

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

**DOTTORATO DI RICERCA IN VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIE
MICROBICHE**

CICLO: XXII

TITOLO TESI

**FATTORI GENETICI DELL'OSPITE E PROGRESSIONE DI
FIBROSI NEL FEGATO DI PAZIENTI CON EPATITE CRONICA
C (CHC)**

Coordinatore : Ch. mo Prof. Giorgio Palù)

Supervisore : Ch. mo Prof. Alfredo Alberti)

DOTTORANDA: Moira Marcolongo

SUMMARY	pag. 1
RIASSUNTO	pag. 3
INTRODUZIONE	pag. 5
Il virus dell'epatite C	pag. 5
Fibrosi epatica	pag. 7
Fibrogenesi epatica associata ad HCV	pag. 12
Progressione della fibrosi nell'epatite cronica da HCV	pag. 13
Cirrhosis Risk Score (CRS)	pag. 15
SCOPO DELLO STUDIO	pag. 19
MATERIALI E METODI	pag. 21
Pazienti	pag. 21
Valutazione biopsie epatiche	pag. 22
Estrazione DNA da sangue intero	pag. 23
Genotipizzazione dei 7 SNPs CRS mediante Tecnologia Luminex	pag. 23
CRS	pag. 26
Genotipizzazione dei 7 SNPs non CRS mediante Real Time PCR	pag. 27
Statistica	pag. 27
RISULTATI	pag. 28
Biopsie epatiche e progressione di fibrosi	pag. 29
Distribuzione del CRS secondo la progressione di fibrosi	pag. 31
Tasso di progressione secondo i gruppi di rischio del CRS	pag. 31
Analisi multivariate della progressione in funzione del CRS	pag. 32
CRS e consumo significativo di alcol	pag. 34
Analisi degli aplotipi di TLR4 e STXBP5L	pag. 34
DISCUSSIONE	pag. 37
BIBLIOGRAFIA	pag. 41

SUMMARY

Chronic infection with hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma worldwide and is the most common reason for liver transplantation in many western countries¹.

Natural history studies indicate that only a subgroup of patients chronically infected with HCV eventually progress to cirrhosis and to end-stage liver disease and that rates and speed of progression are extremely variable in individual cases. Patients infected with chronic hepatitis C may indeed behave as rapid, intermediate, or slow/no progressors, with time to development of cirrhosis ranging from a few years to several decades².

Univariate and multivariate analysis applied to cross-sectional and longitudinal studies have identified several variables that significantly influence the rate of disease progression in chronic HCV infection. Viral parameters, i.e. the HCV genotype and serum levels, have a minor impact on the clinical phenotype in untreated patients while environmental and host factors play a more relevant role³⁻⁴. Alcohol intake and coinfection with hepatitis B virus (HBV) or immunodeficiency virus (HIV) have been clearly proven to accelerate fibrosis progression and development of end-stage liver disease in HCV patients⁵⁻⁶. As far as host factors are concerned, age at infection⁷, male sex⁸, immunosuppression, and presence of metabolic syndrome and/or of type II diabetes have all been associated with more severe and progressive liver disease⁹⁻¹⁰.

Increasing evidence indicates that genetic factors may have a major influence on the natural history of chronic liver disease of different etiologies, including hepatitis C. Special interest has been focused on the identification of candidate genes involved in hepatic fibrogenesis, considering that liver fibrosis, the hallmark of liver disease progression to cirrhosis, is a dynamic process in which multiple genes are likely to interact with environmental factors. Most of these findings were from studies conducted in rather small cohorts of patients and have not been confirmed in independent series. Conflicting results have been obtained in other studies that have assessed variations in genes that might be involved in the regulation of the immune response to HCV. Using a hypothesis-driven, functional genome scan approach,

Huang et al.¹³ identified a seven gene variant signature, termed the Cirrhosis Risk Score (CRS) that is associated with development of cirrhosis in patient chronically infected with HCV. In this study, high CRS scores, derived from an algorithm based on a constellation of seven SNPs, is associated with presence of cirrhosis in HCV patients. However no longitudinal studies have been conducted to assess the prognostic value of the CRS seven-gene signature in fibrosis progression in HCV patients. To assess the role of CRS in predicting fibrosis, we investigated 271 untreated patients with chronic hepatitis C having initial liver biopsy showing METAVIR stage F0 (n=104), F1 (n=101), or F2(n=59) who had been followed up without antiviral therapies for at least 60 months (mean 108.5 ± 71.5 months) and had a liver biopsy at the end of this observation period. For each patient, genomic DNA was isolated from whole blood and the genotypes for the seven SNPs in the CRS signature plus a gender marker were simultaneously determined using a multiplex PCR and oligonucleotide ligation research assay using Luminex™ system technology. In the present study, the value of CRS was calculated for each patient using the original Naïve Bayes Formula.

Of these, 24.4% showed no histologic progression, 75.6% progressed by at least one stage, 45.0% progressed by at least two stages and 10.3% progressed by more than two stages. The mean CRS was significantly higher ($P=0.005$) in patients with fibrosis progression compared with those without progression, and this difference was particularly evident ($P=0.0002$) with F0 on initial biopsy. Mean CRS scores were not associated with degree of fibrosis progression. In the relative risk of fibrosis progression increased with increasing CRS value. This association was significant in males but not in females and was most evident in males with F0 at initial biopsy (odds ratio 16.5, 95% confidence interval 1.6-166; $P=0.02$) in the presence of high CRS. Multivariate analysis confirmed the significant association of CRS score with fibrosis progression. The predictive value of CRS was confirmed in hepatitis C virus patients admitting significant alcohol intake. In conclusion we have shown here that host genetics defined by CRS predict fibrosis progression in male with initially mild chronic hepatitis C and may become a useful parameter for prognostic evaluation and treatment decision.

RIASSUNTO

L'infezione cronica da virus dell'epatite C (HCV) rappresenta una delle principali cause di malattia cronica del fegato, cirrosi ed epatocarcinoma nei paesi occidentali¹. La malattia del fegato presente nei portatori cronici HCV comprende diversi gradi d'infiammazione e di progressione della fibrosi che, in circa il 30% dei casi è in grado di evolvere verso le forme avanzate .

È noto che la velocità e il tasso di progressione della malattia epatica sono estremamente variabili e in base a questi parametri sono stati definiti diversi pattern di progressione: rapida, intermedia, lenta e non progressione con sviluppo di cirrosi che va da pochi anni a molti decenni².

Tuttavia, i meccanismi patogenetici alla base del danno epatico causato da HCV non sono ancora del tutto stati chiariti. Diversi studi, longitudinali e trasversali hanno evidenziato che nell'infezione cronica da HCV (CHC), i meccanismi alla base della patogenesi e del tasso di progressione della malattia epatica sono influenzati sia da fattori genetici che epigenetici. È emerso infatti che il fenotipo clinico di pazienti HCV non trattati è influenzato principalmente da parametri ambientali e dell'ospite mentre i fattori virali, quali genotipo e livelli di viremia, sembrano avere un ruolo marginale³⁻⁴. In particolare è stato dimostrato che l'alcol e le coinfezioni virali con i virus dell'epatite B (HBV) e dell'immunodeficienza umana (HIV-1) sono associate ad un' aumento della progressione di fibrosi e ad un maggiore sviluppo di complicanze dello stadio finale della malattia⁵⁻⁶.

Fino a pochi anni fa, i parametri clinici e metabolici considerati maggiormente associati ad una rapida progressione della malattia del fegato erano l'età al tempo dell'infezione⁷, il sesso maschile⁸, l'immunosoppressione, e la presenza di sindromi metaboliche e/o diabete di tipo II⁹⁻¹⁰. Tuttavia, tale approccio è da considerarsi limitativo in quanto la fibrosi epatica sembra essere il risultato di un processo dinamico nel quale diversi fattori genetici interagiscono con fattori ambientali. Per questo motivo, negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata sullo studio di fattori genetici dell'ospite che sembrano avere un impatto notevole nella storia naturale delle malattie epatiche tra cui anche la CHC. In particolare è sorto uno speciale interesse

per l'identificazione di geni dell'ospite coinvolti nel meccanismo della fibrogenesi. Sono stati pubblicati numerosi studi nei quali è evidenziata un'associazione di alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) con la progressione della fibrosi in pazienti con CHC. Tuttavia, i risultati ottenuti da questi studi sono risultati spesso contraddittori in quanto derivati da un ridotto numero di pazienti o non sono stati confermati in serie indipendenti.

In uno studio di scansione genomica condotto da Huang et al.¹³, gli autori hanno identificato una “signature” di sette polimorfismi, definita “cirrhosis risk score” (CRS), la quale è associata allo sviluppo di cirrosi in pazienti con CHC. Lo studio di Huang et al. indica che un alto CRS è associato alla presenza di cirrosi nei pazienti con CHC, tuttavia fin’ora non è stato condotto nessuno studio longitudinale per testare il valore prognostico del CRS nella progressione della fibrosi nel tempo. Scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di valutare longitudinalmente i polimorfismi del CRS e altri ad essi correlati nella progressione della fibrosi epatica in pazienti con epatite cronica da HCV con fibrosi epatica lieve o minima alla prima biopsia. A tal scopo sono stati arruolati 271 pazienti che alla biopsia iniziale presentavano stadi di fibrosi F0 (n=104), F1 (n=101), o F2(n=59) e che, per tutto il periodo intercorso tra le due biopsie di almeno 60 mesi (media 108.5±), non erano stati trattati. Il DNA genomico di ogni paziente è stato isolato da sangue intero e sono stati simultaneamente amplificati, mediante PCR multipla i sette polimorfismi del CRS più un marcatore per il sesso. Il genotipo di ogni paziente è stato individuato mediante una saggio di ligazione oligonucleotidica utilizzando la tecnologia Luminex® TM system. Ogni profilo genetico emerso dall’analisi è stato inserito in un software chiamato “Risk Calculator” il quale ha fornito per ogni paziente un indice di rischio per la cirrosi calcolato usando l’algoritmo originale elaborato da Celera (Huang et al). Durante il periodo di osservazione il 24.4% dei nostri pazienti non ha mostrato progressione istologica mentre il 75.6% è progredito di almeno uno stadio METAVIR. Di questi il 45% presenta una progressione di almeno due stadi METAVIR e il 10.3% una progressione maggiore di due stadi. Sono poi state confrontate le medie del CRS di pazienti progressori con quelle di pazienti non progressori evidenziando una differenza statisticamente significativa tra le due categorie (P=0.005). Questa differenza diventa maggiormente significativa paragonando pazienti progressori e non

progressori aventi stadio F0 alla prima biopsia (P=0.002). Ciò nonostante la media del CRS non è associata con il grado di progressione della fibrosi. Dai nostri dati è emerso che il rischio relativo di sviluppare fibrosi cresce con l'aumentare del valore del CRS. Tuttavia questa associazione è significativa nei maschi ma non nelle femmine e diventa molto evidente nei pazienti maschi con F0 alla prima biopsia e alto CRS (odds ratio 16.5 intervallo di confidenza al 95% 1.6 – 166; P=0.02). L'analisi multivariata comprendente altri fattori come età al tempo dell'infezione, età alla prima biopsia, sesso, intervallo tra le due biopsie, conferma l'associazione significativa dell'indice CRS con la progressione della fibrosi. Inoltre, il valore predittivo del test è stato valutato e confermato anche in un gruppo di 49 pazienti con assunzione significativa di alcol giornaliera (> 30mg/ die). In conclusione i nostri dati mostrano come i fattori genetici che costituiscono il CRS sembrano poter predire la progressione della fibrosi in maschi con malattia epatica cronica iniziale o minima. Questo test quindi potrebbe essere usato come parametro per una valutazione predittiva della progressione di fibrosi ed essere utile al clinico per decidere il trattamento di un paziente.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite C

Il virus dell'epatite C (HCV) è l'unico membro del genere Hepacivirus appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, che comprende anche il genere *Flavivirus* (es. dengue, febbre gialla) e *Pestivirus* (es. diarrea bovina, colera dei suini). I *Flaviviridae* hanno un virione rotondeggiante di 40-50 nm di diametro formato da un pericapside lipidico al quale sono associate proteine virus-specifiche; il genoma è costituito da una singola catena di RNA a polarità positiva di circa 10 Kb la cui replicazione avviene nel citoplasma e che codifica per proteine strutturali e non strutturali¹⁴.

