*Modulo richiesta borsa*

|  |  |
| --- | --- |
| **TUTOR** | **Prof. Claudio Stefanelli** |

|  |  |
| --- | --- |
| **TITOLO DEL PROGETTO** | |
| **Studio dei meccanismi molecolari di microRNA HCC-specifici nella risposta all’ipossia e a trattamenti farmacologici nell’epatocarcinoma umano** | |
| **DESCRIZIONE DEL PROGETTO** |  |
| **Stato dell’Arte e Razionale**  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. 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.  Il tipo di opzione terapeutica per pazienti con HCC dipende dallo stadio in cui viene diagnosticato il tumore. In caso di diagnosi ad uno stadio precoce, le possibili opzioni terapeutiche comprendono la resezione chirurgica, il trapianto di fegato e l’ablazione percutanea. In caso di diagnosi ad uno stadio intermedio, la terapia di elezione per l’HCC è rappresentata dalla chemioembolizzazione transarteriosa (TACE). La durata dell’efficacia di questo trattamento è variabile e spesso sono necessari cicli ripetuti di TACE. Non esistono ad oggi biomarcatori circolanti in grado di predire la risposta antitumorale in seguito a questo trattamento.  I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA endogeni responsabili della regolazione di numerose funzioni fisio-patologiche. 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 resistenza ad uno specifico trattamento terapeutico è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento 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.  L’elevata eterogeneità dell’HCC rappresenta un ostacolo per lo sviluppo di modelli preclinici rappresentativi della patologia. Le linee cellulari hanno permesso un notevole progresso nella conoscenza della biologia del cancro tuttavia non sono rappresentative della crescita in vivo del tumore e non tengono in considerazione l’elevata eterogeneità del tumore rappresentando un forte limite nello stabilire l’efficacia di nuovi farmaci per il trattamento dell’HCC. In questo contesto colture primarie (modelli 2D) e organoidi (modelli 3D) derivanti da tessuto di HCC di pazienti sottoposti a resezione epatica rappresentano una valida alternativa all’utilizzo di linee cellulari in quanto sono in grado di riprodurre l’architettura e le caratteristiche genetiche del tumore d’origine. Lo sviluppo di organoidi da tumori primari consente di preservare le caratteristiche peculiari di ogni HCC permettendo di testare trattamenti e loro associazioni in diversi contesti molecolari derivati dalle neoplasie primarie stesse.  **Obiettivi**  Questo studio si pone l’obiettivo di verificare *in vitro* ed *ex vivo* l’eventuale contributo di microRNA TACE-specifici in linee cellulari di HCC ed in colture primarie 2D e 3D sottoposte a trattamento con doxorubicina e coltivate in condizioni di ipossia e in tessuti tumorali derivati da pazienti con HCC. Il microRNA TACE-specifico che avrà maggiori effetti *in vitro* verrà selezionato per la creazione di cloni cellulari stabili che overesprimono o sono silenziati per tale microRNA.  **Risultati attesi**  Questo lavoro consentirà di identificare nuovi biomarcatori e bersagli terapeutici per pazienti con HCC in stadio intermedio sottoposti a TACE. Permetterà inoltre di identificare i meccanismi molecolari sottostanti la regolazione di microRNA TACE-associati e di valutare l’efficacia dell’utilizzo contemporaneo di molecole microRNA-mediate in presenza di doxorubicina e in condizioni di ipossia in modelli *in vitro*. | |
| **DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DEL BORSISTA** |  |
| Il borsista valuterà mediante Real Time PCR i livelli di espressione di microRNA TACE-associati, derivanti da dati preliminari del gruppo di ricerca, nel tessuto tumorale e nel circostante fegato non neoplastico derivante da pazienti sottoposti a resezione chirurgica per HCC. Gli stessi microRNA TACE-associati verranno analizzati in linee cellulari di HCC sottoposte a trattamento con doxorubicina e a condizioni di ipossia. Tramite analisi bioinformatica verranno identificati i principali bersagli molecolari di microRNA TACE-specifici, la cui regolazione verrà valutata *in vitro* mediante saggi funzionali (analisi di Real Time PCR, Western blot, saggi di proliferazione, vitalità e apoptosi) e saggi con vettori reporter.  Il borsista dovrà inoltre allestire colture primarie (2D e 3D) a partire da tessuto tumorale di pazienti con HCC di natura non virale e valutare la resistenza delle stesse in seguito a trattamento con doxorubicina e ipossia.  Infine, il borsista dovrà ottenere dei cloni cellulari stabili che overesprimono o sono silenziati per l’espressione di un microRNA TACE-specifico che sarà selezionato sulla base degli esperimenti precedenti. Tali cloni cloni verranno caratterizzati in vitro per l’espressione del microRNA in esame e dei suoi bersagli molecolari e per le sue caratteristiche fenotipiche e di crescita.  Questo studio consentirà di porre le basi per lo sviluppo pre-clinico di una terapia combinata che prevede l’utilizzo di molecole microRNA-mediate e trattamento locoregionale con TACE in pazienti con HCC. | |