

**Allegato A: Progetto per un assegno di ricerca dal titolo: “Valutazione di strategie terapeutiche combinate basate sui microRNA in modelli animali di epatocarcinoma” – Tutor: Dr.ssa Francesca Fornari. L’attività prevista per l’assegno di ricerca rientra nell’ambito del progetto AIRC IG 2020 (ID 25187) dal titolo: “IDENTIFICATION OF CIRCULATING BIOMARKERS FOR PATIENT ALLOCATION TO THE BEST TREATMENT IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA”, Responsabile scientifico Dr.ssa Francesca Fornari.**

L’epatocarcinoma (HCC) rappresenta il principale tumore primario del fegato e la seconda causa di mortalità per tumore nel mondo. L’HCC insorge nel 90% dei casi su fegato cirrotico ed i principali fattori di rischio sono le infezioni causate dai virus dell’epatite B e C (HBV e HCV), l’abuso di alcool e la sindrome metabolica, quest’ultima sta diventando una delle cause principali di progressione della patologia epatica nei paesi occidentali in associazione all’epidemia di obesità. L’elevata mortalità di questo tumore è associata a diversi fattori tra cui: una diagnosi spesso tardiva, la presenza di recidiva epatica nel 70% dei casi sottoposti a chirurgia e la mancanza di biomarcatori circolanti in grado di stratificare i pazienti verso la migliore strategia terapeutica e di predire precocemente la risposta al trattamento.

Le opzioni terapeutiche disponibili per i pazienti con epatocarcinoma dipendono dallo stadio in cui viene diagnosticato il tumore. Ad uno stadio precoce, le possibili opzioni terapeutiche comprendono la resezione chirurgica, il trapianto di fegato e l’ablazione percutanea. Il gold standard per l’HCC in stadio intermedio è rappresentato dalla chemioembolizzazione transarteriosa (TACE), mentre ad uno stadio avanzato sono disponibili diverse terapie sistemiche.

In particolare, l’avvento dell’immunoterapia in ambito oncologico ha rivoluzionato la gestione dei pazienti con HCC in fase avanzata diventando la strategia terapeutica di elezione per questo tipo di pazienti. Nonostante, l’enorme beneficio per un sottogruppo di pazienti che rispondono all’immunoterapia vi sono alcuni pazienti che non sono eleggibili per i trattamenti con inibitori dei checkpoint immunitari o che sviluppano resistenza in corso di trattamento. Per questi pazienti, i farmaci a bersaglio molecolare (TKI) sorafenib e lenvatinib rappresentano l’opzione terapeutica di prima o seconda linea. Tuttavia, una percentuale elevata di pazienti sviluppa resistenza in corso di terapia. Nonostante i numerosi sforzi della comunità scientifica, non sono stati individuati ad oggi biomarcatori in grado di predire la risposta al sorafenib o di stratificare i pazienti verso la migliore strategia terapeutica, rappresentando un forte deterrente allo sviluppo di un approccio terapeutico personalizzato.

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA endogeni responsabili della regolazione di numerose funzioni fisiopatologiche. Il coinvolgimento di miRNA HCC-specifici nella progressione tumorale e nella resistenza farmacologica è stato ampiamente dimostrato. La caratterizzazione dei meccanismi molecolari sottostanti il fenomeno di farmaco-resistenza è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento combinato dell’HCC. L’efficacia e la non tossicità di trattamenti sistemici a base di molecole miRNA mimetiche o antagoniste è comprovata da numerosi studi in vivo e da un trial clinico in pazienti con infezione da HCV. Nonostante la terminazione precoce del primo trial clinico con molecole microRNA-mimetiche in ambito oncologico a causa di effetti collaterali gravi, numerosi sono i trial clinici in corso e gli studi su modelli animali per identificare nuove e più efficaci strategie di delivery. A questo proposito, il fegato rappresenta un organo ideale per la ‘terapia genica’.

La disregolazione del microbiota intestinale (disbiosi) è stata osservata in pazienti con epatocarcinoma ed è stato dimostrato che ceppi probiotici sono in grado di migliorare la risposta ai trattamenti farmacologici come ad esempio l’immunoterapia, fornendo la base per lo sviluppo di strategie terapeutiche combinate basate sull’arricchimento di specifici ceppi probiotici o l’utilizzo dei loro metaboliti (post-biotici).