Il genoma di HCV è costituito da una molecola di RNA (ssRNA) di circa 9600 nucleotidi con regioni 5' e 3' non codificanti e viene tradotto in un'unica proteina precursore di circa 3010 amminoacidi. Tale proteina policistronica è processata post-trascrizionalmente da proteasi sia virali che dell'ospite in dieci prodotti differenti che si distinguono in proteine strutturali (Core, E1, E2) e non strutturali (NS2, NS3, NS4, NS5A e NS5B)¹⁵. (Fig.1)

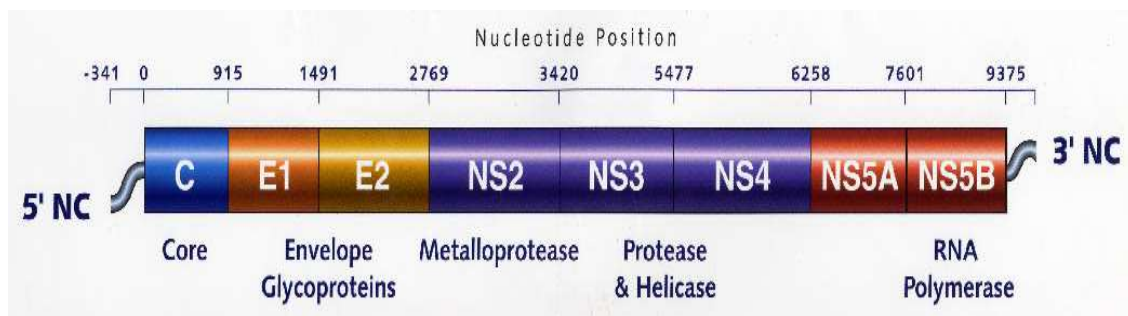


Fig. 1 : Rappresentazione schematica del genoma di HCV

Basandosi sull'eterogeneità della sequenza del genoma, HCV viene classificato in sei genotipi principali (numerati da 1 a 6) a loro volta suddivisi in diversi sottotipi (contraddistinti da lettere *a-e*). genotipi diversi si differenziano l'uno dall'altro per il 31-34% della sequenza nucleotidica, mentre i sottotipi sono contraddistinti da una

soglia del 20-23%. Questa marcata eterogeneità dipende principalmente dalla mancanza di attività di *proof-reading* (5'-3' esonucleasica) della RNA polimerasi, la quale, assieme alla rapidità cinetica di replicazione virale, porta ad un accumulo elevato di mutazioni. Le regioni genomiche più capaci di mutare sono quelle che codificano per le proteine dell'envelope, in particolare il segmento ipervariabile HVR1 della regione E2/NS1, verso cui sono diretti anticorpi dell'ospite che neutralizzano gli epitopi del mantello virale, ma il cui potere neutralizzante è rapidamente vanificato dalla capacità del virus di mutare la struttura antigenica dell'envelope. Tali mutazioni, nel corso dell'infezione, permettono al virus di sfuggire al controllo immunologico. Ciò spiega almeno in parte l'elevato tasso di cronicizzazione dell'infezione, con percentuali che possono sfiorare anche l'80% dei soggetti infettati, nonostante la presenza di elevati titoli di anticorpi che di volta in volta si rinnovano contro i diversi epitopi del virus¹⁶.

Attualmente, secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) HCV infetta circa il 3% della popolazione mondiale (180 milioni d'individui) e si stima provochi più di 280.000 morti l'anno per complicanze allo stadio finale di malattia¹. Le manifestazioni cliniche, associate all'infezione da HCV, costituiscono un quadro eterogeneo che varia da condizioni cliniche del tutto asintomatiche ad epatiti croniche di diversa attività ed evoluzione. Il 15-40% dei soggetti esposti al virus HCV, risolve l'infezione in 6 mesi, mentre i restanti 60-85% dei pazienti, che presentano un HCV RNA ancora rilevabile dopo 6 mesi, sono considerati cronicamente infetti e sviluppano epatite cronica¹⁷.

L'epatite C essendo caratterizzata dall'alto grado di cronicizzazione costituisce, la principale causa di malattia epatica cronica, nonché la più frequente causa di trapianto di fegato in tutto il mondo occidentale¹⁸. La prevalenza dell'infezione cambia nelle diverse aree geografiche:

Stati Uniti	1.8%	
Asia Sud-Orientale	1-10%	
Africa	4-5%	(Egitto>10%)
Europa Occidentale	1%	
Italia	3%	

Bisogna tuttavia sottolineare che tali dati potrebbero rappresentare una sottostima del reale quadro epidemiologico globale dell'epatite C, che decorre spesso in modo asintomatico in quanto chi contrae l'infezione può non manifestare anche per molti anni alcun segno della malattia.

Fibrosi epatica.

Sia per le epatiti virali che per le steatoepatiti non alcoliche (NASH), l'evoluzione della malattia epatica verso gli stadi terminali avviene attraverso un percorso fisiopatologico, che coinvolge diversi tipi cellulari, basato sulla formazione e sull'accumulo di fibrille o tessuto fibroso nel parenchima epatico, che porta ad una progressiva distorsione dell'architettura parenchimale epatica culminante nella cirrosi. La fibrogenesi epatica, è un processo dinamico derivante dall'attivazione cronica dei meccanismi di riparo tissutale, in seguito a un danno che si ripresenta ripetutamente a livello del fegato, influenzato da numerosi fattori che contribuiscono, da un lato alla deposizione di matrice extracellulare (ECM) e dall'altro alla sua degradazione.

Generalmente il processo di riparazione tissutale di un danno acuto, (altrimenti detto *wound healing*) è caratterizzato da una precisa serie di eventi che coinvolgono nella sede del danno diversi tipi cellulari. In primo luogo nella zona di tessuto danneggiata si concentra un importante infiltrato infiammatorio che ha lo scopo fondamentale di bloccare la causa della lesione e di rimuovere le componenti compromesse o necrotiche. Le stesse cellule inoltre, rilasciano fattori di crescita e citochine che fungono da stimolo chemotattico per le cellule mesenchimali residenti nel tessuto. Nella seconda fase del processo cellule come fibroblasti, miofibroblasti e cellule endoteliali raggiungono la sede del danno e si portano ad uno stato attivato: lo stroma intracellulare perduto viene ripristinato con la produzione di nuova matrice extracellulare (ECM), mentre la rete vascolare viene ricostruita con la proliferazione delle cellule endoteliali. In modo singolare, la deposizione di nuova matrice non si rivela un fenomeno statico ma soggetto anzi ad un continuo rimodellamento tradotto in un preciso equilibrio tra fibrogenesi e fibrolisi. La corretta ricostruzione del microambiente originale, sia strutturale che vascolare, è un passo fondamentale per la rigenerazione delle cellule parenchimali. Infine nell'ultima fase, si osservano la

graduale scomparsa dell'infiltrato infiammatorio e la progressiva acquisizione della distribuzione cellulare originale¹⁹.

Nel momento in cui il danno tissutale è persistente, come nel caso dell'infezione cronica da virus C, il processo di riparazione tissutale perde le sue finalità positive e si trasforma nella causa fisiopatologica responsabile della fibrosi (fig. 2). La continua stimolazione del sistema implica la perdita dell'equilibrio che regola il meccanismo fisiologico e porta al prevalere di certi effetti sugli altri. In particolare i processi riparativi più grossolani, quale la deposizione della matrice extracellulare, (ECM) si impongono su quelli più complessi e finalizzati che consistono nella rigenerazione parenchimale e nella corretta angiogenesi: ciò che si osserva è un accumulo incontrollato di ECM fibrillare dovuto al mancato antagonismo dell'azione fibrolitica rimodellante²⁰.

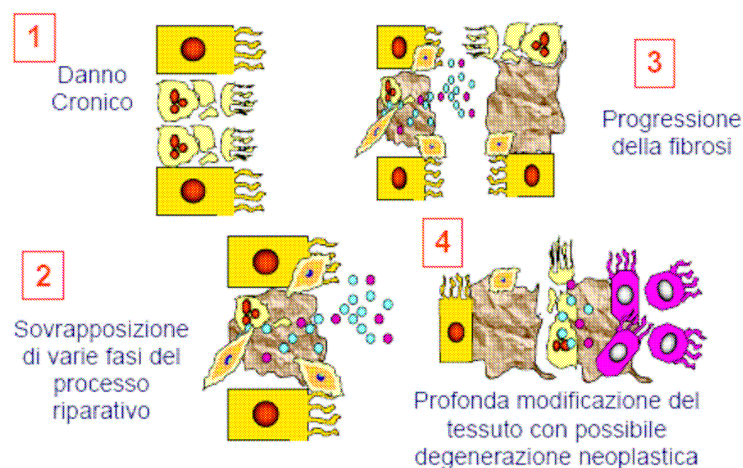


Fig.2. Attivazione cronica del processo di riparazione tissutale.

Nel processo fibrogenetico la matrice cellulare assume un ruolo fondamentale ed è soggetta ad importanti cambiamenti qualitativi e quantitativi. Nel fegato sano, la ECM si localizza nello spazio pericellulare e nello spazio di Disse e costituisce la lamina basale delle cellule epiteliali, endoteliali e mesenchimali. Essa si compone prevalentemente di molecole collageniche di vario tipo e molecole non collageniche che includono glicoproteine (fibronectina, laminina, entactina...) diversi tipi di proteoglicani solfati e acido ialuronico. In un fegato fibrotico, le componenti si

ridistribuiscono in distinte regioni anatomiche e si presentano, oltre che in una maggiore quantità, in un diverso rapporto percentuale con il prevalere di alcune molecole sulle altre²¹. L'alterazione della matrice si riflette in nuove diverse proprietà della stessa: in primo luogo, le cellule epatiche si circondano di un microambiente biochimico e di supporto totalmente diverso da quello della condizione fisiologica. Sono pregiudicate, inoltre, importanti funzioni regolative e di comunicazione cellulare proprie della ECM.

Oltre ai miofibroblasti, anche le cellule stellate epatiche (HSC) assumono un ruolo fondamentale nello sviluppo della fibrosi nel fegato. Le HSC si collocano anch'esse nello spazio di Disse a stretto contatto con gli epatociti e le cellule dell'endotelio sinusoidale. Pur rappresentando soltanto il 5-8% di tutte le cellule epatiche, esse si dispongono regolarmente lungo i sinusoidi mantenendo una distanza internucleare costante assicurando così l'intera copertura dell'albero microvascolare. Nel fegato sano esse sono implicate nel metabolismo e immagazzinamento dei retinoidi e contribuiscono al normale *turn over* della matrice extracellulare²². In condizione di danno epatico cronico, le cellule stellate sono interessate da un fenomeno di attivazione che le porta a passare da un fenotipo quiescente ad uno "simil-miofibroblastico" con nuove importanti proprietà. In particolare il processo si distingue in due fasi successive denominate iniziazione e perpetuazione dell'attivazione. Alla prima sono associati rapidi cambiamenti nell'espressione genica e nel fenotipo che rende le HSC maggiormente responsive agli stimoli locali conseguiti al danno. La fase di iniziazione, dunque, coglie il messaggio di allarme generato da numerose cellule che includono neutrofili, cellule di Kupffer, cellule dell'endotelio, epatociti e cellule del dotto biliare danneggiato. La successiva fase di perpetuazione, invece, consiste in diversi eventi cellulari che amplificano il fenotipo attivato potenziando la responsività delle cellule stesse. Le HSC assumono in questa fase nuove e peculiari caratteristiche. Diventano il principale tipo cellulare impegnato nella deposizione della matrice modificando anche le quantità e il tipo di componenti sintetizzate: passano da una produzione predominante di collagene III e IV ad un'augmentata sintesi di collagene di tipo I. La fibrogenesi è inoltre potenziata

dall'azione del fattore di crescita trasformante $\beta 1$ (citochina TGF- $\beta 1$), prodotto dalle stesse HSC e in minor misura, dalle cellule di Kupffer e dalle piastrine.

Una maggiore quantità di matrice fibrillare si riflette anche in un aumento delle cellule stellate dovuto all'azione di fattori mitogeni come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) per cui si riscontra nelle HSC sia un incremento della sua secrezione che una maggiore espressione del suo recettore. Assume fondamentale importanza anche la secrezione di citochine pro-infiammatorie che richiamano nel tessuto fibrotico cellule leucocitarie ed attribuiscono alle cellule stellate un ruolo chiave nel mantenere attivo lo stato di infiammazione. L'attivazione delle HSC interessa infine i processi degradativi della ECM modificando in particolare l'espressione di specifiche metallo-proteinasi calcio-dipendenti e degli inibitori di quest'ultime. Questi enzimi assumono un ruolo determinante nel classico processo di riparazione tissutale in quanto sono responsabili dell'affinamento qualitativo e quantitativo della matrice extracellulare appena prodotta. È stato dimostrato che le metallo-proteinasi sono strettamente regolate a diversi livelli per limitare l'attività proteolitica a regioni discrete nell'ambiente pericellulare: infatti, oltre ad un'attivazione dipendente da taglio proteolitico, la funzione degradativa è modulata dal legame di particolari inibitori chiamati TIMPs (inibitori tissutali delle metallo-proteinasi). Durante il processo fibrogenetico, l'accumulo incontrollato di matrice fibrillare riflette una diminuita espressione di questi enzimi nelle cellule stellate contrapposta ad un aumento della sintesi dei rispettivi inibitori²³.

