

Alma Mater Studiorum  
Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche: progetto n. 3 "Fisiologia Applicata e Fisiopatologia

Ciclo XXIV

**Settore Concorsuale:** 06/B1

**Settore scientifico disciplinare:** MED09

TITOLO TESI

**RISPOSTA IMMUNITARIA EPATITE B SPECIFICA IN PAZIENTI AFFETTI  
DA EPATOCARCINOMA**

**Coordinatore Dottorato**

Prof. Ildebrando Lucio Cocco

**Relatore**

Prof. Mauro Bernardi

**Presentata da:** Lilia Testa

**n. matricola:** 0000379484

**Esame finale anno 2012**

# INDICE

---

<b>1. <i>Il Virus dell'epatite B</i></b>	
1.1 Struttura del virione	pag. .... 1
1.2 Genoma virale	pag. .... 2
1.3 Ciclo replicativo	pag. .... 4
1.4 Epidemiologia dell'infezione	pag. .... 5
1.5 Storia naturale dell'infezione da HBV	pag. .... 8
1.6 Immunopatogenesi del danno epatico	pag. .... 10
<b>2. <i>Il carcinoma epatocellulare</i></b>	
2.1 Epidemiologie ed eziologia	pag. .... 12
2.2 Carcinogenesi	pag. .... 13
2.3 Meccanismi molecolari	pag. .... 16
2.4 Storia naturale	pag. .... 23
2.5 Anatomia patologica	pag. .... 25
2.6 Biomarcatori	pag. .... 26
2.7 Sistemi di prevenzione	pag. .... 29
2.8 Approcci terapeutici	pag. .... 30
<b>3. <i>Proteina X del virus dell' HBV</i></b>	
3.1 Caratteristiche generali di HBx	pag. .... 32
3.2 HBx e regolazione apoptotica	pag. .... 33
3.3 HBx e ciclo cellulare	pag. .... 35
3.4 HBx e risposta immunitaria	pag. .... 35
3.5 HBx e il suo ruolo nell' insorgenza della fibrosi e nella angiogenesi	pag. .... 36
<b>4. <i>Ruolo delle citochine nell'epatocarcinoma</i></b>	
4.1 Interleuchina-8	pag. .... 40
4.2 Interleuchina-6	pag. .... 41
4.3 Interleuchina-10	pag. .... 42
<b>5. <i>Parte Sperimentale</i></b>	
Scopo del lavoro	pag. .... 44
Materiali e metodi	pag. .... 46
Risultati	pag. .... 52
Discussione	pag. .... 57
<b>6. <i>Bibliografia</i></b>	pag. .... 60

# CAPITOLO 1

---

## *Il virus dell'epatite B*

Il virus dell'epatite B (hepatitis B virus: HBV) è il prototipo di una famiglia di virus a DNA di piccole dimensioni e muniti di envelope [1]. Questo virus ha una struttura grossolanamente circolare, un genoma a DNA parzialmente bicatenario ed una peculiare ed insolita strategia replicativa [1].

### 1.1 Struttura del virione

Al microscopio elettronico, il siero di pazienti con infezione da HBV presenta diversi tipi di particelle virali, strutturalmente ben distinte, alcune complete, altre incomplete [2,3,4]:

- “particelle di Dane”: particelle sferoidali a doppio guscio di 42 nm;
- particelle sferiche di circa 22 nm,
- particelle filamentose del diametro di 22 nm e di lunghezza variabile.

Le “particelle di Dane” altro non sono che i virioni infettanti dell'HBV e la loro presenza nel siero è indicativa di attiva replicazione virale nel fegato.

Sono costituite da un involucro esterno lipoproteico (*envelope*) di 7 nm contenente tutti gli

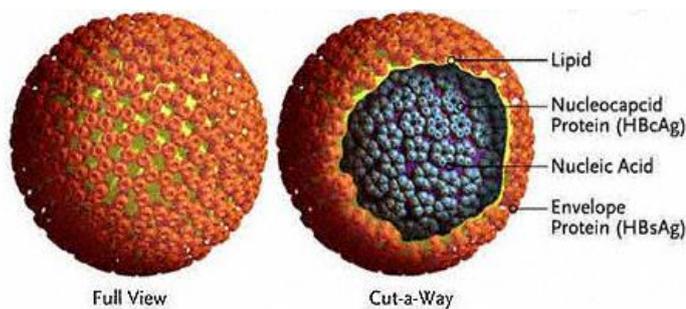


Figura 1: struttura del virus B

antigeni di superficie del virus, e da un rivestimento proteico interno (*capside*), dotato di specificità antigenica (*antigene core*) che nel suo interno racchiude il genoma virale (HBV-DNA) e la DNA-

polimerasi virus-specifica. Nel loro insieme, le molecole proteiche del capsid, il genoma e la DNA-polimerasi formano il core della particella virale di 30 nm di diametro [2].

