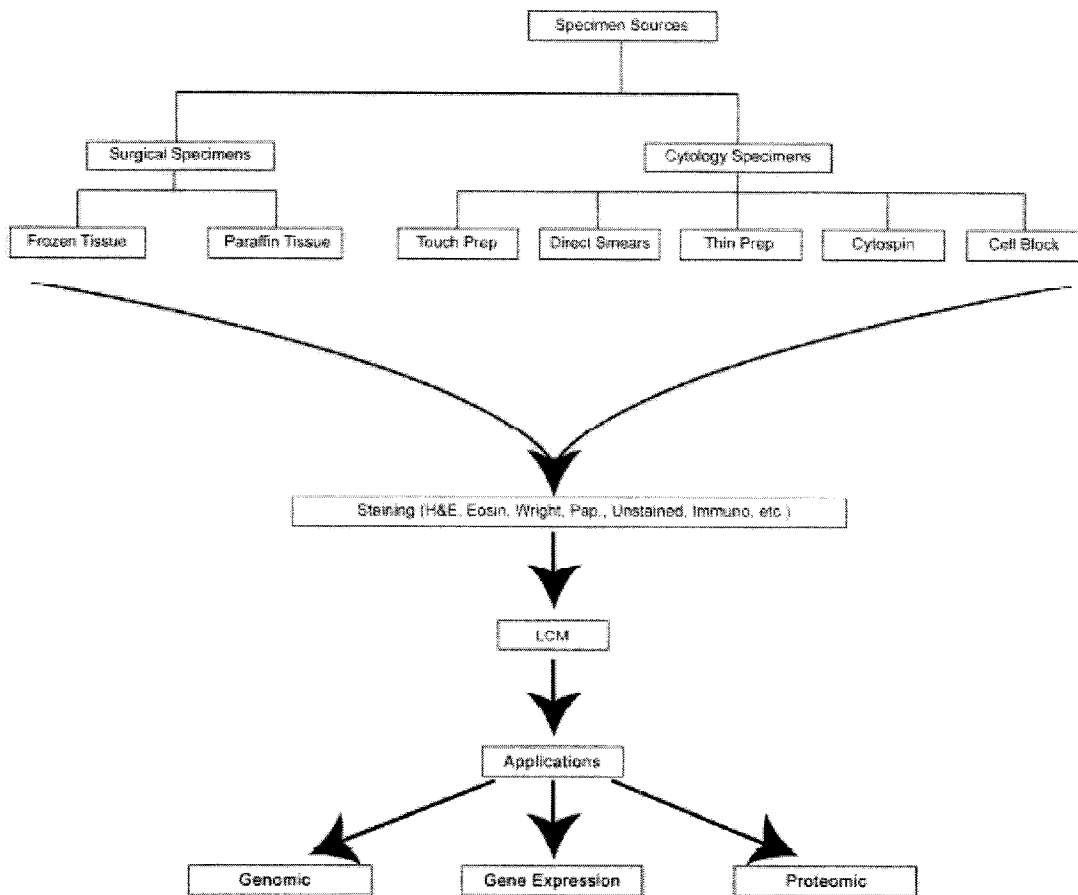


**Fig. 1. Classificazione istopatologica dell' HCC su biopsie tissutali. A) HCC ben differenziato; B) HCC moderatamente differenziato; C) HCC poco differenziato. Da Kulesza et al, 2004.**

### **Scopi e fasi del progetto**

La composizione cellulare di molte biopsie di HCC precoci è eterogenea e comprende tipi cellulari che, in base a parametri morfologici e di differenziamento, possono essere definiti sia normali che precancerosi o cancerosi. Utilizzando opportune tecniche di analisi, questa eterogeneità morfologica offre la possibilità di identificare marcatori molecolari capaci di identificare i primi passi del processo di cancerogenesi, che è noto essere costituito da una serie di eventi successivi (multistep).

A questo proposito, le tecniche della Laser Microdissection (LM) e della Laser Capture Microdissection (LCM) focalizzano oggi notevole interesse, perché consentono di sezionare e raccogliere separatamente i distinti tipi cellulari presenti in una sezione bioptica nel corso del normale esame microscopico, mantenendone l'integrità e consentendone la successiva analisi molecolare con le più sofisticate e sensibili tecniche di Genomica e Trascrittomica (9). Tali tecniche permettono di ottenere un quadro chiaro dell'espressione genica di ogni specifico tipo cellulare, evitando che l'eterogeneità tissutale e la contaminazione del tessuto infiammatorio circostante possano impedire il rilevamento delle sensibili alterazioni di espressione genica che potrebbero essere utilizzate come marcatori precoci del processo di trasformazione.



**Fig. 2. La Tecnica della Laser Capture Microdissection (LCM): Schema esplicativo della procedura e delle possibili applicazioni**

In aggiunta, le analisi vengono effettuate su cellule inserite nel loro contesto nativo, partendo da sezioni di biopsie sia non fissate (semplicemente congelate a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), che incluse in paraffina. Le cellule sezionate, che in base al loro grado di differenziamento possono essere classificate come normali, precancerose o cancerose, vengono utilizzate separatamente per l'estrazione di DNA o RNA (vedi Figura 2).

