

Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Mediche

Dottorato di Ricerca in "MEDICINA MOLECOLARE"

TESI DI DOTTORATO

RECIDIVA DI EPATITE C POST-TRAPIANTO:
GLI ANTICORPI ANTI-CITOCROMO 2E1 PREDICONO LA
SEVERITÀ DELLA NECROINFIAMMAZIONE

Relatore: Chiar.mo Prof. Emanuele Albano

Candidato: Dr Cristina Rigamonti

Anno accademico 2007-2008

*...Alla mia famiglia
unica e speciale*

GLOSSARIO

HCV: virus dell'epatite C

HBV: virus dell'epatite B

HIV: virus dell'immunodeficienza umano

ROS: specie reattive dell'ossigeno

HNE: 4-idrossinonenale

MDA: malonildialdeide

TGF- β 1: transforming growth factor beta-1

IgG: immunoglobuline G

CYP2E1: citocromo P450 2E1

CYP3A4: citocromo P450 3A4

CYP1A2: citocromo P450 1A2

CYP2C9: citocromo P450 2C9

CYP2D6: citocromo P450 2D6

CYP2A6: citocromo P450 2A6

ANA: anticorpi anti-nucleo

SMA: anticorpi anti-muscolo liscio

LKM-1: anticorpi anti-microsomi epatici e renali

OR: odds ratios

IC: intervallo di confidenza

HR: hazard ratios

ALT: alaninoaminotransferasi

AST: aspartatoaminotransferasi

γ -GT: gammaglutamiltranspeptidasi

CyA: ciclosporina A

FK506: tacrolimus

INDICE

RIASSUNTO.....	pag. 1
EPATITE C.....	pag. 2
Storia naturale dell'infezione da HCV.....	pag. 2
Fattori di progressione.....	pag. 3
RECIDIVA DI EPATITE C POST-TRAPIANTO.....	pag. 5
Storia naturale.....	pag. 5
Diagnosi istologica.....	pag. 6
Fattori di progressione.....	pag. 7
DANNO OSSIDATIVO.....	pag. 9
Nel setting del trapianto di fegato.....	pag. 9
In corso di epatite cronica C.....	pag. 9
AUTOIMMUNITÀ.....	pag. 11
Nel setting del trapianto di fegato.....	pag. 11
In corso di epatite cronica C.....	pag. 12
REATTIVITÀ ANTI-CITOCROMI P450 ED EPATITE CRONICA C.....	pag. 13
CITOCROMO P450 2E1 (CYP2E1).....	pag. 15
SCOPO DELLO STUDIO.....	pag. 17
PAZIENTI E METODI.....	pag. 18
Pazienti.....	pag. 18

Criteri diagnostici.....	pag. 18
Indagini di laboratorio.....	pag. 18
Biopsie epatiche.....	pag. 19
Determinazione della reattività anti-addotti albumina-MDA.....	pag. 19
Determinazione della reattività anti-CYP2E1.....	pag. 20
Analisi statistica.....	pag. 21
RISULTATI.....	pag. 22
Pazienti.....	pag. 22
Reattività anti-addotti albumina-MDA.....	pag. 23
Reattività anti-CYP2E1.....	pag. 23
Reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto.....	pag. 24
Persistenza della reattività anti-CYP2E1 pre- e post-trapianto.....	pag. 24
DISCUSSIONE.....	pag. 26
TABELLE E FIGURE.....	pag. 30
BIBLIOGRAFIA.....	pag. 41

RIASSUNTO

Il riscontro di reazioni autoimmuni post-trapianto di fegato è riportato con sempre maggior frequenza. Nei pazienti non trapiantati affetti da epatite cronica C abbiamo precedentemente dimostrato una prevalenza pari al 40% di autoanticorpi anti-citocromo P450 2E1 (CYP2E1). Lo studio ha indagato la prevalenza e il significato clinico della reattività anti-CYP2E1 nei pazienti con recidiva di epatite C post-trapianto di fegato.

Nei 46 pazienti indagati gli anticorpi IgG anti-CYP2E1 sono stati riscontrati nel 41% dei sieri raccolti immediatamente prima del trapianto e nel 33% dei sieri raccolti al 12° mese post-trapianto, al momento dell'esecuzione della biopsia epatica. Nei pazienti con reattività anti-CYP2E1 persistente prima e dopo il trapianto (26%) è stata osservata una prevalenza di recidiva di epatite C con necroinfiammazione e fibrosi severa ad un anno dal trapianto significativamente superiore rispetto ai restanti pazienti. Inoltre, la probabilità di sviluppare nel follow-up post-trapianto recidiva epatica con necroinfiammazione severa è risultata significativamente aumentata nei pazienti con persistente reattività anti-CYP2E1. L'analisi multivariata e di Cox hanno confermato che la persistenza di anticorpi anti-CYP2E1 prima e dopo il trapianto, insieme alla storia di rigetto acuto e l'età del donatore superiore a 50 anni, è un fattore di rischio indipendente e significativo per lo sviluppo di recidiva di epatite C con necroinfiammazione severa.

I dati dello studio suggeriscono che le reazioni autoimmuni che coinvolgono il CYP2E1 potrebbero contribuire al danno epatico in un sottogruppo di pazienti trapiantati con recidiva di epatite C.

EPATITE C

Il virus dell'epatite C (HCV), identificato con tecniche di biologia molecolare dal gruppo di Michael Houghton nel 1989 (1), rappresenta attualmente la principale causa di epatopatia cronica nel mondo (2;3).

L'incidenza annua di infezioni sintomatiche è stimata intorno ad 1-3 casi/100000 abitanti (4). Occorre tuttavia considerare che l'infezione in fase acuta é comunemente asintomatica. Si stima che approssimativamente 180 milioni di persone nel mondo siano infette da HCV (5). In Europa la prevalenza dell'infezione si attesta intorno all'1%, con un gradiente nord-sud variabile dallo 0,5% dei paesi nordici al 2% dei paesi mediterranei (6). La mortalità HCV-correlata, legata all'insorgenza di complicanze che si sviluppano quando l'epatopatia sia evoluta in cirrosi, è duplicata dal 1990 ad oggi (7) ed è attesa aumentare nuovamente nella prossima decade (8). Le complicanze dell'infezione cronica da HCV rappresentano la causa principale di indicazione al trapianto di fegato sia in Europa (9) che negli Stati Uniti (10).

STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE DA HCV

La storia naturale dell'infezione cronica da HCV è estremamente variabile: nella maggior parte dei pazienti infetti la malattia è lentamente progressiva, con evoluzione verso la cirrosi e lo sviluppo delle complicanze con insufficienza epatica dopo decenni dall'avvenuta infezione. Tipicamente l'infezione cronica da HCV rimane clinicamente silente per parecchi anni.

Dei soggetti infettati solo una minima parte guarisce spontaneamente (15-25%), mentre in circa il 75-85% dei casi si assiste alla cronicizzazione dell'infezione (11-13), legata principalmente alla capacità del virus di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite (14;15). L'alta percentuale di cronicizzazione dell'infezione e la presentazione clinica spesso asintomatica spiegano la presenza di un grosso reservoir di soggetti infettati.

Sebbene la maggior parte dei pazienti con l'infezione acuta sviluppi l'epatite cronica, la severità della malattia epatica può variare notevolmente. La più importante complicanza dell'epatite cronica C è lo sviluppo di cirrosi, che si verifica nel 10-30% dei pazienti infettati (16-20) in un tempo variabile, stimato dall'analisi di studi retrospettivi, dai dodici ai quarantaquattro anni dal momento dell'infezione (16).

Nei pazienti cirrotici può insorgere il carcinoma epatocellulare con una incidenza annua pari al 3-10% (3;21). La mortalità annua nei pazienti cirrotici, dovuta allo sviluppo di complicanze quali ipertensione portale, insufficienza epatica o carcinoma epatocellulare, è pari al 2-5% (22).

È da considerare che la stima del tasso di progressione di fibrosi e il tempo per lo sviluppo della cirrosi dipendono dal disegno degli studi considerati e dalla popolazione di pazienti indagati. Globalmente i diversi studi suggeriscono che c'è un variabile tasso di progressione dell'epatite cronica C verso la cirrosi e le sue complicanze, verosimilmente per l'interazione di multipli fattori.

FATTORI DI PROGRESSIONE

I fattori di rischio associati alla progressione dell'epatite cronica C includono variabili non modificabili legate al virus e all'ospite (età al momento dell'infezione, sesso, razza, durata dell'infezione e fattori genetici), e variabili modificabili quali l'attività infiammatoria all'istologia, i livelli di alaninoaminotransferasi, il consumo di alcol, il fumo, i fattori metabolici (steatosi, insulino-resistenza), l'accumulo di ferro e la coinfezione con il virus dell'epatite B (HBV) o virus dell'immunodeficienza umano (HIV) (23).

L'età avanzata al momento dell'infezione è risultata correlata positivamente al tasso di progressione della malattia in diversi studi, anche dopo correzione per la durata dell'infezione (24-27).

La maggior parte degli studi riguardanti la progressione della fibrosi nell'epatite cronica C ha dimostrato una più veloce progressione negli individui di sesso maschile (25;27).

Nonostante la loro importanza nella eliminazione del virus in corso di terapia antivirale, la carica virale e il genotipo non sembrano avere nessuna influenza sulla progressione della malattia HCV-correlata (23).

Numerosi studi hanno dimostrato nei pazienti con livelli di alaninoaminotransferasi (ALT) persistentemente normali una minore progressione della fibrosi e una minore probabilità di sviluppo della cirrosi rispetto ai pazienti con livelli serici di ALT elevati (28-31).

L'assunzione cronica di alcol con livelli approssimativamente superiori a 50 g/die è associata ad un aumentato tasso di progressione dell'epatite cronica C (32-34). Il fumo è un predittore indipendente di progressione della fibrosi, anche dopo correzione per il consumo alcolico (35;36).

Esiste una stretta associazione tra steatosi ed epatite cronica C con meccanismi in parte mediati dal genotipo. Infatti, i pazienti con infezione da HCV genotipo 3 hanno più frequentemente steatosi severa e steatoepatite, quest'ultima correlata a fibrosi più avanzata (37-40). La steatosi contribuisce alla progressione dell'epatite cronica C, indipendentemente dall'età, dal sesso e dal consumo di alcol.

Nonostante siano stati identificati diversi fattori in grado di influenzare l'evoluzione dell'epatite cronica C, l'importanza relativa di molti di essi resta ancora sconosciuta. Non esistono modelli predittivi per la stratificazione del rischio di progressione, strumento che sarebbe di fondamentale importanza dal momento che non è ancora disponibile una terapia universalmente efficace e tollerabile per la cura dell'epatite cronica C.

RECIDIVA DI EPATITE C POST-TRAPIANTO

Il trapianto di fegato è il trattamento di scelta nei pazienti con cirrosi da HCV in fase avanzata. Dopo il trapianto l'infezione recidiva nel 100% dei pazienti con HCV-RNA positività pre-trapianto, determina una nuova epatite nella maggior parte dei casi (41;42) e rappresenta una delle più frequenti cause di morbidità nel post-trapianto.

Nei pazienti trapiantati la malattia è più rapida ed aggressiva rispetto a quella osservabile nei pazienti immunocompetenti (43). 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 (43), pur considerando che la reale incidenza di cirrosi C post-trapianto è sottostimata laddove non si eseguono biopsie di protocollo. Altrettanto rapido nel setting del trapianto appare il decorso della cirrosi verso l'insufficienza epatica e la perdita del graft (43-45). 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.

STORIA NATURALE

L'evoluzione della recidiva di epatite C post-trapianto è molto variabile: ci sono pazienti viremici con minimo o assente danno epatico nel post-trapianto ed altri che progrediscono rapidamente verso la cirrosi epatica e l'insufficienza d'organo. L'alta variabilità della evoluzione della recidiva epatitica è enfatizzato da uno studio basato sulla esecuzione di biopsie epatiche di protocollo annuali che ha dimostrato un'incidenza pari al 12% di fibrosi severa o cirrosi e al contrario l'assenza di fibrosi nel 30% di pazienti a 5 anni di follow-up dal trapianto (46). Dati recenti indicano inequivocabilmente che la sopravvivenza dei pazienti trapiantati per epatite C è ridotta (47) ed è significativamente inferiore a quella dei trapiantati per epatopatia non HCV-

correlata (48). Vi é inoltre evidenza che la recidiva di epatite C é ancora più severa negli ultimi anni, forse in relazione all'utilizzo di "donatori anziani" e di farmaci immunosoppressori più potenti (49-51). 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.

DIAGNOSI ISTOLOGICA

Dal momento che né i livelli di transaminasi (46) né la viremia (41) sono predittivi del danno epatico, la diagnosi e la stadiazione della recidiva di epatite C è basata sull'istologia e il modo migliore per monitorarne l'evoluzione nel tempo è l'esecuzione di biopsie epatiche sequenziali di protocollo (46;52).

