

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XIX***

Relazione IV° anno

TITOLO:

**CLONAGGIO ED ESPRESSIONE DELLA PROTEINA CORE DELL'HCV E
MESSA A PUNTA DI UN SISTEMA DI CULTURA EPATOCITARIA**

Candidato: dr CARLO SMIRNE

Tutor: Prof. MARIO PIRISI

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite C (HCV) è una delle principali cause dell'epatite cronica ad eziologia virale. Circa l'80% dei soggetti infetti da HCV manifesta una cronicizzazione dell'infezione con lo sviluppo nel 15-20% di cirrosi e/o epatocarcinoma (HCC), dopo 20-30 anni dall'infezione.

Per HCV non è stato finora messo a punto un sistema stabilizzato di infezione in vitro con produzione di progenie virale infettante. Per questo motivo rimangono ancora da chiarire le caratteristiche dell'interazione tra HCV ed epatocita, sua cellula bersaglio primaria, per quanto concerne sia molti aspetti biologici del ciclo vitale del virus, sia gli effetti funzionali e patogenetici della replicazione virale a livello cellulare (compreso il possibile sviluppo di HCC). Una delle possibili cause del mancato sviluppo di un modello di infezione di HCV è senza dubbio che le linee di epatociti in uso presentano modeste analogie con le cellule epatiche in vivo. Lo sviluppo di un sistema stabilizzato di replicazione di HCV in epatociti, oltre a poter chiarire i punti suddetti, permetterebbe di allestire prove in vitro per la valutazione dell'efficacia di farmaci antivirali e della capacità neutralizzante degli anticorpi anti-HCV, dati con rilevanti implicazioni dal punto di vista terapeutico e di strategia vaccinale.

Modello di rigenerazione epatica e citochine

Sin dall'antichità è stata riconosciuta al fegato la peculiarità di essere un organo in grado di rigenerare il proprio parenchima dopo un danno, come testimoniato dal mito greco di Prometeo, il gigante che donò il fuoco al genere umano. Come punizione per quest'atto Zeus lo condannò infatti a aver divorato ogni giorno, da un'aquila, il proprio fegato, che tuttavia si rigenerava nel corso di ogni notte fornendo all'aquila eterno nutrimento ed a Prometeo eterno supplizio. La straordinaria capacità del fegato a rigenerare ha fatto ipotizzare l'esistenza di una cellula progenitrice (in inglese, stem cell), sebbene tuttora sostenuta da alcuni autori, non ha tuttavia trovato chiare verifiche sperimentali. Recentemente, i meccanismi che presiedono e controllano la rigenerazione epatica sono stati estesamente indagati e parzialmente chiariti grazie allo sviluppo di modelli sperimentali animali. Tra questi l'induzione di un' insufficienza epatica acuta mediante epatectomia parziale (PHx, 70% del parenchima) ha fornito le maggiori informazioni circa gli eventi e la cascata di reazioni che precedono e stimolano la rigenerazione.

La rigenerazione ha sempre inizio nella zona 1 o regione periportale e procede verso la zona 2 o centrolobulare in 36-48 ore. La restante popolazione cellulare epatica (fibroblasti, cellule endoteliali etc.) inizia la sintesi di DNA solo a distanza di circa 24 ore dall'inizio della replicazione epatocitaria, a suggerire un ruolo diretto degli epatociti nel pilotare, tramite la produzione di fattori di crescita, la proliferazione degli altri tipi cellulari. Gli eventi molecolari più precoci dopo PHx interessano la membrana cellulare che, dopo soli 5 minuti, presenta un incremento del numero di recettori per l'urokinasi ed un incremento dell'attività di tale enzima. Nei primi 30 minuti dopo l'intervento si verifica inoltre l'espressione di numerosi geni chiamati "immediate early genes" quali la proteina legante insulin-like growth factors I (IGF1-BP), il signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), lo active nuclear factor kappa B (NF-kB), enhanced binding protein- α e β (cEBP α e cEBP β), hepatic associated transcription factors come hepatic nuclear factor 1, 4 e 3 (HNF1, HNF4, HNF3), tutti implicati nel meccanismo della replicazione. L'espressione di "markers fetali" quali α FP ed isoenzimi fetali di aldolasi e piruvato-kinasi riappare in corso di rigenerazione, per annullarsi nuovamente ad una settimana circa dalla resezione. Citochine, fattori di crescita, ormoni svolgono anch'essi un ruolo chiave fin dalle prime ore del post intervento; hepatocyte growth factor (HGF), (TNF), interleuchina-6 (IL6), epidermal growth factor (EGF) e tumor growth factor α (TGF α), insulina e norepinefrina sono solo alcuni dei fattori che regolano, con successione cronologica precisa, la proliferazione e la differenziazione cellulare.

Modelli in vitro attualmente disponibili di colture epatocitarie

Negli ultimi 15 anni vi è stato un notevole incremento del numero delle pubblicazioni inerenti lo sviluppo di sistemi di coltura epatocitari. Numerosi sono infatti i vantaggi che tale sistema sperimentale è in grado di offrire, almeno da un punto di vista teorico: in primo luogo il risparmio del sacrificio di animali di laboratorio, elemento di attualità e dibattuto sia in ambito scientifico che, più in generale, nell'opinione pubblica. Anche se si superassero le considerazioni etiche, il ricorso alla sola sperimentazione animale comunque non annullerebbe i rischi derivanti dalle differenze metaboliche presenti nelle diverse specie: i ratti, per esempio, sono un modello inattendibile per quanto concerne il metabolismo di fase I nell'uomo. Ciò comporta, ad esempio, che solo dopo l'introduzione di un farmaco nell'uso clinico è possibile avere piena conoscenza sulla sua reale epatotossicità. Essendo il metabolismo dei farmaci una delle principali funzioni del fegato, un attendibile sistema sperimentale in vitro consentirebbe di verificare la tossicità di molecole di nuova sintesi.

Il modello sperimentale ideale sarebbe quello che ricrei perfettamente l'organizzazione tridimensionale del parenchima epatico, preservi la totalità delle funzioni metaboliche, consenta la raccolta e l'analisi della bile, e mantenga le cellule polarizzate e vitali per lungo tempo. Per tale motivo in passato si è tentato il ricorso a sistemi sperimentali quali il fegato isolato perfuso e, più recentemente, alle sezioni tissutali. Il primo modello presenta il vantaggio di essere assimilabile alla situazione presente in vivo; la struttura tridimensionale è preservata, la struttura biliare è presente e strutturalmente integra, è possibile la raccolta di bile. Le limitazioni che tale modello presenta sono legate alla difficoltà nel reperimento di organi umani da destinare a tale utilizzo, nella difficoltà di messa appunto del sistema stesso, nella brevità del mantenimento dell'integrità funzionale e nell'impossibilità di studiare più composti nello stesso sistema sperimentale. Le sezioni tissutali prevedono la preservazione di una struttura lobulare, ma, pur richiedendo modeste quantità di tessuto umano (l'equivalente di un frustolo da biopsia epatica percutanea), hanno una sopravvivenza limitata (meno di dieci ore) e non consentono lo studio e l'analisi della bile.

I modelli sperimentali alternativi rispetto a quelli sopra elencati hanno tutti la caratteristica di presentare le cellule in monostrato, con la perdita quindi delle interazioni presenti in vivo nella struttura tridimensionale. Un vantaggio offerto da queste colture è tuttavia la loro estrema semplicità: si tratta abitualmente di modelli costituiti da un unico tipo di cellula, funzionalmente integra, vitale ma posizionata al di fuori dell'organismo. Questo implica la possibilità di indagare le funzioni cellulari più fini, le diverse interazioni molecolari ed attività enzimatiche estraniandole da un contesto generale nel quale alcune informazioni potrebbero essere mascherate o minimizzate dalla presenza di inibitori oppure dall'effetto del metabolismo sistemico. Essendo il sistema così semplice, esso risulta inoltre facilmente modulabile, il che consente di creare condizioni di coltura adattabili alle necessità della sperimentazione.

Il modello in vitro oggi più largamente utilizzato è rappresentato dalla coltura primaria di epatociti. Con tale termine si usano indicare colture di cellule originate direttamente dall'organismo, che non sono andate necessariamente incontro a replicazione in vitro. Le colture primarie offrono il vantaggio della semplicità di preparazione e della possibilità di mantenere, fino a circa 72 ore dal loro isolamento, caratteristiche di polarizzazione e differenziazione. Il loro principale svantaggio consiste però proprio nel limitato arco di tempo nel quale la sperimentazione può essere condotta in condizioni di omogeneità del sistema sperimentale.

Nonostante la nota capacità rigenerativa del fegato, solo nel 1981 si giunse allo sviluppo della prima linea cellulare umana, le Hep-G2, ottenute da fegato neoplastico: la disponibilità di tale linea portò ad un notevole sviluppo degli studi inerenti gran parte delle funzioni epatocitarie. Tuttavia più le ricerche progredivano, più diveniva evidente che le Hep-G2, in quanto cellule neoplastiche, si distaccavano dalla normalità, risultando prive di alcune fondamentali funzioni presenti in vivo e di alcuni aspetti di differenziazione indispensabili per l'interazione con molecole o virus. Pertanto la necessità di un sistema colturale "normale" divenne sempre più urgente e si tentò di rimediare alla difficoltà di indurre la replicazione di epatociti posti in coltura primaria inserendo stimoli mitogeni

nel sistema di coltura o all'interno delle cellule stesse. Utilizzando metodiche quali la cocoltura con cellule epiteliali di ratto ed il ricorso alla transfezione con oncogeni virali o con geni di origine virale (Simian virus 40 large tumor antigen gene), fu possibile ottenere la crescita e "l'immortalizzazione" di tali cellule in coltura, senza tuttavia consentire il mantenimento, in vitro, di tutti gli aspetti di differenziazione. Negli ultimi anni, infine, è stato pubblicato il primo lavoro relativo allo sviluppo di una coltura epatocellulare umana normale: tali epatociti venivano descritti come in grado di mantenere, dopo più di un anno di coltura continua, la morfologia e le funzioni proprie degli epatociti differenziati. Tuttavia, a rigore, le cellule non potevano essere definite normali, in quanto l'esame del cariotipo aveva rivelato numerose anomalie quali poliploidia e delezioni significative nella struttura cromosomica. I nuovi sviluppi nel campo della coltura cellulare si intrecciano sempre più strettamente ai progressi nel campo tecnologico: sono state infatti recentemente messe a punto tecnologie, mediate dall'esperienza aerospaziale americana, che consentono di ricreare condizioni di gravità ed interazione cellule-matrice extracellulare tali da consentire la crescita tridimensionale in vitro. Questa nuova metodica, che utilizza bioreattori microgravitari, annulla l'effetto che la gravità esercita sulle cellule al momento del piastramento. Le cellule in sospensione vengono poste, insieme ai componenti della matrice, in un cilindro connesso ad un sistema di ossigenazione ed a contatto con il terreno di crescita. La rotazione applicata sul cilindro è tale da annullare gli effetti dati dalla viscosità sulla velocità di flusso, rendendo la soluzione un tutt'uno che ruota a velocità costante, mantenendo interazioni costanti con le cellule o la matrice circostante. In tal modo è possibile ricostruire all'interno di tali bioreattori delle strutture tridimensionali che si mantengono vitali per lungo tempo in coltura. Pur essendo impossibile ricreare le strutture biliare e vascolare, questa tecnica di coltura consentirebbe di ottenere un'organizzazione tridimensionale del parenchima con probabile piena espressione e compartimentalizzazione delle diverse funzioni secretorie.

