

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Mediche

Relazione e progetto di ricerca

Il Anno di Corso del Dottorato di Ricerca in

“MEDICINA MOLECOLARE” Ciclo XX

Dottoranda: Dr CRISTINA RIGAMONTI

Anno accademico 2005/2006

Nel corso del II anno di Dottorato l'attività di ricerca è stata proseguita nell'ambito del Progetto di Ricerca "EPATITE C NEL MODELLO DEL TRAPIANTO UMANO: RUOLO DEI COFATTORI NELLA FIBROGENESI E PROGRESSIONE DEL DANNO EPATICO".

È stata effettuata la raccolta dei campioni biologici, ed avviata l'analisi dei campioni per lo studio dello stress ossidativo e della risposta autoimmune nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato per cirrosi HCV-correlata e in pazienti sottoposti a trapianto per cirrosi HBV-correlata, come indicato nel progetto.

Inoltre, l'attività scientifica, è consistita nella partecipazione a corsi e aggiornamento bibliografico continuo in epatologia (Medline e Journal Club).

PARTECIPAZIONE A CORSI E SEMINARI

1. CORSO "ULTRASUONI NEL CASTELLO DI GARGONZA" – Gargonza 4-6 Ottobre 2005
2. Riunione Monotematica AISF - 2005 "TERAPIA DELLA CIRROSI EPATICA" – Napoli 26-28 Ottobre 2005
3. Seminario "HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications" – Novara, 23 novembre 2005
4. Course 5 EASL School of Hepatology "HEPATITIS B AND C" – Milan 9-10 December 2005
5. Liver Club "Epatite acuta ed emolisi" – Milano, 13 Dicembre 2005
6. Liver Club "Deficit di alfa-1-antitripsina" – Milano, 7 Febbraio 2006
7. Corso "Ruolo della transglutaminasi nel morbo celiaco" – Milano, 17 Marzo 2006
8. Seminario "The natural course of preclinical type 1 diabetes" – Novara, 20 marzo 2006
9. Seminario "L'epatite autoimmune" – Novara, 18 maggio 2006
10. Liver Club "Distiroidismo ed epatopatia" – Milano, 16 Maggio 2006

11. Seminario "TOWARDS INDIVIDUALIZED MANAGEMENT OF THE PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS" – Milano 26-27 Maggio 2006
12. Liver Club "Overlap PBC/PSC" – Milano 6 Giugno 2006
13. Corso "MALATTIE DEL FEGATO E DELLE VIE BILIARI: UPDATE" – Orta San Giulio 17 Giugno 2006
14. Course 6 EASL School of Hepatology "CLINICAL HEPATOLOGY" – Dublin 23-24 June 2006
15. Corso "MALATTIE DEL FEGATO E DELLE VIE BILIARI: UPDATE" – Orta San Giulio 2 Settembre 2006
16. Liver Club "Meccanismi di anemia in pazienti in terapia antivirale" – Milano 18 Settembre 2006

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI INTERNAZIONALI

1. 2006 Joint International Congress of ILTS, ELITA & LICAGE – Milan 3-6 May 2006
2. 2nd International Conference "MOVING FORWARD WITH HEPATITIS C. 2nd INTERNATIONAL CONFERENCE 2006" – Dublin 21-23 June 2006

PRESENTAZIONE ABSTRACT

2006 Joint International Congress of ILTS, ELITA & LICAGE

2 poster

PUBBLICAZIONI

FULL PAPERS

1. Vay D, Rigamonti C, Vidali M, Mottaran E, Alchera E, Occhino G, Sartori M, Albano E. Anti-phospholipid antibodies associated with alcoholic liver disease target oxidized phosphatidylserine on apoptotic cell plasma membranes. *J Hepatol*. 2006; 44: 183-89.
2. Rigamonti C, Shand LM, Feudjo M, Bunn CC, Black CM, Denton CP, Burroughs AK. Clinical features and prognosis of primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis. *Gut* 2006, 55: 388-94.

ABSTRACTS

1. Sartori M, Andorno A, Rigamonti C, Colombi S, Boldorini R, Contessi GB, Rossini A. Predictive factors for histological response to long-term phlebotomy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42: 688A-689A.
2. Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Serino R, Moia S, Rigamonti C, Sartori M, Albano E. Contribution of auto-immune reactions involving cytochrome P4502E1 to hepatocyte injury during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006; 44: S166-167.
3. Carmignani L, Acquati P, Donato MF, Agnelli F, Rigamonti C, Rossi G, Rocco F, Fassati LR. Sexuality and erectile dysfunction in patients who have undergone liver transplant. *Liver Transpl* 2006; 12: C-12.
4. Donato MF, Agnelli F, Viganò M, Rigamonti C, Rossi G, Fassati LR, Colombo M. Pegylated (PEG-IFN) versus standard interferon- α (IFN) in the treatment of genotype 1b hepatitis C recurring after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: C-21.
5. Rigamonti C, Donato MF, Fraquelli M, Agnelli F, Ronchi G, Rossi G, Fassati LR, Colombo M. Evaluation of liver graft fibrosis by transient elastography (TE). *Liver Transpl* 2006; 12: C-60.
6. Cantù P, Donato MF, Rossi G, Forzenigo L, Piodi L, Agnelli F, Rigamonti C, Tenca A, Fassati LR, Penagini R. Stent-trial in anastomotic biliary stricture after liver transplantation: does it help patients' management? *Liver Transpl* 2006; 12: C-64.
7. Donato MF, Arosio E, Monti V, Berra M, Agnelli F, Rigamonti C, Rossi G, Fassati LR, Colombo M. The changes in serum antinuclear antibody (ANA) correlated with severity of hepatitis C recurrence after transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: C-82.