Gli obiettivi di questo progetto riguardano la valutazione di strategie terapeutiche combinate basate su oligonucleotidi microRNA mimetici o antagonisti in modelli preclinici di epatocarcinoma. In particolare, verrà impiegato un modello di xenograft su topo per caratterizzare il coinvolgimento di microRNA HCC-specifici

nella risposta al trattamento con TKI. Inoltre, verrà impiegato un modello di HCC su ratto per la valutazione di terapie combinate con TKI e oligonucleotidi che mimano o silenziano microRNA HCC-specifici o con specifici ceppi probiotici che risultano sottorappresentati in corso di trattamento.

#### **Piano Formativo:**

Il piano di attività prevede che il titolare dell'assegno di ricerca si occupi dell'attività sperimentale per la valutazione dell'effetto di microRNA HCC-specifici nella resistenza a trattamenti con TKI in un modello di xenotrapianto su topo e dell'efficacia antitumorale di strategie terapeutiche combinate (microRNA mimetici, antagonisti o ceppi probiotici) in un modello di epatocarcinogenesi chimicamente indotta su ratto. Inoltre, verranno caratterizzati i meccanismi molecolari microRNA-mediati sottostanti il fenomeno di farmaco resistenza nei due modelli animali. In particolare, il progetto prevede:

- Creazione di un modello di xenotrapianto tramite inoculo sottocutaneo di cloni cellulari contenenti microRNA HCC-specifici in topi immunocompromessi ai fini della valutazione del coinvolgimento dei microRNA nella risposta al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare quali il lenvatinib.

- Induzione di tumorigenesi epatica in un modello di ratto in seguito a trattamento con l'agente epatotossico dietilnitrosamina. La tumorigenesi verrà monitorata ecograficamente e, alla comparsa dei noduli di HCC, gli animali verranno randomizzati e trattati con il solo farmaco TKI o con una combinazione di lenvatinib e oligonucleotidi (miRNA mimics e antagomiR) per 21 giorni. L'endpoint primario è la valutazione dell'efficacia antitumorale del trattamento combinato rispetto al trattamento singolo. Al termine del trattamento, gli animali verranno sacrificati per la raccolta dei campioni biologici (tessuto epatico tumorale e non tumorale e sieri). Verranno eseguite analisi di biologia molecolare per valutare le vie molecolari coinvolte nella risposta ai trattamenti. Seguirà ulteriore caratterizzazione dei meccanismi molecolari identificati in modelli di colture cellulari 2D e 3D in vitro.

- Valutazione del trattamento combinato di lenvatinib e di una formulazione probiotica nel modello animale di ratto sopra descritto nei confronti del trattamento con solo lenvatinib. L'endpoint primario è la valutazione dell'efficacia antitumorale del trattamento combinato rispetto al trattamento singolo. I campioni fecali verranno raccolti prima, durante e dopo il trattamento. Al termine del trattamento, gli animali verranno sacrificati per la raccolta di ulteriori campioni biologici (tessuto epatico tumorale e non tumorale, campioni fecali e siero). Verranno eseguite analisi di biologia molecolare e di biochimica per valutare le vie molecolari coinvolte nella risposta ai trattamenti e di RNA-sequencing per la valutazione della composizione del microbioma intestinale. Seguirà l'approfondimento dei meccanismi molecolari identificati in modelli in vitro.

- Su entrambi i modelli animali verranno eseguite analisi di biologia molecolare e istologia (Real Time PCR, western blot, immunoistochimica) per caratterizzare i meccanismi molecolari coinvolti nella risposta ai trattamenti combinati

L'attività, della durata di 12 mesi, si svolgerà in un ambiente di ricerca multidisciplinare e condiviso rappresentato dal Centro di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA), Università di Bologna, Policlinico di Sant'Orsola, Bologna.

Un risultato formativo atteso per la persona che verrà reclutata sarà l'organizzazione del lavoro in un ambiente di laboratorio condiviso e l'ottimizzazione della programmazione del piano sperimentale in funzione degli obiettivi e delle scadenze del progetto stesso. Inoltre, ci si aspetta un'ulteriore maturazione dell'assegnista nella supervisione delle attività di laureandi, nella stesura di report delle attività sperimentali e nella scrittura di articoli scientifici e abstract per la partecipazione a congressi.