SCOPO DEL LAVORO

Nel corso dei precedenti anni del dottorato abbiamo cercato di caratterizzare le diverse modalità di espressione della proteina core dell'HCV in linee cellulari immortalizzate.

Per meglio definire il possibile ruolo della proteina core nello sviluppo di epatocarcinoma (obbiettivo finale degli studi che abbiamo in corso), abbiamo quindi provato a mettere a punto di un sistema di epatociti normali in coltura, nel tentativo di sviluppare condizioni il più possibile simili a quelle fisiologiche; tale sistema, se si rivelerà funzionale, sarà successivamente trasfettato mediante vettori virali ricombinanti contenenti il core.

In sintesi gli obbiettivi che ci siamo proposti sono:

A) definizione delle condizioni di coltura che possono consentire lo sviluppo di un sistema epatocellulare, in grado di mantenere le caratteristiche morfologiche e funzionali proprie degli epatociti differenziati;

B) caratterizzazione di tale sistema in termini di integrità genomica e di modulazione della crescita in specifiche condizioni sperimentali.

MATERIALI E METODI

Paziente

Un frammento di tessuto epatico del peso approssimativo di 5 g, è stato ottenuto chirurgicamente da un paziente maschio di 61 anni (M.R.), affetto da carcinoma del colon (stadio II di Dukes) nel corso di un intervento di resezione eseguito presso l'Istituto di Clinica Chirurgica dell'Università di Udine. Il paziente aveva fornito il proprio consenso informato per l'esecuzione della biopsia ed il suo successivo utilizzo per lo sviluppo di una coltura primaria.

Terreni

A) Terreno di coltura

Il mezzo di coltura utilizzato per stimolare la crescita epatocitaria è stato denominato HCM (Hepatocyte Culture Medium) ed è costituito da un terreno base (Ham F12, GIBCO), commercialmente disponibile, nella cui composizione sono presenti tutti gli aminoacidi, sali minerali (calcio, rame, ferro, potassio, magnesio, zinco), vitamine, composti organici ed inorganici di diversa natura. A tale terreno-base vengono aggiunti alcuni elettroliti (sali di calcio, magnesio, bicarbonato di sodio e glucosio) ed alcuni componenti specifici per la crescita di epatociti, tra cui:

- Siero bovino fetale (GIBCO)
- Insulina (Elanco), Transferrina (Sigma), Idrocortisone (Sigma), Glicil-Istidil-Lisina (Sigma) e Somatostatina (Sigma), un gruppo di sostanze denominato 5H
- Estratti di ipotalamo ed ipofisi (tessuti forniti dalla Pel Freez Biologicals, Rogers, Arkansas)
- Triiodotironina (Sigma)
- Rosso fenolo (Sigma)
- Streptomina (Gibco)
- Penicillina (Gibco)
- L-ornitina (1-2.5 Diaminopentanoic acid) (Sigma)

B) Terreno di differenziamento

Un diverso tipo di terreno è stato messo a punto al fine di ottenere la sopravvivenza a lungo termine delle cellule in coltura ma nel contempo un arresto della crescita cellulare. Il risultato atteso dal suo utilizzo era una maggiore differenziazione cellulare, con aumento dell'espressione di recettori di superficie, attivazione di vie metaboliche mantenute silenziose nel corso della replicazione, aumento delle granulazioni di glicogeno intracitoplasmatiche e quindi maggiore disponibilità di substrati per reazioni enzimatiche di ogni ordine.

Le modificazioni introdotte in tale terreno erano da un lato la sua semplificazione, ottenuta rimuovendo gli estratti di ipotalamo ed ipofisi ed il siero bovino e riducendo le concentrazioni ormonali, e dall'altro la modificazione delle concentrazioni di ioni, soprattutto Calcio e Magnesio, e di glucosio. Tale medium modificato è stato denominato HCM MOD.

Soluzioni

A) MOSH. Il MOSH o Calcium and Magnesium free Hank's balance salt solution rappresenta una soluzione tamponata estesamente utilizzata in tutte le operazioni che richiedano il risciacquo delle cellule o il loro mantenimento, per brevi periodi, fuori dell'incubatore senza medium.

B) CTC. Tale soluzione è stata utilizzata per il passaggio cellulare, ovvero per staccare le cellule adese alla superficie della piastra, minimizzando gli eventuali danni alla membrana citoplasmatica. La composizione base di tale soluzione è data da tripsina e collagenasi la cui azione tossica viene ridotta dall'aggiunta di siero di pollo. La composizione di un litro della soluzione è la seguente:

C) Hank's V stock solution. Tale soluzione costituisce fundamentalmente un sistema tampone atto a ricreare, in vitro, le caratteristiche elettrolitiche proprie dei fluidi biologici. Si tratta di uno dei costituenti base di un gran numero di soluzioni utilizzate nella colture cellulari.

Al fine di garantirne la sterilità, al momento della preparazione tutte le soluzioni su indicate, compresi i terreni, sono state fatte passare attraverso un filtro di diametro 0.2 µ.

Colture

A) Allestimento della coltura primaria

Il tessuto, è stato sospeso in MOSH, e quindi, dopo rimozione della capsula e dei frammenti vascolari di maggiori dimensioni, è stato frazionato meccanicamente prima di dare inizio alla sua digestione enzimatica con CTC, proseguita per due ore. Al termine, dopo una centrifugazione a 1000 rpm, condotta per 5 minuti, il soprannatante è stato aspirato ed eliminato, mentre il pellet cellulare è stato risospeso in terreno fresco e insemato in 6 piastre per coltura primaria. Circa 8 ml di terreno fresco HCM sono stati aggiunti in ciascuna delle piastre: il primo cambio è stato

Condizioni di coltura: le piastre sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C e con il 5% di CO₂. Il terreno (HCM) è stato cambiato due volte alla settimana, aggiungendo ad ogni cambio 8 ml di soluzione fresca.

B) Colture secondarie

Colonie cellulari epiteliali di aspetto poligonale sono state demarcate e successivamente isolate mediante uso di cilindri per clonaggio (“cloning cylinders”). Cilindri costituiti da materiale plastico sono stati sigillati alla base con grasso di silicone ed infine fatti aderire alla superficie della piastra, nelle zone precedentemente marcate. Il CTC è stato aggiunto fino al massimo volume consentito dal cilindro, e le piastre sono infine state riposizionate all’interno dell’incubatore per circa 30 minuti, fino cioè al completo distacco del monostrato cellulare. Infine la soluzione è stata aspirata ed il contenuto posizionato in piastre del diametro di 60 mm, cui erano stati precedentemente aggiunti 4 ml di terreno fresco.

Quando invece la crescita delle cellule all’interno delle piastre, primarie e secondarie, era giunta a confluenza, il passaggio è stato eseguito secondo un diverso protocollo. Il terreno veniva infatti aspirato e si procedeva ad un lavaggio della superficie cellulare con MOSH (8 ml circa). Dopo un minuto circa si procedeva all’aspirazione del MOSH e 2.5 ml di CTC (per piastre del diametro di 100 mm) venivano posizionati e lasciati agire per circa 1 ora in incubatore a 37 °C. La centrifugazione e la risospensione delle cellule sono state eseguite secondo quanto precedentemente descritto: il rapporto di ripiastramento è stato abitualmente di 1:4.

Curve di crescita

L’analisi dei parametri di crescita della nostra coltura è stata eseguita tramite la costruzione di “curve di crescita” dopo circa 10 generazioni cellulari. Per ognuno dei tempi considerati sono state preparati campioni cellulari in triplicato: il passaggio e la successiva conta cellulare sono stati eseguiti ogni due giorni. Sulla base dei grafici ottenuti sono stati desunti i parametri di crescita della popolazione mediante il calcolo del numero di duplicazione della popolazione (PDL). Il PDL indica il numero di generazioni compiute dalla popolazione, nell’intervallo di tempo considerato.

Nella fase di crescita logaritmica della curva, si considera un tratto approssimabile ad una retta; riferendosi ai valori corrispondenti ai giorni estremi del tratto considerato si può applicare la formula $N_f/N_i=2^x$, dove N_f è il numero finale di cellule, N_i è il numero iniziale, x è il Population duplication level (PDL).

Il tempo di duplicazione delle cellule in esame è il tempo necessario perché la popolazione cellulare raddoppi il numero dei suoi elementi ovvero perché una cellula origini due cellule figlie. Questo viene desunto considerando un intervallo di tempo, nella fase di crescita logaritmica, nel quale le cellule raddoppiano il loro numero e solitamente viene espresso in ore.

Studio dell’ mRNA

Dopo 10 e 20 generazioni cellulari, per giungere ad una ulteriore caratterizzazione cellulare, si è proceduto alla ricerca del mRNA codificante per proteine di specifica sintesi epatica. In dettaglio, si è ricercata la presenza di mRNA per albumina, alfa-fetoproteina, ferritina, transferrina, fattore IX della coagulazione. L’analisi è stata eseguita su un campione cellulare pari a 1×10^6 ; le cellule erano cresciute fino a confluenza al momento del passaggio ed erano state mantenute costantemente in terreno di crescita.

Per l'esecuzione dell'amplificazione di mRNA mediante la tecnica della reazione a catena delle polimerasi (PCR) sono necessari due passaggi preliminari quali l'estrazione genomica del total mRNA, eseguita con kit commerciali (Total quick RNA, Talent, Trieste, Italia) ed una retrotrascrizione.

A) Estrazione genomica. Il processo di estrazione consta di quattro distinti passaggi nei quali si ottiene, mediante l'aggiunta al campione di soluzioni di diversa composizione, dapprima la lisi cellulare, con precipitazione del materiale genomico sotto forma di complessi con il detergente, e successivamente la purificazione del mRNA dai detriti proteici e di DNA, mediante due distinti lavaggi con soluzioni contenenti cloroformio ed etanolo, nell'ordine. L'uso di provette di raccolta in cui viene ad accumularsi, mediante centrifugazione, il filtrato, facilita questi passaggi consentendo l'eliminazione ad ogni fase, del materiale indesiderato.

I dettagli della metodica sono stati presentati nella relazione sui dati preliminari ottenuti nel corso del III anno di dottorato (vedi).

B) Retrotrascrizione (RT-PCR). I dettagli della metodica sono già stati presentati nella relazione sui dati preliminari ottenuti nel corso del III anno di dottorato (vedi).

C) Amplificazione. Come precedentemente ricordato, la tecnica di amplificazione è stata applicata per la ricerca di mRNA codificante alcune proteine di specifica sintesi epatica. A tal scopo, la sequenza dei primers specifici è stata ricavata dalla consultazione elettronica della "Gene Bank" mentre la loro sintesi è stata ottenuta mediante utilizzo di un sintetizzatore di oligonucleotidi (Nucleotide Syntetizer Mod 320, Applied Biosystem USA).

E' stata ricercata l'espressione dei seguenti mRNA: albumina; alfa-feto proteina (AFP); CYP2E1; eritropoietina; fattore IX della coagulazione; transferrina. La beta actina è stata usata come controllo positivo.