8. Donato MF, Rigamonti C, Agnelli F, Rossi G, Maggi U, Viganò M, Arosio E, Maggioni M, Colombo M, Fassati LR. Protocol liver biopsies to evaluate severity of recurrent HCV hepatitis: a recent monocentric experience. *Liver Transpl* 2006; 12: C-124.

EPATITE C NEL MODELLO DEL TRAPIANTO UMANO: RUOLO DELL'INTERAZIONE VIRUS-OSPITE E DEI COFATTORI NELLA FIBROGENESI E PROGRESSIONE DEL DANNO EPATICO

Dimensione del problema

Il trapianto di fegato è il trattamento di scelta nei pazienti con cirrosi da virus dell'epatite C (HCV) in fase avanzata. Dopo il trapianto l'infezione recidiva nel 100% dei pazienti con HCV-RNA positività pre-trapianto e determina una nuova epatite nella maggior parte dei casi (1;2).

Nei pazienti trapiantati la malattia è più rapida ed aggressiva rispetto a quella osservabile nei pazienti immunocompetenti (3). Infatti, in questi ultimi la cirrosi si sviluppa nel 20-25% dei casi, dopo 20-30 anni dal contagio con il virus dell'epatite C. Al contrario, nel post-trapianto, fino al 30% dei pazienti evolve a cirrosi in 5 anni (3), pur considerando che la reale incidenza di cirrosi C post-trapianto è sottostimata laddove non si eseguono biopsie protocolari. Altrettanto rapido nel setting del trapianto appare il decorso della cirrosi verso l'insufficienza epatica e la perdita del graft (3-5). Sebbene sembri evidente che lo stato di immunodepressione indotto dalla terapia immunosoppressiva modifichi di per sé la storia naturale dell'epatite C post-trapianto, l'effetto di numerosi altri fattori responsabili del pattern e della severità della ricorrenza HCV post-trapianto rimane tuttora un campo di intensa ricerca. L'identificazione dei fattori, sia presenti pre-trapianto che sviluppati nel post-trapianto, capaci di influenzare la storia naturale della recidiva epatitica C è di notevole importanza per l'individuazione dei pazienti ad alto rischio di ricorrenza severa, per il management post-trapianto e anche per una migliore allocazione degli organi.

Esistono una serie di fattori potenzialmente in grado di contribuire alla progressione dell'epatite C (6). In aggiunta a quelle note nel paziente immunocompetente, ci sono variabili uniche nel setting del trapianto che complicano ulteriormente le difficili interazioni tra virus ed ospite. Tra queste sono inclusi i fattori legati alla chirurgia, particolarmente il tempo di ischemia e il danno da riperfusione, quelli correlati al donatore come l'età, l'istocompatibilità tra il donatore e il ricevente, il chimerismo immunologico ed infine quelli secondari alla terapia immunosoppressiva (6).

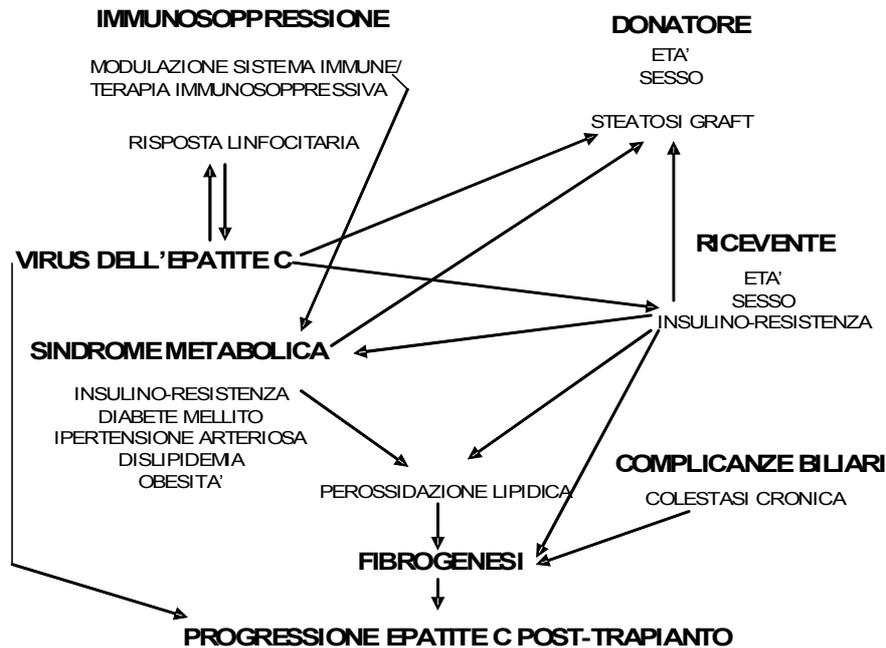
Tra i fattori virologici una elevata viremia HCV pre-trapianto (7-9), precoce aumento della viremia post-trapianto (10), una elevata espressione di forme replicative del virus nel fegato (8), l'infezione con i genotipi virali 1 e 4 (11-13), la coinfezione con CMV (14) sono i più accreditati. Alcune caratteristiche del ricevente tra cui l'età avanzata, la razza non-bianca (1;11), il sesso femminile (15) ed una ridotta risposta immune HCV-specifica sono fattori prognostici negativi. Infine, tra i fattori legati al donatore l'età avanzata (superiore a 50 anni) (16-18) e la steatosi del graft (15) si associano a ricorrenza epatitica C più severa. I cambiamenti nella modalità di immunosoppressione post-trapianto possono anch'essi influenzare l'evoluzione della recidiva di epatite C, in particolare modificazioni sostanziali e repentine dello stato di immunodepressione, con rapida parziale ricostituzione del sistema immune in grado di influenzare negativamente l'equilibrio tra HCV circolante ed ospite (6;19-23).