A livello istologico si possono distinguere diversi *pattern* di fibrosi che sembrano correlare con le diverse cause di danno epatico e le loro caratteristiche temporali e patofisiologiche. In ogni caso, l'accumulo di matrice fibrillare si localizza, come atteso, in corrispondenza delle aree necrotiche e dell'infiltrato infiammatorio propri della lesione. Per quanto riguarda un'epatite cronica dovuta ad infezione con virus dell'epatite C (HCV), il processo fibrotico si sviluppa generalmente a partire dai margini dello spazio portale, definito pertanto allargato, e con il progredire della malattia avanza verso la vena centrolobulare. Una tale fibrosi, descritta come (portale-centrale), si risolve nella formazione di noduli cirrotici e porta rapidamente ad importanti conseguenze metaboliche ed emodinamiche tra cui lo sviluppo

dell'ipertensione portale. Il fenomeno permane anche nelle aree cirrotiche, al margine tra parenchima ed i setti fibrotici, ed intacca pesantemente la rete sinusoidale il cui apporto sanguigno deriva, in questo contesto, dalle diramazioni dell'arteria epatica (arterializzazione). Nel processo di "capillarizzazione", inoltre, l'endotelio sinusoidale perde le fenestrature e lo spazio di Disse si riempie di ECM fibrillare. Ciò che infine si osserva è un totale stravolgimento dell'architettura del tessuto riflesso in una perdita progressiva delle funzioni epatiche.

La quantità di matrice extracellulare nel processo fibrotico è utilizzata nella pratica clinica per misurare il livello di malattia epatica. Con il sistema di punteggio METAVIR, si distinguono cinque stadi numerati da 0 a 4. Nei primi tre, equivalenti rispettivamente all'assenza di fibrosi (0), allargamento del tratto portale (1) e presenza di pochi setti fibrotici (2), gran parte degli epatociti sono illesi ed effetti trascurabili sono osservati a livello funzionale. Nello stadio 3 caratterizzato da numerosi setti fibrotici, sono seriamente colpite le funzioni epatocitarie ed il flusso sanguigno si presenta alterato. Il quadro generale peggiora ulteriormente nell'ultimo stadio, il più grave, che si riscontra nel fegato cirrotico²⁴ (fig. 3).

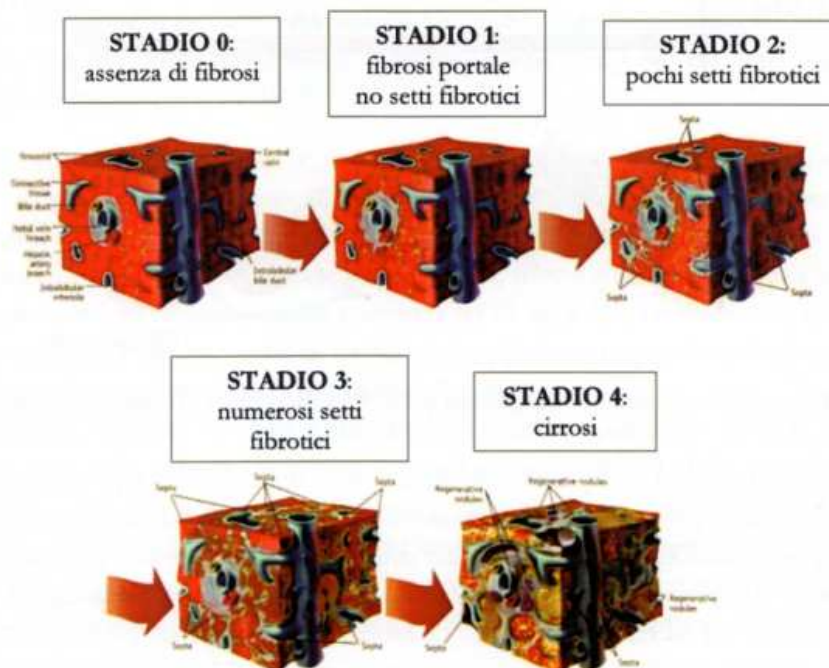


Fig. 3 Progressione della fibrosi epatica.

Fibrogenesi epatica associata ad HCV

Il contributo diretto del virus dell'epatite C nello sviluppo e nella progressione della fibrosi non è ancora stato chiaramente accertato. È noto che le HSC, cellule "principe" direttamente coinvolte nel processo di formazione dell'ECM, esprimono i recettori specifici per HCV - CD 80, recettori per LDL (LDLR) e il recettore del complemento 1q (C1q) - i quali potrebbero supportare la possibilità di un' infezione diretta da parte del virus *in vivo*, che però non è ancora stata confermata. La proliferazione delle HSC viene anche indotta indirettamente da proteine non strutturali e del core di HCV. Una volta attivate, le HSC, rilasciano segnali d'infiammazione²⁵ e fattori di crescita per il tessuto connettivo (CTGF)²⁶ innescando il meccanismo fibrogenetico. Un altro meccanismo con cui il virus contribuisce alla formazione di fibrosi epatica, vede direttamente coinvolta la proteina E2 la quale è in grado di aumentare l'espressione genica della metallo-proteasi di matrice 2 (MMP-2), proteina responsabile della normale degradazione della matrice extracellulare durante il processo fibrogenico. Un aumento trascrizionale di MMP-2 comporta una degradazione massiccia della ECM che compromette l'equilibrio necessario al rimodellamento tissutale portando alla distorsione dell'architettura epatica con conseguente stimolo di risposta fibrogenetica. Altre proteine di HCV quali Core, NS3 e NS5A sembrano coinvolte nel processo pro-fibrogenetico attraverso l'attivazione della citochina TGF- β 1 e un aumento dell'espressione del pro-collagene²⁷.

In particolare, Core sembra esercitare varie azioni biologiche in molti tipi di cellule inclusi gli epatociti. Questi effetti includono il controllo della crescita cellulare, l'apoptosi, lo stress ossidativo, e l'immunomodulazione. Recenti studi indicano che la proteina Core è in grado di legarsi direttamente al recettore del complemento 1q (C1q) presente su cellule target quali i linfociti inducendo una cascata di eventi che si traducono in diversi effetti, tra cui la generazione di radicali liberi, la stimolazione di protein-chinasi attivate da mitogeni (MAPK), e l'attivazione del fattore nucleare NF- κ B. La proteina non-strutturale NS3 invece, sembra indurre la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e regolare l'espressione di due importanti oncogeni quali p21 e p53²⁵.

Progressione della fibrosi nell' epatite cronica da HCV

Nonostante il meccanismo con cui il virus promuove la fibrogenesi sia ormai in via di chiarimento non è ancora noto tuttavia il motivo per cui la progressione della fibrosi può ampiamente variare nei pazienti con CHC. Essa infatti, può rimanere clinicamente silente per molte decadi, a volte per sempre e la comparsa dei sintomi può avvenire anche dopo lunghi periodi quando la malattia si trova già in uno stadio avanzato. È stato dimostrato inoltre che il tasso e la velocità di progressione della fibrosi sono estremamente variabili tra i pazienti HCV. In seguito a questa estrema variabilità è stato sviluppato un modello che suggerisce un ampio spettro di pattern di progressione: a) *progressione rapida*: il tempo che intercorre tra l'infezione e lo sviluppo della cirrosi è < 20 anni; b) *progressione intermedia*: sviluppo della cirrosi in 20-50 anni; c) *progressione lenta*: > 50 anni; d) *non progressione*². Studi longitudinali e trasversali hanno evidenziato che la progressione della fibrosi epatica nei pazienti con CHC viene influenzata da numerosi fattori sia genetici che epigenetici. Inizialmente i fattori virali, quali genotipo e viremia, ne erano considerati i principali responsabili. Alcuni studi, ormai datati, riportavano infatti che il genotipo 1b sembrava conferire una progressione più rapida della malattia. Tuttavia la casistica analizzata proveniva da un'area geografica circoscritta e nei risultati non venivano considerati altri cofattori, cosicché i dati ottenuti non possono essere considerati riproducibili. Altri lavori evidenziano invece un'associazione tra genotipo 3 di HCV e progressione rapida della fibrosi in quanto conseguenza della capacità di HCV-3 di indurre lo sviluppo di steatosi epatica. Tuttavia è stato dimostrato successivamente che l'apparente associazione tra genotipo 3 e fibrosi era indipendente da l'accumulo di grasso all'interno degli epatociti. Inoltre il genotipo 3 è associato ad una più alta risoluzione spontanea della malattia in seguito ad infezione acuta⁴ e quindi di per sé il tasso di cronicizzazione è inferiore rispetto agli altri genotipi di HCV. Per quanto riguarda la viremia invece nessuno studio è riuscito fin'ora a dimostrare un'associazione significativa con la progressione della fibrosi. Da questi lavori quindi è emerso che i parametri virali, quali genotipo e i livelli di viremia, non sembrano svolgere un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione della fibrosi epatica. Recentemente è stato invece, dimostrato che il fenotipo clinico di pazienti

HCV non trattati sembra influenzato principalmente da parametri ambientali e dell'ospite³⁻⁴. In particolare l'alcol sembra essere uno dei fattori maggiormente implicati nella progressione della malattia del fegato infatti un consumo cronico maggiore di 50mg/die è associato ad un incremento importante del tasso di progressione della fibrosi, con un rischio di cirrosi di 2.3 in pazienti con CHC che abusano di sostanze alcoliche⁴. Le coinfezioni virali con i virus dell'epatite B (HBV) e dell' immunodeficienza umana (HIV-1) sembrano anch'esse implicate nella patogenesi della fibrosi. Infatti è stato dimostrato che in pazienti con CHC la co-infezione con HBV è associata ad una più rapida progressione della malattia del fegato ed ad un maggior rischio di sviluppo di HCC. Per quanto riguarda i pazienti con co-infezione da HIV, la progressione della fibrosi epatica potrebbe essere influenzata da una caratteristica tipica dell'infezione da HIV ossia un tasso ridotto CD8/CD4 poiché sembra che le cellule CD8 possano essere relativamente più fibrogeniche se comparate alle CD4. Inoltre, alcuni dati preliminari recenti sembrano dimostrare che le HSC possano essere infettate direttamente da HIV e quindi questo potrebbe spiegare perché, nei pazienti coinfezti HCV/HIV, si assista ad una regressione della fibrosi epatica in corso di terapia anti-retrovirale efficace²⁸.

Oltre ai fattori virali, lo sviluppo e la progressione della fibrosi epatica possono essere influenzati da diversi parametri clinici e metabolici caratteristici dell'ospite. Tra questi, l'età al tempo dell'infezione²⁹ (spesso però difficile da determinare a causa della mancanza di sintomi clinici immediati), l'immunosoppressione e la presenza di sindromi metaboliche e/o diabete di tipo II. Interessante, inoltre, l'associazione tra fibrosi epatica e sesso maschile⁴ imputabile alla capacità degli estrogeni di diminuire *in vitro* la progressione della fibrosi tramite un' alterazione della proliferazione e dell'attività delle cellule stellate. Nonostante la loro importanza e l'influenza notevole che esercitano sulla fibrogenesi, tutti questi fattori non sono sufficienti a dare una previsione accurata di quale paziente potrà sviluppare cirrosi, e identificare precocemente quali necessitano di un trattamento antivirale.

Considerando che la fibrosi epatica sembra essere il risultato di un processo dinamico nel quale diversi geni interagiscono con fattori ambientali, negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata sullo studio di fattori genetici dell'ospite che sembrano avere un impatto notevole sulla storia naturale delle malattie epatiche tra cui anche la

CHC. In particolare è sorto uno speciale interesse per l'identificazione di geni dell'ospite coinvolti nel meccanismo della fibrogenesi. Sono stati pubblicati numerosi studi nei quali è evidenziata un'associazione di alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) con la progressione della fibrosi in pazienti con CHC. Fin'ora i geni più studiati sono stati quelli che codificano per l'Interferone- γ (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'interleuchina-10 (IL-10), il recettore per LDL (LDLR), il fattore V di Leiden e la proteina chemotattica per i monociti 2 (MCP-2) (^{4,30,31}).

Tuttavia, i risultati ottenuti da questi studi sono spesso contraddittori in quanto derivano da un ridotto numero di pazienti o non sono stati confermati in serie indipendenti.