Le alterazioni istopatologiche della recidiva precoce (< tre mesi post-trapianto) includono la dilatazione sinusoidale, l'infiammazione lobulare e la necrosi apoptotica focale, talora associate a vari gradi di steatosi. L'epatite acuta può svilupparsi tra il primo e il quarto mese post-trapianto, mentre le alterazioni istologiche compatibili con epatite cronica generalmente sono evidenziabili dopo il terzo-quarto mese post-trapianto (41). L'epatite cronica è dimostrabile nel 70-90% dei riceventi dopo un anno dal trapianto e nel 90-95% dei pazienti dopo 5 anni (53). Le caratteristiche istologiche della recidiva di epatite C sia nella fase acuta che cronica sono assimilabili a quelle che si osservano nei pazienti non trapiantati con epatite cronica C, con infiammazione portale e lobulare di vario grado in associazione a necrosi epatocitaria. In aggiunta, possono essere presenti altre figure istologiche quali danno duttale, venulite, colestasi, proliferazione duttulare, rigonfiamento degli epatociti in sede perivenulare, che mimano altre entità quali rigetto, ostruzione biliare o ischemia (52). Inoltre, la recidiva di epatite C può presentarsi con un pattern istopatologico simile all'epatite autoimmune con prevalenza di infiltrati infiammatori ricchi in plasmacellule ed infiammazione perivenulare e necrosi che coinvolge la maggior parte delle aree centrali, indicativi di reazioni autoimmuni/rigetto e spesso associate ad outcome negativo (54-56). In particolare, se non trattato (con aumento dell'immunosoppressione), il danno perivenulare significativo (moderato o severo) accelera lo sviluppo di fibrosi a ponte porto-portale e centro-centrale (54-56).

FATTORI DI PROGRESSIONE

Esistono una serie di fattori potenzialmente in grado di contribuire alla progressione dell'epatite C (57). In aggiunta a quelli noti 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 ri-perfusione, 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 post-trapianto (57).

Tra i fattori virologici una elevata viremia HCV pre-trapianto (58-60), precoce aumento della viremia post-trapianto (61), una elevata espressione di forme replicative del virus nel fegato (59), l'infezione con i genotipi virali 1 e 4 (49;62;63), la coinfezione con citomegalovirus (64) sono i più accreditati. Alcune caratteristiche del ricevente tra cui l'età avanzata, la razza non-bianca (41;49), il sesso femminile (51) ed una ridotta risposta immune HCV-specifica sono considerati fattori prognostici negativi. Tra i fattori legati al donatore l'età avanzata (superiore a 50 anni) (50;65;66) e la steatosi del graft (51) 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 sono in grado di influenzare negativamente l'equilibrio tra HCV circolante ed ospite (57;67-71). 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, le alterazioni istologiche precoci, in particolare il grado di attività infiammatoria nel primo anno post-trapianto (72-75), rappresentano il miglior predittore di sviluppo successivo di cirrosi. Anche la presenza di fattori potenzialmente fibrogenetici come complicanze ischemiche/biliari e sindrome da insulinoresistenza/diabete può favorire la progressione della recidiva epatitica C (76). Il danno ossidativo, che è dimostrato aumentare nel corso dell'epatite cronica C (77-80) e nel post-trapianto (81), può agire da cofattore di progressione di per sé mediante

l'attivazione della fibrogenesi e mediante l'induzione di meccanismi immunitari di danno. Ancora non chiaro è, infine, il ruolo patogenetico della comparsa di reazioni autoimmuni, evento frequente nel post-trapianto, caratterizzato dalla comparsa nel siero di autoanticorpi tissutali, indicativi della presenza di danno epatico (82).

È verosimile che l'evoluzione dell'epatite C post-trapianto sia la risultante della sinergica interazione di numerosi fattori, la cui analisi è di fondamentale importanza per la comprensione della sua patogenesi. Il trapianto di fegato rappresenta un modello unico di ricerca per studiare l'immunopatogenesi del danno da HCV nelle fasi precoci di cronicizzazione dell'infezione. Infatti, l'impatto della comparsa di fattori clinici di progressione può essere seguito strettamente nel tempo unitamente al monitoraggio della risposta immune.

DANNO OSSIDATIVO

NEL SETTING DEL TRAPIANTO DI FEGATO

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 (81;83). 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 (81). 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 stesso del trapianto, non ultima l'immunosuppressione con i farmaci inibitori della calcineurina (tacrolimus, ciclosporina A). Infatti, sebbene al tacrolimus siano state attribuite proprietà antiossidanti (84), la ciclosporina A sembrerebbe avere un potenziale pro-ossidante (85).

IN CORSO DI EPATITE CRONICA C

Il coinvolgimento dello stress ossidativo nella patogenesi dell'epatite cronica 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 (77-80). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte in eccesso in corso di danno cellulare, interagendo con gli acidi grassi polinsaturi contenuti nei fosfolipidi, danno 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 (86-89) 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) (90). Tali autoanticorpi correlano con la severità di malattia nell'epatite cronica C (90) e sono stati recentemente identificati come fattori predittivi indipendenti di sviluppo di fibrosi avanzata nella steatoepatite non alcolica (91). 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 verosimilmente espressione di meccanismo immuno-mediato di danno epatico evocato dalla presenza di stress ossidativo (92).

AUTOIMMUNITÀ

NEL SETTING DEL TRAPIANTO DI FEGATO

La comparsa di autoanticorpi tissutali post-trapianto è un evento comune (82). Lo sviluppo di reazioni autoimmuni asintomatiche e di epatopatia autoimmune post-trapianto sono documentate con sempre maggior frequenza.

Ci sono poche segnalazioni in letteratura in cui il siero dei pazienti è stato testato prima e dopo il trapianto e queste documentano che la prevalenza di autoanticorpi aumenta nel tempo dopo il trapianto (82). La presenza di autoanticorpi è stata associata ad un sfavorevole decorso clinico post-trapianto, con sviluppo di epatite cronica, disfunzione epatica severa, rigetto cronico, perdita dell'organo e morte sia in serie di pazienti adulti trapiantati che pediatrici (93).

I targets antigenici per autoimmunità fegato-specifica sono specie specifici (antigeni non polimorfici), pertanto condivisi da ricevente e donatore; l'organo trapiantato è ripopolato dalle cellule dendritiche del ricevente.

I possibili fattori favorenti l'autoimmunità nel post-trapianto sono:

- rilascio di neoantigeni dai tessuti danneggiati
- farmaci inibitori della calcineurina (tacrolimus, ciclosporina A) mediante induzione degli isoenzimi del citocromo P450 e interferenza con linfociti T regolatori: i farmaci inibitori della calcineurina predispongono allo sviluppo di autoimmunità e malattie autoimmuni, verosimilmente interferendo con i meccanismi di maturazione dei linfociti T o con la funzione delle cellule T regolatorie, con conseguente attivazione di cloni T cellulari autoaggressivi
- infezioni virali mediante meccanismi quali microchimerismo, stimolazione policlonale linfocitaria, aumentata espressione di antigeni MHC di classe I e II ed interferenza con meccanismi immunoregolatori (82).

Tra i targets molecolari delle reazioni autoimmuni in pazienti trapiantati, figurano gli isoenzimi della famiglia dei citocromi P450. Nei pazienti pediatrici trapiantati di rene è stata descritta una prevalenza pari a 21% di reattività contro diversi isoenzimi del citocromo P450 (CYP2E1, CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9) nei trattati con ciclosporina, 29% (CYP2E1, CYP3A4, CYP1A2) nei trattati con tacrolimus dopo switch da ciclosporina e 25% (CYP2E1, CYP3A4) nei trattati con tacrolimus (94). La reattività anti-citocromi è risultata correlata all'età di avvio di terapia immunosoppressiva e alla durata

della stessa e associata, in alcuni casi, a tossicità farmacologica e al rigetto d'organo (94). Nei pazienti adulti trapiantati di rene è stata descritta una prevalenza di autoanticorpi anti-citocromi pari al 7% (CYP2E1, CYP3A4) (94).

IN CORSO DI EPATITE CRONICA C

L'infezione cronica da epatite C si associa alla comparsa di fenomeni autoimmuni e sviluppo di numerosi autoanticorpi non organo-specifici. Sin dalla sua scoperta come agente eziologico dell'epatite nonA-nonB nel 1989, l'infezione da HCV è stata associata a varie condizioni immunopatologiche, tra cui la crioglobulinemia mista, la produzione di autoanticorpi, la sindrome di Sjögren, e il linfoma B-cellulare. Specifici meccanismi sono operanti nella comparsa di fenomeni autoimmuni in corso di epatite virale: tali processi verosimilmente consistono in cross-reazioni tra antigeni virali ed autoantigeni epatocitari a livello di sequenze aminoacidiche o strutture terziarie simili (mimetismo molecolare).

In associazione all'infezione cronica da HCV è stata descritta la presenza di autoanticorpi non organo-specifici con una prevalenza fino al 70% per gli anticorpi anti-actina del muscolo liscio (SMA) e fino al 40% per gli anticorpi anti-nucleo (ANA) (95). In un gruppo di 226 soggetti anti-HCV positivi identificati mediante lo screening di una popolazione non selezionata di 7000 soggetti (96), la prevalenza di autoanticorpi non organo specifici è risultata pari al 25%, molto più elevata di quella osservata nei soggetti non-HCV infetti e in quelli con infezione da virus dell'epatite B (97). Negli individui infetti la presenza di autoanticorpi è risultata associata al riscontro di danno epatico.

REATTIVITÀ ANTI-CITOCROMI P450 ED EPATITE CRONICA C

Tra gli autoanticorpi descritti in associazione all'epatite cronica C figurano quelli diretti contro diversi isoenzimi della superfamiglia del citocromo P450. In particolare, sono presenti in circa il 10% dei pazienti con epatite cronica C autoanticorpi diretti contro epitopi del citocromo P450 2D6 (CYP2D6) (anticorpi LKM-1) (98;99), e autoanticorpi anti-citocromo P450 2A6 (CYP2A6) sono stati riscontrati nel 2-8% dei casi, soprattutto in associazione con i precedenti (100). Inoltre, nei pazienti con epatite cronica C, abbiamo recentemente dimostrato una prevalenza pari al 40% di autoanticorpi IgG anti-citocromo P450 2E1 (CYP2E1), anticorpi diretti prevalentemente contro epitopi conformazionali, non cross-reattivi con il target degli autoanticorpi LKM-1 (CYP2D6), e la cui presenza è risultata indipendente dal consumo di alcol e significativamente associata alla severità della piecemeal necrosis (83).

Non è tuttora chiaro da dove derivi la reattività anti-citocromi in corso di epatite cronica C, anche se è verosimile che specifici meccanismi siano implicati nella comparsa dei fenomeni autoimmuni, in particolare il mimetismo molecolare con il virus dell'epatite C è stato proposto come meccanismo alla base dell'induzione di risposte autoimmuni. Studi più approfonditi sono stati effettuati riguardo al CYP2D6, target degli autoanticorpi LKM-1, che presenta una omologia di sequenza pari al 40% con il CYP2E1. Esiste mimetismo molecolare tra il CYP2D6 (aa 254-288, nella stessa regione riconosciuta come maggiore epitopo lineare degli anticorpi LKM-1 presenti nei pazienti con epatite autoimmune di tipo 2) e le proteine NS3 e NS5a di HCV, ossia gli anticorpi diretti contro epitopi conformazionali di CYP2D6 cross-reagiscono con epitopi conformazionali delle proteine NS3 e NS5a di HCV (101). La presenza di mimetismo molecolare conformazionale tra il CYP2D6 e le proteine di HCV potrebbe pertanto spiegare la presenza di autoanticorpi LKM-1 in circa il 10% dei pazienti affetti da epatite cronica C. Inoltre, è stata dimostrata la presenza di mimetismo molecolare tra la proteina core di HCV (epitopi 178-187) e CYP2A6 / CYP2A7 (aa 8-17) (102). Linfociti T CD8+ citotossici indotti dalla proteina core di HCV sono risultati in grado di cross-reagire contro peptidi self (forma nativa di CYP2A6 e CYP2A7 e forma processata di CYP2A6), determinando danno cellulare alle cellule non infette (102). In una serie tedesca, il 5% dei pazienti

HCV è risultato positivo per gli anticorpi anti-CYP2A6, in particolare l'8% dei pazienti HCV e LKM-1 positivi e il 2% dei pazienti HCV LKM-1 negativi (100).

Un meccanismo a più steps che coinvolge epitopi chiave sui citocromi e le omologie con sequenze virali potrebbe essere alla base della generazione di anticorpi anti-citocromi. L'ipotesi che gli antigeni intracellulari rilasciati in seguito a danno possano essere considerati come "estranei" dal sistema immune innescando la produzione di autoanticorpi anti-citocromi non è convincente: in primis, non ogni forma di danno epatico è associata alla comparsa di tali risposte; in secondo luogo, in quelle condizioni cliniche associate ad autoreattività anti-citocromo, sono presenti profili altamente specifici e distinti. La variazione nell'espressione dell'enzima, associata alla presenza di agenti inducenti e possibilmente anche mutazioni minori che modifichino la struttura tridimensionale della proteina potrebbero favorire la comparsa di una risposta autoimmune anti-citocromi (103).