Le particelle sferiche e filamentose sono costituite solo dall'involucro lipoproteico e mancano di nucleocapside e di genoma, di conseguenza non sono infettanti.

L'involucro del virione è formato dal doppio strato lipidico proveniente dalle cellule dell'ospite e da tre glicoproteine virali chiamate proteine di superficie small (S), middle (M) e large (L). Il rivestimento esterno dei diversi tipi di particelle virus-relate presenti nel siero è costituito principalmente dalla proteina S, mentre le proteine M e L sono presenti in minor quantità. La proteina di superficie S rappresenta pertanto un antigene di frequente riscontro chiamato antigene di superficie dell'epatite B (hepatitis B surface antigen: HBsAg) [2,3].

Una delle caratteristiche peculiari dell'HBV è l'enorme eccesso con cui vengono prodotte alcune proteine virali (in particolare le proteine di superficie e la forma secretoria della proteina nucleocapsidica). L'esubero di sintesi delle proteine di superficie fa sì che solo una piccola porzione di esse vengano utilizzate per la costituzione del rivestimento del virione, la maggior parte viene invece secreta sotto forma di particella (sferica o filamentosa) difettiva, che pur presentando la reattività "HBsAg", non è infettiva, in quanto non contiene l'acido nucleico virale [4].

## 1.2 Genoma virale

Il genoma dell'HBV è costituito da una molecola di DNA circolare a doppia elica incompleta, del peso molecolare di  $2.3 \times 10^6$  dalton [2]. Il doppio anello è formato da un filamento lungo a polarità negativa di dimensioni costanti (*minus strand*) e da un filamento corto a polarità positiva che può variare dal 15 al 60% della lunghezza della forma circolare (*plus strand*).

Il genoma ha un'organizzazione molto compatta, vale a dire che ogni nucleotide si trova in una regione codificante e più della metà del genoma è tradotto da più moduli di lettura aperta (*open reading frames, ORFs*) [5].

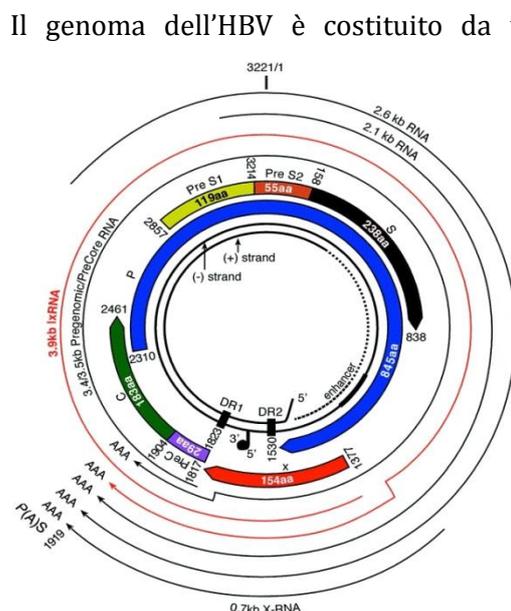


Figura 2: organizzazione del genoma virale

L'analisi di sequenza del DNA virale (HBV) ha portato alla identificazione di quattro ORFs localizzati tutti sul minus strand [5]:

- ORF pre-S/S che codifica per gli antigeni di superficie (pre-S1, pre-S2 e S)
- ORF pre-C/C che codifica per le proteine strutturali del core e per l'antigene e (HBeAg)

- gene P che codifica per la polimerasi virale
- gene X che codifica per una proteina il cui ruolo nel ciclo biologico del virus rimane tuttora ignoto.

### Proteine di superficie

L'ORF che codifica per le proteine strutturali dell'involucro esterno della particella di Dane è costituito da un unico modulo che comprende sia il *gene S* sia due altre regioni contigue che lo precedono nello stesso modulo, definite *pre-S<sub>1</sub>* e *pre-S<sub>2</sub>* [4]. Il genoma può così codificare per le tre diverse proteine di superficie: S, M e L. La proteina L è il prodotto dell'intero ORF (*preS<sub>1</sub>* + *preS<sub>2</sub>* + S), la M del gene S e della sequenza *preS<sub>2</sub>* e la proteina S è codificata dal solo gene S.

Tutte le tre proteine sono costituenti essenziali dell'involucro esterno dell'HBV ove sono stabilmente rappresentate e sembrano svolgere importanti funzioni quali ad esempio l'assemblaggio del core a livello citoplasmatico, l'adesione alle membrane plasmatiche delle cellule dell'ospite e la penetrazione della particella virale all'interno della cellula epatica [3].