Attualmente la definizione dello stadio di fibrosi rappresenta il parametro più importante per la prognosi e la conseguente gestione del paziente con epatite cronica virale. Spesso però le epatopatie croniche sono asintomatiche e gli esami bioumorali non hanno valore prognostico sufficiente. È evidente quindi, che l'identificazione dei soggetti a rischio di progressione e quindi di sviluppare cirrosi ed epatocarcinoma, risulta fondamentale per ridurre i costi relativi alle fasi terminali delle epatopatie croniche in quanto la malattia epatica scompensata ha un alto costo socio-assistenziale, incluso quello del trapianto di fegato. È di fondamentale importanza quindi identificare dei parametri clinici o genetici che riescano a predire la progressione della fibrosi nell'epatite cronica così da ottimizzare la terapia individuale di ogni paziente.

Cirrhosis Risk Score (CRS)

Recentemente, mediante uno studio di scansione genomica “non hypothesis driven”, Huang et al.³² in collaborazione con Celera hanno sviluppato un test definito Cirrhosis Risk Score (CRS) mediante il quale sembra possibile predire il rischio di comparsa di cirrosi in pazienti con CHC. Il test si basa sulla combinazione di 7 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) (tab. 1) risultati essere fortemente correlati alla cirrosi e in grado, singolarmente, di promuovere la malattia o proteggere da essa.

I sette SNPs che compongono il CRS derivano appunto da una scansione genomica di circa 25000 polimorfismi a singolo nucleotide, scelti indipendentemente da un loro

ipotetico ruolo nella comparsa della fibrosi. Da una prima analisi sono stati selezionati 361 SNPs che risultavano essere correlati in qualche modo alla fibrosi epatica. Questo sottogruppo di polimorfismi è stato nuovamente analizzato in una coorte di pazienti più ristretta comprensiva di soli soggetti caucasici senza fibrosi o con cirrosi. Da quest' ultima analisi sono stati identificati 7 polimorfismi che mostrano singolarmente una forte associazione con la cirrosi (SNP1-7). Ciascuno di questi polimorfismi è caratterizzato da un'alta frequenza (18,5%-87,3%) e da un odd ratio (OR) significativo che va da un minimo di 1.86 a un massimo di 3.23. L'area sotto la curva (AUC) calcolata per ogni SNP risulta di 0.56-0.59, indicando la loro moderata predittività se considerati singolarmente. Il valore predittivo aumenta considerevolmente qualora i 7 SNPs vengano combinati in un algoritmo che da come risultato un indice di rischio per la cirrosi (CRS), il cui valore è compreso tra 0 e 1: più alto è il valore di CRS maggiore sarà il rischio per un paziente di sviluppare cirrosi. In particolare i pazienti cronicamente infetti con HCV che risultano avere un alto indice di rischio ($CRS > 0.7$) mostrano un valore predittivo positivo (PPV) che va dall'82% per i soggetti della corte di studio al 96% in quella di validazione, e l'area sotto la curva per questi ultimi (AUC) era di 0.73, contro una AUC, che considerava i soli i fattori clinici, di 0.53.

	Gene (Cromosoma)	Genotipo rischio	Rischio conferito	P value univariata	ORs (95% CI)	Frequenza (caucasica)
SNP1	AZIN1 (Chr8)	GG	-	0.0002	3.23 (1.76-6.11)	86.9%
SNP2	TLR4 (Chr9)	CC	+	0.0004	3.11 (1.66-5.81)	87.3%
SNP3	TRPM5 (Chr11)	CT,CC	+	0.0006	2.05 (1.36-3.08)	63.6%
SNP4	unknown (Chr15)	AG,AA	-	0.0038	1.86 (1.22-2.82)	41.6%
SNP5	unknown (Chr1)	GG	+	0.0001	2.35 (1.52-3.63)	72.3%
SNP6	STXBP5L (Chr3)	AG,AA	-	0.0014	2.76 (1.48-5.15)	18.5%
SNP7	AQP2 (Chr12)	GG	+	0.0003	2.17 (1.42- 3.30)	66.7%

Tab. 1: Polimorfismi genetici costituenti il CRS e loro parametri individuali

Combinando il CRS con i fattori clinici considerati non sono stati ottenuti grossi miglioramenti rispetto al solo risultato del CRS, indicando così che tale indice è caratterizzato da un alto valore predittivo se paragonato ai soli parametri clinici. Inoltre, il CRS è un indice oggettivo mentre i fattori clinici sono soggettivi (in particolare l'alcol) e possono variare anche nell'arco di poco tempo rendendoli quindi dei parametri poco attendibili. Come suggerito da diversi studi, non è da escludere che altri fattori clinici e metabolici non contemplati in questo studio (es. steatosi epatica, BMI, diabete, accumulo di ferro) possano essere dei buoni marcatori da utilizzare nella valutazione del rischio di cirrosi.

L'importanza e il valore clinico del CRS è notevole in quanto potrebbe essere utilizzato in un prossimo futuro come marcatore non invasivo per stratificare i pazienti caucasici in base al rischio di cirrosi prima di sottoporli ad una biopsia (fig. 4). Quindi, ipoteticamente, si potrebbe decidere di trattare pazienti ad alto rischio indipendentemente dal grado di fibrosi. I pazienti con rischio basso o intermedio dovrebbero sottoporsi invece a biopsia epatica per una corretta stadiazione della fibrosi: la presenza di fibrosi significativa (2-4) implica la necessità di terapia antivirale.

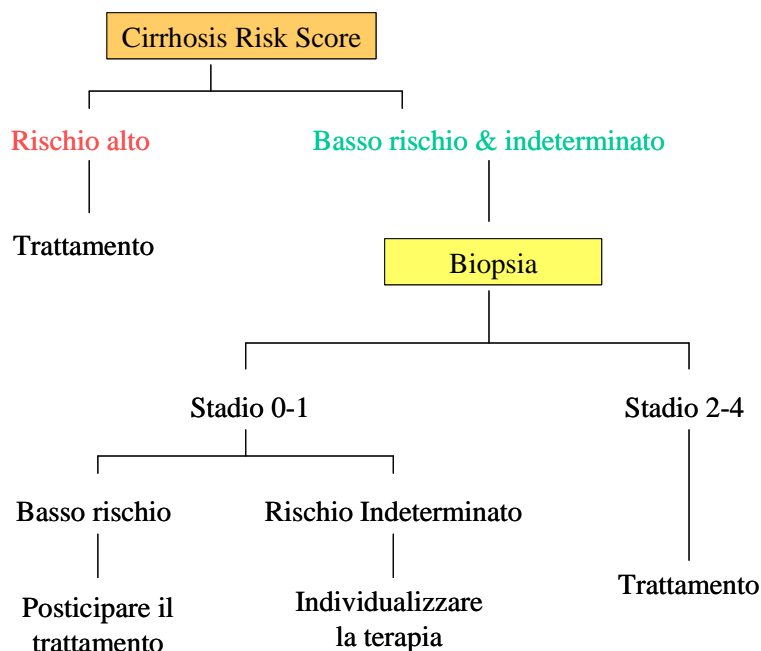


Fig. 4. Potenziali applicazioni cliniche del CRS

Tuttavia, lo studio di Huang et al. presenta alcuni limiti. Per prima cosa, idealmente, lo studio dovrebbe essere condotto longitudinalmente con biopsie seriali di tutti i pazienti ripetute in arco di tempo di almeno 3-5 anni in modo da considerare anche la velocità e il tasso di progressione della malattia nel tempo. Sfortunatamente, questo tipo di approccio è difficilmente praticabile in quanto solo una piccola percentuale di pazienti viene sottoposta a biopsie ripetute nel tempo prima di iniziare la terapia antivirale. In secondo luogo, tutte le biopsie dovrebbero essere valutate da uno stesso anatomopatologo in modo da non incorrere in errori di valutazione istologica.

Ulteriori validazioni sono necessarie per potenziare il valore clinico del CRS in modo tale da renderlo un marcatore affidabile da affiancare ad altri test non-invasivi di valutazione dello stadio di fibrosi quali APRI (rapporto amino transferasi/piastrine), Fibrotest e Fibroscan.

SCOPO DELLO STUDIO

Attualmente la ricerca di marcatori non invasivi in grado di predire la progressione della fibrosi epatica in pazienti con epatite cronica da virus C è di fondamentale importanza. Recentemente è stato sviluppato un test, definito CRS, basato su polimorfismi genetici in grado di predire la comparsa di cirrosi in pazienti caucasici con CHC. Come già descritto precedentemente, lo studio originale però necessita di ulteriori validazioni. L'obiettivo del lavoro di questa tesi di dottorato, svolto in collaborazione con Celera, è stato quello di testare la predittività del CRS come possibile marcatore non solo di rischio di cirrosi ma anche di sviluppo di fibrosi significativa. A tale scopo, nel nostro lavoro è stato considerato il tempo di sviluppo della fibrosi, testando una coorte di pazienti provenienti da due centri clinici dell'Università di Padova e di Verona, i quali erano stati sottoposti a biopsie seriali distanti tra loro almeno 60 mesi.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Lo studio è stato condotto in 271 pazienti caucasici con epatite cronica da virus C sottoposti a biopsie del fegato in due centri clinici dell'università di Padova e di Verona tra il 1980 e il 1996, con un "follow-up" tra le biopsie di almeno 60 mesi in assenza di alcuna terapia antivirale (tab. 2).

N pazienti	271
Maschi/femmine	150/121
Età media alla prima biopsia	44.8 ± 10.7 anni
Genotipi HCV	HCV-1 9.1% HCV-2 20.8% HCV-3 11.3% HCV-4 5.1%
Prima biopsia	F0 37% F1 41.3% F2 21.7%
Intervallo tra le due biopsie	104.3 mesi (range 60-516)

Tab 2. Caratteristiche cliniche e demografiche dei 271 pazienti analizzati.

Sono stati inseriti nello studio solo pazienti che rispondevano ai seguenti criteri di inclusione: 1) pazienti con fibrosi assente, minima, o moderata (METAVIR stage da F0 a F2) alla prima biopsia; 2) evidenze sierologiche di epatite cronica da virus C definita dalla presenza persistente di anticorpi anti-HCV (> 6 mesi) e positività all'HCV RNA nel siero. 3) due biopsie per ogni paziente di misura adeguata (> 15 mm con più di 7 tratti portal) per valutare lo stadio di fibrosi. I pazienti visti prima del 1990, con diagnosi iniziale di epatite non-A/non-B, sono stati riclassificati per diagnosi di HCV utilizzando campioni di siero conservati. Inoltre, nell'analisi statistica di associazione tra i polimorfismi genetici e la progressione di malattia è

stata incluso il sesso maschile e l'età, variabili note influenzare la progressione della fibrosi nell'epatite C.

Per cercare di evitare interferenze con altri fattori di rischio conosciuti e quindi di testare esclusivamente la predittività propria dei polimorfismi, sono stati esclusi dallo studio pazienti coinfectati con HBV o HIV e pazienti affetti da obesità severa (BMI > 28), sindrome metabolica o diabete mellito di tipo II. Altro parametro di esclusione è stata la terapia antivirale: nessuno dei pazienti arruolati era stato sottoposto a trattamento antivirale per HCV prima di essere incluso nello studio o durante il periodo di follow-up precedente la seconda biopsia. Questo grande numero di casi naïve è spiegabile in quanto molti dei pazienti selezionati erano stati visti e seguiti negli anni '80 e nei primi anni '90, quando il trattamento antivirale per HCV non era ancora disponibile o aveva un'efficacia limitata; inoltre, a quell'epoca, gli stadi iniziali di fibrosi non erano considerati indicativi per iniziare un trattamento antivirale. Ultimo, ma non meno importante, criterio di esclusione è il consumo giornaliero di alcol significativo (>30mg/die), un parametro che, come descritto prima, influenza notevolmente la progressione della fibrosi epatica. Tuttavia, poiché l'abuso di alcol è molto diffuso tra i pazienti con CHC, in un secondo momento, abbiamo voluto valutare la predittività del test anche in presenza di questo importante parametro.. Abbiamo quindi analizzato un ulteriore gruppo di 49 pazienti con CHC (35 maschi e 14 femmine) con età media di 42 ± 13.1 anni, caratterizzati da assunzione di una dose giornaliera di alcol significativa (>30mg/die).

Valutazione biopsie epatiche

Il tempo intercorso tra le due biopsie epatiche dei pazienti era maggiore di 5 anni (media 106.48 ± 71.74 mesi, [range, 60-316 mesi]) e il campione bioptico è stato ottenuto utilizzando la tecnica Meneghini con un ago di 1,6 mm. La lunghezza media delle biopsie era di 29 mm (range, 15-61 mm), e in media presentavano 11 tratti portalì (range, 7-23). L'anatomopatologo che ha valutato le biopsie non era a conoscenza né dei dati clinici e demografici dei pazienti né della sequenzialità delle biopsie.