Dati recenti indicano inequivocabilmente che la sopravvivenza dei pazienti trapiantati per epatite C è ridotta (24) ed è significativamente inferiore a quella dei trapiantati per epatopatia non HCV-correlata (25). Vi è inoltre evidenza che la recidiva di epatite C è ancora più severa negli ultimi anni, forse in relazione all'utilizzo di "donatori anziani" e di farmaci immunosoppressori più potenti (11;15;16).

Il meccanismo patogenetico che sta alla base della rapida evoluzione del danno epatico in un consistente sottogruppo di pazienti trapiantati con recidiva di epatite C non è ancora del tutto chiarito ed è verosimilmente multifattoriale. Certamente, le alterazioni immunologiche derivanti dalla manipolazione del sistema immune per scongiurare il rigetto d'organo, hanno un ruolo preminente nell'evoluzione dell'infezione verso la cirrosi, come avviene in altri modelli di immunodeficienza (coinfezione con virus HIV). È noto infatti che l'immunosoppressione facilita la replicazione virale e modula la risposta immune linfocitaria T CD4+ e CD8+ HCV-specifica, che è fondamentale per l'eliminazione di HCV in fase acuta.

In aggiunta alle suddette alterazioni immunologiche, la presenza di fattori potenzialmente fibrogenetici come complicanze ischemiche/biliari e sindrome da insulinoresistenza/steatosi può favorire la progressione della recidiva epatitica C. Infine il danno ossidativo, che è dimostrato aumentare nel corso dell'epatite cronica C (26-29) e nel post-trapianto (30), può agire da cofattore di progressione di per sé mediante l'attivazione della fibrogenesi e mediante l'induzione di meccanismi immunitari di danno. È verosimile che l'evoluzione dell'epatite C post-trapianto sia la risultante della sinergica interazione di numerosi fattori, la cui analisi sistematica è di fondamentale importanza nello studio della patogenesi della recidiva C post-trapianto.

COMPLESSE INTERAZIONI NELLA PATOGENESI DEL DANNO HCV-MEDIATO POST-TRAPIANTO



Il trapianto di fegato umano rappresenta un modello unico di ricerca per studiare l'immunopatogenesi del danno da HCV nelle fasi precoci di cronicizzazione dell'infezione. Infatti, l'infezione acuta che occorre inevitabilmente post-trapianto permette di studiare la risposta immune innata e adattativa scatenata nello stadio precoce dell'infezione seguendo i pazienti nel tempo ad intervalli regolari con raccolta di campioni biologici come sangue e tessuto epatico. Inoltre, a differenza del setting del paziente immunocompetente, che é generalmente associato ad una stabile replicazione virale che non varia per mesi o anni, il trapianto epatico porta ad un incremento fino a venti volte dei titoli virali circolanti. Dal momento che la replicazione virale si associa ad accumulo di mutazioni, le quasispecie possono essere caratterizzate longitudinalmente dopo trapianto (31). Infine, l'impatto della comparsa di fattori clinici di progressione può essere seguito strettamente nel tempo unitamente al monitoraggio della risposta immune.

Scopi dello studio

Lo scopo dello studio prospettico è l'analisi sistematica dei fattori favorenti la progressione della epatite C post-trapianto e l'interazione tra essi nell'evoluzione del danno epatico.