### Proteine del core

Come per l'ORF *pre-S/S*, anche per l'ORF del core sono presenti due regioni identificate come *pre-C* e C [3]. Il prodotto del gene C è la proteina del core (HBcAg) che costituisce l'unità fondamentale del nucleocapside e, sintetizzata nel citoplasma della cellula ospite, ritorna nel nucleo concorrendo poi all'assemblaggio della particella virale infettiva. Se viene espresso l'intero modulo di lettura (*pre-C/C*) si ottiene una proteina che differisce dall'HBcAg per la presenza di una regione tradotta dalla sequenza *pre-C*; questa sequenza contiene un piccolo peptide che ha la funzione di trasportare il prodotto proteico nel reticolo endoplasmico della cellula ospite in cui la proteina subisce un taglio proteolitico prima della secrezione [3]. Questo taglio origina l'antigene nucleocapsidico "e" (HBeAg), fisicamente distinto dall'HBcAg. L'HBeAg non sembra indispensabile per le funzioni biologiche e vitali del virus ma ne è stata mantenuta la produzione in tutti gli hepadnavirus: è possibile che ciò tragga ragione dal suo ruolo di modulatore dell'interazione virus/sistema immune dell'ospite [3,6,7].

### Proteina P

Il prodotto codificato dal gene P, una proteina basica ricca di istidina, si caratterizza per l'attività svolta nel processo di replicazione del virus, in quanto questa regione codifica per la DNA polimerasi indispensabile per la sintesi del DNA virale [5,8]. Di più recente individuazione, che assegna un ruolo importante nelle varie fasi di *packaging* dell'RNA



del core sarebbero coinvolte nel trasporto nucleare [15]. Una volta nel nucleo il genoma circolare parzialmente a doppia elica si trasforma in una nuova forma di DNA virale chiamato DNA circolare chiuso covalentemente (cccDNA) [16,17]. Il cccDNA rappresenta lo stampo per la trascrizione del genoma virale [14].

➤ Replicazione del genoma:

Il cccDNA una volta formato, viene amplificato e successivamente trascritto ad opera di una RNA-polimerasi DNA dipendente della cellula ospite [5]. Nell'evolversi del ciclo riproduttivo, una parte dell'RNA genomico migra nel citoplasma dove viene utilizzato come RNA messaggero (mRNA) per dirigere la sintesi delle proteine virali, mentre l'altra parte rimane temporaneamente sequestrata nel nucleo dell'epatocita per poi migrare verso il citoplasma e fungere da stampo per la sintesi di nuovo DNA virale. L'RNA destinato alla replicazione virale, definito pre-genomico (pgRNA), è incapsidato in particelle core immature all'interno delle quali viene poi retrotrascritto dall'azione catalitica della DNA polimerasi virale, nella catena minus strand del DNA virale [5]. Man mano che il minus strand si allunga, il pgRNA si degrada ad opera della DNA-polimerasi virale. Una volta completato il minus strand questo servirà da stampo per la sintesi della catena corta (plus strand) che ha luogo sempre all'interno della particella virale immatura. Il cccDNA è il primo intermedio replicativo a comparire dopo l'infezione e rappresenta la principale forma di DNA presente nel nucleo [5].

➤ Assemblaggio delle particelle virali e liberazione in circolo:

per essere secreto il virus deve assolutamente possedere l'involucro, in particolare deve avere le proteine di superficie. L'assemblaggio delle particelle del core con le proteine dell'envelope avviene nel citoplasma attraverso una complessa interazione che genera virioni con involucro. Le particelle così assemblate vengono trasportate nel reticolo di Golgi e quindi secrete mediante trasporto vescicolare [5].

## **1.4 Epidemiologia dell' infezione**

### Prevalenza e incidenza

L'infezione da HBV è un problema epidemiologicamente rilevante se si considerano le seguenti cifre [30,31]:

✓ In tutto il pianeta ci sono oltre 2 miliardi di persone che risultano sierologicamente

positive per uno o più marcatori d'infezione, a testimonianza di una pregressa (o attuale) esposizione al virus;

- ✓ Il numero dei portatori cronici dell'antigene di superficie HBsAg, siano essi sani o malati, è di oltre 360 milioni (tali individui costituiscono un serbatoio d'infezione e contribuiscono alla diffusione dell'infezione);
- ✓ Ogni anno nel mondo 2 milioni di pazienti muoiono per complicanze direttamente o indirettamente correlate alla malattia da HBV. Oltre il 75% di questi decessi sono imputabili ad una malattia cronica di fegato, nelle sue diverse espressioni anatomico-cliniche, o alle sue evoluzioni: epatite cronica, cirrosi, fino all'insufficienza epatica terminale, carcinoma primitivo del fegato.