L'applicazione della Laser Microdissection rappresenta quindi il più sensibile e selettivo approccio per l'identificazione di marcatori molecolari (proteine, RNA, polimorfismi del DNA) capaci di tipizzare le cellule in stato di trasformazione precoce. Mentre sui campioni di DNA è possibile determinare l'insorgere di mutazioni e/o riarrangiamenti cromosomici, su quelli di RNA è possibile valutare anche sensibili variazioni dei livelli di espressione genica, utili sia come marcatori molecolari precoci che per identificare le cellule tumorali più aggressive, oggi comunemente indicate come "cancer stem cells" e ritenute rappresentare il target d'elezione su cui indirizzare i trattamenti terapeutici (10,11).

L'espressione del gene *DKC1*, della telomerasi, degli oncogeni *myc* e *p53*, del pathway *wnt/catenina* e di un sottoinsieme di microRNA sono stati identificati dal nostro gruppo come bersagli preferenziali per la tipizzazione sia dei campioni tumorali *in toto* che delle cellule sezionate mediante Laser Microdissection da campioni di HCC.

L'elevata espressione del gene *DKC1* e della telomerasi è già stata dal nostro e da altri gruppi di ricerca associata alla progressione di diversi tipi di tumori (12,13,14) e viene attualmente considerato come un indicatore estremamente sensibile e potenzialmente utile per la diagnosi precoce. Mutazioni da perdita di funzione del gene *DKC1* provocano anche la discheratosi congenita X-linked (X-DC), una patologia ereditaria caratterizzata da insufficienza dei tessuti proliferanti (midollo osseo, mucose e cute), invecchiamento precoce ed aumentata suscettibilità alle

neoplasie, un dato che supporta il suo possibile ruolo nello sviluppo e nella progressione tumorale. La proteina codificata dal gene *DKC1*, denominata discherina, stabilizza infatti il complesso attivo della telomerasi mediante il legame ad hTERC, la componente ad RNA della telomerasi stessa.

Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che diversi trascritti alternativi derivano dal gene *DKC1*; l'espressione relativa dei vari trascritti nei vari stadi di differenziamento potrebbe essere molto importante per la comprensione delle cause molecolari che provocano l'insorgenza dell' HCC e ne dirigono l'avanzamento (15). Il nostro gruppo ha inoltre acquisito esperienza nell' uso della Laser microdissection accoppiata alla tipizzazione molecolare del trascrittoma che caratterizza specifici tipi cellulari durante lo sviluppo (16). Mediante una sistematica serie di esperimenti di Real Time RT-PCR determineremo quindi l'espressione dei trascritti varianti nei diversi tipi cellulari e verrà controllata la possibilità che la loro espressione possa essere regolata dall'oncogene *c-myc*, noto essere coinvolto nella genesi di in un'ampia serie di tumori umani.

L'importanza dell'analisi della regolazione dell'espressione del gene *DKC1* nello sviluppo dell'HCC e delle infezioni da HCV risiede inoltre nell'effetto, ancora non completamente compreso, del livello di pseudouridilazione dell'RNA ribosomiale e la capacità dei ribosomi di tradurre gli mRNA a partire dalle IRES (Internal Ribosome Entry Site) (17), un meccanismo che spesso sottende alla traduzione di proteine coinvolte nei fenomeni di proliferazione e/o apoptosi cellulari. Poiché è stato dimostrato che anche l'espressione del genoma a RNA dell'HCV è dipendente dalle sequenze IRES (18,19,20), l'espressione del gene *DKC1* potrebbe rivelarsi di primaria importanza per comprendere le basi molecolari dei fenomeni di cronicizzazione dell'infezione e di una sua eventuale trasformazione verso la neoplasia maligna.

Infine, per una più completa tipizzazione dei campioni verranno effettuate analisi mutazionali dei geni b-raf, c-Raf, p14, p16, p21 ed Erb4 sulle biopsie da epatocarcinoma

Lo svolgimento del progetto e la valutazione dei risultati ottenuti si avvarranno di collaborazioni scientifiche nazionali ed internazionali, già in atto con il Dr. Lorenzo Montanaro, Professore di Patologia Sperimentale, Università di Bologna, ed il Prof. P J Mason, Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA.

### **Risultati attesi ed indicatori di valutazione del progetto:**

--Identificazione di marcatori molecolari utili per la classificazione dei vari tipi di epatocarcinoma e la loro stadiazione

-- Definizione di parametri di riferimento per la tipizzazione dell' epatocarcinoma, utili per una corretta valutazione della prognosi ed l' applicazione di una terapia mirata .