Lo studio si articola in quattro sotto-progetti con i seguenti obiettivi:

- 1) Studio dei fattori clinici di progressione del danno (complicanze ischemiche/biliari, sindrome da insulino-resistenza/steatosi)
- 2) Studio del danno ossidativo e della risposta autoimmune
- 3) Ottimizzazione del monitoraggio post-trapianto della progressione di fibrosi

1) Studio dei fattori clinici di progressione del danno

La presenza di comorbidità (infezione da CMV, rigetto, complicanza ischemico/biliare) a partire dalle prime settimane post-trapianto, nello stesso periodo in cui il graft si infetta con HCV, rende difficile la diagnosi eziologica, l'inquadramento patogenetico e l'approccio terapeutico, oltre ad accelerare verosimilmente la progressione della malattia virale C. Spesso la biopsia epatica, considerata il gold standard per la diagnosi di recidiva C, mostra lesioni istologiche overlap con le altre patologie. Le complicanze biliari, tra cui la stenosi anastomotica responsabile di sviluppo di colangiti ricorrenti e stasi biliare, si verificano nel 6-34% dei pazienti trapiantati (32). Numerosi modelli sperimentali e clinici hanno documentato lo sviluppo di fibrosi epatica conseguente alla stasi biliare cronica (33-35). Una vasta gamma di alterazioni metaboliche può insorgere post-trapianto come diabete mellito, dislipidemia, obesità ed influenzare il decorso dell'epatite C (36). Questi quadri morbosi, favoriti dall'uso dei farmaci immunosoppressori come gli inibitori della calcineurina (tacrolimus, ciclosporina A), hanno in comune come substrato patogenetico il fenomeno dell'insulino-resistenza e la conseguente iperinsulinemia che rappresenta il fondamento della sindrome metabolica e si associa a comparsa di steatosi epatica. L'insulino-resistenza è stata dimostrata essere inoltre un fattore indipendente associato ad HCV nel post-trapianto (37). L'iperinsulinemia e la steatosi sono entrambe profibrogeniche sia per attivazione diretta delle cellule stellate che per aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno e conseguente attivazione del processo di perossidazione lipidica (38-43). È altresì noto come anche il virus C ed in particolare il genotipo 3 induca steatosi per effetto citopatico diretto (44-46), indipendentemente dal fenomeno di insulino-resistenza, costituendo un meccanismo aggiuntivo o sinergico di genesi della fibrosi. L'impatto relativo dei suddetti fattori nell'evoluzione della recidiva epatica C non è tuttora noto.

Obiettivo del sotto-progetto 1 è:

Studio del ruolo dei cofattori (complicanze ischemiche/biliari, alterazioni metaboliche, e caratteristiche clinico-epidemiologiche del donatore-ricevente) nella evoluzione del danno epatico in pazienti con recidiva virale C.

2) Studio del danno ossidativo e della risposta autoimmune

È stato dimostrato che il processo di perossidazione lipidica è aumentato nel trapianto nella fase intraoperatoria durante la riperfusione epatica, consistente con il danno da ischemia/riperfusione (30). Sebbene nell'immediato post-trapianto lo stress ossidativo si riduca, esso aumenta nuovamente gradualmente nel primo anno post-trapianto in modo tempo-dipendente, ma indipendentemente da eventi quali rigetto, ricorrenza dell'epatopatia o insufficienza del graft (30). Tali dati suggeriscono come nel post-trapianto lo stress ossidativo possa essere considerato un cofattore di danno di per sé, indipendente dallo sviluppo di altri eventi patogenetici, e presumibilmente legato al setting del trapianto, non ultima l'immunosuppressione stessa. Infatti, sebbene al tacrolimus siano state attribuite proprietà antiossidanti (47), la ciclosporina A sembrerebbe avere un potenziale pro-ossidante (48).

Il coinvolgimento dello stress ossidativo nella patogenesi dell'epatite C pre-trapianto è supportato da evidenze cliniche, in particolare dalla dimostrazione nel siero e nel fegato di pazienti affetti di marcatori di danno ossidativo (26-29). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte in eccesso in corso di danno cellulare, interagendo con gli acidi grassi polinsaturi contenuti nei fosfolipidi, danno al luogo al processo di perossidazione lipidica, i cui prodotti terminali consistono in residui aldeidici (4-idrossinonenale, HNE e malonildialdeide, MDA). Nei modelli di fibrosi, i prodotti di perossidazione lipidica sono risultati necessari e sufficienti per indurre l'attivazione delle cellule stellate epatiche e, tramite la stimolazione delle vie di signaling intracellulare, la produzione di TGF- β 1 (il più potente stimolo fibrogenico) e di collagene I (49-52) da parte delle cellule stellate. I prodotti terminali del processo di perossidazione lipidica, in particolare la MDA, sono in grado di legarsi alle proteine endogene e formare addotti stabili, utili markers di avvenuta perossidazione lipidica. Alcuni studi hanno dimostrato che il danno ossidativo nei pazienti con epatite cronica C e/o malattia alcolica è associato allo sviluppo di anticorpi IgG circolanti diretti contro epitopi derivati dalle proteine modificate dai prodotti di perossidazione lipidica (addotti proteine-MDA) (53). Tali autoanticorpi correlano con la severità di malattia nell'epatite cronica C (53) e sono stati recentemente identificati come fattori predittivi indipendenti di sviluppo di fibrosi avanzata nella NAFLD (54). È stato dimostrato, inoltre, che lo stress ossidativo è in grado di generare, oltre che una risposta immune di tipo umorale, anche una risposta cellulare T CD4+ diretta contro gli addotti proteine-MDA, strettamente correlata alla produzione dei sopraccitati anticorpi IgG, e verosilmente espressione di meccanismo immuno-mediato di danno epatico evocato dalla presenza di stress ossidativo (55).