### Geografia dell'infezione

La prevalenza dei portatori di HBV nella popolazione adulta apparentemente sana, in particolare tra i donatori di sangue, varia nelle diverse aree geografiche. Il mondo, pertanto, è stato grossolanamente distinto in tre zone in base alla prevalenza dell'infezione [30].

- Regioni iperendemiche, dove l'infezione è praticamente universale: Sud-Est Asiatico (compresa la Cina), Pacifico Occidentale, regioni artiche- inclusa l'Alaska occidentale, Groenlandia e Africa subsahariana. In queste zone il sovraffollamento nei singoli nuclei familiari e nelle comunità, la promiscuità e l'inosservanza delle più elementari norme igienico-sanitarie favoriscono la diffusione dell'infezione sia orizzontale, da soggetto malato a sano, sia verticale o perinatale, da madre a figlio. La percentuale di portatori in tali popolazioni supera l' 8%;
- Regioni ad endemia intermedia quali Nord Africa; Medio Oriente, parte dell'Europa meridionale ed orientale, Sud America e Continente indiano con prevalenza di portatori di HBsAg variabile dal 2 all' 8% della popolazione generale;
- Regioni a bassa prevalenza che comprendono il Nord Europa, la maggior parte dei Paesi dell'Europa occidentale, gli Stati Uniti, il Canada, l'Australia e la Nuova Zelanda. In questa aree, meno del 10% della popolazione generale ha evidenza sierologica di infezione da HBV e il tasso di portatori è pari o inferiore al 2%. Anche in questi Paesi, tuttavia, la prevalenza di infezione e portatori può variare considerevolmente in base alle abitudini sociali, voluttuarie e sessuali nonché in base ai gruppi etnici e ai movimenti migratori.

Se fino alla metà degli anni '80, l'infezione da HBV costituiva il più frequente fattore eziologico delle epatiti croniche, nell'ultimo decennio le migliorate condizioni socio-

economiche ed igienico-sanitarie, hanno progressivamente e considerevolmente modificato l'impatto dell'infezione da HBV nell'eziologia delle epatopatie croniche in Italia. Tuttavia, i flussi migratori degli ultimi anni verso il nostro Paese e il nuovo stile di vita acquisito attraverso l'agiatazza e nuove possibilità, hanno determinato una riacutizzazione delle infezioni dal virus dell'epatite.

Il virus dell'epatite B è distinto in 8 differenti genotipi definiti con una divergenza superiore all' 8% nella sequenza nucleotidica e differenti sottotipi antigenici della principale glicoproteina di superficie quale l' HBsAg. Sono stati identificati 8 genotipi indicati con le lettere dalla A all' H che seguono una caratteristica distribuzione geografica che riflette i movimenti della popolazione umana e altri significativi eventi epidemiologici [31].



Figura 4: distribuzione geografica dell' infezione

#### Modalità di trasmissione

L' HBV è un patogeno molto resistente a temperatura ambiente (6 mesi), al freddo (sotto i 20 °C per diversi anni), al caldo (a 60 °C per 4 ore) e all'irradiazione con ultravioletti. Viene inattivato solo dalle alte temperature (121 °C) e con trattamento in stufa ed autoclave. Il virus è altamente infettante (100 volte più infettante di HIV) ed è presente in tutte le secrezioni e liquidi corporei: sangue, saliva, sperma, secrezioni vaginali, sangue mestruale, ed in misura minore nel sudore, latte materno, lacrime ed urine [30].

Le principali vie di trasmissione sono:

- via parenterale o percutanea apparente: trasfusioni di sangue ed emoderivati, trapianto di organi, punture accidentali, interventi chirurgici ed odontoiatrici, scambio di siringhe fra tossicodipendenti, tatuaggi, ecc.;
- via parenterale inapparente: uso promiscuo di oggetti potenzialmente contaminati,

- punture, tagli;
- via sessuale (omo ed eterosessuale) favorita da lesioni delle mucose genitali e della mucosa orale;
  - via verticale: per quanto concerne questo tipo di trasmissione, l'infezione si può trasmettere durante il parto o nei contatti madre/figlio immediatamente successivi alla nascita, ed è più frequente, quando la madre presenta un'infezione acuta nel terzo trimestre di gravidanza.