Gli stadi di fibrosi sono stati definiti usando il sistema di punteggio METAVIR, e la progressione di fibrosi è stata valutata in base ai cambiamenti dello stadio METAVIR tra la prima e la seconda biopsia. Nelle analisi multivariate, il tasso di progressione individuale è stato calcolato come unità di fibrosi METAVIR per anno.

Estrazione DNA da sangue intero

Il DNA genomico di ogni paziente è stato estratto dal sangue intero mediante il kit commerciale Qiamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), utilizzando 200 µl di campione e seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Il DNA così ottenuto è stato risospeso in 100 µl di acqua sterile e la concentrazione è stata quantificata mediante spettrofotometro Beckman DU 530.

Genotipizzazione dei 7 SNPs CRS mediante Tecnologia Luminex

La genotipizzazione dei 7 SNPs costituenti il CRS è stata effettuata con Tecnologia Luminex che prevede 4 passaggi principali: amplificazione delle regioni contenenti i 7 SNPs, saggio di ligazione oligonucleotidica (OLA assay), ibridizzazione mediante biglie (bead hybridization) e marcatura finale con fluoro croma (SA-PE labelling). Il protocollo e i reagenti sono forniti da Celera e sono coperti da brevetto: non sono a noi note quindi né le concentrazioni dei reagenti usati nelle varie reazioni né la sequenza nucleotidica dei primer utilizzati per amplificare i campioni.

- L'amplificazione delle sette distinte regioni contenenti i polimorfismi e di un marcatore per il sesso (presente nei cromosomi X e Y) è stata condotta mediante una PCR-multipla utilizzando, per ciascuna reazione, una quantità di DNA genomico compresa tra i 3-12 ng
- Saggio di ligazione oligonucleotidica: il secondo passaggio prevede lo svolgimento di un saggio di ligazione nucleotidica chiamato "Oligonucleotide Ligation Assay" (OLA), in cui il prodotto di PCR viene incubato con 10 µl di una mix (OLA master mix) contenente :

- Oligo allele-specifici (ASO) che presentano al 5' una sequenza oligonucleotidica denominata "PIZ": per ogni SNPs ci sono due ASO, rappresentanti i due diversi alleli (wild-type e mutato).
- Ligation Specific Oligo (LSO) biotinilato al 5'.

L'appaiamento di ASO a LSO avviene solo ed esclusivamente se il 3' di ASO si lega con il prodotto di PCR che rappresenta l'allele corretto.(Fig 5).

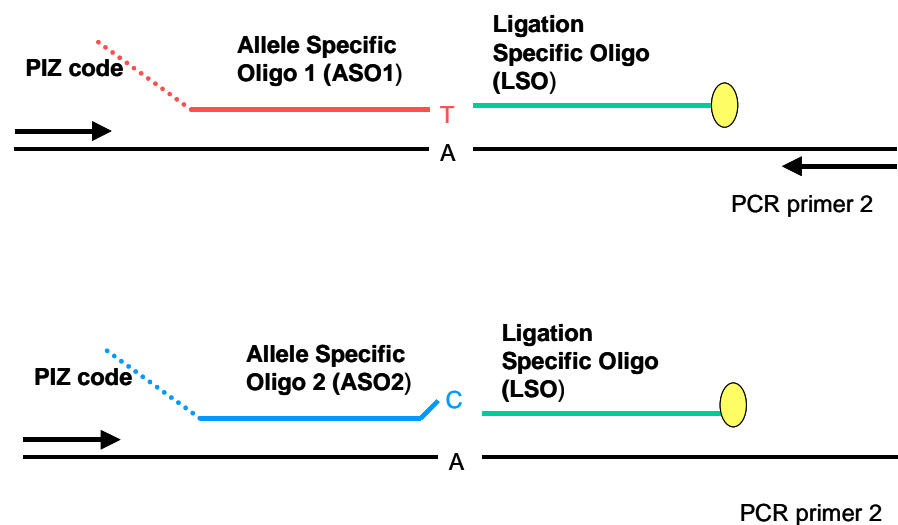


Fig.5 Rappresentazione schematica del saggio di ligazione oligonucleotidica.

Una volta aggiunta la OLA master mix, i campioni vengono trasferiti in un termociclatore e sottoposti al seguente programma: 5'' a 95.5°C, 2' a 48°C, per 32 cicli, e infine 10'a 99 °C.

- Bead Hybridization : in questa fase vengono fatte ibridare delle biglie allele specifiche ai prodotti ottenuti dalla reazione OLA. In pratica, vengono aggiunti 30 µl di Bead master mix al prodotto di ligazione ottenuto dalla reazione precedente.

Per ogni polimorfismo sono presenti due biglie rappresentanti i due diversi alleli: si tratta di sfere in poliestere carbossilato le quali al loro interno contengono una

miscela di due fluorocromi (CL1 e CL2). Al loro esterno sono invece coniugate con degli oligonucleotidi specifici per ogni allele chiamati “zip codes”.

Durante la reazione di Bead Hybridization il 5’ “piz code” legato agli ASO si lega complementariamente allo “zip codes” coniugato alle biglie (Fig.6).

- L’ultimo step è quello di aggiungere streptavidina e R-ficoeritrina (SA-PE) i quali legando la biotina al 3’ di LSO permetteranno di marcare “con fluorescenza” i prodotti ottenuti.

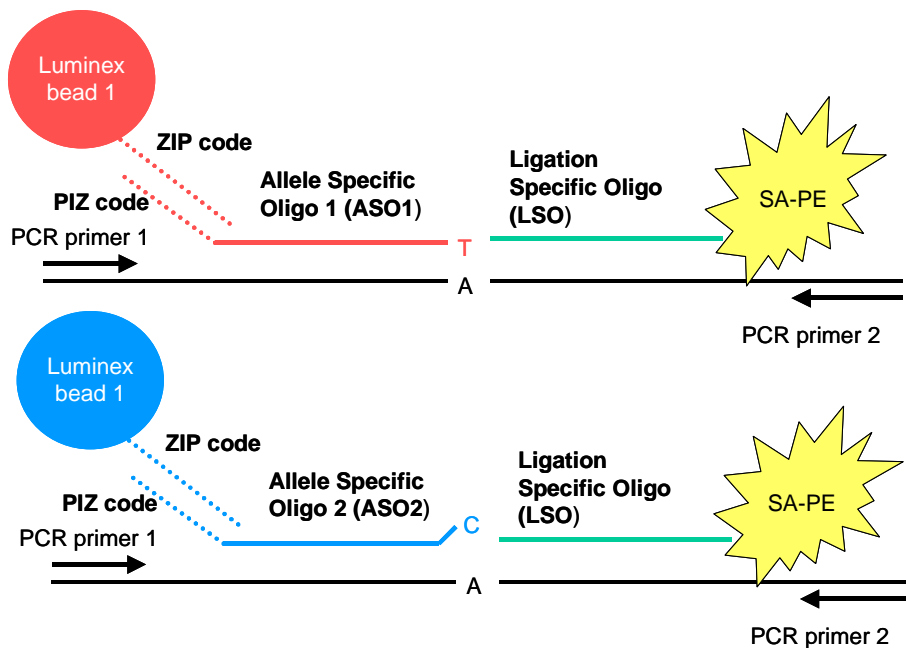


Fig. 6. Rappresentazione schematica dell'areazione Bead Hybridisation e marcatura con SA-PE.

Il tutto viene analizzato al Luminex[®] TM System, uno strumento in grado di analizzare fino a 100 polimorfismi contemporaneamente. Le microsfere legate ai prodotti di PCR ibridati con oligo specifici sono acquisiti da una sonda che ne permette il passaggio singolarmente. Un primo laser (Reporter Laser) eccita i “SA-PE” e il segnale emesso per ogni biglia viene catturato, permettendo la quantificazione dei prodotti legati ad ogni microsfere. Il secondo laser (Classification Laser) eccita

invece i due fluorocromi (CL1 e CL2) all'interno delle biglie. Il rapporto tra CL1 e CL2 dà il Profilo Identificativo (ID) della biglia. L' ID indica il genotipo di ogni SNPs. L'elaborazione dei dati ottenuti al Luminex viene effettuata un mediante un software sviluppato da Celera, il Genotyping Coller ID (GCID) che fornisce, per ogni paziente, il genotipo dei 7 polimorfismi più il marcatore del sesso.

CRS

Per ogni paziente il Cirrhosis Risk Score è stato calcolato usando l'algoritmo originale sviluppato da Celera³²:

$$CRS = \frac{0.626 * P(\text{Cirrhosis})}{0.626 * P(\text{Cirrhosis}) + 0.374 * P(\text{no Cirrhosis})}$$

P(Cirrhosis) = p(SNP1) x p(SNP2) x p(SNP3)... x p(SNP7)
P(no Cirrhosis) = p(SNP1) x p(SNP2) x p(SNP3)... x p(SNP7)

il quale tiene in considerazione sia la probabilità che un polimorfismo contribuisca alla formazione di cirrosi che la probabilità che protegga da essa. (Tab. 3)

SNPs	SNP value		p(Cirrhosis) for SNP=1	p(Cirrhosis) for SNP=0	p(Cirrhosis) for SNP=1	p(Cirrhosis) for SNP=0
	=1	=0				
1)AZIN1 (Chr8)	GG	GA, AA	0.928030303	0.071969697	0.801282051	0.198717949
2)TLR4 (Chr9)	CC	CT, TT	0.928301887	0.071698113	0.810126582	0.189873418
3)TRMP5 (Chr11)	TT	TC, CC	0.318181818	0.681818182	0.487341772	0.512658228
4)none (Chr15)	GG	GS, AA	0.554716981	0.445283019	0.696202532	0.303797468
5)none (Chr1)	GG	GC, CC	0.784905660	0.215094340	0.610062893	0.389937107
6)none (Chr3)	GG	GA, AA	0.784905660	0.215094340	0.905660377	0.094339623
7)AQP2 (Chr12)	GG	GC, CC	0.747169811	0.252830189	0.578616352	0.421383648

Tab 3. Probabilità calcolate per ogni SNPs usate nell'algoritmo per il calcolo del CRS

Statistica

La distribuzione continua del CRS è stata testata, per l'associazione con la progressione della fibrosi, usando il test Wilcoxon. I soggetti sono stati classificati in tre gruppi: basso ($CRS < 0.5$), intermedio ($0.5 \leq CRS \leq 0.7$) e alto rischio ($CRS > 0.7$) di progressione della fibrosi. Il test di Armitage è stato usato per associare il CRS con la proporzione di soggetti che hanno mostrato progressione di almeno uno stadio METAVIR. La regressione logistica è stata fatta dopo aver aggiustato i valori per il sesso, l'età al tempo dell'infezione, e il tempo intercorso tra le due biopsie.

RISULTATI

Biopsie epatiche e progressione di fibrosi

La tabella 4 descrive le proporzioni dei 271 pazienti analizzati che mostrano fibrosi stabile o progressiva tra la prima e la seconda biopsia calcolate raggruppando i pazienti in base allo stadio iniziale della malattia (F0, F1, F2). In tale analisi sono stati esclusi i soggetti con assunzione significativa di alcol (> 30mg/die).

In base a questa stratificazione, possiamo vedere che, alla prima biopsia, la maggior parte dei pazienti non presenta fibrosi (F0, n=104 [38.4%]) o mostra una fibrosi epatica minima (F1, n=108 [39.8%]). 59 di essi (21.8%) presenta invece uno stadio iniziale di fibrosi F2 (secondo METAVIR stage). Durante il periodo intercorso tra le due biopsie, si assiste ad una progressione di fibrosi di almeno uno stadio METAVIR in 205 pazienti (76,6%), dei quali 80 (39,0%) con stadio F0 nella biopsia iniziale. La progressione di due o più stadi METAVIR è stata vista in 122 pazienti (45%).

1st Biopsy	2nd Biopsy					Total % (n)
	F0 % (n)	F1 % (n)	F2 % (n)	F3 % (n)	F4 % (n)	
0	23.1(24)	26.0 (27)	34.6.(36)	9.6 (10)	6.7 (7)	38.4 (104)
F1	0 (0)	31.5 (34)	37.0 (40)	21.3 (23)	10.2 (11)	39.9 (108)
F2	0 (0)	0 (0)	13.6 (8)	27.1 (16)	59.3 (35)	21.8 (59)
Total	8.9 (24)	22.5 (61)	31.0 (84)	18.1 (49)	19.6 (53)	100 (271)

Tab. 4: Variazioni della fibrosi in stadi METAVIR tra la 1^a and 2^a biopsia nei 271 pazienti con epatite cronica da virus C.