Se la presenza di anticorpi anti-citocromi partecipi al danno immunologico degli epatociti non è tuttora chiarito. Se gli anticorpi si legano agli epatociti, tale evento potrebbe portare a lisi cellulare per citossicità anticorpo-mediata o attivazione del complemento o possibilmente per apoptosi. La presenza di autoanticorpi potrebbe perpetuare ed aggravare il danno epatico indotto inizialmente dal virus. È stato ipotizzato che la distruzione degli epatociti da parte dei linfociti T CD8+ citotossici determini il rilascio di proteine intracellulari come il CYP2D6, uptake di tali proteine da parte delle cellule professionali presentanti l'antigene e formazione di autoanticorpi in presenza di cellule B e linfociti CD4+ autoreattivi (104). Il danno epatico sarebbe mantenuto da T CD8+ citotossici cross-reattivi, indotti dal virus, che mediante mimetismo molecolare riconoscono le proteine self espresse sulla membrana cellulare (una volta avvenuta la clearance virale i T CD8+ sarebbero mantenuti da T helper autoreattivi) (104). L'interazione di HCV, di linfociti B autoreattivi e linfociti T CD4+ e CD8+ sarebbe pertanto necessaria per l'innescamento della risposta autoimmune anti-citocromi.

CITOCROMO P450 2E1 (CYP2E1)

Il citocromo P450 2E1 è l'isoforma più conservata dei citocromi (78% di omologia tra CYP2E1 del ratto e CYP2E1 umano) espresso in maniera costitutiva nel fegato con i livelli più alti nella zona centrolobulare (105). È un enzima inducibile dall'alcol con una variabilità interindividuale nell'espressione (forma inducibile) fino a 12 volte. Sono stati identificati alcuni polimorfismi nella regione regolatoria 5', che non sembrano avere effetti sull'espressione costitutiva dell'enzima, ma piuttosto sembrerebbero importanti per la sua induzione (106). Il CYP2E1 ha un ruolo nella gluconeogenesi (in condizioni di digiuno fornisce i substrati per la via gluconeogenetica trasformando l'acetone in acetoso), nel metabolismo di xenobiotici (solventi, idrocarburi aromatici come benzene, etanolo, acetaldeide, alotano, clorzoxazone) e nel metabolismo di prodotti di perossidazione lipidica (pentano, esano, acetone, acido linoleico e acido arachidonico) (107;108). Inoltre, l'enzima ha la capacità di produrre specie reattive dell'ossigeno (attività ossidasica) (109). È prevalentemente espresso sul versante citosolico della membrana plasmatica del reticolo endoplasmico, ma è presente anche in altri compartimenti cellulari: lisosomi, apparato di Golgi, membrana plasmatica (110).

La presenza di CYP2E1 sul versante esterno della membrana plasmatica è stato dimostrato mediante esperimenti con microscopio ad immunofluorescenza ed esperimenti di biotinizazione della superficie cellulare. Il ruolo fisiologico del CYP2E1 espresso sulla membrana cellulare è sconosciuto, ma potrebbe essere legato alla detossificazione degli xenobiotici (110). La presenza di CYP2E1 sulla membrana plasmatica sembrerebbe essere un fenomeno fisiologico.

La presenza di CYP2E1 sulla membrana plasmatica degli epatociti potrebbe rappresentare il trigger nello sviluppo di diverse forme di epatite autoimmune farmaco-indotta.

Il CYP2E1 svolge un ruolo nella patogenesi della epatopatia alcolica e della steatoepatite non alcolica, verosimilmente in quanto enzima coinvolto nella produzione di stress ossidativo. L'attività di CYP2E1, misurata mediante clearance orale di clozoxazone, è superiore in pazienti con assunzione di alcol (140-210 g/sett per più di 5 anni) rispetto ai pazienti non bevitori (111) e nei pazienti con steatoepatite non alcolica non diabetici rispetto ai controlli (112). Nel 40% circa dei pazienti con epatopatia

alcolica avanzata sono presenti, inoltre, anticorpi anti-CYP2E1, che potrebbero contribuire al danno epatico (113).

SCOPI DELLO STUDIO

Gli scopi dello studio sono:

- valutazione dell'eventuale risposta immune umorale (anticorpi IgG) diretta contro proteine modificate dai marcatori di perossidazione lipidica
- valutazione della prevalenza e dell'eventuale rilevanza clinica della risposta autoimmune umorale (autoanticorpi IgG) diretta contro il citocromo P450 2E1 sulla progressione dell'epatopatia C post-trapianto.

PAZIENTI E METODI

PAZIENTI

Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti consecutivi trapiantati per malattia epatica terminale da infezione cronica da HCV dal 2002 al 2005 presso il Centro Trapianti di Fegato del Policlinico di Milano, sottoposti a biopsia epatica di protocollo al 12° mese post-trapianto. Il siero di tutti i pazienti è stato raccolto immediatamente prima del trapianto e al momento della biopsia. Il consumo di alcol di tutti i pazienti è stato valutato prima e dopo il trapianto mediante un questionario standardizzato. Il criterio di esclusione dei pazienti è stato una biopsia epatica inadeguata.

CRITERI DIAGNOSTICI

Recidiva di epatite C è stata definita la presenza di caratteristiche istologiche di epatite acuta o cronica in pazienti con HCV-RNA sierico positivo post-trapianto, indipendentemente dai livelli di transaminasi (114). La diagnosi di epatite autoimmune “de novo” è stata definita sulla base della presenza di livelli aumentati di transaminasi (> 1.5 UNL), titolo sierico di autoanticorpi tissutali $\geq 1:160$, livello di immunoglobuline G (IgG) > 1.5 g/dL, evidenza istologica di epatite dell’interfaccia con infiltrati portalici di plasmacellule ed esclusione di epatite virus- o farmaco-indotta e rigetto acuto cronico (115).

INDAGINI DI LABORATORIO

Gli anticorpi anti-HCV sono stati testati con test ELISA di seconda generazione (Ortho DS, Raritan, NJ). La determinazione di HCV-RNA sierico è stata effettuata mediante RT-PCR.

La determinazione degli autoanticorpi antinucleo (ANA), anti-muscolo liscio (SMA), e anti-microsomi epatici e renali (LKM-1) è stata effettuata mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta eseguita su sezioni al criostato di $4 \mu\text{m}$ di fegato, rene e stomaco di ratto alla diluizione sierica di 1:40. Tutti i sieri con ANA reattività sono stati

ulteriormente caratterizzati su cellule Hep-2 alla diluizione di 1:80. I sieri positivi sono stati testati fino alla diluizione 1:320.

BIOPSIE EPATICHE

La biopsie epatiche sono state effettuate per via percutanea sotto guida ecografica (ago Menghini automatico, 16 G, Biomol, Roma). I campioni di biopsia epatica sono stati considerati adeguati se di lunghezza superiore a 1.5 cm o se contenenti ≥ 11 tratti portali completi. Fissati in formalina ed inclusi in paraffina in sezioni di spessore pari a 5 μm , dopo colorazione con ematossilina-eosina e tricromica di Masson, i campioni di biopsia epatica sono stati analizzati per la presenza di necroinfiammazione (grading 0-18) e fibrosi (staging 0-6) secondo lo score di Ishak (116). È stata definita necroinfiammazione severa la presenza di grading ≥ 9 e fibrosi severa la presenza di staging ≥ 4 . La steatosi è stata valutata secondo uno score semiquantitativo arbitrario sulla base della percentuale di epatociti con infiltrazione di grasso: assente $< 5\%$; lieve 5-24%; moderata 25-50%; severa $> 50\%$.

Il rigetto acuto cellulare è stato valutato secondo i criteri di Banff (117). Caratteristiche di rigetto cellulare tardivo overlapping con caratteristiche istologiche di epatite C sono state valutate come descritto da Demetris (115). La presenza di infiltrati ricchi in plasmacellule è stata inoltre riportata.

DETERMINAZIONE DELLA REATTIVITÀ ANTI-ADDOTTI ALBUMINA-MDA

La quantificazione della produzione di IgG dirette contro epitopi derivati da proteine modificate dai prodotti di perossidazione lipidica è stata effettuata mediante test immunoenzimatico ELISA utilizzando come antigene l'addotto albumina umana sierica-malonidialdeide. L'addotto albumina-MDA è stato preparato facendo reagire 1 mg/ml di albumina umana sierica con 50 mmol/L di MDA per 2 ore a 37°C. Le piastre ELISA (Nunc-Immuno Maxi-Sorp, Nunc, S/A, Roskilde, Denmark) sono state incubate per 4 ore a 37°C con 0.05 mg/ml di addotto albumina-MDA o albumina umana nativa solubilizzati in 0.1 M tampone bicarbonato (pH 9.6). Dopo l'incubazione, le soluzioni sono state rimosse e i siti di legame non-specifici sono stati bloccati mediante 1 ora di

incubazione e sostituite con 0.3 ml di soluzione contenente 3% di albumina bovina sierica disciolta in soluzione fosfato (PBS), pH 7.4. I sieri dei pazienti (0.2 ml, diluiti 1:50) sono stati aggiunti alle piastre in duplicato e incubati per 1 ora a 37°C. In seguito, sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS-0.25% Triton X-100. La presenza di anticorpi anti-addotti albumina-MDA nel siero dei pazienti con la formazione di un legame antigene-anticorpo è stata rivelata con l'utilizzo di un anticorpo secondario marcato (anti-IgG legato alla perossidasi, diluizione 1:5000) (Dako S.p.A., Milano, Italy) e successiva aggiunta di soluzione reagente contenente 0.4 mg/ml 1-fenilendiamina, 0.4 µg/ml di perossido d'idrogeno (30%), 5.1 mg/ml di acido citrico, e 6.1 mg/ml di Na₂HPO₄ a pH 5. Dopo 15 minuti, la reazione è stata terminata mediante l'aggiunta di 50 ml 2M H₂SO₄. I risultati sono stati espressi in unità di densità ottica (o.d.) a 495 nm dopo aver sottratto la reattività di base (background) dei sieri testata nelle piastre contenenti solo albumina umana nativa. La soglia di positività degli anticorpi IgG anti-addotto albumina-MDA è stata scelta calcolando il valore al 97.5° percentile in un gruppo di 60 soggetti sani matched per età e sesso con i pazienti (40 maschi, 20 femmine; età media 53 ± 11 anni, range 34-68 anni) provenienti dalla stessa area geografica dei pazienti.

DETERMINAZIONE DELLA REATTIVITÀ ANTI-CYP2E1

La determinazione degli anticorpi IgG anti-CYP2E1 è stata effettuata mediante test immunoenzimatico ELISA utilizzando come antigene il CYP2E1 umano ricombinante purificato (113). Le piastre ELISA (Nunc-Immuno Maxi-Sorp, Nunc, S/A, Roskilde, Denmark) sono state incubate per una notte a 4°C con 18.5 nMol citocromo P450 2E1 ricombinante umano (Oxford Biochemicals Inc. Oxford, MI, USA) solubilizzato in 0.1 M tampone bicarbonato (pH 9.6); un uguale numero di piastre è stato incubato con lo stesso volume di solo tampone bicarbonato. I siti di legame non-specifici sono stati bloccati mediante 1 ora di incubazione con 0.3 ml di soluzione contenente 3% di albumina umana sierica disciolta in soluzione fosfato (PBS), pH 7.4. I sieri dei pazienti (0.2 ml, diluiti 1:50) sono stati aggiunti alle piastre in duplicato e incubati per 1 ora a 37°C. In seguito sono stati effettuati 5 lavaggi con PBS-0.25% Triton X-100. La presenza di anticorpi anti-CYP2E1 nel siero dei pazienti con la formazione di un legame antigene-anticorpo è stata rivelata con l'utilizzo di un anticorpo secondario marcato (anti-IgG legato alla perossidasi, diluizione 1:5000) (Dako S.p.A., Milano, Italy). I risultati

sono stati espressi in unità di densità ottica (o.d.) a 495 nm dopo aver sottratto la reattività di base (background) dei sieri testata nelle piastre contenenti solo albumina umana sierica. La soglia di positività degli anticorpi IgG anti-CYP2E1 è stata scelta calcolando il valore al 97.5° percentile in un gruppo di 60 soggetti sani matched per età e sesso con i pazienti (40 maschi, 20 femmine; età media 53 ± 11 anni, range 34-68 anni) provenienti dalla stessa area geografica dei pazienti.

La determinazione della reattività anti-CYP2E1 mediante western blotting e test di immunoprecipitazione è stata effettuata utilizzando 10 pmol di CYP2E1 umano ricombinante.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata mediante software SPSS v.12 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le differenze tra i diversi gruppi di pazienti sono state testate mediante Mann-Whitney U test. Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per il confronto di frequenze tra i gruppi. Gli intervalli di confidenza sono stati calcolati con il metodo Newcombe utilizzando CIA software v.2.1.1 (by T. Bryant, Southampton University, UK). La normalità di distribuzione è stata valutata preliminarmente mediante q-q plot, Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests. In presenza di una significativa deviazione dalla ipotesi di normalità è stata effettuata una correzione mediante trasformazione logaritmica. L'effetto indipendente delle variabili significative è stato valutato mediante analisi logistica di regressione. I risultati sono stati presentati come odds ratios (OR) ed intervalli di confidenza al 95%. L'analisi di Kaplan-Meier è stata effettuata per valutare la probabilità di sviluppo di recidiva epatitica severa. I fattori di rischio associati a necroinfiammazione e fibrosi severa sono stati valutati mediante analisi proporzionale di Cox.