I dettagli sulle metodiche e le sequenze dei primers sono stati presentati nella relazione sui dati preliminari ottenuti nel corso del III anno di dottorato (vedi).

D) Elettroforesi su gel di agarosio.

Analisi della sintesi proteica

A) Albumina. In piastre di 100 mm di diametro, contenenti cellule cresciute a confluenza, il terreno è stato aspirato e, dopo un lavaggio eseguito con MOSH, sono stati piastrati 8 ml di terreno di differenziamento (HCM MOD). Dopo 24, il terreno così "condizionato" in quanto rimasto a contatto con le cellule, è stato raccolto ed utilizzato per il dosaggio dell'albumina utilizzando un metodo spettrofotometrico, solitamente applicato nel dosaggio delle proteine urinarie (Enzycolor, Jersey City, USA). Il principio della reazione è il seguente: l'albumina presente nel campione reagisce con il Rosso di Pirogallolo e con Molibdato in mezzo acido, formando, in modo proporzionale alla sua concentrazione, un complesso colorato che viene misurato spettrofotometricamente; la lettura viene eseguita a 600 nm.

B) CYPE21. L'espressione di CYP2E1 (a livello proteico) nel sistema cellulare è stata confrontata con quella di estratti microsomiali di ratto, usati come controllo.

Caratterizzazione morfologica

A) Colorazione con ematosilina-eosina. La prima valutazione morfologica delle cellule è stata effettuata mediante colorazione con ematosilina ed eosina. I dettagli circa la citocentrifugazione e la colorazione sono stati descritti nella relazione sui dati preliminari ottenuti nel corso del III anno di dottorato (vedi).

B) Analisi immunoistochimica. Al fine di caratterizzare ulteriormente la nostra popolazione cellulare, dopo dieci e venti generazioni abbiamo eseguito un'indagine immunoistochimica con anticorpi specifici rivolti contro citocheratine ed integrine abitualmente presenti sulla superficie epatocitaria. Le cellule sono state cresciute in diverse condizioni:

- piastrate in capsule di Petri
- cresciute in "chamber slides" (Nalgene Nunc International, Naperville, USA) ovvero cellette in

materiale plastico montate su vetrini portaoggetto.

L'uso delle due condizioni di coltura è stato dettato dalla ricerca della diversa espressione e localizzazione delle integrine nelle cellule fissate ed analizzate mentre a confluenza, con mantenimento cioè degli aspetti dettati dal contatto cellula-cellula, oppure dopo passaggio, condizione nella quale le cellule risultano isolate e non interagenti tra loro. In entrambi i casi le cellule sono state mantenute in terreno di crescita fino al raggiungimento della confluenza, mentre successivamente sono state mantenute, per circa due settimane, in terreno di differenziamento.

I dettagli circa le metodiche sono stati presentati nella relazione sui dati preliminari ottenuti nel corso del III anno di dottorato (vedi). In sintesi, gli anticorpi utilizzati sono stati:

- anti CAM 5.2: Anticorpo primario (monoclonale) di topo (Becton Dickinson, Plymouth, UK): Anticorpo secondario di cavallo (Vector, Burlingame, USA)
- anti CK 8: Anticorpo primario (monoclonale) di topo (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germania): Anticorpo secondario di coniglio (Dako, Glostrup, Denmark)
- anti CEA: Anticorpo primario (policlonale) di coniglio (Dako): Anticorpo secondario di maiale (Dako)

C) Microscopia elettronica. L'indagine è stata eseguita in collaborazione con l'equipe del prof. F. Curcio presso I Laboratori dell'Università di Udine. I dettagli tecnici sono stati presentati nella relazione sui dati preliminari ottenuti nel corso del III anno di dottorato (vedi).

Studio dei cromosomi

Definito il mantenimento delle caratteristiche morfologiche e di sintesi proprie degli epatociti, abbiamo valutato la "normalità" della nostra coltura continua sottoponendo le cellule ad analisi del cariotipo. L'indagine è stata eseguita in collaborazione con l'equipe del prof. F. Curcio presso I Laboratori dell'Università di Udine.

Le cellule sono state piastrate a bassa concentrazione, in numero di 5000 per vetrino coprioggetto: per ovviare alla sofferenza ed al rallentamento replicativo abitualmente osservati in colture a "bassa densità cellulare", 5 vetrini copri-oggetto sono stati posti in capsule di Petri del diametro di 100 mm. Dopo aver eseguito il passaggio delle cellule secondo la procedura precedentemente descritta (vedi colture secondarie), un ml di sospensione cellulare è stato piastrato su ogni vetrino: solo dopo due ore, ad adesione cellulare avvenuta, sono stati aggiunti 8 ml di terreno di crescita. Le cellule sono state quindi mantenute in incubatore, ed il numero di mitosi cellulari è stato monitorato: dopo due giorni di crescita le cellule sono state inviate al Laboratorio di Genetica, dove l'analisi è stata eseguita.

E' stata utilizzata la metodica abitualmente utilizzata per l'analisi delle cellule del liquido amniotico. Il primo passaggio di tale metodica è finalizzato a bloccare in metafase i cromosomi delle cellule in divisione: ciò è reso possibile dall'azione di depolimerizzazione attuata dalla Demecolcine (Colcemid Solution, 10 g/ml, Gibco, N.Y., USA) sui microtubuli. In ciascuna delle capsule di Petri preparate come precedentemente descritto sono stati posizionati 5 ml di Demecolcine. Le piastre sono quindi state poste in termostato per 5 ore. Si è proceduto quindi all'allestimento dei preparati trattandoli con le seguenti soluzioni: soluzione ipotonica; prefissativo; fissativo.

Il protocollo prevedeva le seguenti operazioni:

- rimozione del terreno di coltura
- aggiunta nella piastra 10 ml di soluzione ipotonica
- aggiunta di 10 ml di prefissativo per bloccare l'azione della soluzione ipotonica.
- Rimozione della soluzione ipotonica e del prefissativo, e aggiunta di 10 ml di fissativo
- I vetrini portaoggetto sono stati quindi prelevati dalle piastre e montati su vetrini portaoggetto con Eukitt per essere poi posti in una stufa dove venir lasciati a 40°C per una notte. Si è proceduto quindi alla colorazione con Giemsa al 5% e all'osservazione al microscopio. Le metafasi sono state ricercate a 100 ingrandimenti e le migliori fotografate a 1000 ingrandimenti. Di ogni campione sono state fotografate 6 mitosi e di ognuna di esse misurate le coordinate per

mezzo di una scala annessa al tavolino traslatore del microscopio, per poterli ritrovare e rifotografare in fluorescenza dopo colorazione con Mostarda di Quinacrina. Per realizzare questa colorazione si è dovuto prima procedere alla decolorazione (vedi dettagli in relazione III anno).

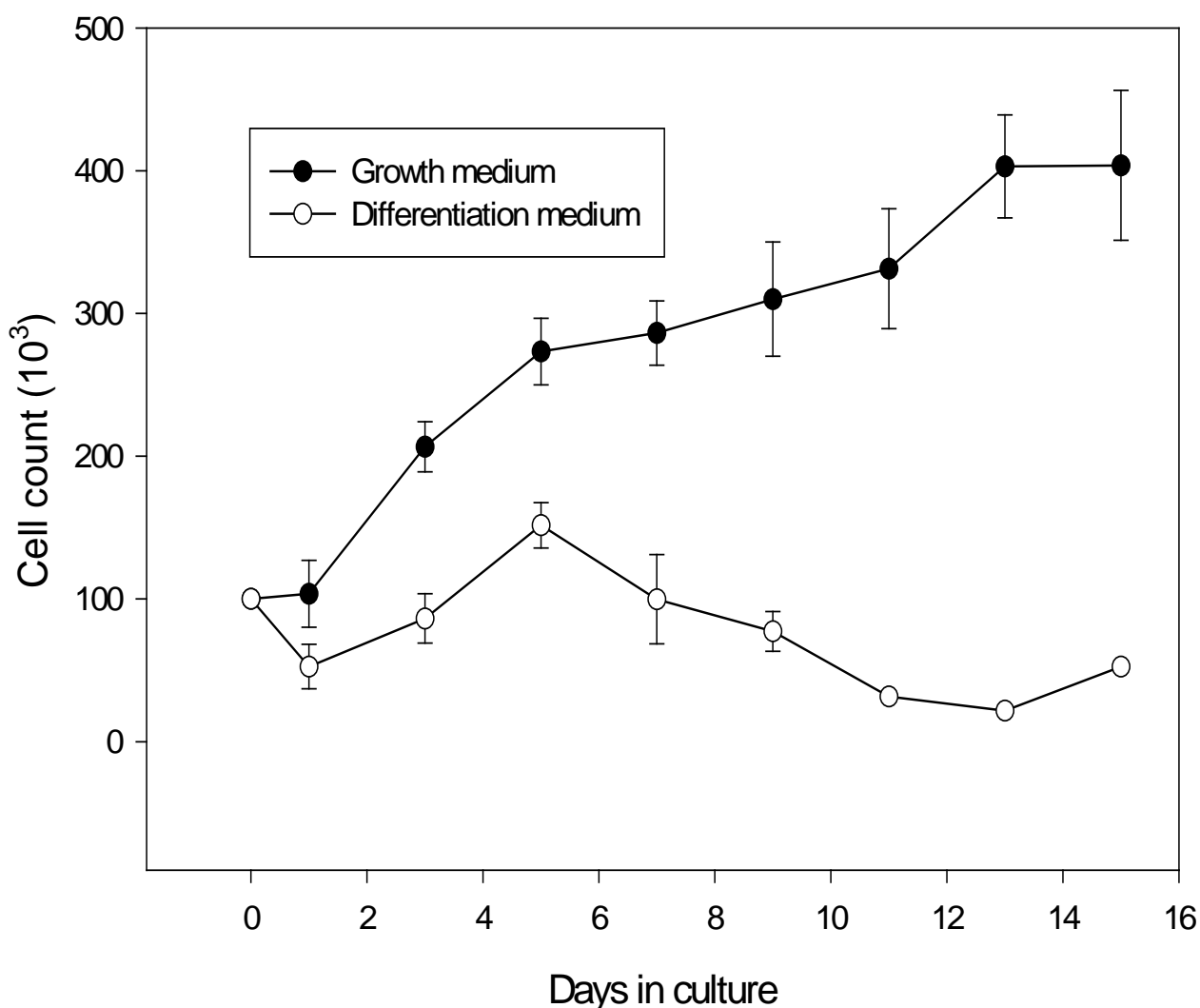
I vetrini sono stati quindi sottoposti a colorazione con Mostarda di Quinacrina per circa 30 minuti, trascorsi i quali si è proceduto al loro risciacquo sotto acqua corrente: sono stati quindi montati i coprioggetto. Le sei metafasi precedentemente fotografate sono state rifotografate in fluorescenza. Le metafasi sono state considerate ottimali quando i cromosomi erano ben separati, senza sovrapposizioni e con bandeggio evidente. Dalle fotografie delle metafasi scelte si è proceduto infine al ritaglio dei cromosomi, al loro riordino ed alla numerazione per ricostruire il cariotipo cellulare.

RISULTATI

Sono stati confermati e migliorati alcuni dei risultati ottenuti nel corso del III anno di dottorato.