In aggiunta, in corso di epatite cronica C, è stata dimostrata la presenza di reazioni autoimmuni dirette contro diversi isoenzimi della superfamiglia del citocromo P450; in particolare autoanticorpi diretti contro epitopi del citocromo P450 2D6 (CYP2D6) sono presenti in circa il 10% dei pazienti con epatite cronica C (56;57), e autoanticorpi anti-citocromo P450 2A6 (CYP2A6) sono stati riscontrati nel 2-8% dei casi, soprattutto in associazione con gli autoanticorpi LKM-1 (58).

Uno studio condotto dal nostro gruppo ha documentato una prevalenza del 40% di elevati titoli anticorpali anti-citocromo P450 2E1 (CYP2E1), al disopra del 97° percentile della popolazione controllo, in pazienti affetti da epatite cronica C e ha osservato come la presenza di livelli elevati di autoanticorpi anti-CYP2E1 si associ ad epatite più severa.

La risposta immune umorale generata dallo stress ossidativo e autoimmune ed il loro eventuale impatto nel setting del trapianto non sono ancora stati indagati.

Obiettivi del sotto-progetto 2 sono i seguenti

- Identificazione dei marcatori serici di danno ossidativo nel post-trapianto.
- Valutazione dell'eventuale risposta immune umorale (anticorpi IgG) diretta contro proteine modificate dai marcatori di perossidazione lipidica.
- Valutazione dell'eventuale risposta autoimmune umorale (autoanticorpi IgG) diretta contro proteine endogene (isoenzimi della superfamiglia del citocromo P450).
- Valutazione dell'impatto del danno ossidativo sulla progressione dell'epatopatia C post-trapianto mediante correlazione con danno istologico, eventuale presenza di cofattori clinici, caratteristiche del ricevente e terapia immunosoppressiva.

3) Ottimizzazione del monitoraggio post-trapianto della progressione di fibrosi

La diagnosi di recidiva di epatite C si basa principalmente sulla biopsia epatica, utile sia quando vi sia un sospetto clinico che quando il paziente presenti le transaminasi normali (59). Esiste infatti, una quota di pazienti stimabile dal 30 al 50% viremici senza malattia epatica e pazienti con epatite cronica ed indici epatici nella norma. Le transaminasi sono indici aspecifici, potendo essere alterate per cause non legate alla recidiva di epatite C. La biopsia epatica a cadenza ravvicinata (semestrale/annuale) è inoltre necessaria per valutare la progressione del danno epatico verso la fibrosi. Il livello di viremia è solitamente superiore rispetto al pre-trapianto e può essere utilizzato per predire l'evoluzione e monitorare la terapia (60).

Recentemente, sono stati sviluppati na ulteriore modalità per misurare la comparsa di fibrosi epatica é una tecnica d'immagine, l'elastografia pulsionale (Fibroscan®), basata sulla valutazione indiretta della elasticità del tessuto epatico mediante misurazione della velocità di propagazione di

onde trasversali a bassa frequenza (61), che appare in studi preliminari correlata al grado di fibrosi (62-65).

Obiettivo del sotto-progetto 3 è:

Ottimizzazione del monitoraggio post-trapianto nella valutazione della progressione di fibrosi: confronto di biopsia epatica vs Fibroscan® effettuati a tempi prestabiliti.

Fasi principali, protocolli e metodologie

Le fasi principali dello studio prospettico prevedono:

- 1) Raccolta caratteristiche clinico-epidemiologiche del donatore e del ricevente
- 2) Raccolta di campioni biologici di siero, plasma e tessuto epatico nei riceventi HCV positivi e in un gruppo di controllo non-HCV
- 3) Follow-up clinico-strumentale protocollare dei pazienti in studio
- 4) Studio biologico dei campioni raccolti
- 5) Creazione di un database epatite C-trapianto e cofattori e analisi dei dati raccolti.

PAZIENTI

Pazienti consecutivi sottoposti a trapianto di fegato per cirrosi/epatocarcinoma da HCV a partire dal Gennaio 2005 presso il Centro Trapianti di Fegato del Policlinico Maggiore di Milano e pazienti controllo sottoposti a trapianto di fegato per cirrosi/epatocarcinoma non da HCV dal Gennaio 2005 per 24 mesi.

Arruolamento in corso, previsto 50 pazienti.