RISULTATI

PAZIENTI

Dei 58 pazienti inizialmente inclusi nello studio, 12 non sono stati ulteriormente considerati per decesso entro i tre mesi dal trapianto (n=9) o perché hanno rifiutato le biopsie epatiche di follow-up (n=3). I restanti 46 pazienti (37 maschi e 9 femmine) analizzati presentavano tutti recidiva di epatite C post-trapianto, erano stati consecutivamente sottoposti a biopsia epatica al 12° mese post-trapianto ed hanno avuto un follow-up di almeno 24 mesi e una o più biopsie epatiche nel corso del follow-up (ultima biopsia epatica ad un tempo mediano dal trapianto pari a 29 mesi; range interquartile 18-39 mesi). Nessuno dei pazienti era stato sottoposto a trattamento antivirale nel corso del primo anno post-trapianto; 18 pazienti (40%) sono stati sottoposti a terapia antivirale in un tempo successivo. L'età mediana al trapianto era 55 anni (range interquartile 20-65). La tabella 1 riporta le principali caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti inclusi nello studio. Il 70% dei pazienti non assumeva alcol prima e dopo il trapianto; il 30% aveva un consumo alcolico compreso tra 10 e 30 g/die. La metà dei pazienti era in terapia immunosoppressiva con ciclosporina A, la restante metà con tacrolimus; il 39% era in terapia di associazione con ciclosporina/tacrolimus e micofenolato mofetil. La diagnosi di rigetto acuto nei primi tre mesi post-trapianto era stata formulata in 13 (28%), 12 dei quali erano stati trattati con boli di steroide e uno con l'aumento della posologia dei farmaci immunosoppressori.

La prevalenza di autoanticorpi ANA \geq 1:160 nel siero al 12° mese post-trapianto è risultata pari a 20%; il 4% dei pazienti presentava positività per gli anticorpi anti-LKM1.

Al 12° mese post-trapianto in tutti i 46 pazienti HCV-RNA positivi la biopsia epatica dimostrava la presenza di caratteristiche istologiche di recidiva di epatite C con diversi gradi di severità: da lesioni minime (grading \leq 3 e staging \leq 1, n=9) a necroinfiammazione severa (grading \geq 9, n=16) o estesa fibrosi a ponte o cirrosi completa/incompleta (staging \geq 4, n=9). La Figura 1 e 2 mostrano due campioni di biopsia epatica con epatite minima ed epatite severa con setti fibrosi, rispettivamente. Tra i 16 pazienti con necroinfiammazione severa, 12 (75%) presentavano caratteristiche di moderata/severa o severa infiammazione portale (score \geq 3), 12 (75%) necrosi focale diffusa (score \geq 3), 8 (50%) numerose aree di necrosi confluyente centrolobulare (score

≥3) e 5 (31%) moderata o severa piecemeal necrosis (score ≥3). In 2 pazienti erano presenti segni di rigetto overlapping con la recidiva di epatite C. Nessuno dei pazienti presentava un infiltrato ricco in plasmacellule in associazione alle caratteristiche di recidiva dell'epatite C, né soddisfaceva i criteri per la diagnosi di epatite autoimmune de novo.

REATTIVITÀ ANTI-ADDOTTI ALBUMINA-MDA

La prevalenza di positività per IgG specifiche anti-addotto albumina-MDA immediatamente prima del trapianto è risultata pari al 30% (14/46 pazienti) e al 12° mese post-trapianto 20% (9/46 pazienti). I livelli di IgG specifiche dirette contro l'addotto albumina-MDA pre- e post-trapianto non erano significativamente diversi (mediana o.d._{495 nm} 0.777 e range interquartile 0.648-0.914 nel pre-trapianto; mediana o.d._{495 nm} 0.704 e range interquartile 0.566-0.842 nel post-trapianto) (Figura 3) e non sono risultati correlati con il grado di infiammazione e con lo stadio di fibrosi e nemmeno con i livelli degli enzimi di citolisi epatica al 12° mese post-trapianto. Tuttavia, la presenza di positività per IgG specifiche anti-addotto albumina-MDA a 12 mesi dal trapianto è risultata associata significativamente a recidiva di epatite C con fibrosi severa (staging ≥4, p=0.03; OR 6.0, IC95% 1.12–32.12) all'analisi univariata.

REATTIVITÀ ANTI-CYP2E1

La reattività anti-CYP2E1 valutata in ELISA sui sieri raccolti immediatamente prima del trapianto (mediana o.d._{495 nm} 0.380; range interquartile 0.167-0.599) non è risultata significativamente diversa da quella determinata sui sieri raccolti al 12° mese post-trapianto (mediana o.d._{495 nm} 0.282; range interquartile 0.166-0.562). Prendendo come cut-off il 97.5° percentile della reattività anti-CYP2E1 in ELISA in 60 soggetti sani matched per età e sesso con i pazienti (o.d._{495nm} 0.470) è risultato che in 19 pazienti (41%) la reattività IgG anti-CYP2E1 era al disopra del limite di controllo immediatamente prima del trapianto (Figura 4, pannello di sinistra) e in 12 di essi (26%) era mantenuta elevata al 12° mese post-trapianto, mentre in 7 pazienti veniva persa dopo il trapianto. La persistenza della reattività anti-CYP2E1 non è risultata associata al consumo di alcol post-trapianto, né alla terapia immunosoppressiva

(Tabella 2). In 3 pazienti (7%) la reattività anti-CYP2E1 era presente solo nel post-trapianto.

Gli esperimenti combinati di western blotting ed immunoprecipitazione hanno documentato che il riconoscimento di CYP2E1 in 17 (89%) dei 19 sieri positivi pre-trapianto veniva perso dopo la denaturazione della proteina in western blotting, indicando il riconoscimento preferenziale di epitopi conformazionali (Figura 4, pannello di destra).

REATTIVITÀ ANTI-CYP2E1 PRE-TRAPIANTO

I 19 pazienti con reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto presentavano al 12° mese post-trapianto un grading istologico significativamente superiore ($p=0.046$) (Figura 5, pannello di sinistra) e un'aumentata prevalenza di recidiva di epatite C con necroinfiammazione severa ($\text{grading} \geq 9$) (53% vs 22%; $p=0.037$) rispetto ai pazienti con IgG anti-CYP2E1 al di sotto del limite di controllo. Non erano invece significative le differenze in termini di stadio di fibrosi. All'analisi univariata, la presenza di reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto indipendentemente dalla positività di tali anticorpi post-trapianto ($p=0.037$) e la storia di rigetto acuto ($p=0.021$) erano significativamente associati a recidiva di epatite C con necroinfiammazione severa, mentre l'associazione con l'età del donatore >50 anni era ai limiti della significatività ($p=0.069$) (Tabella 3). Età del ricevente, sesso del donatore e ricevente, tipo di immunosoppressione, uso dei boli di steroide, consumo di alcol, genotipo HCV e viremia HCV media nel primo anno post-trapianto non erano significative all'analisi univariata. All'analisi multivariata la reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto, il rigetto acuto e l'età del donatore >50 anni sono risultati predittori indipendenti di recidiva di epatite C con infiammazione severa a 12 mesi dal trapianto (Tabella 3, modello multivariata 1).

PERSISTENZA DELLA REATTIVITÀ ANTI-CYP2E1 PRE- E POST-TRAPIANTO

I 12 pazienti che hanno mantenuto elevata la reattività anti-CYP2E1 al 12° mese post-trapianto avevano livelli di transaminasi (ALT $p=0.002$, AST $p=0.001$), grading necroinfiammatorio ($p=0.001$) e stadio di fibrosi ($p=0.006$) significativamente superiori rispetto agli altri pazienti (Tabella 2; Figura 6). Non era diversa nei due gruppi di pazienti ($p=0.21$) la prevalenza di autoanticorpi ANA (Tabella 2). I 12 pazienti con reattività IgG anti-CYP2E1 persistentemente positiva avevano una prevalenza di

ricidiva di epatite C con necroinfiammazione severa (grading ≥ 9 ; $p=0.001$) e fibrosi severa (staging ≥ 4 ; $p=0.039$) significativamente superiore rispetto ai pazienti con reattività anti-CYP2E1 persistentemente negativa o positiva solo pre- o solo post-trapianto. In particolare, i pazienti con reattività anti-CYP2E1 persistentemente positiva avevano una prevalenza significativamente superiore di score elevati di necrosi confluyente centrolobulare (5/12 versus 4/34 pazienti, $p=0.039$) e di infiammazione portale (9/12 versus 11/34 pazienti, $p=0.017$) rispetto agli altri. All'analisi univariata la persistenza di autoanticorpi IgG anti-CYP2E1 auto-reactivity era associata ad aumentato rischio di recidiva di epatite C con necroinfiammazione severa (OR 11.6, 95%IC 2.5-54.4; $p=0.002$) a 12 mesi dal trapianto. L'inclusione di questa variabile nell'analisi multivariata dopo correzione per i livelli totali di IgG ha confermato il ruolo della persistenza della reattività anti-CYP2E1 come fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di recidiva epatitica con necroinfiammazione severa (Tabella 3, modello multivariata 2). Inoltre, il confronto di Nagelkerke's R-square dei valori delle due analisi multivariate ha dimostrato che la persistenza di reattività IgG anti-CYP2E1 era un migliore predittore della severità della recidiva di epatite C rispetto alla presenza della reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto (0.56 vs 0.43) (Tabella 3).

L'analisi di Kaplan-Meier ha rivelato che la probabilità di sviluppo di recidiva epatitica con necroinfiammazione severa nel corso del follow-up era significativamente superiore (Log Rank test $p=0.005$, HR non corretto 3.4; 95% IC 1.4-8.5; $p=0.008$) nei pazienti con persistente reattività anti-CYP2E1 (Figura 7). Non vi erano invece differenze considerando la reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto. I fattori di rischio indipendenti associati allo sviluppo di severa necroinfiammazione sono stati inclusi nell'analisi di Cox, che ha confermato che l'età del donatore >50 anni (HR corretto 3.1; 95% IC 1.1-8.4; $p=0.028$), la storia di rigetto acuto (HR corretto 2.9; 95% CI 1.1-7.6; $p=0.026$) e la persistenza di anticorpi anti-CYP2E1 (HR corretto 3.5; 95%CI 1.3-8.9; $p=0.01$) aumentavano significativamente il rischio di sviluppo di recidiva epatica post-trapianto con necroinfiammazione severa.

Sono stati analizzati anche i fattori di rischio per lo sviluppo di fibrosi severa (staging ≥ 4) ad un anno dal trapianto: la presenza persistente di anticorpi anti-CYP2E1 al trapianto e dopo 12 mesi é risultata significativamente associata allo staging solo all'analisi univariata ($p=0.034$); all'analisi multivariata l'unico fattore di rischio indipendente è risultato il grading istologico ($p=0.01$; OR 29; 95% IC 2.9-294) (Tabella 4).

DISCUSSIONE

La severità del danno epatico dopo trapianto di fegato nei pazienti con recidiva di epatite C può essere molto variabile e innumerevoli fattori possono contribuire alla evoluzione della recidiva di epatite C (44;47;52;53;57;70;118). Tra questi, il nostro studio ha indagato il ruolo dello stress ossidativo e della presenza di reazioni autoimmuni anti-citocromo 2E1.

La stretta associazione tra stress ossidativo ed infezione cronica da HCV e il suo contributo nella progressione del danno epatico sono stati ben dimostrati. Nel setting del trapianto è stato riportato che lo stress ossidativo è aumentato indipendentemente da eventi quali rigetto, ricorrenza dell'epatopatia o insufficienza del graft (81). Nella nostra serie di pazienti con recidiva di epatite C la presenza di positività anticorpale specifica per l'addotto albumina-malonildialdeide è risultata associata a malattia più severa in termini di fibrosi ad un anno dal trapianto. Tuttavia, all'analisi multivariata la necroinfiammazione severa è risultata essere l'unico predittore indipendente di fibrosi nella recidiva di epatite C, in accordo con osservazioni precedenti che documentavano la forte associazione tra necroinfiammazione e progressione della fibrosi nei pazienti con recidiva di epatite C (57;72-75;119).

L'epatite cronica C è spesso associata a manifestazioni di autoimmunità sia epatica che extraepatica (98). Sebbene lo sviluppo di epatite autoimmune de novo nei riceventi di trapianto di fegato sia ben documentata (82;93;120), esistono pochi dati in merito al ruolo delle reazioni autoimmuni nella progressione della recidiva di epatite C. Due studi recenti hanno riportato che un sottogruppo di pazienti con recidiva di epatite C e istologia epatica caratterizzata dalla presenza di infiltrati ricchi in plasmacellule, suggestivi di reazioni autoimmuni, avevano un'evoluzione più aggressiva dell'epatite associata ad outcome negativo (54;55).