Curve di crescita

Le cellule sono state seminate a una concentrazione iniziale di 10^5 cellule per pozzetto sia nel terreno di coltura (circoletti neri) che in quello di differenziamento (circoletti bianchi).



Le conte cellulari sono state ottenute in triplicato dopo 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 giorni in coltura. Il terreno di crescita ha permesso di ottenere curve di crescita simili a quanto già descritto in precedenza.

A) Quando mantenute in un apposito terreno di differenziamento, in tutti gli stadi di crescita in piastra considerati, le cellule hanno mostrato un blocco della moltiplicazione, mantenendo costante il loro numero e potendo essere mantenute in questa condizione per tempo prolungato, con tempo massimo accertato un mese.

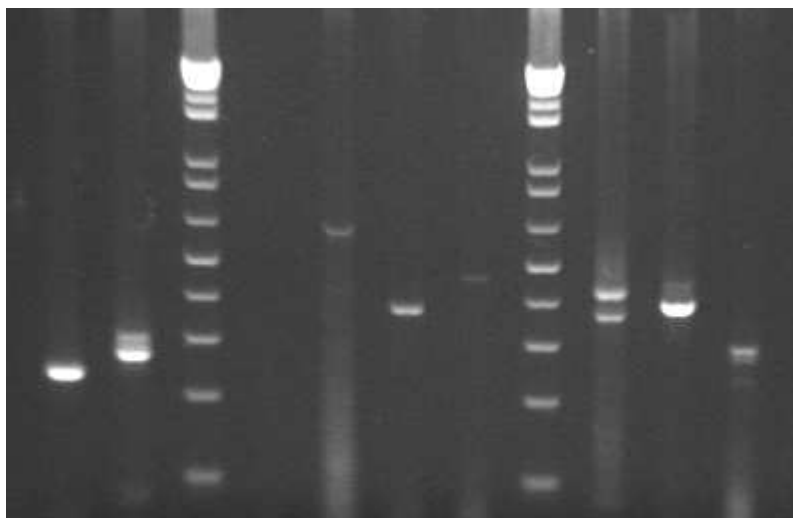
B) L'analisi delle curve di crescita, eseguite in triplicato dopo 10 generazioni cellulari, ha dimostrato la presenza di tre fasi: una prima, nella quale si è osservato un calo del numero cellulare

il giorno successivo al piastramento (non tutte le cellule si attaccano al substrato); una seconda di crescita logaritmica (tra il I ed il V giorno), ed una terza di plateau (tra il V e l'XI giorno). Per quanto concerne il tempo di duplicazione relativo alla curva sopra indicata, si è considerato il raddoppiamento del numero cellulare dal valore di 400.000 a quello di 800.000 ottenendo un valore del tempo di duplicazione in circa 47 ore. Il calcolo del PDL in tale intervallo di tempo è risultato pari a 1.93

Espressione di mRNA epatospecifici

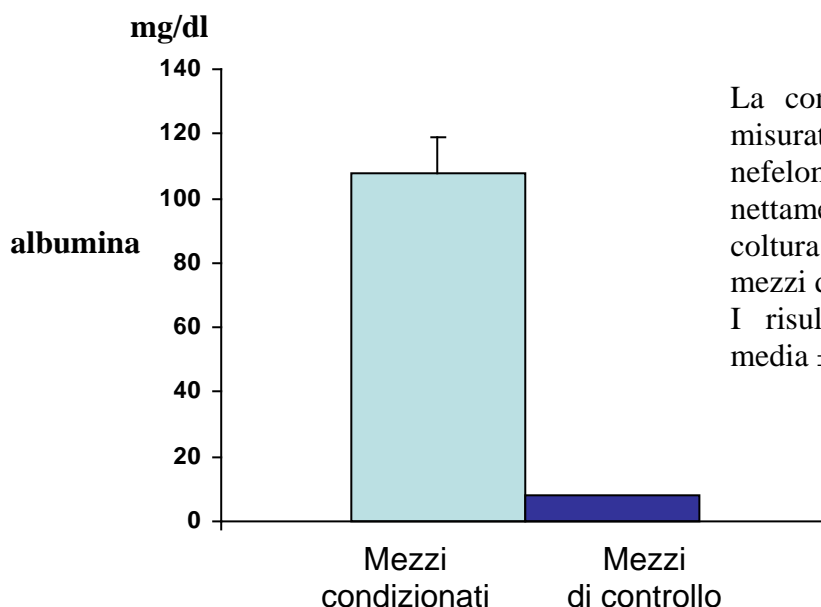
Il sistema cellulare si è rivelato in grado di esprimere mRNA specifici delle cellule epatocitarie normali adulte.

Nella figura rappresentativa viene mostrata l'elettroforesi su gel dei prodotti di RT-PCR ottenuti da cellule al PDL 4.



Pozzetto 1: beta actina (controllo positivo) (MW 250 kDa); pozzetto 2: albumina (MW 273 kDa); pozzetti 3 e 8, markers dei MW; pozzetto 4: AFP; pozzetto 5: controllo positivo di AFP; pozzetto 6: CYP2E1 (mw 370); pozzetto 7: CYP2E1 (MW 451); pozzetto 9: eritropoietina (MW 420-370); pozzetto 10: fattore IX (MW 400); pozzetto 11: transferrina (MW 297).

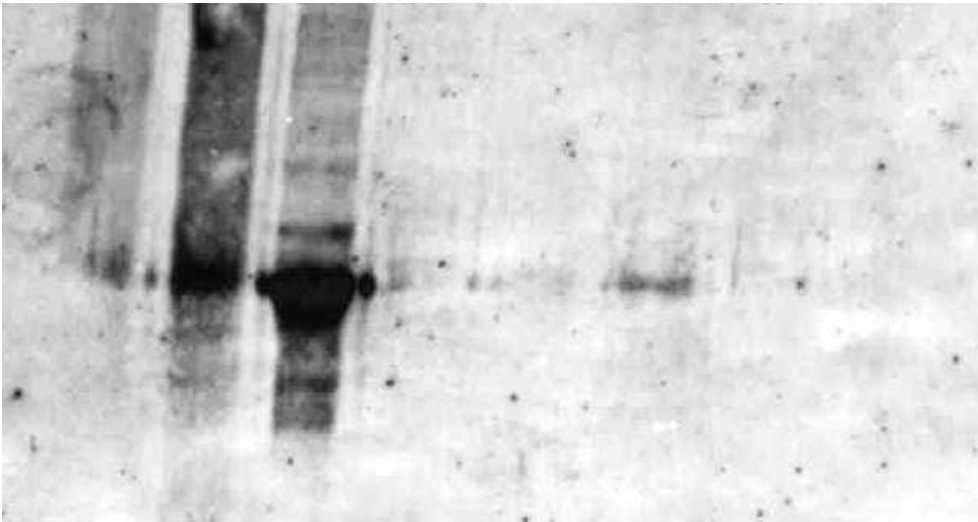
Espressione di albumina



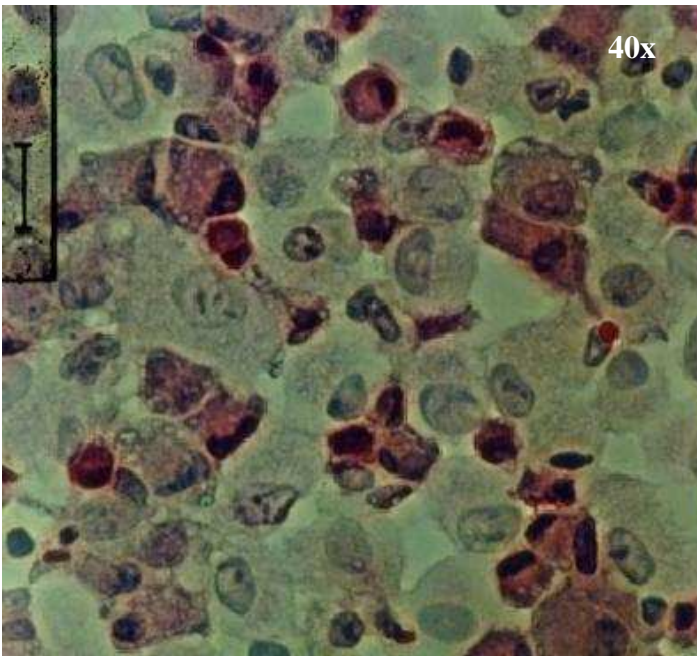
La concentrazione di albumina, misurata tramite un metodo nefelometrico, è risultata nettamente maggiore nei mezzi di coltura condizionati rispetto ai mezzi di coltura di controllo. I risultati sono mostrati come media \pm D.S.

Espressione di CYPE21

L'espressione di CYP2E1 in estratti microsomiali di ratto è mostrata nel pozzetto 1 (controllo=100%). L'espressione è stata del 116% negli epatociti freschi (pozzetto 2) e del 95% nella sottocoltura epatocitaria, e ancora detettabile (8%) al PDL 12. E' interessante notare che l'espressione di CYP2E1 si è mantenuta più a lungo nelle cellule coltivate in mezzi contenenti estratti ipofisari sintetici (pozzetto 5) rispetto a estratti naturali (pozzetto 4). Pozzetto 3: espressione di CYPE21 nelle cellule al PDL 30.



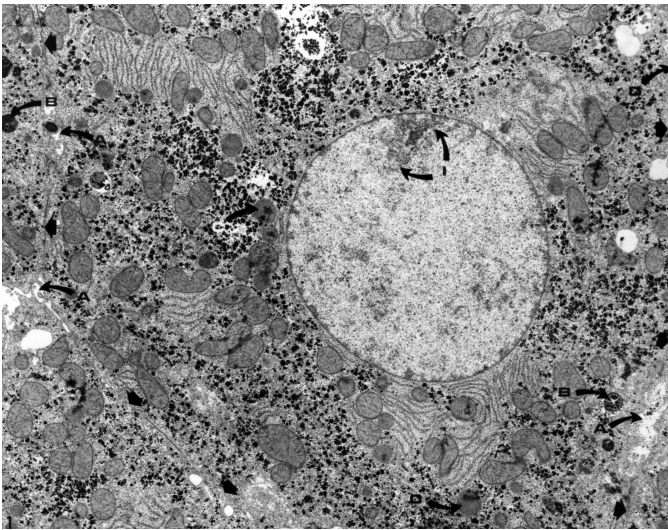
Analisi immunocistochemica



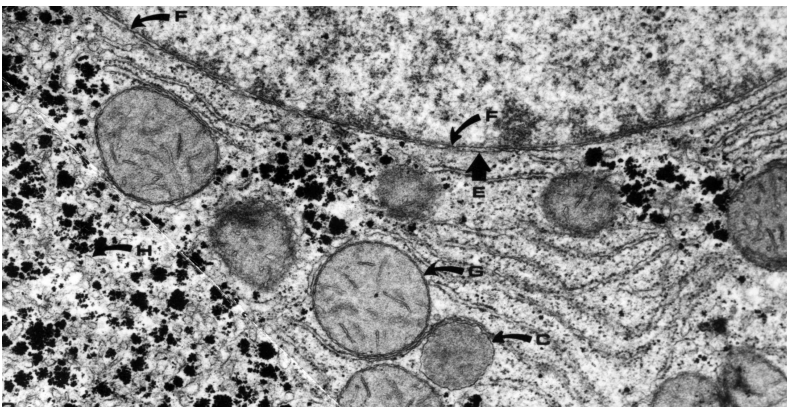
Alla valutazione morfologica, le cellule sono apparse grandi (15-30 mm di diametro), poliedriche, piu' allungate ed irregolari quando disperse, più piccole e regolari quando a confluenza. Quando isolate esse tendevano a ricercare il contatto mediante la creazione di estroflessioni citoplasmatiche. I nuclei erano grandi, sferoidali, centrali, i nucleoli sempre ben evidenti. Il citoplasma si presentava granulare, ed il numero delle granulazioni tendeva ad aumentare quando le cellule erano poste in terreno di differenziazione.