Una progressione maggiore di due stadi METAVIR è correlata ad un intervallo più lungo intercorso tra le due biopsie: 17 pazienti (16.3%) con stadio F0 alla prima biopsia progrediscono fino allo stadio F3; il tempo medio dell'intervallo tra le biopsie

in questi pazienti era di 324 ± 156 mesi (mediana, 276 mesi). Nei pazienti con stadio iniziale F0 che non progrediscono o mostrano progressione di uno o due stadi, il tempo medio intercorso tra le due biopsie è invece di 104 ± 20.5 mesi (mediana, 108 mesi). Poiché le dimensioni della biopsia possono influire sulla valutazione istologica, sono state comparate sia le dimensioni che il numero dei tratti portalari delle biopsie ottenute da pazienti "non-progressor" con quelle di pazienti "progressor". Come riportato nella tabella 5, la grandezza e il numero dei tratti portalari della prima e seconda biopsia non differiscono significativamente tra i due gruppi indipendentemente dal grado di progressione.

	Lunghezza (mm) (media \pm SD)		Tratti portalari (numero) (media \pm SD)	
	1 st biopsia	2 nd biopsia	1 st biopsia	2 nd biopsia
Tutti i casi	24 \pm 11	27 \pm 14	10 \pm 8	11 \pm 9
Non progressori	22 \pm 9	24 \pm 12	9 \pm 4	10 \pm 6
Progressori (tutti gli stadi)	25 \pm 13	28 \pm 16	12 \pm 7	11 \pm 9
Progressori (≥ 2 stadi METAVIR)	24 \pm 10	27 \pm 15	11 \pm 6	13 \pm 10

Tab. 5: Grandezza delle biopsie epatiche e numero di tratti portalari nei campioni consecutivi dei 271 pazienti analizzati.

E' emerso invece che la progressione della fibrosi è significativamente associata al sesso maschile (OR= 2.3552, CI 95%: 1.3351-4.1547; P=0.003), con stadi METAVIR di fibrosi più alti nella prima biopsia (OR 1.21, 95% CI 1.07-1.35; P=0.02), e un tempo più lungo intercorso tra le due biopsie (OR 1.091, 95% CI 1.006-1.032; P=0.05). Inoltre la progressione della fibrosi nella seconda biopsia correla con il grado di attività infiammatoria nella prima biopsia, (OR 2.34, 95% CI 1.11-4.32; P=0.01).

Al contrario, l'età al tempo della diagnosi ($P=0.14$), l'età alla prima biopsia, ($P=0.55$) e il genotipo non sono associati alla progressione della fibrosi.

Distribuzione del CRS secondo la progressione di fibrosi

In un secondo momento sono state confrontate le medie del CRS calcolate in pazienti “non-progressori” e “progressori” indipendentemente dallo stadio METAVIR (0.531 ± 0.21 e 0.635 ± 0.19 rispettivamente; $P = 0.005$). Al contrario, nessuna variazione significativa si è vista confrontando le medie del CRS di pazienti che progrediscono di uno (0.627 ± 0.18), due (0.655 ± 0.19), tre (0.588 ± 0.24), o quattro (0.629 ± 0.14) stadi METAVIR. Considerando solo i pazienti con assenza di fibrosi (F0) alla biopsia iniziale, notiamo che la media del CRS differisce tra “progressori” (0.655 ± 0.18) e “non progressori” (0.499 ± 0.22) con aumento della significatività statistica ($P=0.002$). Tuttavia, nei pazienti con assenza di fibrosi non si notano differenze significative tra i valori di CRS in relazione al grado di progressione tra la prima e la seconda biopsia (progressione di uno stadio; CRS = 0.669 ± 0.18 ; di due stadi: CRS = 0.658 ± 0.17 ; di tre stadi: CRS = 0.626 ± 0.22 ; di quattro stadi: CRS = 0.629 ± 0.14). Tali risultati indicano che non c'è un'associazione significativa tra l'indice CRS e il tasso individuale di progressione, calcolato come unità METAVIR di fibrosi per anno.

Tasso di progressione secondo i gruppi di rischio del CRS

Successivamente i pazienti sono stati stratificati in tre categorie di rischio basandosi sul punteggio CRS proposto da Huang et al³². Pazienti a basso rischio (CRS < 0.5), a rischio intermedio (CRS compreso tra 0.5-0.7), e pazienti ad alto rischio (CRS > 0.7). La tabella 6 descrive la percentuale di soggetti, stratificati in base all'indice CRS, che manifestano progressione di fibrosi. Tra i pazienti con stadio iniziale F0 e con progressione di fibrosi di almeno uno stadio METAVIR, il 56.7% risulta a basso rischio, il 79.4% a rischio intermedio e il 90% ad alto rischio di progressione.

Biopsia iniziale	CRS score	Pazienti totali	Pazienti progressori N (%)	95 % CI
F0-F2				
	Basso	82	52 (63.4)	52.4-74.4
	Intermedio	89	69 (77.5)	68.3-86.8
	Alto	100	84 (84.0)	76.3-91.7
F0-F1				
	Basso	63	38 (60.3)	47.4-73.2
	Intermedio	68	49 (72.1)	60.7-83.5
	Alto	81	67 (82.7)	73.9-91.6
F0				
	Basso	30	17 (56.7)	37.3-76.1
	Intermedio	34	27 (79.4)	64.4-94.5
	Alto	40	36 (90.0)	79.4-100.0

Tab. 6: Percentuale di pazienti con progressione di malattia secondo la fibrosi alla prima biopsia e il CRS score.

Basandosi sul confronto con il gruppo a basso rischio, l'OR associato alla progressione è di 2.95 (95% CI 0.98-8.87) nel gruppo a rischio intermedio e di 6.88 (95% CI 1.95-24.3) nel gruppo ad alto rischio.

Analisi multivariate della progressione in funzione del CRS

Sono state eseguite a questo punto delle analisi multivariate per testare l'associazione del CRS con la progressione della fibrosi considerando parametri quali sesso, età alla diagnosi, età alla prima biopsia e l'intervallo tra le due biopsie. L'associazione del CRS con la progressione di fibrosi rimane significativa indipendentemente da tutte queste variabili, escluso il sesso. La tabella 7 descrive i risultati di OR ottenuti da quest'analisi in relazione alla fibrosi iniziale, il sesso e il CRS.

Sesso	CRS	F0 alla biopsia iniziale		F0-F2 alla biopsia iniziale	
		OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value
Tutti	Alto	4.98 (1.28-19.28)	0.02	2.03 (0.95-4.37)	n.s.
	Intermedio	3.70 (1.11-12.30)	0.03	1.90 (0.97-3.84)	n.s.
	Basso	1 (ref)		1 (ref)	
Maschi	Alto	16.53 (1.64-166.12)	0.006	4.70 (1.57-14.1)	0.006
	Intermedio	11.15 (1.15-108.48)	0.04	4.18 (1.24-14.1)	0.02
	Basso	1 (ref)		1 (ref)	
Femmine	Alto	3.24 (0.46-22.89)	n.s.	1.04 (0.34-3.16)	n.s.
	Intermedio	2.38 (0.53-10.72)	n.s.	1.30 (0.54-3.12)	n.s.
	Basso	1 (ref)		1 (ref)	

Tab. 7: Odds Ratios per la progressione di fibrosi (≥ 1 stadio METAVIR) in relazione alla fibrosi iniziale, il sesso e il CRS

Si può notare infatti che quando i maschi e le femmine vengono considerati insieme, i casi con moderato o alto CRS mostrano un OR per la progressione della fibrosi più alto rispetto ai casi con basso CRS con una differenza statisticamente significativa solo nel sottogruppo di pazienti con fibrosi iniziale assente (F0). L'associazione del CRS con la progressione della fibrosi è invece altamente significativa nei pazienti maschi contrariamente alle femmine in cui non è emersa alcuna significatività statistica. Infatti solo i pazienti maschi con CRS moderato o alto mostrano un OR per la fibrosi significativamente più alto rispetto ai pazienti del gruppo a basso rischio. Questa evidenza, inoltre, risulta essere indipendente dallo stadio iniziale di malattia.

Riassumendo, l'OR più alto è stato visto nei pazienti maschi con F0 alla prima biopsia e alto CRS score (OR 16.5, 95% CI 1.6-166; $P = 0.02$). Al contrario, nelle femmine il CRS non è associato alla progressione di fibrosi, indipendentemente dallo stadio iniziale della malattia.

CRS e consumo significativo di alcol

Forti dei risultati ottenuti abbiamo voluto, in seguito, testare la predittività del CRS anche in pazienti con consumo significativo di alcol giornaliero (>30 mg/die). Poiché l'alcol rappresenta uno dei cofattori che influenzano maggiormente la progressione di fibrosi, è interessante verificare se è in grado di alterare il risultato del test. Sono stati quindi analizzati altri 49 pazienti con diversi gradi di fibrosi che durante il periodo di follow-up tra le due biopsie avevano consumato una quantità di alcol superiore ai 30 mg/die. Di questi 49 soggetti, 19 mostravano progressione minima di fibrosi di un solo stadio METAVIR mentre i rimanenti 30 avevano una progressione istologica di due o più stadi METAVIR. Poiché la mediana dell'intervallo tra le due biopsie era simile in questi due sottogruppi (74 versus 82 mesi) è stato possibile analizzare il contributo del CRS nella progressione della fibrosi in presenza di assunzione di alcol comparando 19 pazienti a lenta progressione con 40 pazienti a rapida progressione. Il CRS medio trovato è di 0.561 ± 0.11 nei primi e 0.674 ± 0.18 negli ultimi ($P=0.049$). Anche questi pazienti sono stati stratificati secondo il valore di CRS ottenuto: 15 di essi sono rientrati nel gruppo a basso rischio, 15 nel gruppo intermedio e 19 in quello ad alto rischio. È emersa una progressione di fibrosi significativa (più di uno stadio METAVIR) rispettivamente in 5 (33.3%), 7 (46.6%), e 18 (94.7%) pazienti. Queste evidenze, sebbene ottenute da una coorte ridotta di pazienti, indicano che la "firma genetica" usata per la costruzione del CRS sembra rimanere predittiva, anche in presenza di un consumo significativo di alcol giornaliero.

DISCUSSIONE

Numerose evidenze indicano che i fattori genetici dell'ospite possono influenzare la storia naturale e la progressione di varie malattie epatiche croniche, inclusa ovviamente l'epatite C. E' noto che anche la razza influisce sull'evoluzione della fibrosi nei pazienti infetti da HCV^{33,34}. Inoltre numerosi studi hanno dimostrato l'implicazione di polimorfismi appartenenti a specifici geni nella progressione della malattia epatica associata all'infezione cronica da HCV. Tuttavia, molti di questi studi sono stati condotti su un numero ristretto di pazienti e su un intervallo di tempo tra due biopsie seriali troppo breve, generando così risultati contrastanti³⁵. Attualmente, è molto complesso capire il significato patogenetico e le possibili implicazioni cliniche delle scoperte ottenute. Infatti, la progressione della malattia nell'epatite cronica da virus C, coinvolge un numero smisurato di geni, i quali contribuiscono ad aumentare la difficoltà di definire il relativo contributo di ognuno. Oltretutto, molti cofattori ambientali e alcune comuni comorbidità sembrano influenzare la progressione della malattia in soggetti con CHC. I loro effetti prominenti possono ostacolare lo studio delle predisposizioni genetiche emergenti o ampiamente esaminate, che modificano la velocità di progressione della malattia.

L'associazione tra CRS e cirrosi è stata stabilita da Huang et al.³², conducendo uno studio trasversale che comparava un gruppo di controllo di pazienti HCV senza fibrosi (F0 secondo METAVIR) ad un gruppo di casi con malattia al limite tra fibrosi e cirrosi (F3-F4). Nel nostro studio longitudinale abbiamo ora confermato il valore prognostico del CRS nell'epatite cronica C mostrando la sua associazione con il rischio di sviluppare fibrosi e cirrosi in pazienti con fibrosi minima o assente alla prima biopsia. Nella nostra casistica sono stati considerati numerosi pazienti con stadio di fibrosi F0 alla prima biopsia, poiché in passato questi casi non erano considerati per la terapia antivirale ed era chiaramente indicato che dovevano essere monitorati con biopsie sequenziali.