Studio dei riceventi:

- Raccolta delle caratteristiche clinico-epidemiologiche e stato virologico pre-trapianto
- Stoccaggio del materiale biologico a -80 C° al momento del trapianto (siero e fegato nativo) per indagini virologiche ed immunopatologiche
- Stoccaggio dei campioni di sangue post-trapianto al giorno 1°,7°,15°,30°, mese 3°,6°,12° ed annualmente per la valutazione della cinetica virale ed immunologica.
- Immunotipizzazione HLA
- Monitoraggio post-trapianto clinico e laboratoristico (esami ematochimici, inclusi indici di funzione epatica, renale, esame emocromocitometrico, parametri di coagulazione, profilo marziale)
- Determinazione dei parametri metabolici secondo i criteri diagnostici della Sindrome Metabolica (ATPIII-NCEP) e determinazione insulinoresistenza (HOMA) pre e post-trapianto
- Biopsia epatica di protocollo al 6°, 12° mese, annuale e su richiesta clinica
- Ecotomografia di protocollo al 3°, 6°, 12° mese, annuale e su richiesta clinica
- Elastografia/Fibroscan® di protocollo al 3°, 6°, 9° e 12° mese, e annuale
- Colangio-RM di protocollo al 6° e 12° mese post-trapianto.

Studio dei donatori:

- Raccolta delle caratteristiche clinico-epidemiologiche (sesso, età, causa di morte,).

- Immunotipizzazione HLA
- Esame istologico del graft per la valutazione del grado di steatosi
- Ricerca marcatori sierologici di infezione virale.
- Il materiale biologico (siero e fegato nativo) viene stoccato a -80°C al momento del trapianto.

STUDIO BIOLOGICO

Laboratorio di immunopatologia, istologia epatica e biologia molecolare (Unità di Gastroenterologia, IRCCS Ospedale Maggiore di Milano)

- Routine istologica con sistema di analisi di immagine computerizzato per determinazione e quantificazione delle reazioni immunoistochimiche (caratterizzazione dell'infiltrato CD4/CD8; proliferazione cellulare con PCNA-LI, apoptosi con Tunel).
- Diagnosi di epatite C viene effettuata secondo criteri internazionalmente accettati (66); il grado di steatosi quantificato sulla base della percentuale di epatociti steatosici.
- Determinazione degli autoanticorpi (ANA, SMA, LKM) mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta sia su substrato di ratto che su cellule Hep-2 e tecnica Western blot per lo studio delle specificità antigeniche.
- Estrazione dell'RNA totale da campioni di siero e tessuto congelati a -80° (Mini kit commerciali).
- RT-PCR con primer commerciali per la determinazione qualitativa dell'HCV-RNA; quantificazione della viremia C mediante tecnica del branched-DNA (2.0, Quantiplex, Emeryville,CA).

Laboratorio di Patologia, Dipartimento di Scienze Mediche (Prof. Emanuele Albano, Università del Piemonte Orientale)

- Tests ELISA su sieri per la quantificazione della produzione di IgG dirette contro epitopi derivati da proteine modificate dai prodotti di perossidazione lipidica o ossidate, e contro il citocromo P450 2E1 ricombinante umano.

[Si utilizzano piastre ELISA ibridate con albumina umana nativa e addotti albumina umana-malonildialdeide, albumina umana-lipoperossido, cardiolipina ossidata. In presenza di anticorpi anti-addotti o anti-CYP2E1 nel siero dei pazienti si ha la formazione di un legame antigene-anticorpo, rivelato con l'utilizzo di un anticorpo secondario marcato].

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica verrà effettuata mediante software SPSS. Le differenze tra i diversi gruppi di pazienti verranno testate mediante tests non parametrici (Mann-Whitney test) o Chi-square. Verranno eseguite analisi univariata e multivariata.

Risultati attesi

Identificazione di pazienti con recidiva di infezione C a maggior rischio di sviluppare malattia progressiva sulla base di uno o più dei seguenti fattori :

- sfavorevole matching donatore-ricevente
- risposta immune umorale collegata al danno ossidativo e/o risposta autoimmune
- evidenza di comorbidità a potenziale profibrogenico.

Studio del danno ossidativo e della risposta autoimmune: risultati preliminari

Per quanto riguarda lo studio del danno ossidativo e della risposta autoimmune è stata avviata un'analisi preliminare retrospettiva con inclusione di pazienti consecutivi sottoposti a trapianto di fegato dal Gennaio 2002 aventi biopsia epatica e siero a 12 mesi dal trapianto (al fine di ottenere una casistica più ampia da valutare preliminarmente in attesa di completare la raccolta prospettica dei campioni).

Sono stati inclusi 38 pazienti (31 maschi, 7 femmine) sottoposti a trapianto per cirrosi HCV-correlata (tutti con infezione da HCV ricorrente post-trapianto) e 20 pazienti (16 maschi, 4 femmine) sottoposti a trapianto per cirrosi HBV-correlata. Tra questi ultimi nessuno presentava ricorrenza dell'infezione da HBV post-trapianto, uno era affetto da steatoepatite non alcolica post-trapianto.