Il citocromo P450 2E1 è una delle isoforme dei citocromi più conservate e pertanto rappresenta un'antigene non polimorfico specie-specifico espresso sia nel fegato del ricevente che del donatore. Vi sono sempre maggiori evidenze che numerosi isoenzimi dei citocromi, incluso il citocromo P450 2E1, sono trasportati attraverso le vescicole

secretorie dal reticolo endoplasmico alla membrana plasmatica degli epatociti, dove sono espressi sul versante extracellulare (110;121-123). Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che gli anticorpi anti-CYP2E1 associati all'epatite cronica C si legano agli epitopi di CYP2E1 espressi sul versante extracellulare della membrana epatocitaria (83), in analogia con quanto documentato nei pazienti con epatite da alcol in cui gli autoanticorpi anti-CYP2E1 riconoscono il CYP2E1 sulla membrana plasmatica (121). Pertanto, gli autoanticorpi anti-CYP2E1 potrebbero contribuire al danno epatico attivando la citotossicità anticorpo-dipendente. Tuttavia, potrebbe essere coinvolta anche la risposta immune mediata dai linfociti T contro il CYP2E1, analogamente a quanto documentato nell'epatite autoimmune di tipo 2 caratterizzata dalla presenza degli anticorpi LKM-1 e dalla presenza di linfociti T autoreattivi contro il CYP2D6 (124;125).

Il nostro studio ha dimostrato che gli autoanticorpi IgG anti-CYP2E1 circolanti sono presenti nel 41% dei pazienti con malattia epatica terminale da infezione da HCV che vengono sottoposti a trapianto di fegato. Tale prevalenza è molto simile a quella precedentemente documentata in un gruppo non selezionato di pazienti con epatite cronica C (83). Un anno dopo il trapianto di fegato i pazienti con reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto elevata hanno presentato un'aumentata prevalenza di recidiva di epatite C con necroinfiammazione severa (grading ≥ 9). Inoltre, la presenza di reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto, insieme all'età del donatore superiore a 50 anni e la storia di rigetto acuto, è risultata essere un fattore di rischio per lo sviluppo di recidiva epatitica con necroinfiammazione severa nei nostri pazienti. Nonostante la casistica inclusa nello studio sia relativamente piccola, tuttavia i nostri dati sono in accordo con studi precedenti condotti su più numerose coorti di pazienti trapiantati che hanno dimostrato l'associazione indipendente tra severità della recidiva epatitica C e sia l'età del donatore che la storia di rigetto acuto (50;57;75;126;127). Tra i pazienti inclusi in questo studio, il 26% ha mantenuto la reattività anti-CYP2E1 al di sopra del limite di controllo ad un anno di follow-up dal trapianto. La persistenza della autoreattività anti-CYP2E1 prima e dopo il trapianto è risultata essere un migliore predittore di severità della recidiva epatitica rispetto alla presenza della reattività IgG anti-CYP2E1 pre-trapianto. Inoltre, l'analisi di Kaplan-Meier ha dimostrato che la probabilità di sviluppo di recidiva epatitica con necroinfiammazione severa nel corso del follow-up post-trapianto sia significativamente superiore nei pazienti con reattività IgG anti-CYP2E1 persistente prima e dopo il

trapianto. Nei nostri pazienti, la presenza di risposta autoimmune contro il CYP2E1 non è risultata associata al riscontro istologico di infiltrati ricchi in plasmacellule simili a quelli evidenziabili in corso di epatite autoimmune. In una quota significativa di pazienti con persistenza della reattività anti-CYP2E1 prima e dopo il trapianto era presente, invece, necrosi confluyente coinvolgente la maggior parte delle aree centrali, caratteristica suggestiva di reazioni autoimmuni o rigetto (115). Tale aspetto suggerisce la possibilità che in un sottogruppo di pazienti trapiantati HCV-infetti la perdita della tolleranza nei confronti del CYP2E1 induca risposte immuni mediate dai linfociti T contro gli epatociti ricchi in CYP2E1 nelle aree centrolobulari, mimando il danno epatico da rigetto e contribuendo così all'evoluzione della recidiva di epatite C.

La persistenza della reattività anti-CYP2E1 è risultata associata anche ad un aumentato rischio di fibrosi severa (staging ≥ 4) a 12 mesi di follow-up dal trapianto. Tuttavia, all'analisi multivariata la necroinfiammazione severa è risultata essere l'unico predittore indipendente di fibrosi nella recidiva di epatite C, in accordo con osservazioni precedenti che documentavano la forte associazione tra necroinfiammazione e progressione della fibrosi in tale ambito (57;72-75;119)

Gli anticorpi anti-CYP2E1 sono stati riscontrati per la prima volta in associazione con l'epatite indotta da alotano (128), ma sono stati rilevati anche in pazienti con danno epatico da idrofluoroclorocarboni refrigeranti (129) o con epatite idiosincrasica indotta da anestetici (130). Inoltre, gli stessi autoanticorpi sono presenti in circa il 35-40% dei pazienti con epatopatia alcolica avanzata (113). Attualmente, i meccanismi responsabili dello sviluppo di reattività anti-CYP2E1 nell'epatite cronica C non sono noti. Lytton e collaboratori hanno riportato precedentemente che gli autoanticorpi anti-citocromi sono significativamente aumentati nei bambini trapiantati in terapia immunosoppressiva e in alcuni casi sono associati a tossicità da farmaci e rigetto d'organo (94). Nella nostra serie di pazienti, la reattività anti-CYP2E1 è risultata presente già prima del trapianto nel 41% dei casi e pertanto non influenzata dai farmaci immunosoppressori. Ugualmente, il consumo di alcol post-trapianto non è risultato associato alla persistenza della reattività anti-CYP2E1. Quest'ultima osservazione potrebbe sembrare in contrasto con la nozione che l'etanolo aumenta l'espressione di CYP2E1 negli epatociti e che gli anticorpi anti-CYP2E1 sono riscontrabili in un gruppo di pazienti con epatopatia alcolica (113). Tuttavia, la mancata associazione degli autoanticorpi anti-CYP2E1 con il consumo di alcol è stata precedentemente documentata nel nostro precedente studio condotto in

un'ampia coorte di pazienti con epatite cronica C con differente consumo alcolico (83). Numerosi studi hanno identificato strette omologie di sequenza e cross-reattività tra epitopi B cellulari sul CYP2D6 riconosciuti dai sieri dei pazienti con epatite cronica C LKM-1 positivi e proteine di HCV, cytomegalovirus e herpes virus-1 (101;131-133), suggerendo come il mimetismo molecolare con gli antigeni virali potrebbe essere responsabile dello sviluppo della reattività anti-CYP2D6. Anche se gli autoanticorpi anti-CYP2E1 non cross-reagiscono con il CYP2D6 (83), l'omologia di sequenza tra i due citocromi suggerisce l'ipotesi che il mimetismo molecolare potrebbe promuovere anche la reattività anti-CYP2E1 nei pazienti con infezione cronica da HCV.

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato che la presenza di auto-reattività anti-CYP2E1 nei pazienti trapiantati di fegato con recidiva di epatite C è un predittore di severità della necroinfiammazione, che a sua volta è associata con la progressione della fibrosi. Questi dati supportano le più recenti osservazioni che evidenziano come le risposte autoimmuni innescate dall'infezione da HCV potrebbero essere considerate tra i fattori che peggiorano l'evoluzione della recidiva di epatite C (54;55). Studi ulteriori su più ampie casistiche sono necessari per confermare se la persistenza di autoanticorpi anti-CYP2E1 e/o la presenza di tali anticorpi al trapianto possano essere utilizzati come predittori per l'identificazione di pazienti a rischio di malattia severa.

TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e demografiche dei 46 pazienti con recidiva di epatite C sottoposti a biopsia epatica al 12° mese post-trapianto.

CARATTERISTICHE	
Maschi, No.	37 (80%)
Età al trapianto, anni *	55 (47–58)
Età al momento dello studio, anni *	56 (48–59)
Body mass index, Kg/m ² *	24.8 (22.9–27.3)
Consumo di alcol, No.	14 (30%)
HCV genotipo 1, No.	34 (74%)
ANA ≥1:160, No.	9 (20%)
Anti-LKM1, No.	2 (4%)
ALT, UI/L *	50 (27–129)
AST, UI/L *	50 (27–97)
γ-GT, UI/L *	55 (26–145)
IgG, g/dL *	1.2 (1.0–1.6)
Terapia immunosoppressiva:	
Ciclosporina A, No.	23 (50%)
Tacrolimus, No.	23 (50%)
Micofenolato mofetil, No.	18 (40%)

* I valori sono espressi come mediana (range interquartile).

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e demografiche dei 12 pazienti con recidiva di epatite C e reattività anti-CYP2E1 persistente a confronto con le caratteristiche cliniche e demografiche dei 34 pazienti con recidiva di epatite C senza reattività anti-CYP2E1 persistente.

FEATURES	Persistenza di anti-CYP2E1 IgG (No.=12)	No persistenza di anti-CYP2E1 IgG (No.=34)	p
Maschi, No.	11 (92%)	26 (77%)	0.41 ^
Età al trapianto, anni *	55 (45–60)	54 (47–58)	0.98 §
Età al momento dello studio, anni *	56 (46–61)	56 (48–59)	0.89 §
Body mass index, Kg/m ² *	24.7 (22.8–27.1)	24.8 (22.9–27.5)	0.88 §
Consumo di alcol, No.	2 (17%)	12 (35%)	0.29 ^
HCV genotipo 1, No.	9 (75%)	25 (73%)	1.0 ^
ANA ≥1:160, No.	4 (33%)	5 (15%)	0.21 ^
Anti-LKM1, No.	0	2 (6%)	–
ALT, UI/L *	143 (67–225)	40 (25–66)	0.002 §
AST, UI/L *	112 (62–171)	36 (26–72)	0.001 §
γ-GT, UI/L *	92 (52–177)	42 (25–110)	0.10 §
IgG, g/dL *	1.6 (1.4–1.9)	1.1 (0.9–1.5)	0.001 §
Grading istologico (Ishak score)*	10 (8–11)	6 (3–8)	0.001 §
Staging istologico (Ishak score)*	3 (2–4)	1 (1–2)	0.006 §
Terapia immunosoppressiva:			
Ciclosporina A, No.	8 (67%)	15 (44%)	0.31 ^
Tacrolimus, No.	4 (33%)	19 (56%)	0.31 ^
Micofenolato mofetil, No.	4 (33%)	14 (41%)	0.74 ^

* I valori sono espressi come mediana (range interquartile).

^ Fisher's Exact test

§ Mann-Whitney U-test

Tabella 3. Analisi univariata e multivariata dei fattori di rischio associati alla presenza di recidiva epatitica con necroinfiammazione severa (grading ≥ 9) alla biopsia epatica al 12° mese post-trapianto nei 46 pazienti.

	PREDITTORE		UNIVARIATA		MULTIVARIATA 1 *		MULTIVARIATA 2 §	
	p	O.R. (IC95%)	p	O.R. (IC95%)	p	O.R. (IC95%)	p	O.R. (IC95%)
Modello Multivariata 1	Reattività IgG anti-CYP2E1 pre-trapianto	0.037	3.9 (1.1-14.0)	0.017	9.0 (1.5-54.5)			
	*Età del ricevente	0.234	1.0 (0.9-1.0)					
	*Sesso del ricevente	0.919	1.1 (0.2-5.1)					
	*HCV genotipo 1	0.902	1.1 (0.3-4.4)					
	*HCV carica virale (>800000 UI/mL)	0.480	1.0 (1.0-1.0)					
	*Età del donatore (>50 anni)	0.069	3.3 (0.9-11.9)	0.013	11.2 (1.7-76.6)	0.025	9.7 (1.3-69.8)	
	*Sesso del donatore	0.702	1.3 (0.4-4.7)					
	*Mismatch sesso donatore-ricevente	0.743	0.8 (0.2-3.0)					
	*Terapia immunosoppressiva (Ciclosporina A vs Tacrolimus)	0.537	1.5 (0.4-5.0)					
	*Storia di rigetto acuto	0.021	5.0 (1.3-19.7)	0.022	6.8 (1.3-35.7)	0.012	12.8 (1.7-94.6)	
	*Boli di steroide	0.204	2.4 (0.6-9.3)					
*Consumo di alcol	0.560	0.7 (0.2-2.6)						
Reattività IgG anti-CYP2E1 persistente	0.002	11.6 (2.5-54.4)			0.002	30.1 (3.4-267.9)		
% di predizione corretta						78%	83%	
Nagelkerke's R-square						0.434	0.562	

Il modello logistico multivariata 1 è stato calcolato includendo la reattività IgG anti-CYP2E1 pre-trapianto e le variabili contrassegnate da *.

Il modello logistico multivariata 2 è stato calcolato includendo la reattività IgG anti-CYP2E1 persistente e le variabili contrassegnate da *.

Tabella 4. Analisi univariata e multivariata dei fattori di rischio associati alla presenza di recidiva epatica con fibrosi severa (staging ≥ 4) alla biopsia epatica al 12° mese post-trapianto nei 46 pazienti.

PREDITTORE	UNIVARIATA		MULTIVARIATA	
	p	O.R. (IC95%)	p	O.R. (IC95%)
Età del ricevente	0.406	1.0 (0.9-1.2)		
Sesso del ricevente	0.823	0.8 (0.1-4.8)		
HCV genotipo 1	0.583	0.6 (0.1-3.1)		
HCV carica virale (>800000 IU/mL)	0.616	1.0 (1.0-1.0)		
Età del donatore (>50 anni)	0.273	2.4 (0.5-10.9)		
Sesso del donatore	0.242	2.8 (0.5-16.1)		
Mismatch sesso donatore-ricevente	0.453	0.5 (0.1-2.9)		
Immunosuppressive therapy (CyA vs FK506)	0.711	0.8 (0.2-3.3)		
Boli di steroide	0.769	0.8 (0.1-4.4)		
Storia di rigetto acuto	0.707	1.4 (0.2-6.5)		
Consumo di alcol	0.553	0.6 (0.1-3.3)		
Reattività IgG anti-CYP2E1 persistente §	0.034	5.4 (1.1-25.3)	0.438	2.1 (0.3-13.4)
Grading istologico (Ishak score) §	0.001	38.6 (4.2-356.5)	0.004	29.2 (2.9-294.5)
% di predizione corretta			81%	
Nagelkerke's R-square			0.504	

§ Questi predittori sono stati inclusi nell'analisi multivariata.