### **1.5 Storia naturale dell' infezione**

Il 70% circa dei soggetti che acquisiscono un'infezione acuta da HBV sviluppa un'epatite subclinica o anitterica, mentre il restante 30% ha una forma itterica [32,33]. Il periodo di incubazione dell'epatite B acuta va da 1 a 4 mesi. Il segno caratteristico è l'elevazione della transaminasi glutamico-piruvica (ALT) [32,33]. Nei pazienti che guariscono, la normalizzazione delle ALT si osserva di solito entro 1-4 mesi. Se questo non avviene e le ALT persistono elevate per più di 6 mesi, è verosimile la persistenza dell'infezione e l'evoluzione verso una forma cronica.

Il tasso di cronicizzazione dell'infezione da HBV correla con l'età al momento dell'infezione, essendo di circa il 90% in caso di infezioni perinatali, del 20-50% per le infezioni acquisite tra 1 e 5 anni e meno del 5% per le infezioni acquisite in età adulta. La storia naturale dell'infezione cronica da HBV è il risultato dell'interazione fra replicazione virale da un lato, e sistema immune dell'ospite dall'altro.

Nel corso dell'infezione si possono distinguere due fasi virologiche distinte e sequenziali [34]:

- fase replicativa precoce;
- fase tardiva non replicativa di infezione latente.

Nei pazienti con infezione perinatale, c'è un'ulteriore fase definita di immunotolleranza caratterizzata da replicazione virale in assenza di malattia epatica attiva.

La fase replicativa precoce è contraddistinta da intensa attività virale che si traduce nella presenza di elevati livelli sierici di HBeAg e HBV-DNA ed espressione dell'HBeAg nel fegato e in una malattia epatica attiva.

La fase tardiva si identifica con la scomparsa dell'HBeAg e la sieroconversione ad anti-HBe. In alcuni pazienti, la replicazione virale cessa del tutto malgrado la presenza di HBsAg nel siero. In questi casi l'HBV-DNA non è più determinabile nel siero anche con la PCR, il danno epatico è in remissione e le transaminasi sono normali. Di solito questo quadro si accompagna alla progressiva scomparsa dell'HBsAg che avviene ogni anno in circa lo 0,5-

2% dei casi [34].

Una certa percentuale di casi HBeAg negativi, prevalenti in determinate aree geografiche quali Italia e bacino del Mediterraneo in genere, continuano a presentare moderati livelli di replicazione virale (HBV-DNA positivo con metodica di ibridizzazione) e malattia epatica attiva (ipertransaminasemia e flogosi cronica alla biopsia epatica). Questi pazienti sono in genere portatori di un'infezione cronica da mutanti precore dell'HBV [35].

### **Marcatori sierologici dell'infezione da HBV:**

#### **HBsAg e anti-HBs**

L'HBsAg è l'indicatore sierologico più importante. Può essere rilevato nel siero di pazienti infetti da 6 a 16 settimane dal contagio. L'HBsAg di solito diventa non rilevabile dopo 4-6 mesi nei pazienti che guariscono spontaneamente, mentre se persiste per più di 6 mesi è indicativo di cronicizzazione.

La scomparsa dell'HBsAg è seguita dalla comparsa del relativo anticorpo (anti-HBs) che nella maggior parte dei pazienti persiste per anni o per tutta la vita, conferendo un'immunità a lungo termine [32].

#### **HBcAg e anti-HBc**

L'antigene core dell'HBV (HBcAg) è un antigene intracellulare espresso negli epatociti infetti e quindi non presente in circolo. Il corrispondente anticorpo (anti-HBc) è rilevabile nel siero per tutta la durata dell'infezione (IgM in fase acuta e quindi IgG) [35].

Le IgG anti-HBc persistono indefinitamente nel siero sia dei pazienti che guariscono (e in qualche caso possono rappresentare l'unico marcatore di infezione pregressa), sia dei pazienti con infezione cronica e in quest'ultimo caso si accompagnano all'HBsAg.

#### **HBeAg e anti-HBe**

L'HBeAg è in genere considerato un marcatore di attiva replicazione virale ed infettività. È riscontrabile in circolo nella prima fase dell'epatite acuta B, cioè durante la fase di attiva replicazione virale, pochi giorni dopo la comparsa dell'HBsAg e la sua presenza si associa alla presenza di HBV-DNA nel siero. La sierconversione da HBeAg al relativo anticorpo (anti-HBe) si associa di solito alla scomparsa dell'HBV-DNA nel siero [36], a meno che non ci si trovi di fronte alle forme da mutanti pre-core descritte in precedenza [26].