Quando poste in terreno di differenziamento (Figura), le cellule mostravano a partire dal giorno successivo al cambiamento del terreno, una riduzione delle dimensioni, una regolarizzazione dei margini (cellule piu' piccole, poligonali e strettamente adiacenti tra loro) ed un aumento delle granulazioni interne.

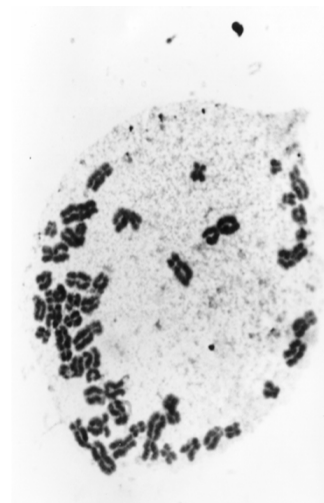
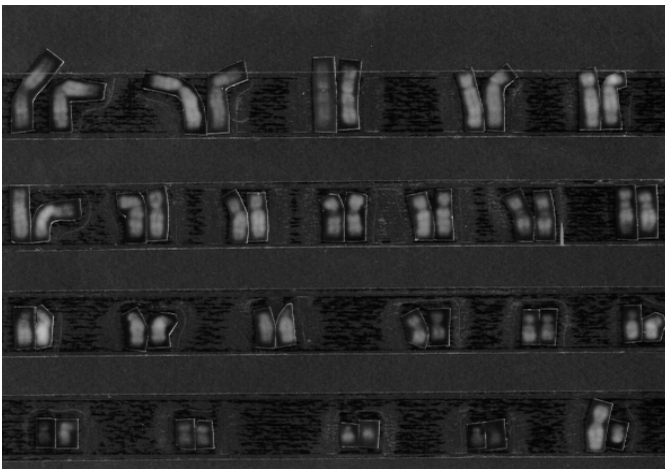
Analisi al microscopio elettronico



Le cellule hanno confermato avere nuclei con cromatina condensata alla periferia, un ricco RER, l'apparato di Golgi, mitocondri e microvilli



Citogenetica



La maggior parte delle cellule ha confermato di avere un normale cariotipo diploide, senza riarrangiamenti né delezioni cromosomiche. Sono state tuttavia trovate anche occasionali cellule polipoidi.

DISCUSSIONE

Le colture epatocitarie costituiscono un fondamentale sistema per lo studio di diverse funzioni epatocellulari, quali sintesi, trasporto, detossificazione e metabolismo di sostanze di derivazione sia esogena che endogena. I sistemi attualmente disponibili per studi in vitro sono rappresentati da colture primarie di epatociti, linee epatocellulari immortalizzate mediante l'utilizzo di tecniche di trasfezione di oncogeni virali, linee derivate da neoplasie epatiche umane e, più recenti, cellule staminali epatiche (le cosiddette cellule ovali) ed extraepatiche. Le colture primarie hanno il pregio di mantenere affinità strutturali con il tessuto epatico di origine, ma rapidamente vanno incontro a sdifferenziazione, con perdita delle funzioni specifiche degli epatociti. Gli altri due tipi di sistemi non possono essere considerati pienamente rispettosi della fisiologia degli epatociti, mancando in entrambi la possibilità di una regolazione della crescita e della conseguente differenziazione cellulare. Il ruolo delle cellule staminali epatiche nel mantenimento del tessuto e nella sua rigenerazione, specie successivamente ad un danno, risulta essere un argomento intrigante, ma particolarmente controverso. Tali cellule prendono parte alla rigenerazione epatica in risposta ad alcuni danni cronici, soprattutto quando la capacità proliferativa degli epatociti sia compromessa o indebolita, e possono essere mobilizzate in seguito a stimoli opportuni e messe in coltura. Un dato molto interessante e di recentissima acquisizione è che queste cellule staminali possano derivare da precursori midollari. Questa ipotesi è stata suggerita dall'evidenza che le cellule ovali esprimono sulla loro superficie marcatori di staminalità: il primo di essi ad essere identificato è il fattore di crescita SCF (stem cell factor) e il suo recettore, il c-kit tirosin chinasi. Successivamente, cellule ovali isolate dal fegato di pazienti con malattie croniche biliari sono risultate esprimere il CD34, il più tipico e conosciuto marcatore delle cellule staminali emopoietiche.

La disponibilità di una linea cellulare epatocitaria umana realmente "normale" consentirebbe di studiare in fine dettaglio i meccanismi molecolari coinvolti nel funzionamento degli epatociti sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Inoltre, sarebbe essenziale per uno sviluppo dei sistemi di supporto epatico bioartificiale che iniziano a trovare applicazione in campo clinico (come alternativa temporanea o definitiva al trapianto di fegato). Gli studi fino ad ora condotti nel tentativo di ottenere lo sviluppo di una linea epatocitaria umana normale sono stati numerosi. La disponibilità commerciale di fattori di crescita ritenuti organo-specifici e di componenti della matrice intercellulare di derivazione animale hanno consentito di sviluppare tecniche di coltura che cercano di ricostituire in vitro un microambiente simile a quello del tessuto di origine. Con tali tecniche è stato possibile ottenere la proliferazione di epatociti derivanti da tessuto epatico umano normale. Anche in tali sistemi si verificano, tuttavia, dopo un numero relativamente modesto di generazioni, alterazioni cromosomiche severe (delezioni di intere regioni geneticamente rilevanti) che rendono tali cellule comunque lontane da un modello di normalità. In particolare, la presenza di aberrazioni cromosomiche viene a costituire un ostacolo all'utilizzo di tali linee nelle applicazioni cliniche, quali il supporto epatico bioartificiale, essendovi il rischio di una diffusione, all'interno di organismi immunocompromessi, di cellule cariotipicamente aberranti.

Nel nostro lavoro, siamo invece riusciti a porre in atto un sistema cellulare, costituito da epatociti umani cariotipicamente e fenotipicamente normali (in particolare, colture primarie di epatociti da frammenti bioptici di tessuto epatico del peso iniziale di circa 5 g), mantenuti in coltura per lungo tempo (almeno due mesi), senza l'utilizzo di tecniche di cocoltura. Per fare ciò, ci siamo avvalsi dell'uso di specifici mezzi di coltura, selezionati per favorire rispettivamente crescita e differenziazione cellulare. La confluenza è stata raggiunta, per divisioni successive, circa quattro settimane dopo l'approntamento della coltura primaria, rendendo quindi necessario il ricorso al passaggio per consentire l'ulteriore espansione della popolazione cellulare. La tecnica del passaggio è stata inizialmente applicata su popolazioni cellulari selezionate, demarcate ed isolate mediante l'uso di cilindri di clonazione: in tal caso pertanto le cellule sono state passate prima del raggiungimento della confluenza per coltura primaria. Le colture secondarie e le successive sono partite con una distribuzione uniforme delle cellule nelle nuove piastre: la maggior parte delle cellule piastrate ha aderito al nuovo substrato ed ha iniziato la replicazione. Per tutto il periodo di

osservazione si è evidenziato un andamento costante: la confluenza veniva raggiunta in una decina di giorni circa ed ogni piastra a confluenza presentava un numero di cellule pari a circa due milioni. Ottenuta la crescita di cellule con morfologia poligonale, citoplasma granuloso, ed aspetto al microscopio a contrasto di fase giudicato compatibile con epatociti, abbiamo eseguito, dopo circa 10 generazioni (PDL), accertamenti atti a valutare il mantenimento di funzioni specifiche del tessuto epatico. Tali indagini sono ripetute ogni dieci PDL, ed alla ventesima generazione sono stati eseguiti il cariotipo cellulare ed uno studio morfologico mediante microscopia elettronica. Un dato rilevante della nostra ricerca è che le cellule si sono dimostrate funzionalmente attive (come documentato dalla efficienza nel trasporto elettrogenico della bromsulfaleina, analoga a quella documentabile in epatociti di ratto mantenuti in coltura primaria: vedi relazione del III anno). Sulla base studi di immunoistochimica con anticorpi diretti contro un epitopo specifico identificato come "bilirubin-binding motif", abbiamo dimostrato che questa capacità si associa alla presenza di bilitranslocasi che appare correttamente orientata sulla superficie cellulare (dati ancora da confermare). Tutti questi risultati, per quanto preliminari, sembrerebbero dunque confermare che abbiamo ottenuto una linea epatocitaria umana normale.

Se il nostro sistema cellulare confermasse le sue premesse (cioè la crescita in vitro di epatociti umani normali a lungo termine, pur mantenendo funzioni cellulari differenziate), potrebbe essere un utile strumento per lo studio in vitro del metabolismo epatico degli xenobiotici. Inoltre, potrebbe essere di aiuto nello studio delle funzioni epatocellulari e dei meccanismi di rigenerazione epatica, costituendo la premessa per un sistema di fegato bio-artificiale rinnovabile, specie-specifico.

Ancora, si potrebbe pensare ad un'ulteriore e più immediata fase della nostra ricerca, vale a dire la valutazione della suscettibilità a HCV del sistema cellulare stesso e la successiva caratterizzazione degli aspetti virologici dell'infezione, con particolare riferimento alla proteina del core. Quest'ultima, come è noto, potrebbe giocare un ruolo chiave nel meccanismo di epatocarcinogenesi dell'infezione cronica HCV, come suggerito da esperimenti sul topo transgenico. In effetti, recenti ricerche hanno suggerito che la proteina del core HCV, oltre ad essere una proteina strutturale implicata nel package dell'RNA virale, regola la trascrizione di geni cellulari e virali ed è in grado di inibire, in certe condizioni sperimentali, l'apoptosi mediata da cisplatino e da c-myc; inoltre, in cooperazione con un oncogene, può trasformare fibroblasti primari di embrione di ratto. La proteina del core HCV sembrerebbe essere il più potente induttore di signaling intracellulare tra sette diverse proteine virali derivate da HCV e HBV.