Figura 1: Campione di biopsia epatica che dimostra la presenza di epatite minima (grading 3, staging 1 secondo Ishak). Colorazione ematossilina-eosina

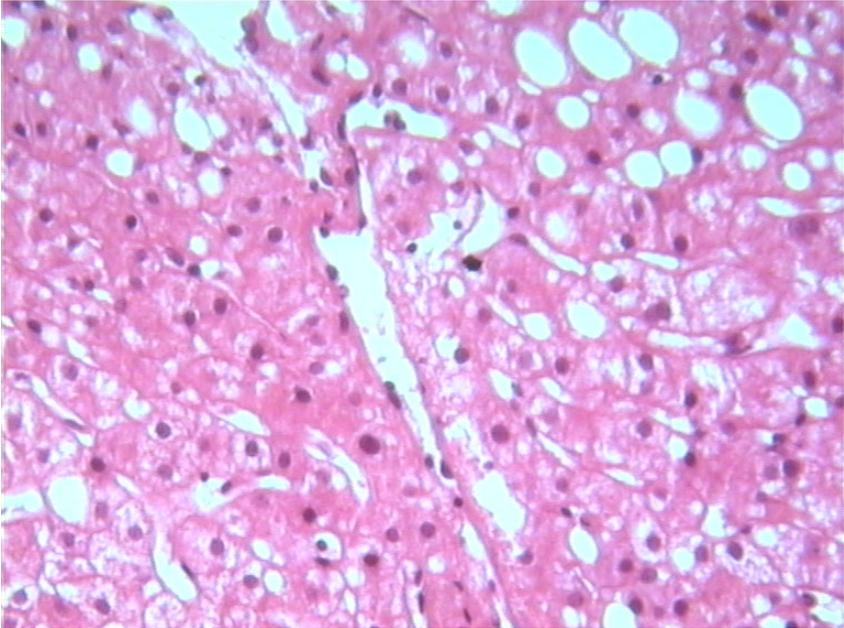
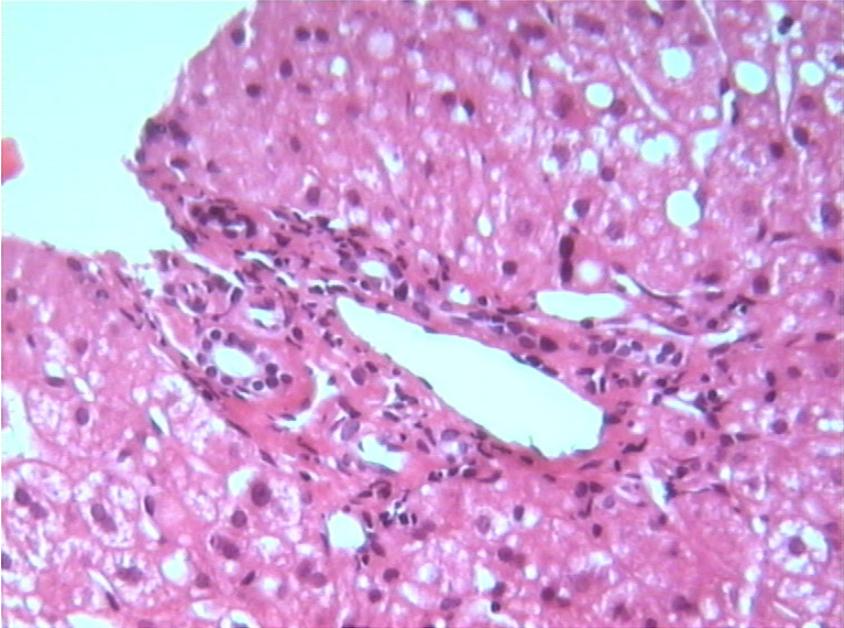


Figura 2: Campione di biopsia epatica che dimostra la presenza di epatite severa con necrosi centrolobulare e setti fibrosi (grading 10, staging 4 secondo Ishak). Colorazione ematossilina-eosina e tricromica di Masson.

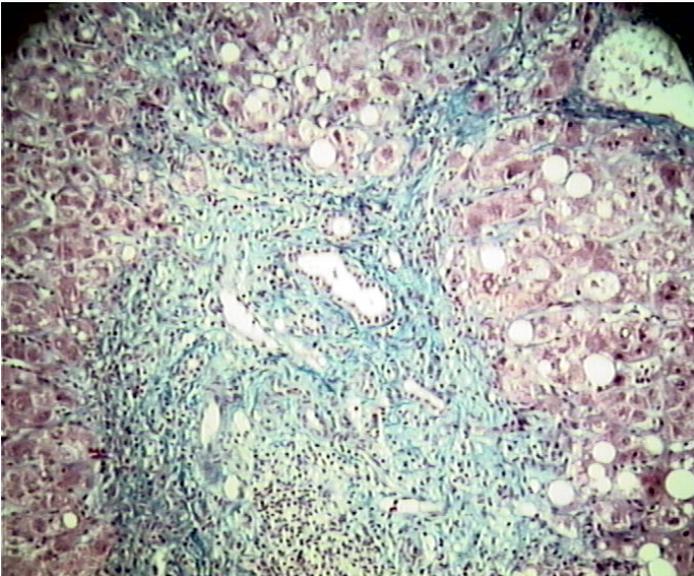
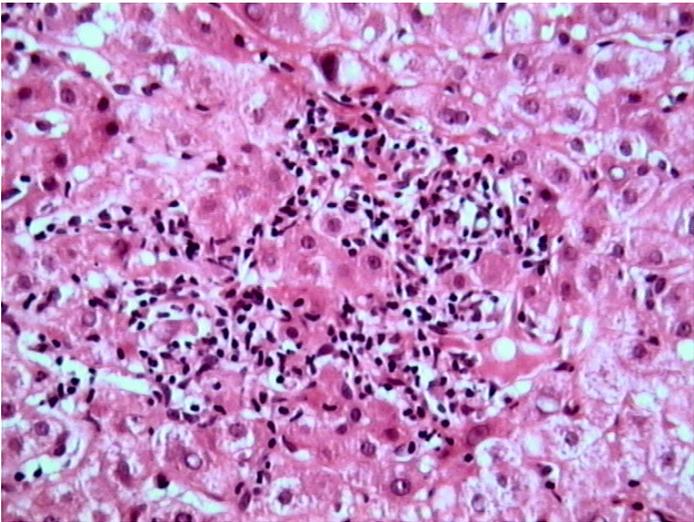
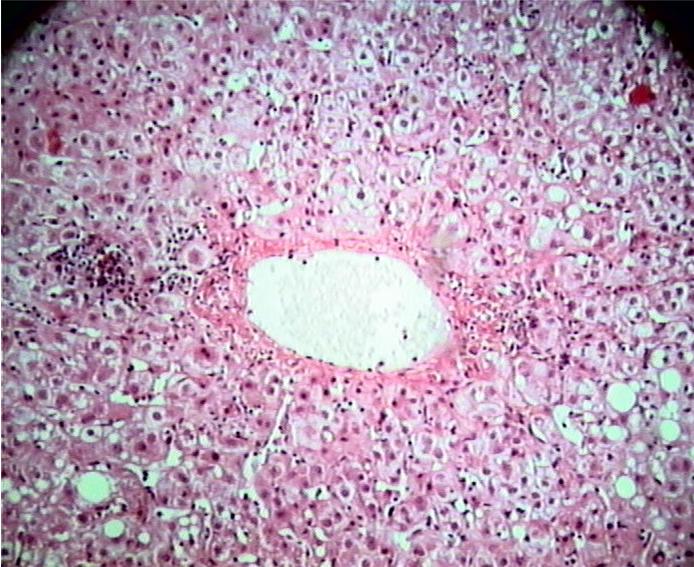


Figura 3: Reattività IgG anti addotti albumina-MDA in 46 pazienti sottoposti a trapianto di fegato per malattia epatica terminale da infezione cronica da HCV. I sieri dei pazienti sono stati raccolti immediatamente prima del trapianto e al 12° mese post-trapianto. I risultati sono espressi in unità di densità ottica (o.d.) a 495 nm dopo aver sottratto la reattività di base (background) dei sieri. La linea orizzontale rappresenta la media dei livelli di IgG anti addotti albumina-MDA in unità di densità ottica a 495 nm prima e dopo il trapianto. I cerchi neri rappresentano I pazienti con reattività IgG anti-CYP2E1 persistente prima e dopo il trapianto.

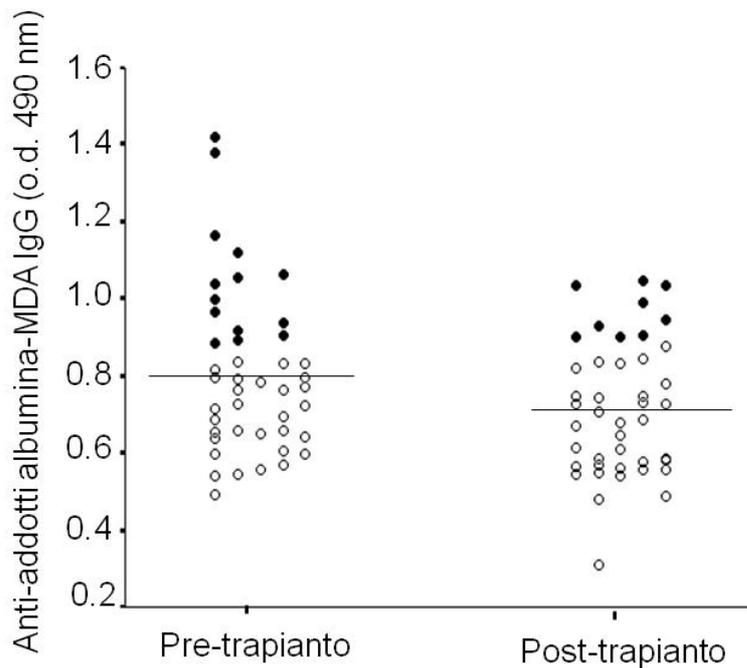


Figura 4: (Pannello di sinistra) Reattività IgG anti citocromo P450 2E1 ricombinante umano in 46 pazienti sottoposti a trapianto di fegato per malattia epatica terminale da infezione cronica da HCV. I sieri dei pazienti sono stati raccolti immediatamente prima del trapianto e al 12° mese post-trapianto. I risultati sono espressi in unità di densità ottica (o.d.) a 495 nm dopo aver sottratto la reattività di base (background) dei sieri. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta il limite di reattività IgG anti-CYP2E1 calcolata al 97.5° percentile in un gruppo di 60 soggetti sani provenienti dalla stessa area geografica. I cerchi neri rappresentano i pazienti con reattività IgG anti-CYP2E1 persistente prima e dopo il trapianto.

(Pannello di destra) Riconoscimento degli epitopi conformazionali di CYP2E1 da parte degli autoanticorpi anti-CYP2E1. I blots dimostrano la capacità degli autoanticorpi IgG di riconoscere il CYP2E1 negli esperimenti di western blot (WB) e immunoprecipitazione (IP) in 7 pazienti con reattività anti-CYP2E1 pre-trapianto al di sopra del limite di controllo scelti a caso. Le colonne rappresentano il livello individuale di reattività anti-CYP2E1 in ELISA.