#### **HBV-DNA**

La presenza di HBV-DNA nel siero è indicativa di replicazione virale. Questo marcatore può essere rilevato nel siero con metodiche quantitative o qualitative con limiti di sensibilità differenti: tecniche di ibridazione o amplificazione del segnale o tecnica della polymerase chain reaction (PCR). La guarigione da un'epatite B si accompagna generalmente, con la scomparsa dell'HBV-DNA che può comunque rimanere determinabile nel siero per molti anni, anche dopo guarigione; questo suggerisce la persistenza del virus all'interno del sistema immune [37].

### **1.6 Immunopatogenesi del danno epatico**

I meccanismi patogenetici alla base delle epatopatie acute e croniche HBV-relate e della loro evoluzione sono definiti solo parzialmente per la mancanza di adeguati modelli sperimentali di studio. Si ritiene comunque che il danno epatico sia immuno-mediato, derivi cioè dall'interazione fra il virus e il sistema immune del soggetto infettato. Per l'eliminazione del virus, sono indispensabili sia la risposta immune umorale sia la cellulo-mediata. La risposta immunitaria cellulo-mediata diretta verso antigeni del nucleocapside virale (HBcAg, HBeAg), che sono espressi sulla superficie degli epatociti infettati insieme agli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (HLA-I), può essere coinvolta nella patogenesi della malattia epatica [1]. La risposta immunitaria è un fenomeno estremamente complesso che vede coinvolti: linfociti B, linfociti T (sia i linfociti T-citotossici sia i linfociti T-helper ) e linfociti natural killer (NK). Alla eliminazione del virus, oltre alle due componenti della risposta immune (umorale e cellulo-mediata), contribuiscono anche citochine infiammatorie rilasciate dalle cellule attivate dal virus: interleuchine, tumor necrosis factor, interferone alfa e gamma. Alcune citochine quali interleuchina-1, interleuchina-6, e interferone gamma stimolano la produzione dei linfociti T citotossici e delle natural killer, altre come interleuchina-4 e interleuchina-5 stimolano la proliferazione dei linfociti B, i quali, a loro volta, producono anticorpi specifici; infine, l'interferone alfa e gamma riducono la replicazione virale ed amplificano l'espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe I sulla superficie delle cellule infettate [1]. Il meccanismo che porta alla necrosi dell'epatocita può essere così sintetizzato: dopo l'infezione l'HBV raggiunge gli epatociti e replica al loro interno, le particelle complete, assieme all'eccesso di HBsAg, vengono liberate dall'epatocita in assenza di ogni effetto citopatico e passano in circolo; qui vengono riconosciute dai linfociti T che cominciano a moltiplicarsi e producono un gran numero di linfociti sensibilizzati (linfociti killer). Questi ultimi riconoscono gli antigeni sulla superficie degli epatociti e reagiscono; come

conseguenza della reazione antigene-linfociti i linfociti sensibilizzati neutralizzano l'antigene, ma inducono anche la necrosi. La comparsa del danno epatico e l'evoluzione dell'epatite B sono correlate all'efficienza della risposta immunitaria cellulo-mediata verso HBV. Se la risposta immunitaria è normale e riesce ad eliminare tutti gli epatociti infettati, il paziente sviluppa una epatite acuta autolimitantesi che va incontro a guarigione: tale evento si verifica nel 90-95% dei pazienti adulti immunocompetenti. Se la risposta immune è debole ed i linfociti presenti nel fegato sono numericamente insufficienti rispetto alle cellule epatiche infettate, si verifica una continua necrosi degli epatociti che non riesce tuttavia ad eliminare il virus perpetuando il danno.

# ***CAPITOLO 2***

---

## ***Il carcinoma epatocellulare***

L'epatocarcinoma rappresenta un problema di rilevante importanza clinica in cui il rapido e complesso accumulo di nuove conoscenze e l'introduzione di nuove tecnologie, ha creato divergenze di comportamento in ambito diagnostico e terapeutico.

In Europa, si stima che l'incidenza del carcinoma epatocellulare aumenterà significativamente come risultato di una costante epidemia derivata dall'infezione dal virus dell'epatite C e dalla cronicizzazione dell'infezione da virus dell'epatite B. A fronte di quanto emerso, l'epatocarcinoma è caratterizzato da una mortalità di circa il 90% che riflette la mancanza di strumenti terapeutici adeguati anche a fronte di diagnosi precoce in corso di programmi di screening.

E' opportuno sottolineare che di fronte ad una patologia dal quadro clinico così complesso, non è possibile formulare linee guida che tengano in considerazione tutte le possibili variazioni cliniche e pertanto, il buon senso clinico deve guidare tutto il processo decisionale.