I sieri stoccati a 12 mesi dal trapianto, in concomitanza con l'esecuzione della biopsia epatica, sono stati analizzati con test ELISA (come indicato nei metodi) per la ricerca di alloanticorpi IgG diretti contro addotti albumina umana-malonildialdeide, albumina umana-lipoperossido, cardiolipina ossidata e per la ricerca di autoanticorpi IgG anti-CYP2E1

L'analisi dei sieri a 12 mesi dal trapianto ha documentato la presenza di una prevalenza di alloanticorpi anti-proteine modificate dai prodotti di perossidazione lipidica o ossidate e autoanticorpi anti-CYP2E1 superiore nei pazienti HCV rispetto ai pazienti HBV.

Nei pazienti HCV la positività anticorpale per due-tre proteine modificate dallo stress ossidativo è associata a più elevato score infiammatorio dell'epatite (grading, $P=0.026$) e più elevato score di fibrosi (staging, $P=0.019$). La positività per autoanticorpi anti-CYP2E1 si associa a più elevato grading necroinfiammatorio ($P=0.035$) e il titolo autoanticorpale anti-CYP2E1 è correlato a al grading infiammatorio ($r=0.37$, $P=0.021$). Il cut-off arbitrario di 0.4 o.d. del titolo IgG anti-CYP2E1 identifica i pazienti ad aumentato rischio di sviluppare epatite con elevato grading necroinfiammatorio (grading sec.Ishak ≥ 8 , OR=11.3, IC 95% 2-63.6).

Lo studio preliminare sembrerebbe pertanto confermare l'ipotesi di lavoro per cui la risposta anticorpale evocata dallo stress ossidativo e la risposta autoimmune si associno a più severa recidiva epatica C.

Reference List

1. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35(5):666-678.
2. Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S1-S9.
3. Gane E. The natural history and outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-infected recipients. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S28-S34.
4. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32(4 Pt 1):852-858.
5. Berenguer M, Prieto M, Palau A, Rayon JM, Carrasco D, Juan FS et al. Severe recurrent hepatitis C after liver retransplantation for hepatitis C virus-related graft cirrhosis. *Liver Transpl* 2003; 9(3):228-235.
6. Berenguer M. What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J Hepatol* 2005; 42(4):448-456.
7. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, Everhart J, Zetterman R, Lake J et al. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28(3):823-830.
8. McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40(3):368-374.
9. Pelletier SJ, Raymond DP, Crabtree TD, Berg CL, Iezzoni JC, Hahn YS et al. Hepatitis C-induced hepatic allograft injury is associated with a pretransplantation elevated viral replication rate. *Hepatology* 2000; 32(2):418-426.
10. Charlton M. Liver biopsy, viral kinetics, and the impact of viremia on severity of hepatitis C virus recurrence. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S58-S62.
11. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M et al. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000; 32(4):673-684.
12. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Mishiro S, Maertens G et al. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995; 108(4):1088-1096.
13. Gigou M, Roque-Afonso AM, Falissard B, Penin F, Dussaix E, Feray C. Genetic clustering of hepatitis C virus strains and severity of recurrent hepatitis after liver transplantation. *J Virol* 2001; 75(23):11292-11297.
14. Burak KW, Kremers WK, Batts KP, Wiesner RH, Rosen CB, Razonable RR et al. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8(4):362-369.
15. Berenguer M. Host and donor risk factors before and after liver transplantation that impact HCV recurrence. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S44-S47.

16. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayon JM, Martinez F, Carrasco D et al. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36(1):202-210.
17. Machicao VI, Bonatti H, Krishna M, Aqel BA, Lukens FJ, Nguyen JH et al. Donor age affects fibrosis progression and graft survival after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 2004; 77(1):84-92.
18. Russo MW, Galanko JA, Zacks SL, Beavers KL, Fried MW, Shrestha R. Impact of donor age and year of transplant on graft survival in liver transplant recipients with chronic hepatitis C. *Am J Transplant* 2004; 4(7):1133-1138.
19. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Greenberg HB, Wright TL. Hepatitis C virus and the host: An imbalance induced by immunosuppression? *Hepatology* 2000; 32(2):433-435.
20. Berenguer M. Outcome of posttransplantation hepatitis C virus disease--is it the host, the virus, or how we modify the host and/or the virus? *Liver Transpl* 2002; 8(10):889-891.
21. Papatheodoridis GV, Davies S, Dhillon AP, Teixeira R, Goulis J, Davidson B et al. The role of different immunosuppression in the long-term histological outcome of HCV reinfection after liver transplantation for HCV cirrhosis. *Transplantation* 2001; 72(3):412-418.
22. Lake JR. The role of immunosuppression in recurrence of hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S63-S66.
23. McCaughan GW, Zekry A. Impact of immunosuppression on immunopathogenesis of liver damage in hepatitis C virus-infected recipients following liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S21-S27.
24. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122(4):889-896.
25. Lake JR, Shorr JS, Steffen BJ, Chu AH, Gordon RD, Wiesner RH. Differential effects of donor age in liver transplant recipients infected with hepatitis B, hepatitis C and without viral hepatitis. *Am J Transplant* 2005; 5(3):549-557.
26. De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(3):291-295.
27. Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della LG, Marafin C, Lecis E et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22(4):449-456.
28. Kageyama F, Kobayashi Y, Kawasaki T, Toyokuni S, Uchida K, Nakamura H. Successful interferon therapy reverses enhanced hepatic iron accumulation and lipid peroxidation in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(4):1041-1050.
29. Paradis V, Mathurin P, Kollinger M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Piton A et al. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. *J Clin Pathol* 1997; 50(5):401-406.
30. Burke A, FitzGerald GA, Lucey MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation* 2002; 74(2):217-221.