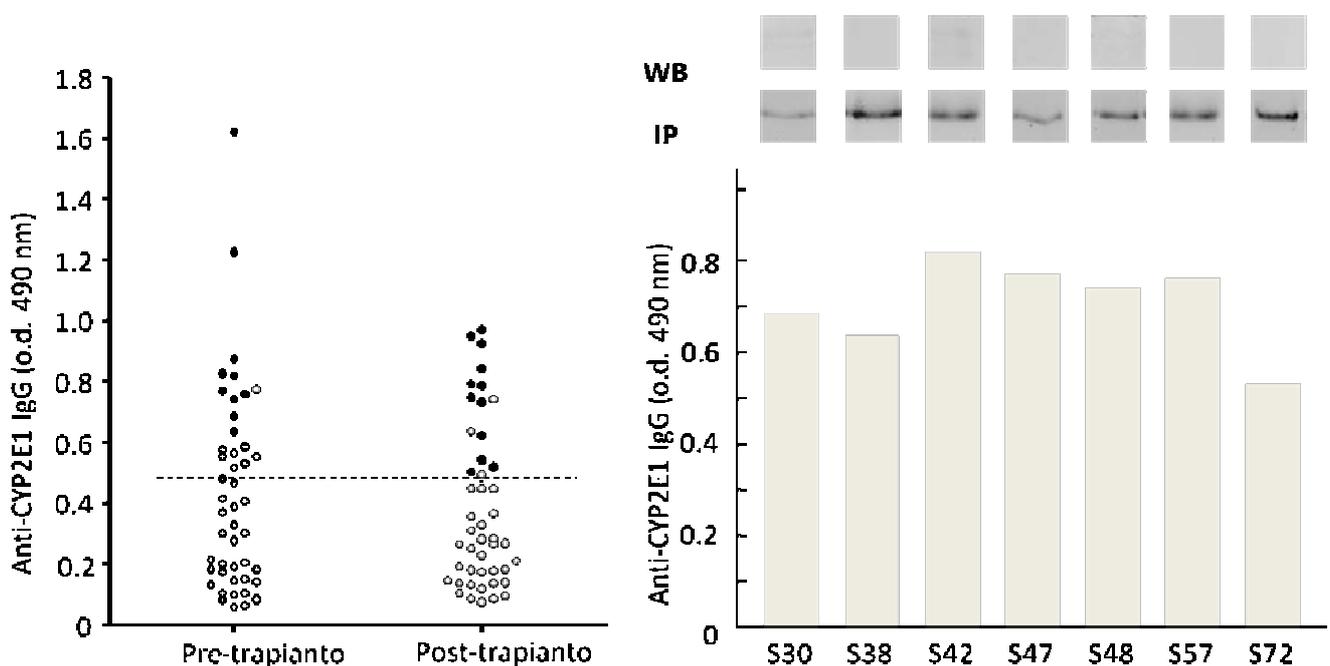


Figura 6: Grading necroinfiammatorio (**pannello di sinistra**) e staging di fibrosi (**pannello di destra**) valutati secondo lo score di Ishak nelle biopsie epatiche eseguite al 12° mese post-trapianto in pazienti con recidiva di epatite C e reattività IgG anti-CYP2E1 prima e dopo il trapianto persistentemente al disopra del limite di controllo (cerchi neri; n=12) o persistentemente nell'ambito del range di controllo o solo pre- o solo post-trapianto al disopra del limite di controllo (cerchi vuoti; n=34). Le linee orizzontali rappresentano le mediane.

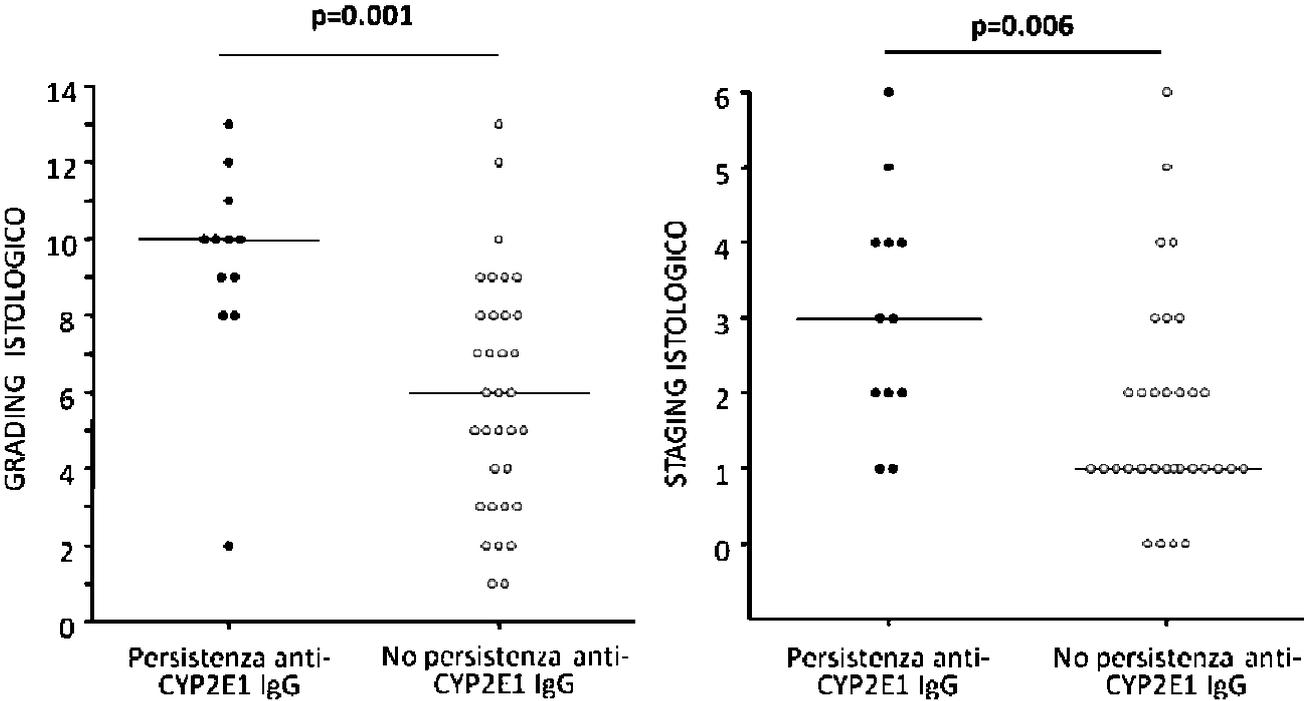
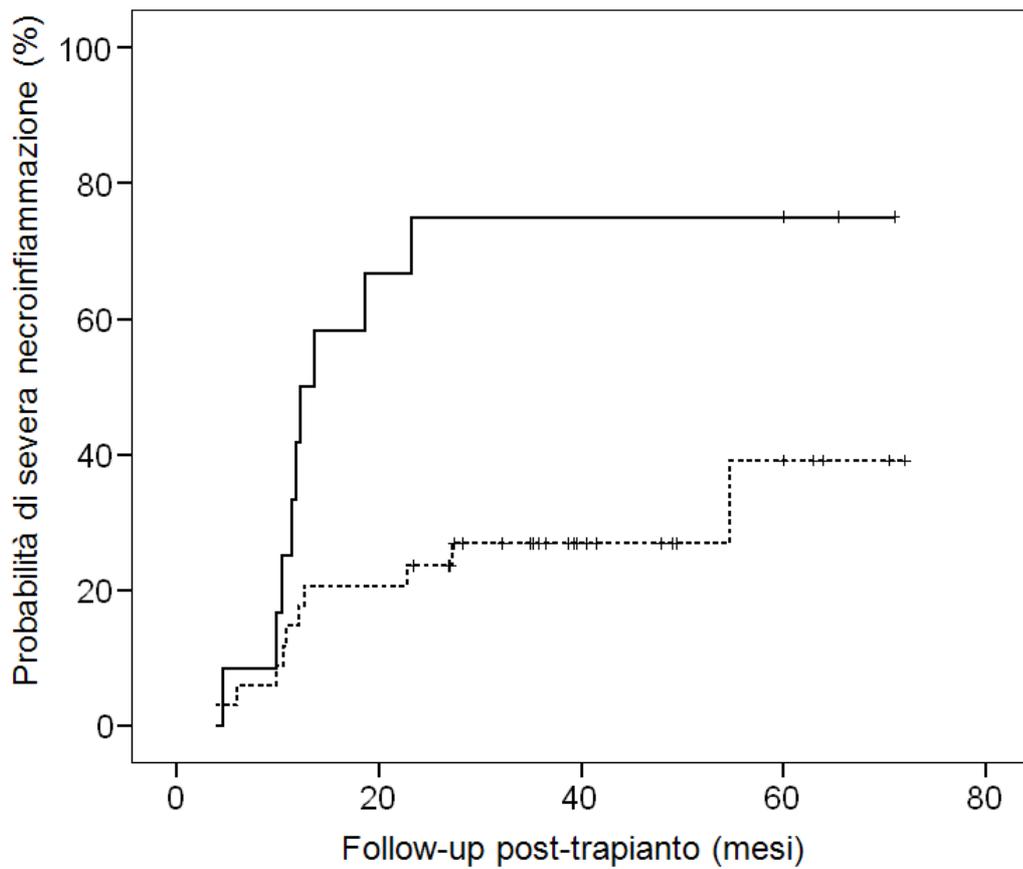


Figura 7: Curva di Kaplan-Meier della probabilità di sviluppo di necroinfiammazione severa (grading ≥ 9) nel corso del follow-up fino a 72 mesi nei pazienti con recidiva di epatite C: confronto tra i pazienti con reattività IgG anti-CYP2E1 persistente prima e dopo il trapianto (linea continua; n=12) e i pazienti con reattività IgG anti-CYP2E1 persistentemente nell'ambito del range di controllo o solo pre- o solo post-trapianto al disopra del limite di controllo (linea tratteggiata; n=34). Le linee verticali indicano i pazienti censurati. Mantel-Cox log rank p=0.005.



BIBLIOGRAFIA

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
2. Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 32: 98-112.
3. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999; 31 Suppl 1: 9-16.
4. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 62S-5S.
5. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-67.
6. Trepo C, Pradat P. Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J Hepatol* 1999; 31 Suppl 1: 80-3.
7. Wise M, Bialek S, Finelli L, Bell BP, Sorvillo F. Changing trends in hepatitis C-related mortality in the United States, 1995-2004. *Hepatology* 2008; 47: 1128-35.
8. Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl* 2003; 9: 331-8.
9. Prieto M, Berenguer M, Rimola A, Loinaz C, Barrios C, Clemente G, Figueras J, Vargas V, Casafont F, Pons JA, Herrero JI. Liver transplantation in hepatitis C. A Spanish multi-centre experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 771-6.
10. Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology* 2002; 36: S1-S2.
11. Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, Ruol A. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992; 340: 697-8.
12. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, del Valle OM, Rodes J, Ordinas A. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995; 21: 639-44.
13. Mattsson L, Sonnerborg A, Weiland O. Outcome of acute symptomatic non-A, non-B hepatitis: a 13-year follow-up study of hepatitis C virus markers. *Liver* 1993; 13: 274-8.
14. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-8.
15. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, . Evidence for immune selection

of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3468-72.

16. Pagliaro L, Peri V, Linea C, Camma C, Giunta M, Magrin S. Natural history of chronic hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 28-44.
17. Tong MJ, el Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; 332: 1463-6.
18. Di Bisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter HJ. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 1991; 14: 969-74.
19. Takahashi M, Yamada G, Miyamoto R, Doi T, Endo H, Tsuji T. Natural course of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 240-3.
20. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 1334-40.
21. Colombo M. Natural history and pathogenesis of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999; 31 Suppl 1: 25-30.
22. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112: 463-72.
23. Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. *Gastroenterology* 2008; 134: 1699-714.
24. Minola E, Prati D, Suter F, Maggiolo F, Caprioli F, Sonzogni A, Fraquelli M, Paggi S, Conte D. Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C. *Blood* 2002; 99: 4588-91.
25. Wright M, Goldin R, Fabre A, Lloyd J, Thomas H, Trepo C, Pradat P, Thursz M. Measurement and determinants of the natural history of liver fibrosis in hepatitis C virus infection: a cross sectional and longitudinal study. *Gut* 2003; 52: 574-9.
26. Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut* 2004; 53: 451-5.
27. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-32.
28. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol* 2001; 34: 730-9.

29. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Cazals-Hatem D, Pham BN, Gervais A, Le B, V, Levy S, Degott C, Valla DC, Marcellin P. Prospective study on anti-hepatitis C virus-positive patients with persistently normal serum alanine transaminase with or without detectable serum hepatitis C virus RNA. *Hepatology* 2001; 34: 1000-5.
30. Puoti C, Castellacci R, Montagnese F, Zaltron S, Stornaiuolo G, Bergami N, Bellis L, Precone DF, Corvisieri P, Puoti M, Minola E, Gaeta GB. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol* 2002; 37: 117-23.
31. Kyrilagitsis I, Portmann B, Smith H, O'Grady J, Cramp ME. Liver histology and progression of fibrosis in individuals with chronic hepatitis C and persistently normal ALT. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1588-93.
32. Ostapowicz G, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1998; 27: 1730-5.
33. Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, McCarthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998; 28: 805-9.
34. Harris DR, Gonin R, Alter HJ, Wright EC, Buskell ZJ, Hollinger FB, Seeff LB. The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Ann Intern Med* 2001; 134: 120-4.
35. Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, Rueff B, Valla DC, Degos F. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 34: 121-5.
36. Hezode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, Pawlostky JM, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008; 134: 432-9.
37. Westin J, Nordlinder H, Lagging M, Norkrans G, Wejstal R. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *J Hepatol* 2002; 37: 837-42.
38. Hofer H, Bankl HC, Wrba F, Steindl-Munda P, Peck-Radosavljevic M, Osterreicher C, Mueller C, Gangl A, Ferenci P. Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2880-5.
39. Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, Adinolfi LE, Asselah T, Jonsson JR, Smedile A, Terrault N, Paziienza V, Giordani MT, Giostra E, Sonzogni A, Ruggiero G, Marcellin P, Powell EE, George J, Negro F. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* 2006; 130: 1636-42.