### **2.1 Epidemiologia ed eziologia**

Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta una patologia ampiamente diffusa in tutto il mondo con un numero elevato di pazienti manifestanti una malattia in stadio avanzato e associata dunque, a prognosi sfavorevole. Nel mondo, si colloca al sesto posto tra le patologie neoplastiche maligne, con circa 600.000 casi di decesso per anno e risulta inoltre, essere il più comune tumore maligno diagnosticato nel sesso maschile, con un rapporto maschi femmine di circa 4:1 [38,39]. L'HCC è al terzo posto tra le cause di morte legate ad una patologia neoplastica ed è conseguenza di decesso in pazienti aventi cirrosi epatica in Europa e negli Stati Uniti [40,41].

La prevalenza dei casi di HCC nella popolazione varia nelle diverse aree geografiche. Il mondo, pertanto, è stato grossolanamente distinto in quattro zone [42]:

- Area con una prevalenza di circa 20 casi/100.000. Il sud Sud-Est Asiatico,

compresa la Cina, l' Africa sub-sahariana e l' Africa occidentale, sono le regioni a più elevata endemia.

- Area con una prevalenza di circa 11casi/100.000. Include l' Italia, la Spagna e l' America Latina.
- Area con una prevalenza di circa 5casi/100.000. Il rischio nelle regioni Francia, Regno Unito e Germania, si colloca in posizione intermedia.
- Area con una prevalenza di 5casi/10.000. Si identificano in questa fascia gli Stati Uniti, il Canada e la Scandinavia

Per tutte le altre regioni del mondo i dati sono a tutt'oggi non conosciuti.

Questa variabilità geografica relativa all' incidenza di HCC può essere attribuita ai cambiamenti della distribuzione dell' infezione da HBV e HCV e alla relativa storia naturale [42].

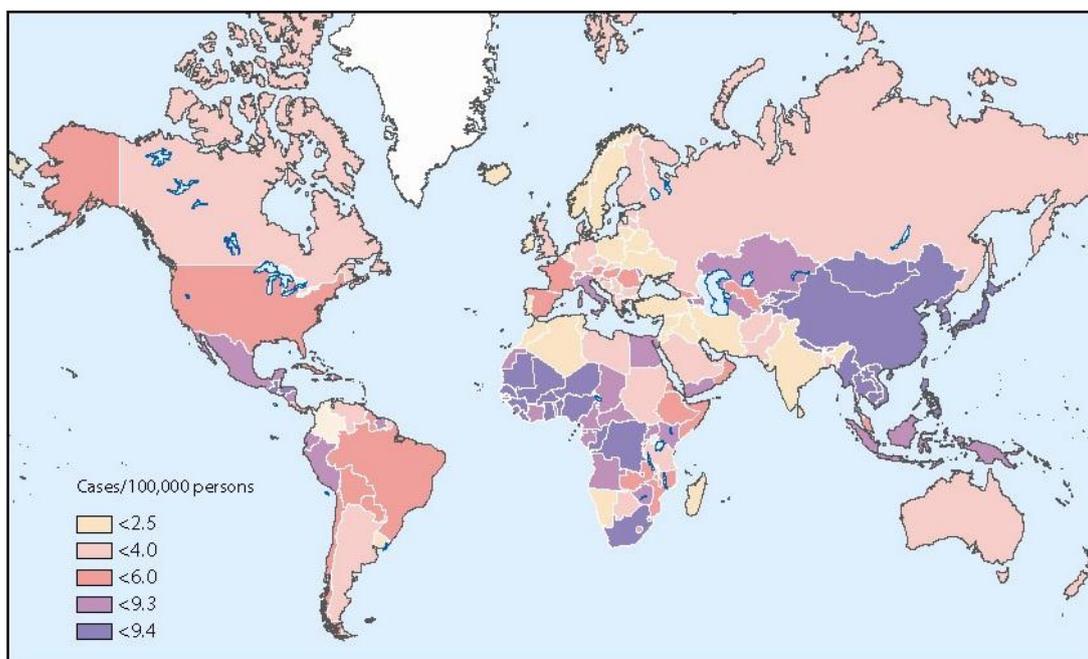


Figura 5: *The New England J Medicine* 2012, *El-Serag HB*

## 2.2 Carcinogenesi

Il più comune fattore di rischio per l' insorgenza di epatocarcinoma è l' infezione da virus dell' epatite C (HCV) e B (HBV), la cirrosi alcolica e la steatoepatite non alcolica [43]. Infatti, l' infezione cronica virale è un fattore di rischio per HCC non solo perché l' infezione evolve in cirrosi, ma anche attraverso meccanismi diversi, che coinvolgono alterazioni nei geni oncosoppressori e preposti alla regolazione del ciclo

cellulare [44].