I risultati ottenuti indicano che il valore prognostico del CRS appare particolarmente solido in questo gruppo di pazienti. Sebbene sia vero che questi dati possono essere stati ingigantiti dal fatto che i pazienti con stadio iniziale F0 possono solo mostrare stabilità o progressione, ma non regressione, come invece potrebbe essere nei casi con

altri stadi di fibrosi iniziali, bisogna anche notare che tali soggetti fanno parte di quella categoria nella quale la decisione di trattare o osservare potrebbe trarre grossi benefici dalla disponibilità di un marcatore predittivo solido. Una severa progressione della malattia può sicuramente avvenire anche in pazienti HCV con stadio iniziale F0, nel nostro lavoro osserviamo infatti che il 17% dei casi mostra una progressione della fibrosi di 3 o 4 stadi METAVIR. Sebbene l'epatite cronica C in molti casi sia una malattia piuttosto lenta e impieghi decenni per progredire a fibrosi avanzata, è stato chiaramente descritto in letteratura che alcuni pazienti HCV possono avere una progressione della malattia estremamente rapida. Nonostante il tasso di progressione dei pazienti F0 del nostro studio sembri più alto rispetto a quello di studi precedenti di storia naturale della malattia, bisogna notare che i nostri pazienti "progressori" hanno un intervallo di tempo tra le due biopsie significativamente più alto e che la progressione a fibrosi avanzata avviene in un periodo di più di 20 anni. Questo tipo di progressione è compatibile con i modelli di sviluppo della malattia descritti in letteratura in pazienti simili ma con un periodo di follow-up più breve³⁶⁻³⁷.

Nel nostro studio, il valore predittivo di un CRS alto è evidente e statisticamente significativo nei pazienti maschi, in particolare in quelli con F0 alla biopsia iniziale, indipendentemente da altre variabili, come l'età e l'intervallo tra le biopsie ma non nelle femmine. L'incapacità del CRS di mostrare un'associazione significativa con il sesso femminile, potrebbe essere dovuto ad una mancanza di potere statistico. Infatti, nelle femmine, la progressione della malattia è solitamente più bassa e ha tempi più lunghi quindi il periodo di follow-up di 5 -10 anni, da noi considerato, potrebbe risultare troppo breve. Alternativamente, i sette polimorfismi inclusi nella costruzione del CRS potrebbero non influire sulla progressione della fibrosi tra le femmine per ragioni non ancora note.

L'associazione tra CRS, sesso maschile e stadio iniziale F0 potrebbe avere una rilevanza clinica notevole. Attualmente infatti i pazienti HCV con fibrosi iniziale F0 sono considerati a basso rischio di progressione di malattia epatica, e quindi non candidati alla terapia antivirale. I risultati ottenuti in questo studio di dottorato dimostrano invece che i pazienti maschi con stadio di fibrosi F0 e alto CRS (>0.70) hanno un rischio significativo di progressione della malattia nel corso del tempo e quindi, dovrebbero essere considerati per il trattamento antivirale immediato.

Tuttavia, sono necessari altri studi per capire se la predicibilità del test può essere aumentata espandendo il pannello di SNPs e/o ricalibrando i cut-off di rischio.

E' noto che la progressione dell'epatite C è profondamente influenzata da diversi fattori, tra cui l'alcol, infezione con HIV-HBV e, secondo recenti studi, le malattie metaboliche e l'insulino resistenza (IR). Nello studio da noi condotto abbiamo dimostrato che il valore prognostico del CRS rimane significativo anche in pazienti HCV che abusano di alcol. Il ruolo del CRS nella predizione dello sviluppo della malattia del fegato riserva adeguate e future valutazioni in pazienti HCV con altre infezioni virali (HBV/HIV) o con sindromi metaboliche,(NAFLD) o con altre malattie croniche del fegato.

PROGETTO IN CORSO

INTRODUZIONE

Attualmente sono in corso diversi studi che hanno come scopo capire il meccanismo molecolare attraverso il quale i polimorfismi, selezionati per costruire la “firma genetica” del CRS, influenzano la progressione della fibrosi nei pazienti con HCV. Tra i più studiati vi sono il “toll like receptor” 4 (TLR4), la “syntaxin binding protein 5 like” STXBP5L e l’ “antizime inhibitor 1” (AZIN1)³⁸. I “toll like receptors” fanno parte di una classe di proteine che giocano un ruolo essenziale nell’immunità innata, essi sono deputati a riconoscere le strutture molecolari di proteine di agenti patogeni e innescare la risposta immunitaria innata. In particolare TLR4 è il recettore per il lipopolisaccaride batterico (LPS) il quale è espresso sulle membrane di diversi tipi cellulari quali: monociti, macrofagi, mast-cellule, cellule mieloidi dendritiche e cellule dell’epitelio intestinale³⁹. Recentemente questo tipo di recettore è stato trovato anche nel fegato in particolare nelle cellule di Kuppfer e molto inaspettatamente nelle cellule stellate. Recenti studi hanno dimostrato che il segnale di risposta infiammatoria innescato dalle HSC in risposta all’LPS, e ad altri ligandi di TLR4, sembra essere estremamente efficace nell’ottenere una risposta fibrogenica elevata. Questo effetto avviene attraverso la “down” regolazione della proteina morfogenetica dell’osso (BMP) e BAMBI (activin membrane-bound inhibitor), un soppressore transmembrana del fattore di crescita trasformante β 1 (TGF β 1), considerata la più importante citochina fibrogenica nel fegato. Questa scoperta concorda con l’evidenza che specifici polimorfismi a singolo nucleotidi di TLR4 contribuiscono a modificare la velocità della progressione di fibrosi, fornendo così un collegamento tra marcatore genetico e patogenesi della malattia⁴⁰. AZIN1 non è stato ancora ben caratterizzato ma alcuni studi hanno evidenziato un’omologia elevata con l’oncogene “ornithine decarboxylase” (ODC) la quale viene legata da AZIN1 che ne inibisce l’attività e ne promuove la degradazione ubiquitina indipendente. AZIN1 è quindi considerato un soppressore tumorale, che gioca un ruolo fondamentale nella proliferazione e morte cellulare⁴¹. STXBP5L invece è implicato nel traffico vescicolare e nel processo di esocitosi e potrebbe essere

coinvolto nella replicazione di HCV nel fegato e indirettamente nella fibrosi epatica promuovendo un ambiente ottimale per la replicazione virale⁴².

Recentemente è stato pubblicato uno studio condotto da Li³⁸ et al dove viene eseguita una mappatura dettagliata e vengono condotti test di associazione genetica delle regioni sopra citate, allo scopo di identificare geni o elementi regolatori in “linkage disequilibrium” (LD: associazione non casuale di alleli in due o più loci) con i polimorfismi originali appartenenti al CRS. In questo modo sono stati identificati 15 e 27 polimorfismi a singolo nucleotide supplementari appartenenti rispettivamente a TLR4 e STXBP5L che mostravano una forte associazione con la progressione della fibrosi. Dall’analisi multivariate è emerso che solo tre SNPs per ogni regione analizzata era il “linkage disequilibrium” tra loro e uno di questi fa parte dei polimorfismi originali considerati nel CRS. Questi SNPs mostravano una forte associazione con la fibrosi indipendentemente dagli altri due considerati. Sono poi stati analizzati gli aplotipi costituiti dai tre polimorfismi selezionati come possiamo vedere nelle tabelle 8 e 9 c’è una forte associazione statistica tra aplotipi e progressione di fibrosi sia per quanto riguarda il gene TLR4 che STXBP5L.

Numero aplotipo	Aplotipo	Rs 960312	Rs 4986791	Rs 11536889	Frequenza casi	Frequenza controlli	P-aplotipo	P-globale
1	ACG	A	C	G	0.676	0.623	0.11	3.04E_05
2	ACC	A	C	C	0.141	0.194	3.15E_02	
3	ATG	A	T	G	0.034	0.096	1.63E_04	
4	GCG	G	C	G	0.148	0.086	7.20E_03	

Tab 8: Associazione degli aplotipi della regione TLR4 con la progressione di fibrosi.

Numero aplotipo	Aplotipo	Rs 960312	Rs 4986791	Rs 11536889	Frequenza casi	Frequenza controlli	P-aplotipo	P-globale
1	TGT	T	G	T	0.746	0.702	0.11	4.49E_06
2	TGC	T	G	C	0.107	0.186	1.62E_03	
3	CGT	C	G	T	0.027	0.067	8.93E_03	
4	TAT	T	A	T	0.118	0.045	4.93E_04	

Tab 9: Associazione degli aplotipi della regione STXBP5L con la progressione di fibrosi.

L'evidenza statistica riportata in questo studio sembra essere piuttosto forte, anche se non ai livelli di altri studi di associazione genomica. Questo perché il numero di pazienti analizzabili che ha questo tipo di dati clinici sono limitati è quindi necessario espandere la corte di studio e approfondire l'analisi anche degli altri polimorfismi appartenenti al CRS originale.

SCOPO DEL LAVORO

Anche questa seconda parte dello studio è stata svolta in collaborazione con Celera. Lo scopo è stato quello di definire più dettagliatamente le varianti genetiche che influenzano la progressione della fibrosi. In particolare, abbiamo analizzato, oltre ai 7 polimorfismi costituenti il CRS, altri sette SNPs (SNPs non CRS) appartenenti ai 365 polimorfismi selezionati nello studio di Huang et al. e suggeriti dai nostri collaboratori: DDX5 rs1991401, MTTP rs3816873, TLR4 rs960312, TLR4 rs11536889, STXBP5L rs35827958, STXBP5L rs2169302, PNPLA3 rs738409.

Visti i recenti risultati ottenuti da Li et al. Abbiamo inizialmente focalizzato la nostra attenzione sullo studio di due regioni in particolare: TLR4 e STXBP5L, andando ad analizzare gli aplotipi nella nostra casistica al fine di trovare i marcatori maggiormente associati alla progressione della fibrosi.

MATERIALI E METODI

Genotipizzazione dei 7 SNPs non CRS mediante Real Time PCR

Sui 271 pazienti analizzati nel lavoro precedente è stata condotta un'ulteriore genotipizzazione di 7 polimorfismi addizionali a singolo nucleotide: DDX5 rs1991401, MTTP rs3816873, TLR4 rs960312, TLR4 rs11536889, STXBP5L rs35827958, STXBP5L rs2169302, PNPLA3 rs738409. Le reazioni di genotipizzazione sono state condotte mediante Real Time PCR utilizzando l'AB7500 (Applied biosystem) Tutte le reazioni sono state effettuate in un volume totale di 25 µl contenente ~10 ng di DNA genomico, 10x AmpliTaq Gold buffer a concentrazione finale 1x, dNTPs (5mM AGC, 5mM dUTP) 200µM/400uM, 25mM MgCl₂ 2.5mM, 20x Syber Green 0.2x, 200x ROX 1x,UNG (8U/ul) 4U, CRA TaqGold (5U7ul) 5U. Per ogni polimorfismo Celera ci ha fornito di due primer specifici per i due diversi alleli e un primer comune che abbiamo usato ad una concentrazione di 10 pmoli. Le condizioni d'amplificazione utilizzate sono: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C poi per 45 cicli: 15 sec a 95°C, 1 min a 60°C.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Oltre alla genotipizzazione degli SNPs appartenenti al CRS, abbiamo analizzato altri 7 SNPs addizionali: DDX5 rs1991401, MTTP rs3816873, TLR4 rs960312, TLR4 rs11536889, STXBP5L rs35827958, STXBP5L rs2169302, PNPLA3 rs738409 (definiti SNPs non-CRS). Lo scopo è quello di trovare altri marcatori, magari più fortemente associati, per cercare di migliorare la predittività del test. Nel frattempo è stato pubblicato uno studio da Li et³⁸ al in collaborazione con Celera che ha evidenziato in pazienti con CHC, la forte associazione con la fibrosi epatica di 3 aplotipi appartenenti ai geni TLR4 e STXBP5L. Ci siamo quindi focalizzati nell'analisi statistica di queste varianti di aplotipi nei nostri pazienti. Dati preliminari indicano che anche nella nostra casistica gli aplotipi sia per TLR4 che per STXBP5L risultano significativamente associati alla progressione della fibrosi. Tuttavia quando vengono presi in considerazione tutti i soggetti analizzati solo due dei tre aplotipi, risultati significativi nel lavoro di Li, lo rimangono anche nel nostro. Mentre

prendendo in considerazione ancora una volta solo i pazienti maschi la significatività viene raggiunta da tutti e tre gli aplotipi. (Tab 10)

Aplotipi TLR4		Progressori	Non Progressori	P vaule
ACG	Tutti i pazienti	0.555	0.559	N.S.
	Solo maschi	0.601	0.554	N.S.
ACC	Tutti	0.189	0.239	N.S.
	maschi	0.118	0.346	<0.01
ATG	Tutti	0.039	0.088	<0.01
	maschi	0.041	0.091	<0.01
GCG	Tutti	0.217	0.114	<0.01
	maschi	0.240	0.090	<0.01

Tab 10: Associazione statistica degli aplotipi di TLR4 con la progressione della fibrose in base al sesso.

La differenza tra i due sessi si nota ancora di più quando si considerano gli aplotipi per STXBP5L.