31. Arenas JI, Gallegos-Orozco JF, Laskus T, Wilkinson J, Khatib A, Fasola C et al. Hepatitis C virus quasi-species dynamics predict progression of fibrosis after liver transplantation. *J Infect Dis* 2004; 189(11):2037-2046.
32. Tung BY, Kimmey MB. Biliary complications of orthotopic liver transplantation. *Dig Dis* 1999; 17(3):133-144.
33. Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA et al. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity. *Surgery* 2005; 138(2):313-320.
34. Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:d496-d503.
35. Wasser S, Tan CE. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann Acad Med Singapore* 1999; 28(1):109-111.
36. Burke A, Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(5):686-693.
37. Delgado-Borrego A, Casson D, Schoenfeld D, Somsouk M, Terella A, Jordan SH et al. Hepatitis C virus is independently associated with increased insulin resistance after liver transplantation. *Transplantation* 2004; 77(5):703-710.
38. Zekry A, McHutchison JG, Diehl AM. Insulin resistance and steatosis in hepatitis C virus infection. *Gut* 2005; 54(7):903-906.
39. Wyatt J, Baker H, Prasad P, Gong YY, Millson C. Steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol* 2004; 57(4):402-406.
40. Fartoux L, Poujol-Robert A, Guechot J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2005; 54(7):1003-1008.
41. Fartoux L, Chazouilleres O, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41(1):82-87.
42. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology* 2003; 125(6):1695-1704.
43. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16(5):663-678.
44. Kumar D, Farrell GC, Fung C, George J. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology* 2002; 36(5):1266-1272.
45. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38(1):75-85.
46. Patton HM, Patel K, Behling C, Bylund D, Blatt LM, Vallee M et al. The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004; 40(3):484-490.

47. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A et al. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* 1997; 64(4):594-598.
48. Wolf A, Trendelenburg CF, Diez-Fernandez C, Prieto P, Houy S, Trommer WE et al. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280(3):1328-1334.
49. Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994; 19(5):1262-1271.
50. Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A et al. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40(1):60-68.
51. Parola M, Pinzani M, Casini A, Leonarduzzi G, Marra F, Caligiuri A et al. Induction of procollagen type I gene expression and synthesis in human hepatic stellate cells by 4-hydroxy-2,3-nonenal and other 4-hydroxy-2,3-alkenals is related to their molecular structure. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222(2):261-264.
52. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194(3):1044-1050.
53. Rigamonti C, Mottaran E, Reale E, Rolla R, Cipriani V, Capelli F et al. Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38(1):42-49.
54. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; 54(7):987-993.
55. Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DE. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 39(1):197-203.
56. Strassburg CP, Vogel A, Manns MP. Autoimmunity and hepatitis C. *Autoimmun Rev* 2003; 2(6):322-331.
57. Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22(4):339-352.
58. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S et al. Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003; 39(5):800-806.
59. Berenguer M, Rayon JM, Prieto M, Aguilera V, Nicolas D, Ortiz V et al. Are posttransplantation protocol liver biopsies useful in the long term? *Liver Transpl* 2001; 7(9):790-796.
60. Berenguer M, Aguilera V, Prieto M, Carrasco D, Rayon M, San Juan F et al. Delayed onset of severe hepatitis C-related liver damage following liver transplantation: a matter of concern? *Liver Transpl* 2003; 9(11):1152-1158.

61. Blanc JF, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A. Investigation of liver fibrosis in clinical practice. *Hepatol Res* 2005.
62. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (Fibroscan(R)): a prospective study. *Gut* 2005.
63. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41(1):48-54.
64. Saito H, Tada S, Nakamoto N, Kitamura K, Horikawa H, Kurita S et al. Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2004; 29(2):97-103.
65. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(12):1705-1713.
66. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22(6):696-699.

DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DI CERTIFICAZIONE

(Art.2 della Legge 4 gennaio 1968, n. 15, come modificato dall'art.3 punto 10 della Legge 15 maggio 1997, n.127 e dal regolamento attuativo degli artt. 1 – 2 – 3 della Legge n. 127)

La sottoscritta Cristina Rigamonti, nata a Novara il 12/04/74, residente a Pernate (Novara) in Via Coppa 4, consapevole delle responsabilità e delle pene stabilite dalla legge per false attestazioni e mendaci dichiarazioni, sotto la sua personale responsabilità (art. 26 L. 4.1.1968, n.15).

DICHIARA

che il contenuto della presente Relazione corrisponde a verità e si obbliga a provarlo nei termini e con le modalità di legge.

In Fede

Dr Cristina Rigamonti

Novara, 29 Settembre 2006