--Ottimizzazione del trattamento e dell' out come terapeutico mediante follow-up

--Comunicazione dei risultati ottenuti a Congressi scientifici internazionali e loro pubblicazione su riviste scientifiche internazionali di prestigio

### **BIBLIOGRAFIA**

1) Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. (1993) Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. Int J Cancer 54:594-606

- 2) Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. (1999) Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83:18–29
- 3) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55(2):74-108.
- 4) Belli G, Fantini C, D'Agostino A, Cioffi L, Langella S, Russolillo N, Belli A. (2007). Laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with histologically proven cirrhosis: short- and middle-term results. *Surg Endosc.* Nov;21(11):2004-11.
- 5) Belli G, Limongelli P, Fantini C, D'Agostino A, Cioffi L, Belli A, Russo G. (2009) Laparoscopic and open treatment of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Br J Surg.* Sep;96(9):1041-8.
- 6) Edmondson HA, Steiner PE. (1954) Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 7:462–503
- 7) Kulesza P, Torbenson M, Sheth S, Erozan YS, Ali SZ. (2004) Cytopathologic Grading of Hepatocellular Carcinoma on Fine-Needle Aspiration. *Cancer Cytopathology*, 102: 247-252
- 8) Li Zhou, Jing-An Rui Da-Xiong Ye Shao-Bin Wang Shu-Guang Chen Qiang Qu. (2008) Edmondson-Steiner Grading Increases the Predictive Efficiency of TNM Staging for Long-term Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma After Curative Resection. *World J Surg* 32:1748–1756
- 9) Domazet B, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, Cheng L. (2008) Laser capture microdissection in the genomic and proteomic era: targeting the genetic basis of cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 15;1(6):475-88.
- 10) Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA. (2009) Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *MAbs.* 1(1):12-25.
- 11) Nie D. (2010) Cancer stem cell and niche. *Front Biosci (Schol Ed)* 1;2:184-93.
- 12) Turano M, Angrisani A, De Rosa M, Izzo P, Furia M. (2008) Real-time PCR quantification of human *DKC1* expression in colorectal cancer. *Acta Oncol.* 40(1):25-30.
- 13) Saleh S, Lam AK, Ho YH. (2008) Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in colorectal cancer. *Pathology* 40(1):25-30.
- 14) Sieron P, Hader C, Hatina J, Engers R, Wlazlinski A, Müller M, Schulz WA. (2009) *DKC1* overexpression associated with prostate cancer progression. *Br J Cancer.* 101(8):1410-6.
- 15) Angrisani, A, Turano M, Paparo L, Furia, M. The repertoire of alternative transcripts derived from the human *DKC1* gene. In preparation.
- 16) Vicidomini, R, Tortoriello, G, Furia, M, Polese, G. Laser microdissection applied to gene expression profiling of subset of cells from the *Drosophila* wing disc. *Journal of Visualized Experiments*, in press

- 17) Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D. (2006) Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science*. 12;312(5775):902-6.
- 18) Lytle JR, Wu L, Robertson HD. (2002) Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *RNA* 8: 1045–1055.
- 19) Gallego J, Varani G. (2002) The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. *Biochem Soc Trans* 30: 140–145.
- 20) Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A. (2001) The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 7: 661–670.

## **CONTRIBUTO TRIENNALE RICHIESTO PER LO SVOLGIMENTO DEL PROGETTO DI RICERCA**

### **Voci di Spesa:**

#### **a) Spese generali a sostegno della ricerca (10%)**

€18.000,00 per anno; **Totale 54.000,00**

**b) Spese per acquisto di attrezzature** (*sostituzione di apparecchiature frequentemente usate per le più comuni manipolazioni sperimentali, quali generatori per elettroforesi, piccole taniche di elettroforesi, agitatori e centrifughe, microscopi ed accessori per analisi di microscopia, taniche per la crioconservazione di campioni biologici, computer, etc*), *software per l'analisi e l'acquisizione di immagini al microscopio, costo di pubblicazioni (destinato al pagamento dei carichi di pagina e per la pubblicazione di foto a colori su riviste di rilevanza internazionale).*

€ 25.000,00 per anno **Totale 75.000,00**

**c) Spese per materiali per l'esecuzione della ricerca, missioni e partecipazioni a Congressi, per servizi a sostegno della ricerca** *Saranno destinate all'acquisto di materiale di consumo, a missioni per lo svolgimento di collaborazioni ed alla presentazione dei risultati a Congressi scientifici. Nell'ambito delle spese di consumo, è previsto l'acquisto di reagenti chimici, enzimi di modificazione e di restrizione per le comuni manipolazioni degli acidi nucleici, kit per analisi molecolari, acquisto di oligonucleotidi sintetici e di nucleotidi marcati radioattivamente per la preparazione di sonde o l'analisi di sequenze nucleotidiche, l'acquisto di anticorpi commerciali, di vetreria e tubi monouso, etc. Nell'ambito delle spese per i servizi della ricerca sono previste spese per sequenziamento, analisi a microscopio confocale, analisi di microarray, etc.*

€ 72.000,00 per anno; **Totale 216.000,00**

**d) Spese per personale:** *spese destinate al pagamento (cocopro; borse di studio) di tecnici/laureati con compiti di raccolta, crioconservazione, preparazione dei campioni di HCC e svolgimento delle successive analisi biomolecolari, nonché della raccolta ed analisi di dati.*

€ 65.000,00 per anno; **Totale 195.000,00**

**Totale a) b) c) d): € 540.000,00**