40. Bedossa P, Moucari R, Chelbi E, Asselah T, Paradis V, Vidaud M, Cazals-Hatem D, Boyer N, Valla D, Marcellin P. Evidence for a role of nonalcoholic steatohepatitis in hepatitis C: a prospective study. *Hepatology* 2007; 46: 380-7.
41. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35: 666-78.
42. 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: S1-S9.
43. Gane E. The natural history and outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-infected recipients. *Liver Transpl* 2003; 9: S28-S34.
44. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, Carrasco D, San Juan F, Burgueno MD, Mir J, Berenguer J. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 852-8.
45. Berenguer M, Prieto M, Palau A, Rayon JM, Carrasco D, Juan FS, Lopez-Labrador FX, Moreno R, Mir J, Berenguer J. Severe recurrent hepatitis C after liver retransplantation for hepatitis C virus-related graft cirrhosis. *Liver Transpl* 2003; 9: 228-35.
46. Berenguer M, Rayon JM, Prieto M, Aguilera V, Nicolas D, Ortiz V, Carrasco D, Lopez-Andujar R, Mir J, Berenguer J. Are posttransplantation protocol liver biopsies useful in the long term? *Liver Transpl* 2001; 7: 790-6.
47. 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: 889-96.
48. 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: 549-57.
49. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M, Cordoba J, Herola A, Ascher N, Mir J, Berenguer J, Wright TL. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000; 32: 673-84.
50. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayon JM, Martinez F, Carrasco D, Moya A, Orbis F, Mir J, Berenguer J. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36: 202-10.
51. Berenguer M. Host and donor risk factors before and after liver transplantation that impact HCV recurrence. *Liver Transpl* 2003; 9: S44-S47.
52. Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: S14-S18.

53. Gane EJ. The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl* 2008; 14 Suppl 2: S36-S44.
54. Fiel MI, Agarwal K, Stanca C, Elhadj N, Kontorinis N, Thung SN, Schiano TD. Posttransplant plasma cell hepatitis (de novo autoimmune hepatitis) is a variant of rejection and may lead to a negative outcome in patients with hepatitis C virus. *Liver Transpl* 2008; 14: 861-71.
55. Khettry U, Huang WY, Simpson MA, Pomfret EA, Pomposelli JJ, Lewis WD, Jenkins RL, Gordon FD. Patterns of recurrent hepatitis C after liver transplantation in a recent cohort of patients. *Hum Pathol* 2007; 38: 443-52.
56. Demetris AJ, Sebagh M. Plasma cell hepatitis in liver allografts: Variant of rejection or autoimmune hepatitis? *Liver Transpl* 2008; 14: 750-5.
57. Berenguer M. What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J Hepatol* 2005; 42: 448-56.
58. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, Everhart J, Zetterman R, Lake J, Detre K, Hoofnagle J. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28: 823-30.
59. McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40: 368-74.
60. Pelletier SJ, Raymond DP, Crabtree TD, Berg CL, Iezzoni JC, Hahn YS, Sawyer RG, Pruett TL. Hepatitis C-induced hepatic allograft injury is associated with a pretransplantation elevated viral replication rate. *Hepatology* 2000; 32: 418-26.
61. Charlton M. Liver biopsy, viral kinetics, and the impact of viremia on severity of hepatitis C virus recurrence. *Liver Transpl* 2003; 9: S58-S62.
62. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Mishiro S, Maertens G, Reynes M, Okamoto H, Bismuth H, Brechot C. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995; 108: 1088-96.
63. 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: 11292-7.
64. Burak KW, Kremers WK, Batts KP, Wiesner RH, Rosen CB, Razonable RR, Paya CV, Charlton MR. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: 362-9.
65. Machicao VI, Bonatti H, Krishna M, Aqel BA, Lukens FJ, Nguyen JH, Rosser BG, Satyanarayana R, Grewal HP, Hewitt WR, Harnois DM, Crook JE, Steers JL, Dickson RC. Donor age affects fibrosis progression and graft survival after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 2004; 77: 84-92.

66. 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: 1133-8.
67. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Greenberg HB, Wright TL. Hepatitis C virus and the host: An imbalance induced by immunosuppression? *Hepatology* 2000; 32: 433-5.
68. 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: 889-91.
69. Papatheodoridis GV, Davies S, Dhillon AP, Teixeira R, Goulis J, Davidson B, Rolles K, Dusheiko G, Burroughs AK. The role of different immunosuppression in the long-term histological outcome of HCV reinfection after liver transplantation for HCV cirrhosis. *Transplantation* 2001; 72: 412-8.
70. Lake JR. The role of immunosuppression in recurrence of hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9: S63-S66.
71. 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: S21-S27.
72. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, Maertens G, Williams R. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 815-20.
73. Prieto M, Berenguer M, Rayon JM, Cordoba J, Arguello L, Carrasco D, Garcia-Herola A, Olaso V, De Juan M, Gobernado M, Mir J, Berenguer J. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29: 250-6.
74. Firpi RJ, Abdelmalek MF, Soldevila-Pico C, Cabrera R, Shuster JJ, Theriaque D, Reed AI, Hemming AW, Liu C, Crawford JM, Nelson DR. One-year protocol liver biopsy can stratify fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2004; 10: 1240-7.
75. Guido M, Fagioli S, Tessari G, Burra P, Leandro G, Boccagni P, Cillo U, Naccarato R, Rugge M. Histology predicts cirrhotic evolution of post transplant hepatitis C. *Gut* 2002; 50: 697-700.
76. Foxton MR, Quaglia A, Muiesan P, Heneghan MA, Portmann B, Norris S, Heaton ND, O'Grady JG. The impact of diabetes mellitus on fibrosis progression in patients transplanted for hepatitis C. *Am J Transplant* 2006; 6: 1922-9.
77. De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F, Van Thiel DH, Floyd RA. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 291-5.
78. Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della LG, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 449-56.

79. 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: 1041-50.
80. Paradis V, Mathurin P, Kollinger M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Piton A, Opolon P, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. *J Clin Pathol* 1997; 50: 401-6.
81. Burke A, FitzGerald GA, Lucey MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 217-21.
82. Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmunity after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 36: 271-6.
83. Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Serino R, Moia S, Alchera E, Carini R, Rigamonti C, Sartori M, Albano E. Detection of auto-antibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007; 46: 605-12.
84. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A, Toledo-Pereyra LH. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* 1997; 64: 594-8.
85. Wolf A, Trendelenburg CF, Diez-Fernandez C, Prieto P, Houy S, Trommer WE, Cordier A. Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 1328-34.
86. 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: 1262-71.
87. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Gentilini P, Dianzani MU. 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: 1044-50.
88. Parola M, Pinzani M, Casini A, Leonarduzzi G, Marra F, Caligiuri A, Ceni E, Biondi P, Poli G, Dianzani MU. 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: 261-4.
89. Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, Robino G, Tamagno E, Aragno M, Danni O, Autelli R, Colombatto S, Dianzani MU, Pinzani M, Parola M. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40: 60-8.
90. Rigamonti C, Mottaran E, Reale E, Rolla R, Cipriani V, Capelli F, Boldorini R, Vidali M, Sartori M, Albano E. Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 42-9.

91. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, Burt AD, Day CP. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; 54: 987-93.
92. 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: 197-203.
93. Vergani D, Mieli-Vergani G. The impact of autoimmunity on hepatocytes. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 140-51.
94. Lytton SD, Berg U, Nemeth A, Ingelman-Sundberg M. Autoantibodies against cytochrome P450s in sera of children treated with immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 293-302.
95. Dickson RC. Clinical manifestations of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997; 1: 569-85.
96. Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, Sodde M, Fratti N, De Martin C, Cristianini G. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology* 1994; 20: 1442-9.
97. Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, Muratori P, Masutti F, Muratori L, Cassani F, Bianchi FB, Tiribelli C. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999; 45: 435-41.
98. Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 339-52.
99. Strassburg CP, Vogel A, Manns MP. Autoimmunity and hepatitis C. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 322-31.
100. Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, Loges S, Schmidt E, Gershwin ME, Manns MP. Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003; 39: 800-6.
101. Marceau G, Lapierre P, Beland K, Soudeyans H, Alvarez F. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry? *Hepatology* 2005; 42: 675-82.
102. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, Cerny A. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *J Exp Med* 1999; 190: 169-76.
103. Bogdanos DP, McFarlane IG. Cytochrome P450 2A6 meets P450 2D6: an enigma of viral infections and autoimmunity. *J Hepatol* 2003; 39: 860-3.
104. Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595-601.

105. Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Penttila KE, Glaumann H, Lindros KO. Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 55-60.
106. Hu Y, Hakkola J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. Structural and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat and human cytochrome P450 2E1 genes: identification of a polymorphic repeat in the human gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 286-93.
107. Terelius Y, Ingelman-Sundberg M. Metabolism of n-pentane by ethanol-inducible cytochrome P-450 in liver microsomes and reconstituted membranes. *Eur J Biochem* 1986; 161: 303-8.
108. Laethem RM, Balazy M, Falck JR, Laethem CL, Koop DR. Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *J Biol Chem* 1993; 268: 12912-8.
109. Ekstrom G, Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1313-9.
110. Neve EP, Ingelman-Sundberg M. Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem* 2008; 392: 1075-84.
111. Liangpunsakul S, Kolwankar D, Pinto A, Gorski JC, Hall SD, Chalasani N. Activity of CYP2E1 and CYP3A enzymes in adults with moderate alcohol consumption: a comparison with nonalcoholics. *Hepatology* 2005; 41: 1144-50.
112. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37: 544-50.
113. Vidali M, Stewart SF, Rolla R, Daly AK, Chen Y, Mottaran E, Jones DE, Leathart JB, Day CP, Albano E. Genetic and epigenetic factors in autoimmune reactions toward cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 410-9.
114. Ferrell LD, Wright TL, Roberts J, Ascher N, Lake J. Hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Hepatology* 1992; 16: 865-76.
115. Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, Czaja A, Daskal I, El Monayeri MS, Fontes P, Fung J, Gridelli B, Guido M, Haga H, Hart J, Honsova E, Hubscher S, Itoh T, Jhala N, Jungmann P, Khettry U, Lassman C, Ligato S, Lunz JG, III, Marcos A, Minervini MI, Molne J, Nalesnik M, Nasser I, Neil D, Ochoa E, Pappo O, Randhawa P, Reinholt FP, Ruiz P, Sebahg M, Spada M, Sonzogni A, Tsamandas AC, Wernerson A, Wu T, Yilmaz F. Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology* 2006; 44: 489-501.
116. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, . Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-9.

117. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658-63.
118. Belli LS, Burroughs AK, Burra P, Alberti AB, Samonakis D, Camma C, De Carlis L, Minola E, Quaglia A, Zavaglia C, Vangeli M, Patch D, Dhillon A, Cillo U, Guido M, Faggioli S, Giacomoni A, Slim OA, Airoidi A, Boninsegna S, Davidson BR, Rolles K, Pinzello G. Liver transplantation for HCV cirrhosis: improved survival in recent years and increased severity of recurrent disease in female recipients: results of a long term retrospective study. *Liver Transpl* 2007; 13: 733-40.
119. Sreekumar R, Gonzalez-Koch A, Maor-Kendler Y, Batts K, Moreno-Luna L, Poterucha J, Burgart L, Wiesner R, Kremers W, Rosen C, Charlton MR. Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 1125-30.
120. Czaja AJ. Autoimmune hepatitis after liver transplantation and other lessons of self-intolerance. *Liver Transpl* 2002; 8: 505-13.
121. Eliasson E, Kenna JG. Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothane hepatitis. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 573-82.
122. Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Belghiti J, Houssin D, Ballet F, Feldmann G, Guengerich FP, Pessayre D. Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* 1993; 104: 203-16.
123. Neve EP, Eliasson E, Pronzato MA, Albano E, Marinari U, Ingelman-Sundberg M. Enzyme-specific transport of rat liver cytochrome P450 to the Golgi apparatus. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333: 459-65.
124. Longhi MS, Hussain MJ, Bogdanos DP, Quaglia A, Mieli-Vergani G, Ma Y, Vergani D. Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 2007; 46: 472-84.
125. Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* 2006; 130: 868-82.
126. Machicao VI, Bonatti H, Krishna M, Aqel BA, Lukens FJ, Nguyen JH, Rosser BG, Satyanarayana R, Grewal HP, Hewitt WR, Harnois DM, Crook JE, Steers JL, Dickson RC. Donor age affects fibrosis progression and graft survival after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 2004; 77: 84-92.
127. Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, Schluger LK, Theise N, Kishikawa K, Kolesnikov V, Bodenheimer H, Emre S, Miller CM. Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21: 30-4.
128. Bourdi M, Chen W, Peter RM, Martin JL, Buters JT, Nelson SD, Pohl LR. Human cytochrome P450 2E1 is a major autoantigen associated with halothane hepatitis. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 1159-66.

129. Hoet P, Graf ML, Bourdi M, Pohl LR, Duray PH, Chen W, Peter RM, Nelson SD, Verlinden N, Lison D. Epidemic of liver disease caused by hydrochlorofluorocarbons used as ozone-sparing substitutes of chlorofluorocarbons. *Lancet* 1997; 350: 556-9.
130. Njoku DB, Mellerson JL, Talor MV, Kerr DR, Faraday NR, Outschoorn I, Rose NR. Role of CYP2E1 immunoglobulin G4 subclass antibodies and complement in pathogenesis of idiosyncratic drug-induced hepatitis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 258-65.
131. Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, Bianchi F, Williams R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003; 170: 1481-9.
132. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88: 1370-8.
133. Yamamoto AM, Cresteil D, Homberg JC, Alvarez F. Characterization of anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM1) from hepatitis C virus-positive and -negative sera. *Gastroenterology* 1993; 104: 1762-7.