Aplotipi STXBP5L		Progressori	Non Progressori	P vaule
TGT	Tutti	0.511	0.502	N.S.
	maschi	0.451	0.553	<0.01
TGC	Tutti	0.300	0.347	N.S.
	maschi	0.310	0.322	<0.01
GCT	Tutti	0.021	0.058	<0.01
	maschi	0.098	0.041	<0.01
TAT	Tutti	0.166	0.145	N.S.
	maschi	0.141	0.084	<0.01

Tab 11: Associazione statistica degli aplotipi di STXBP5L con la progressione della fibrose in base al sesso.

Possiamo infatti notare dalla tabella 11 che quando vengono considerati tutti i pazienti, solo un aplotipo raggiunge la significatività statistica.

Mentre viene raggiunta in tutte e tre le varianti esaminando solo i pazienti maschi. Da notare che nella nostra casistica uno dei tre aplotipi di STXBP5L che risultano associati alla progressione della fibrosi è diverso da quello proposto nel lavoro originale di Li. Sono stati poi confrontati i pazienti che presentano la combinazione dei due aplotipi più fortemente associati alla malattia (GCG per TLR4 e CGT per STXBP5L) e pazienti aventi gli aplotipi non significativi (ACG per TLR4 e TGC per STXBP5L). Da questa associazione è emerso che i primi presentano un Odd Ratio di 12.71 rispetto ai controlli mostrando quindi una probabilità di sviluppare cirrosi notevolmente più alta rispetto agli altri pazienti. Questi risultati preliminari avuti dall'analisi dell'aplotipo di alcune regioni cromosomiche sembrano essere incoraggianti, e l'associazione con la progressione della malattia, nei pazienti maschi, sembra essere ancora più forte del CRS originale. I dati finora trovati sono supportati anche da recenti evidenze emerse in studi di meccanismi molecolari. Come ho spiegato in precedenza, TLR4 è localizzato, sorprendentemente, anche sulla superficie delle HSC. L'attivazione di questo recettore porta all'aumento di TGF β 1, attraverso la down regolazione di BAMBI, un inibitore del pseudorecettore per TGF β 1, con conseguente aumento di fibrogenesi.). I polimorfismi T399I e/o D299G (rs4986791 e rs4986790 rispettivamente) conferiscono una più ridotta responsività di TLR4 al LPS e agli altri suoi ligandi, attenuando così la down regolazione di BAMBI e diminuendo conseguentemente l'accumulo di fibrosi⁴⁰. Per quanto riguarda STXBP5L invece l'ipotesi è che il polimorfismo causi un' aumentata espressione della proteina creando un luogo ideale per la replicazione virale⁴².

Sono attualmente in corso ulteriori analisi statistiche multivariate per verificare la predittività di tali aplotipi anche in presenza di altri cofattori clinici. Oltre a questo stiamo valutando l'associazione con la fibrosi degli altri polimorfismi genotipizzati così da ottenere ulteriori marcatori genetici da aggiungere a quelli già analizzati.

BIBLIOGRAFIA

1. Lauer GM, Walker BD. **C virus infection**. *N Engl J Med*. 2001; 345(1): 41-52.
2. Poynard T, Bedossa P, opolon P, for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. **Natural history of liver fibrosis progression in chronic hepatitis C**. *Lancet* 1997; 13:975
3. Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. **Natural history of hepatitis C**. *J Hepatology* 1999;31 suppl 1: 17-24
4. Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. **Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors**. *Gastroenterology* 2008;134(6):1699-714
5. Hutchison SJ, Bird SM, Goldberg DJ. **Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis**. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:1150–1159
6. Zarski JP, Bohn B, Bastie A, et al. **Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses**. *J Hepatol* 1998;28:27–33.
7. Minola E, Prati D, Suter F, et al. **Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C**. *Blood* 2002;99:4588–4591
8. Wright M, Goldin R, Fabre A, et al. **Measurement and determinants of the natural history of liver fibrosis in hepatitis C virus infection: a cross-sectional and longitudinal study**. *Gut* 2003; 52:574–579.
9. Ratziu V, Munteanu M, Charlotte F, et al. LIDO Study Group. **Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C**. *J Hepatol* 2003;39:1049–1055.
10. McCaughan GW, George J. **Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection**. *Gut* 2004;53:318–321.
11. Bataller R, North KE, Brenner DA. **Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal**. *Hepatology*. 2003 Mar;37(3):493-503. Review.
12. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, et al. **Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis**. *Hepatology* 2000;31:828–833.
13. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, Rowland CM, Catanese JJ, Leong DU, Sninsky JJ, Layden TJ, Wright TL, White T, Cheung RC. **A 7 gene signature identifies the risk of developing**

- cirrhosis in patients with chronic hepatitis C.** *Hepatology*. 2007 Aug;46(2):297-306.
14. Robertson B, Myers G, Howards C, et al. **Classification, nomenclature, and database development for hepatitis c virus (HCV) and related viruses: proposal for standardization.** *International Comitee on Virus Taxonomy. Arch Virol* (1998);143:2493-2503
 15. Reed KE, Rice CM. **Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein preperities.** *Curr Top Microbiol Immunol* (2000);242: 55-84.
 16. Pawlotsky JM. **Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications.** *Clin Liv Dis* (1997); 1:631-646.
 17. Craxi A, Laffi G, Zignego AL. **Hepatitis C virus (HCV) infection: A systemic disease.** *Molecular Aspects of Medicine* 29 (2008) 85-
 18. 95Lauer GM, Walker BD. **C virus infection.** *N Engl J Med*. 2001; 345(1): 41-52.
 19. Pinzani M. **Liver Fibrosis.** *Sprinter Seminars in Immunopathology*, (2000) 21: 475-490.
 20. Cotran R, Kumar V, Collins T (Eds). **Tissue Repair: cellular groeth, fibrosis, and wound healing.** *Robbin's Pathological Basis of Disease*, (1999) 6th ed., WB Saunders Co., Philadelphia, 88-112
 21. Schuppan D. **Structure of extracellular matrix in normal and fibroti liver: collagens and glycoprotein.** *Sem. Liver. Dis.*, (1990) 10,1-10.
 22. Gentilini P. **Le cellule stellate epatiche.** *Il fegato.*(2001) Fisiopatologia, Clinica, terapia, Vol. II, Cap. 15, Ed UTET periodici
 23. Friedman SL. Liver. **Fibrosis – from bench to beside.** *Journal of Hepatology* (2003), 38: S38-S53.
 24. Knodell RG et al. **Formulation ad application of a numerical scoring sistem for assesing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis.** *Hepatology*,(1981) 1(5): 431-5
 25. Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, et al. **Hepatitis C virus coreand nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepaticstellate cells.** *Gastroenterology* 2004;126:529 –540
 26. Shin JY, Hur W, Wang JS, et al. **HCV core protein promotes liverfibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF-beta1.** *Exp Mol Med* 2005;37:138 –145.

-
27. Mazzocca A, Sciammetta SC, Carloni V, et al. **Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells.** *J Biol Chem* 2005;280:11329–11339.
 28. Friedman S.L. **mechanisms of hepatic fibrogenesis.** *Gastroenterology* 2008;134:1655-1669.
 29. Minola E, Prati D, Suter F, et al. **Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C.** *Blood* 2002;99:4588–4591
 30. Hui JM, Sud A, Farrell GC, et al. **Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression.** *Gastroenterology* 2003;125:1695–1704
 31. Bataller R, North KE, Brenner DA. **Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal.** *Hepatology.* 2003 Mar;37(3):493-503. Review
 32. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, Rowland CM, Catanese JJ, Leong DU, Sninsky JJ, Layden TJ, Wright TL, White T, Cheung RC. **A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C.** *Hepatology.* 2007 Aug;46(2):297-306
 33. El-Serag HB, Mason AC. **Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States.** *N Engl J Med* 1999;340:745–750.
 34. Kim WR, Gross JBJ, Poterucha JJ, et al. **Outcome of hospital care of liver disease associated with hepatitis C in the United States.** *Hepatology* 2001;33:201–206
 35. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, et al. **The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors.** *JAMA* 2000;284:450–456
 36. Hui CK, Belaye B, Montegrando K, Lyn T, Wright TL. **A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase.** *Journal of Hepatology* 38 (2003) 511-517
 37. Ghany M, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Park T, Liang TJ and. Hoofnagle JH. **Progression of fibrosis in chronic hepatitis C.** *Gastroenterology* 2003;124:97-104.
 38. Li Y, Chang M, Abar O, Garcia V, Rowland C, Catanese J, Ross D, Broder S, Shiffman M, Cheung R, Wright T, Friedman SL, Sninsky J. **Multiple variant**

- il toll like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection.** *J of Hepatology* 51 (2009) 750-757
39. Takeuchi O, Akira S. **Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system.** *Int Immunopharmacol.* 2001 Apr;1(4):625-35. Review.
40. Guo J, Loke J, Zheng F, Hong F, Yea S, Fukata M, Tarocchi M, Abar O, Huang H, Sninsky JJ, Friedman SL. 2009. **Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses.** *Hepatology* Mar;49(3):960-8
41. U. Mangold. **Antizyme inhibitor: mysterious modulator of cell proliferation.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006; vol 63 (2095-2101).
42. Takashi Tsuboi. **Molecular mechanism of attachment process of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells.** *Neuroscience Research* 63 (2009) 83–88.

PUBBLICAZIONI E POSTER

-2009 Publication- **Hyperinsulinaemia reduces the 24 hour virological response to PEG-interferon therapy in patients with chronic hepatitis C and insulin resistance.** Gladis Bortoletto, Laura Scribano, Stefano Realdon, Maira Marcolongo, Silvia Mirandola, Lisa Franceschini, Sara Boninsegna, Franco Noventa, Mario Plebani, Diego Martines and Alfredo Alberti. *Journal of Viral Hepatology* (in press)

-2009 Publication- **“A 7 gene Signature (cirrhosis risk score) predicts liver fibrosis progression in patients with initially mild chronic hepatitis C”** Maira Marcolongo, Bradford Young, Francesca Dal Pero, Giovanna Fattovich, Laura Peraro, Maria Guido, Giada Sebastiani, Giorgio Palù and Alfredo Alberti. *Hepatology* 2009

-2009 Poster: **A cross-talking between interferon-alpha and insulin pathways could explain hyperinsulinemia in patients with chronic hepatitis C.** L.Franceschini, M. Marcolongo, G.Bortoletto, A. Alberti, S. Realdon
EASL- Copenhagen 2009

-2008 Publication-**“Microsomal triglyceride transfer protein polymorphism (-493G/T) is associated with hepatic steatosis in patient with chronic hepatitis C”.** Mirandola S., Osterreicher CH, Marcolongo M, Datz C, Aigner E, Schlabrakowski A, Realdon S, Gerotto M, Alberti A, Stickel F. *Liver Int.* 2008 Oct 10

-2008 Oral Communication; **“Host genetics regulates liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C (CHC).** M.Marcolongo, Y. Bradford, M.Gerotto, F. Dal Pero, G. Fattovich, M. Pasino, A. Alberti
Monotematica AISF sulla fibrosi epatica- Firenze 2008

-2008 Poster: **Host genetics regulates liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C (CHC).** M.Marcolongo, Y. Bradford, M.Gerotto, F. Dal Pero, Fattovich, M. Pasino, A. Alberti
8th National congress of the Italian Society of Virology (SIV)

-2007 Oral Communication; **“What’s the clue in the progression of liver damage during HCV-infection? Analysis of the role of HCV NS5A and Core proteins.** M. Marcolongo, S. Mirandola, S. Realdon, L. Franceschini, C. Frezza, F. dal Pero, M. Gerotto, D. Bison, G. Bortoletto, L. Scorrano and A. Alberti
7th National congress of the Italian Society of Virology (SIV)

- 2007 Poster: **Cirrhosis Risk Score Identifies those Chronic Hepatitis C Infected Patients Presenting with No Liver Fibrosis that are at High Risk for Fibrosis Progression.** Young Bradford, Gerotto Martina, Marcolongo Maira, Dal Pero, Francesca, Lagier Robert, Rowland Charles, Sebastiani Giada, Alberti Alfredo

The liver meeting, American association for the study of liver disease, Boston, USA

-2007 Poster. “**Microsomal triglyceride transfer protein (mtp) gene polymorphism and lipid metabolism in HCV-infected patients**”. S. Mirandola, M. Marcolongo, S. Realdon, F. Stickel, C. Datz, E. Aigner, G. Niedobitek, M. Gerotto, F. Dal Pero, L. Franceschini, F. Noventa, A. Vario, G. Bortoletto, A. Alberti. 42 nd

Annual Meeting of the European Association for the study of the Liver, April 11-15, 2007

CORSI

Partecipa in qualità di relatore ai seguenti corsi:

2008 Preceptorship on hepatology

- 15-17 Maggio 2008
- 16-18 Ottobre 2008
- 2-4 Dicembre 2008
- 12-14 Ottobre 2009
- Expert meeting di aggiornamento in Epatologia 15 Luglio 2009