Proprio il nostro sistema cellulare potrebbe rivelarsi particolarmente utile nel chiarimento del ruolo oncogenico della proteina del core, finora sempre ostacolato dalla mancata disponibilità di sistemi in vitro che consentano di studiare l'interazione tra questa proteina ed epatociti umani normali. Difatti, la maggioranza degli studi condotti in questo stimolante ambito scientifico hanno utilizzato linee cellulari di epatomi (ad esempio, HepG2 e HuH-7) ovvero linee di deviazione non epatocitaria (ad esempio, cellule di carcinoma della cervice. Tra i possibili meccanismi di epatocarcinogenesi indagabili con il nostro sistema cellulare, particolarmente interessante potrebbe essere la via ciclossigenasi (COX)-2 mediata. La COX-2 è la forma inducibile di COX ed è espressa da vari tipi cellulari in risposta a citochine infiammatorie quali tumor necrosis factor alfa ed interleuchina-1. Di rilievo sono i dati che indicano un ruolo chiave della COX-2 nella dedifferenziazione tumorale epatica, e altri che dimostrano come la sua sovraespressione in tessuto non tumorale si associ a ridotta sopravvivenza libera da malattia in pazienti con carcinoma epatocellulare. Essendo disponibili efficaci farmaci inibitori della COX-2 in vitro; potrebbero trovare future applicazioni cliniche nella terapia dell'epatocarcinoma. Sulla base di queste premesse, sarebbe nostra intenzione usare il nostro sistema cellulare per verificare doversi possibili meccanismi di epatocarcinogenesi correlati alla proteina del core. Ad esempio, intenderemmo verificare la capacità della proteina di indurre o di reprimere la espressione di COX-2, in funzione dell'espressione di fattori di trascrizione nucleare (CCAAT/Enhancer-binding proteins, C/EBP). Il putativo ruolo pro-replicativo della proteina del core HCV e la sua soppressibilità verrebbero verificati ripetendo gli esperimenti in presenza di uno specifico inibitore della COX-2 (ad esempio NS398). Il mantenimento di

funzioni epatocitarie differenziate potrebbe essere controllato con la misurazione dell'espressione di segnale di specifiche proteine, quali la tirosina aminotransferasi (TAT).
In ultima analisi, attraverso la definizione precisa dei meccanismi molecolari per mezzo dei quali la proteina del core HCV può interferire con la replicazione cellulare degli epatociti, si potrebbero aprire nuovi scenari nella prevenzione dell'evoluzione tumorale delle epatopatie croniche da HCV.

BIBLIOGRAFIA

1. Thompson BJ, RG Finch. 2005. Hepatitis C infection. *Clin Microbiol Infect.* 11: 86-94.
2. Pawlotsky JM 2004. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 12: 96-102.
3. Curry MP. Hepatitis B and hepatitis C viruses in liver transplantation. 2004. *Transplantation.* 78: 955-963.
4. Consensus Panel (2002). NIH consensus development conference statement: management of hepatitis C. 2002. *Hepatology* 36: S3-S20.
5. Penin F, J Dubuisson, FA Rey, D Moradpour, JM Pawlotsky. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39: 5-19.
6. Bartenschlager R, A Kaul, S Sparacio. 2003. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Res* 60:91-102.
7. Flint M, ER Quinn, S Levy. 2001. In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clin Liver Dis* 5: 873-893.
8. Barth H, C Schafer, MI Adah, F Zhang, RJ Linhardt, H Toyoda, A Kinoshita-Toyoda, TH von Kuppevelt, E Depla, F von Weizsacker, HE Blum, TF Baumert. 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278: 41003-41012.
9. Bartosch B, A Vitelli, C Granier, C Goujon, J Dubuisson, S Pascale, E Scarselli, R Cortese, A Nicosia, FL Cosset. 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278: 41624-41630.
10. Lozach PY, H Lortat-Jacob, A de Lacroix de Lavalette, I Staropoli, S Foug, a Amara, C Houles, F Fieschi, O Schwartz, JL Virelizier, F Arenzana-Seisdedos, R Altmeyer. 2003. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278: 20358-20366.
11. Burioni R, Y Matsuura, N Mancini, H Tani, T Miyamura, PE Varaldo, M Clementi. 2002. Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived by a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype. *J Virol* 76: 11775-11779.
12. Rehermann B, Nascimbeni M. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Immunol* 5: 215-229.
13. Bartenschlager R, M Frese, T. Pietschmann. 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63:71-180.
14. Pietschmann T, R Bartenschlager. 2003. Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 7:23-43.
15. Su AI, JP Pezacki, L Wodicka, AD Brideau, L Supekova, R Thimme, S Wieland, J Bukh, RH Purcell, PG Schultz, FV Chisari. 2002. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15669-15674.
16. Frese M, T Pietschmann, D Moradpour, O Haller, R Bartenschlager. 2001. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* 82: 723-733.
17. Tseng CT, GR Klimpel. 2002. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 195: 43-49.
18. Malmgaard L. 2004. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24: 439-454.
19. Heller T, S Saito, J Auerbach, T Williams, TR Moreen, A Jazwinski, B Cruz, N Jeurkar. R Sapp, G Luo, TJ Liang. 2005. An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2579-2583.
20. Sell S. 2003. The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35:267-71.

21. Zhang Y, X F Bai, CX Huang. 2003. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 9: 201-4.
22. Newsome PN, MA Hussain, ND Theise. 2004. Hepatic oval cells: helping redefine a paradigm in stem cell biology. *Curr Top Dev Biol* 61: 1-28.
23. Weber A. 2004. Immortalization of hepatic progenitor cells. *Pathol Biol* 52: 93-6.
24. Shackel N, D Rockey. 2005. In pursuit of the "Holy Grail"--stem cells, hepatic injury, fibrogenesis and repair. *Hepatology* 41:16-18.
25. Aizaki, S Nagamori, M Matsuda, H Kawakami, O Hashimoto, H Ishito, M Kawada, T Matsuura, S Hasumura, Y Matsuura, T Suzuki, T Miyamura. 2003. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology*. 314: 16-25.
26. Lowes KN, EJ Croager, JK Olynyk, LJ Abraham, GC Yeoh. 2003. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 4-12.
27. Martin I, D Wendt, M Heberer. 2004. The role of the bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2: 80-86.
28. Hochleitner B, P Hengster, L Duo, H Bucher, G Klima, R Margreiter. 2005. A novel bioartificial liver with culture of porcine hepatocyte aggregates under simulated microgravity. *Artificial Organs* 29: 58-66.
29. Katayama S, C Tateno, T Asahara, K Yoshizato. 2001. Size-dependent in vivo growth potential of adult rat hepatocytes. *Am J Pathol* 158: 97-105.
30. Ali S, C Pellerin, D Lamarre, G Kukulj. 2004. Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 78: 491-501.
31. Carrozzo M, R Quadri, P Latorre, M Pentenero, S Paganin, G Bertolusso, S Gandolfo, F Negro. 2002. Molecular evidence that hepatitis C virus replicates in the oral mucosa. *J Hepatol* 37: 364-369
32. Miglioresi L, E Riva, G Antonelli, F Russo, GL Ricci. 2003. Localization of hepatitis C virus in gastrointestinal mucosa: a possible reservoir for relapse. *Hepatology* 38: 775.

SEZIONE 2
ATTIVITA' FORMATIVA

CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

A) Seminari e Corsi 2003 / 2004

1. GENETIC BASES OF THE AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME (ALPS) SUBTYPES. 3 maggio 2004.
2. BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS: PRINCIPLES, PROSPECTS AND PROBLEMS. 14 Giugno 2004
3. PI 3-KINASE γ CONTROLS CARDIAC CONTRACTILITY AND HYPERTROPHY THROUGH KINASE-DEPENDENT AND INDEPENDENT FUNCTIONS. 29 giugno 2004.
4. MECCANISMI PATOGENETICI DELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA. 30 giugno 2004.
5. FROM THE BENCH TO THE BEDSIDE: GALECTIN-3 IMMUNODETECTION FOR IMPROVING THE PREOPERATIVE DIAGNOSIS OF THE FOLLICULAR THYROID LESIONS. 5 luglio 2004.
6. ETHANOL METABOLISM AND TOXICITY IN PREGNANCY. 7 Luglio 2004.
7. PITFALLS OF GENETIC STUDIES IN LIVER DISEASE. 14 luglio 2004.

B) Seminari e Corsi 2004 / 2005

1. PROTEOMICA DELL'EPITELIO INTESTINALE. 11 marzo 2005.
 2. SCLEROSI MULTIPLA: RICERCA DI GENI DI SUSCETTIBILITÀ NELLA POPOLAZIONE FINLANDESE. 21 marzo 2005.
 3. LE CELLULE DENDRITICHE, UN GIOCATORE CHIAVE NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA: QUALI E QUANTI TIPI? 23 marzo 2005.
 4. IL DOLORE ARTICOLARE: UN PROBLEMA CLINICO O BIOCHIMICO? 30 maggio 2005.
 5. GENI E TRAPIANTI. 1 giugno 2005.
 6. LA TOSSINA DELLA PERTOSSE ED IL SUO B-OLIGOMERO: NUOVI FARMACI IMMUNOSTIMOLANTI E ANTI-HIV? 17 giugno 2005.
 7. CARATTERISTICHE E POTENZIALITÀ DELLE CELLULE ISOLATE DALLE MEMBRANE FETALI UMANE: AMNION E CORION. 12 settembre 2005.
 8. FUNCTIONS OF RIBOSOMAL PROTEIN S19: IMPLICATIONS FOR DIAMOND BLACKFAN ANEMIA. 13 settembre 2005.
 9. REGOLAZIONE DELL'APOPTOSI DA PARTE DI GLUCOCORTICOIDI ED ANNESSINA-1. 20 settembre 2005
- Ottobre 2004-aprile 2005: **corso d'inglese** tenuto dal prof. Colin Irving-Bell
 - Giugno 2005-luglio 2005: **corso di statistica** tenuto dal prof. Magnani e coadiuvato dalla dr.ssa Migliore e dal dr. Vidali.

C) Seminari e Corsi 2005 / 2006

1. CARDIAC POTASSIUM CHANNEL REGULATION BY ACCESSORY SUBUNITS. 18 novembre 2005.

2. MECHANISMS OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION AND DISEASE. 25 novembre 2005.
3. HCV-RELATED STEATOSIS: PATHOGENIC MECHANISMS AND CLINICAL IMPLICATIONS. 23 novembre 2005.
4. MECHANISMS OF OSTEOLYTIC LESIONS IN MULTIPLE MYELOMA: UNCOUPLING BETWEEN BONE RESORPTION AND FORMATION. 19 gennaio 2006.
5. ANTICORPI RICOMBINANTI: UN POTENTE TOOL BIOTECNOLOGICO. 15 febbraio 2006.
6. TECNICHE DI BIOLOGIA E GENETICA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA DEL CARCINOMA DEL COLON. 20 febbraio 2006.
7. THE NATURAL COURSE OF PRECLINICAL TYPE 1 DIABETES. 20 marzo 2006.
8. IL TRAPIANTO DI CELLULE ENDOTELIALI (LSEC) NEL FEGATO DI TOPO HA IMPLICAZIONI PER LA TERAPIA CELLULARE E GENICA DELL'EMOFILIA. 13 marzo 2006.
9. LA PREVENZIONE DELLA TRASMISSIONE VERTICALE DI HIV IN AFRICA SUB SAHARIANA. L'ESPERIENZA DEL PROGRAMMA DREAM (DRUG RESOURCE ENHANCEMENT AGAINST AIDS AND MALNUTRITION). 23 marzo 2006.
10. ASPETTI IMMUNOGENETICI E TERAPEUTICI DELLA "HAIRY CELL LEUCEMIA". 6 aprile 2006.
11. L'EPATITE AUTOIMMUNE. 18 maggio 2006.
12. SPERM MEDIATED GENE TRANSFER. STORIA E APPLICAZIONI. 30 maggio 2006.
13. MESULIN: A STRETCH SENSING MOLECULE CONTROLLINO ADAPTATIVE CARDIAC REMODELING TO PRESSURE OVERLOAD. 15 giugno 2006.
14. RUOLO EZIOLOGICO DEI PAPPILLOMAVIRUS UMANI (HPV) NELLO SVILUPPO DI LESIONI NEOPLASTICHE NEL DISTRETTO GENITALE. 19 giugno 2006.
15. DNA AND PROTEIN ARRAYS IN INFECTION DISEASES: FROM BASIC RESEARCH TO VACCINE DESIGN. 5 luglio 2006.
16. THE ROLE OF CATHEPSIN K IN ARTHRITIS AND ATHEROSCLEROSIS. 11 settembre 2006.
17. LA RETE DI REGOLAZIONE DELLE ATTIVITÀ ANTI-ANGIOGENETICHE DEGLI INTERFERONI. 29 settembre 2006.

D) Seminari e Corsi 2006 / 2007

1. AUTOANTIBODIES IN SYSTEMIC SCLEROSIS: FROM CLINICAL SUBSETS TO PATHOGENETIC FUNCTIONS. Prof. Chizzolini. 12 gennaio 2007.
2. NUOVI RUOLI PER LE PROTEINE ADATTATRICI P130CAS E P140CAP NELLA TRASFORMAZIONE TUMORALE E NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA. Prof.ssa Paola Defilippi. 25 gennaio 2007.
3. GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA. Prof. Beat Thöny. 1 febbraio 2007.
4. HCMV: FROM CLINIC TO THE BENCH AND RETURN. Prof. T. Mertens. 19 febbraio 2007.
5. FRAGILE X SYNDROME FROM RNA METABOLISM IMPAIRMENT TO SPINE DYSMORPHOGENESIS. Prof. Claudia Bagni, 22 febbraio 2007.
6. LA VALUTAZIONE DEL CONTROLLO NERVOSO DELLA CIRCOLAZIONE CLINICA: DALLA TEORIA ALLE APPLICAZIONI PRATICHE. Prof. M. Pagani. 22 febbraio 2007.
7. VITA, OPERE E MIRACOLI DELL' EPATOCITA. Prof. Marco Tripodi. 9 marzo 2007.
8. PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED SENSITIVITY. Dr. Marina Cretich. 14 marzo 2007.

9. LE COLANGIOPATIE AUTOIMMUNI. Prof. M. Podda. 15 marzo 2007.
10. DROSOPHILA AS A MODEL FOR AGING AND CANCER. Prof. Dirk Bohmann, 16 marzo 2007.
11. MARCATORI FARMACOGENOMICI NEL CARCINOMA COLORETTALE: QUALI PROSPETTIVE PER UNA TERAPIA PERSONALIZZATA? Prof. Enrico Mini. 29 marzo 2007.
12. PATHOGENIC VIRUSES: SMART MANIPULATORS OF THE INTERFERON SYSTEM. Prof. Otto Haller. 19 aprile 2007
13. THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALING. Prof. Stefan Karlsson. 25 maggio 2007.
14. SINDROMI AUTOINFIAMMATORIE. Prof. Alberto MARTINI. 4 giugno 2007.
15. LA GENESI DEI GLIOMI E I SUOI RISVOLTI PROGNOSTICI E TERAPEUTICI. Prof. Davide Schiffer. 14 giugno 2007.

- 12 aprile 2007 - Prof. Milanesio Marco (DISTA - Alessandria): Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del Protein Data Base. **Lezione di bioinformatica.**
- 21 giugno 2007 – Dr Flavio Mignone (Università di Milano): Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts. **Lezione di bioinformatica.**

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo)

1. 38° Riunione generale annuale dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF). Roma, 17-18 febbraio 2005.
2. 2005 Annual Meeting of the German Society of Virology (Gesellschaft für Virologie). Hannover, Germania, 16-19 marzo 2005.
3. 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Parigi, Francia, 13-17 aprile 2005.
4. V Congresso Regionale della Società di Medicina d'Emergenza-Urgenza del Piemonte e Valle d'Aosta (SIMEU). Novara, 9-10 Giugno 2005.
5. 60° Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AAASLD). San Francisco, California USA 11-15 novembre 2005.
6. Congresso "International workshop: diagnostic flow-charts in hepatology". Torino, 24-25 novembre 2005.
7. 39° Riunione generale annuale dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF). Roma, 16-17 febbraio 2006.
8. Oratore nella sessione "Angiotensin converting enzyme I/D genes and liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C".
9. 61° Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AAASLD). Boston, MA, USA 26-31 ottobre 2006.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

1. C. Smirne, A. Carbone, E. Tonel, F. Gaspari, G. Bellone, G. Emanuelli. Il trattamento con gemcitabina sensibilizza le cellule di carcinoma del pancreas trattate ad effettori citotossici cellulari e solubili. 104° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Interna, Roma, 4-7 novembre 2003. *Ann Ital Med Int* 2003; 18(2):105S.
2. C. Smirne, A. Carbone, F. Gaspari, E. Tonel, G. Bellone, G. Emanuelli. Alterazioni quantitative e qualitative delle cellule dendritiche nel carcinoma del pancreas: ruolo delle citochine di origine tumorale. 104° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Interna, Roma, 4-7 novembre 2003. *Ann Ital Med Int* 2003; 16(2):104S.
Premiato perchè “giudicato dai discussants tra i migliori poster realmente affissi”.
3. C. Smirne, R. Minisini, R. Rapetti, F. Capelli, S. Grazioli, E. Scaglia, P. Carnevale-Schianca, M. Pirisi. Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D polymorphism in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Atti dell'EASL Monothematic Conference: "Nonalcoholic Steatohepatitis: from cell biology to clinical practice". Lisbona, Portogallo 17-18 settembre 2004.
4. P. Toniutto, C. Fabris, L. Apollonio, E. Fumo, M. Caldato, C. Smirne, R. Minisini, M. Pirisi. Excess weight gain after liver transplantation and early fibrosis progression of recurrent hepatitis C. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA, 29 ottobre- 2 novembre 2004. *Hepatology* 2004; 40:S358A.
5. P. Toniutto, R. Minisini, M. Caldato, C. Avellini, C. Fabris, C. Smirne, B. Bertonecelli, E. Rossi, E. Fumo, S. Fumagalli, S. Fangazio, M. Pirisi. ACE gene variants and graft steatosis/fibrosis in transplantation recipients with hepatitis C. Atti del 38° Riunione generale annuale dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF). Roma, 17-18 febbraio 2005.
6. R. Minisini, M. Burlone, S. Grazioli, C. Smirne, S. Fangazio, P. Toniutto, C. Fabris, M. Pirisi. Localization of the HCV core protein is dependent on cDNA length and cell-type. Atti del Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2005. Hannover, Germania, 16-19 marzo 2005: 262.
7. C. Smirne, C. Colletta, R. Minisini, M. Burlone, E. Ceriani, F. Corlianò, S. Fangazio, C. Fabris, M. Pirisi. Factors associated with fibrosis progression in HCV RNA positive patients with normal liver biochemistry. Atti del Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2005. Hannover, Germania, 16-19 marzo 2005: 261.
8. P. Toniutto, R. Minisini, M. Caldato, C. Avellini, C. Fabris, C. Smirne, B. Bertonecelli, E. Rossi, E. Fumo, S. Fumagalli, S. Fangazio, M. Pirisi. Allelic variants of the angiotensin converting enzyme and graft steatosis/fibrosis in liver transplantation recipients with hepatitis C. 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Parigi, Francia, 13-17 aprile 2005. *J Hepatol* 2005; 42 (Suppl. 1): 59.
9. M. Burlone, R. Minisini, S. Grazioli, C. Smirne, P. Toniutto, C. Fabris, M. Pirisi. Expression and localization of the HCV core protein is strictly promoter and cell-type dependent. 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Parigi, Francia, 13-17 aprile 2005. *J Hepatol* 2005; 42 (Suppl. 1): 155.

10. C. Smirne, C. Colletta, C. Fabris, P. Toniutto, E. Ceriani, F. Corlianò, R. Minisini, M. Pirisi. Value of non-invasive methods to detect fibrosis progression among HCV carriers with normal/near normal transaminases. 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Parigi, Francia, 13-17 aprile 2005. J Hepatol 2005; 42 (Suppl. 1): 232.
11. C. Smirne, B. Azzimonti, M. Sartori, R. Minisini, P. Toniutto, C. Fabris, R. Boldorini, M. Gariglio, M. Pirisi. Hepatic expression of the interferon-inducible protein IFI-16 in patients with chronic hepatitis. 40th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Parigi, Francia, 13-17 aprile 2005. J Hepat 2005; 42 (Suppl. 1): 232.
12. C. Smirne, F. Corlianò, A. Limoncini, S. Grazioli, R. Rapetti, E. Scaglia, R. Mella, S. Fangazio, P. Carnevale Schianca, M. Pirisi. Allelic variants of the angiotensin converting enzyme gene, fatty liver and indexes of insulin sensitivity and secretion among non-diabetic hypertensive subjects. 60° Annual Meeting AASLD. San Francisco, California USA 11-15 novembre 2005.
13. P. Toniutto, E. Falletti, M. Caldato, E. Fontanini, E. Rossi, S. Fumagalli, D. Bitetto, C. Smirne, R. Minisini, C. Fabris, M. Pirisi. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C. 60° Annual Meeting AASLD. San Francisco, California USA 11-15 novembre 2005.
Premiato con “the blue ribbon for the best 10% selected abstracts”.
14. P. Toniutto, C. Fabris, D. Bitetto, E. Falletti, C. Avellini, E. Rossi, S. Fumagalli, C. Smirne, R. Minisini, M. Pirisi. Angiotensin converting enzyme I/D genes and liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 39° Riunione generale annuale dell’Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF). Roma, 16- 17 Febbraio 2006. Dig Liver Dis 2006; 38 (3): A49.
15. S. Grazioli, R. Minisini, P. Toniutto, C. Fabris, R. Rapetti, L. Franchini, E. Falletti, C. Smirne, P. Mario. Differential effects of cyclosporine and tacrolimus on tissue growth factor beta-1 mRNA expression by the human hepatic cell lines HuH7 and LX-2. 61° Annual Meeting AASLD. Boston, USA, 27-31 ottobre 2006. Hepatology 2006; 44 (4, Suppl. 1): 401A.
16. C. Colletta, C. Smirne, C. Fabris, A.M. Foscolo, P. Toniutto, R. Rapetti, R. Minisini, L. Sala, S. Fangazio, M. Pirisi. Regression of fibrosis among long-term responders to antiviral treatment for chronic viral hepatitis. 62° Annual Meeting AASLD. Boston, USA, 2-6 novembre 2007, accepted as oral communication.
17. C. Smirne, C. Borgogna, C. Fabris, B. Azzimonti, C. Marconi, E. Mossio, M. Burlone, P. Toniutto, R. Minisini, M. Gariglio, M. Pirisi. Pattern of intrahepatic expression of the interferon-inducible proteins MxA and IFI16 during acute allograft rejection and viral reinfection among liver transplantation recipients. 62° Annual Meeting AASLD. Boston, USA, 2-6 novembre 2007, accepted.

B) Altre comunicazioni

18. L. Dughera, G. Bellone, A. Carbone, F. Gaspari, E. Tonel, D. Tibaudi, C. Smirne, P. Mioli, G. Emanuelli. Inhibition of cell survival and invasive potential of colorectal carcinoma cells by the tyrosine kinase inhibitor STI571. 11th United European Gastroenterology Week, Madrid, 1-5 novembre 2003. Gut 2003; 35 (Suppl II):A23.
19. C. Gigli, M. Pirisi, Z. Risoffi, R. Ferrante, G. Fortina, C. Smirne, E. Salvador. Prevalenza di infezione da Strongiloidiasi in pazienti anziani ospedalizzati: metodi a confronto. XXXIII

Congresso nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Padova, 8-11 giugno 2004. *Microbiologia Medica* 2004; 19(2): 230.

20. E. Zavattaro, E. Ceriani, R. Minisini, C. Smirne, R. Tiberio, M. Pirisi, G. Leigheb. Evaluation of plasma interferon alpha concentration as a marker of disease severity in human psoriasis. European Congress on Psoriasis 2004. Parigi, 21-24 ottobre 2004. *JEADV* 2004; 6(18): 787-788.

21. C. Smirne, S. Fangazio, M.C. Barbè, C. Cornella, E. Lazzarich., R. Minisini, M. Pirisi, P. Stratta. Espressione di citochine e molecole citotossiche in reni trapiantati, rimossi chirurgicamente per rigetto cronico. Atti del XXVIII Congresso Nazionale della Società Italiana Trapianti d'Organo (SITO). Roma, 21-23 novembre 2004.

22. R. Minisini, P. Toniutto, M. Burlone, F. Caldera, C. Fabris, E. Biletta, R. Rapetti, D. Bitetto, L. Aguggia, C. Smirne, M. Pirisi. Occult hepatitis B virus infection and donor age in relationship to fibrosis progression of recurrent hepatitis C after liver transplantation. Atti del Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2006. Monaco, Germania, 15-18 marzo 2006: 258.

23. F. Caldera, C. Smirne, R. Minisini, C. Fabris, M. Bigliocca, D. Bitetto, E. Biletta, S. Grazioli, P. Toniutto, M. Pirisi, E. Faletti. Outcome of hepatitis B virus infection in relation to the Apolipoprotein H and E gene polymorphisms. Atti del Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2006. Monaco, Germania, 15-18 marzo 2006: 262.

24. C. Smirne, C. Fabris, P. Toniutto, F. Caldera, R. Mella, D. Bitetto, S. Fumagalli, E. Rossi, R. Minisini, E. Ceriani, F. Corliandò, M. Pirisi. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism and liver fibrosis in chronic hepatitis C. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Vienna, Austria, 26-30 aprile 2006. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl. 2): S205-6.

25. M. Burlone, R. Minisini, C. Fabris, F. Caldera, D. Bitetto, E. Falletti, C. Smirne, S. Grazioli, P. Toniutto, M. Pirisi. Apolipoprotein H and E gene polymorphisms and outcome of hepatitis B virus infection. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Vienna, Austria, 26-30 aprile 2006. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl. 2): S169.

26. R. Rapetti, C. Colletta, C. Vandelli, R. Minisini, L. Aguggia, C. Smirne, M. Vandelli, S. Fangazio, M. Bigliocca, P. Toniutto, C. Fabris, M. Pirisi. Analysis of factors involved in fibrosis progression among hepatitis C virus carriers with normal alanine aminotransferases. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Vienna, Austria, 26-30 aprile 2006. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl. 2): S175.

27. A. Limoncini, C. Smirne, F. Corliandò, C. Marconi, E. Scaglia, G. Carnevale Schianca, P. Toniutto, C. Fabris, M. Pirisi. Insulin resistance, insulin secretion and allelic variants of the ace and mpo genes in nondiabetic patients with nonalcoholic fatty liver disease. 42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Barcellona, Spagna, 11-15 aprile 2007. *J Hepatol* 2007; 46 (Suppl. 1): S273.

28. R. Rapetti, C. Fabris, L. Aguggia, R. Minisini, L. Francini, R. Mella, P. Toniutto, C. Smirne, C. Colletta, C. Vandelli, M. Pirisi. Hepatitis C virus carriers with normal alanine aminotransferases: analysis of factors involved in fibrosis progression. 42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Barcellona, Spagna, 11-15 aprile 2007. *J Hepatol* 2007; 46 (Suppl. 1): S211-2.

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

1. G. Bellone, D. Tibaudi, A. Carbone, C. Smirne, V. Busso, I. Ferrero, O. Bosco, C. Gramigni, R. Segir, M. Pagano, M. Camandona, M. Nano, G. Palestro, M. Dei Poli, G. Emanuelli. Il sistema c-kit/stem cell factor nel processo cancerogenetico del carcinoma del colon retto: aspetti biologici e clinici. *Minerva Chir* 2003 Dec;58(6):875-80.
2. R. Grio, L.A. Latino, E. Leotta, C. Smirne, A. Lanza, E. Spagnolo, A. Perozziello, A. Caneparo, L. Bello, R. Lerro. Sexually transmitted diseases and pelvic inflammatory disease. *Minerva Ginecol* 2004 Apr;56(2):141-7.
3. R. Grio, C. Smirne, E. Leotta, L. Bello, A. Lanza, M. Messina, A. Caneparo, L. Perugini. Acquired post partum haemophilia. *Panminerva Med* 2004 Sep; 46(3):201-3.
4. R. Grio, C. Smirne, L. Bello, A. Lanza, M.A. Latino, G. De Intinis, E. Spagnolo, E. Leotta. Chlamydia trachomatis prevalence in North-West Italy. *Minerva Ginecol* 2004 Oct; 56(5):401-6.
5. A. Carbone, U. Rodeck, F. A. Mauri, M. Sozzi, F. Gaspari, C. Smirne, A. Prati, A. Addeo, A. Novarino, A. Robecchi, O. Bertetto, G. Emanuelli, G. Bellone. Human pancreatic carcinoma cells secrete bioactive Interleukin-18 after treatment with 5-Fluorouracil: Implications for anti-tumor immune response. *Cancer Biol Ther* 2005 Feb 2; 4(2):231-41.
6. P. Toniutto, C. Fabris, R. Minisini, L. Apollonio, E. Fumo, M. Caldato, C. Smirne, M. Pirisi. Weight gain after liver transplantation and the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene. *Transplantation* 2005 May;79(10):1338-43.
7. G. Bellone, C. Smirne, F.A. Mauri, E. Tonel, A. Carbone, L. Dughera, A. Robecchi, M. Pirisi, G. Emanuelli. Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. *Cancer Immunol. Immunother* 2006 Jun;55(6):684-98.
8. C. Colletta, C. Smirne, C. Fabris, P. Toniutto, R. Rapetti, R. Minisini, M. Pirisi. Value of two non-invasive methods to detect fibrosis progression among HCV carriers with normal transaminases. *Hepatology* 2005 Oct;42(4):838-845.
9. C. Colletta, C. Smirne, C. Fabris, P. Toniutto, M. Pirisi. Reply. *Hepatology* 2006;43(2):375-376 (correspondence).
10. P. Toniutto, C. Fabris, C. Avellini, R. Minisini, D. Bitetto, E. Rossi, C. Smirne, M. Pirisi. Excess body weight, liver steatosis and early fibrosis progression due to hepatitis C recurrence after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11(38): 5944-50.
11. C. Fabris, P. Toniutto, M. Caldato, D. Bitetto, R. Minisini, C. Smirne, M. Pirisi. Low fibrosis progression of recurrent hepatitis C in apolipoprotein E epsilon4 carriers: relationship with the blood lipid profile. *Liver Int* 2005; 25(6):1128-35.
12. C. Fabris, C. Smirne, P. Toniutto, C. Colletta, R. Rapetti, R. Minisini, E. Falletti, M. Pirisi. Assessment of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and normal alanine aminotransferase values: the role of the AST to platelet ratio index. *Clin Biochem* 2006 Apr;39(4):339-43.

13. M. Pirisi, E. Salvador, Z. Bisoffi, M. Gobbo, C. Smirne, C. Gigli, R. Minisini, G. Fortina, G. Bellomo, E. Bartoli. Unsuspected strongyloidiasis in hospitalized elderly patients with and without eosinophilia. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(8):787-92.
14. G. Bellone, C. Smirne, A. Carbone, A. Buffolino, T. Scirelli, A. Prati, D. Solerio, M. Pirisi, G. Valente, M. Nano, G. Emanuelli. KIT/stem cell factor expression in premalignant and malignant lesions of the colon mucosa in relationship to disease progression and outcomes. *Int J Oncol* 2006 Oct; 29(4):851-9.
15. G. Bellone, A. Carbone, V. Busso, T. Scirelli, A. Buffolino, C. Smirne, A. Novarino, O. Bertetto, L. Tosetti, G. Emanuelli. Antagonistic Interactions Between Gemcitabine and 5-Fluorouracil in the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line Capan-2. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5(10):1294-303.
16. G. Bellone, A. Carbone, C. Smirne, T. Scirelli, A. Buffolino, A. Novarino, A. Stacchini, O. Bertetto, G. Palestro, C. Sorio, A. Scarpa, G. Emanuelli, U. Rodeck. Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol.* 2006 Sep 1; 177(5):3448-60.
17. C. Smirne, A. Carbone, M. Pirisi, G. Bellone. Imatinib mesylate: new perspectives in the treatment of solid tumours. *Expert Opin Ther Patents* 2006 Oct; 16(10):1359-1370.
18. E. Falletti, C. Fabris, P. Toniutto, E. Fontanini, A. Cussigh, M. Caldato, E. Rossi, D. Bitetto, R. Minisini, C. Smirne, M. Pirisi. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2007 Mar;27(3):239-46.
19. C. Fabris, P. Toniutto, D. Bitetto, R. Minisini, E. Fornasiere, C. Smirne, M. Pirisi. Sex-related influence of angiotensin-converting enzyme polymorphisms on fibrosis progression due to recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Gastroenterol.* 2007 Jul;42(7):543-9.
20. P. Toniutto, C. Fabris, D. Bitetto, E. Falletti, C. Avellini, E. Rossi, C. Smirne, R. Minisini, M. Pirisi. Role of AST to platelet ratio index in the detection of liver fibrosis in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, in press. Published article online: 8-Aug-2006. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04628.x
21. C. Colletta, C. Smirne, C. Marini, M. Pirisi. Liver biopsy and non-invasive alternatives in relationship to the duration of antiviral treatment for hepatitis C. Letter to editor. *J Clin Gastroenterol.* 2007, in press.
22. C. Smirne, A. Carbone, T. Scirelli, G. Bellone. Imatinib mesylate for the treatment of solid tumours: recent trials and future directions. *Current enzyme inhibition* 2006, in press.
23. P. Toniutto, R. Minisini, C. Fabris, T. De Feo, F. Marangoni, C. Avellini, D. Bitetto, R. Rapetti, C. Smirne, M. Pirisi. Occult hepatitis B virus infection in liver transplantation recipients with recurrent hepatitis C: relationship with donor age and fibrosis progression. *J Med Virol* 2007, submitted.
24. P. Stratta, C. Smirne, S. Fangazio, C. Cornella, E. Lazzarich, R. Minisini, P. Toniutto, C. Fabris, C. Barbé, M. Pirisi. ACE genotype, body weight changes and target organ damage in renal transplant recipients *J nephrol* 2007, submitted.