Studi condotti su pazienti con HCC virus-relato hanno dimostrato la presenza di cirrosi all' esame strumentale. L'infezione cronica, la cui patogenesi è essenzialmente immuno-mediata, innesca infatti un circolo vizioso per cui l'epatocita che esprime antigeni virali viene riconosciuto dal sistema immunitario cellulo-mediato e diviene pertanto bersaglio della risposta CD8 positiva, dal momento che gli epatociti esprimono sulla loro superficie molecole di istocompatibilità di classe I. La necrosi epatocitaria che ne risulta innesca una risposta proliferativa-mitotica che a sua volta favorisce la rigenerazione nodulare, la quale, in appropriate circostanze, è seguita dalla displasia degli stessi epatociti e quindi dal carcinoma.

Sebbene la rigenerazione nodulare e la cirrosi rimangano le principali cause di carcinoma epatocellulare, l' HCC può sviluppare anche in assenza di cirrosi. In questo caso, e per meccanismi simili a quelli studiati per l' infezione cronica da HBV, l' attività necroinfiammatoria è un requisito importante per lo sviluppo della neoplasia [42].

Durante l' infezione da HBV infatti, il virus viene integrato nel DNA della cellula ospite a cui segue un riarrangiamento che determina alterazioni nella crescita cellulare e nel processo di differenziamento. In seguito a mutazioni inserzionali indotte dall' integrazione dell' HBV-DNA nell' ospite, vengono attivate proteine, come la ciclina A e SERCA 1 [43-44], che giocano un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare e nella variabilità, le quali determinano quindi, una proliferazione incontrollata.

HBV codifica inoltre per proteine oncogeniche virali che contribuiscono all' epatocarcinogenesi [45]. La proteina X di HBV (HBx), una delle componenti non strutturali del genoma di HBV, il cui ruolo funzionale non è stato ancora del tutto delucidato, possiede comunque proprietà transattivanti ed esercita la sua attività su numerosi geni tra cui l' oncosoppressore p53, importante oncogene la cui attività è repressa nel carcinoma epatocellulare. HBx può attivare geni come AP-1 (activating protein-1) e NF-kB (nuclear factor kappa B) riuscendo così ad esercitare il controllo su una varietà di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, proliferazione e apoptosi [46-47].

Da quanto descritto si evince quindi che HCC su HBV rappresenta un modello un po' più complesso di carcinoma epatocellulare: condivide infatti la patogenesi infiammatoria cronica, in cui la necrosi e la rigenerazione epatocellulare inducono processo rigenerativo-fibrotico, condizione che predispone allo sviluppo neoplastico.

E in aggiunta, possiede meccanismi pro-carcinogenetici diretti, tra cui l'integrazione nel genoma ospite, e la produzione di antigeni a significato onco [48].

Solo di recente, l'infezione da HCV è stata identificata quale uno dei principali determinanti la comparsa di epatocarcinoma nei pazienti affetti. Circa il 5-10% dei pazienti con epatite cronica HCV-relata sviluppa l'epatocarcinoma. Numerosi studi epidemiologici confermano l'alta prevalenza dell'HCV-RNA nei pazienti con epatocarcinoma. L'incidenza cumulativa dell'epatocarcinoma nei pazienti HCV-positivi che sviluppano la cirrosi epatica è pari a circa il 50%. Il meccanismo di epatocarcinogenesi correlato all'infezione da HCV non è ancora stato chiarito, ma è stato dimostrato che il virus replica all'interno delle cellule neoplastiche; non è invece stata dimostrata la presenza di oncogeni nel genoma del virus né la sua capacità di integrarsi nel genoma delle cellule epatiche. Queste osservazioni inducono a pensare che l'infezione da HCV causi lo sviluppo dell'epatocarcinoma indirettamente, attraverso l'induzione di un danno cronico infiammatorio [49]. Tra i vari genotipi virali, il genotipo 1b è il più frequentemente associato ad epatocarcinoma nei pazienti con cirrosi [50]. L' HCV ha numerose proteine virali associate a carcinogenesi come le proteine del core NS3 e NS5A, le quali inibiscono l'espressione post-trascrizionale dell' inibitore ciclina dipendente p21, con il risultato di una sregolazione del ciclo cellulare. Le proteine del core di HCV, svolgono quindi un ruolo chiave nella epatocarcinogenesi HCV-relata attraverso la modulazione della proliferazione cellulare, l' apoptosi e la risposta immunitaria [45-51].

La prognosi infausta dell'epatocarcinoma da sempre è stata fonte di una costante ricerca delle procedure più idonee al raggiungimento della diagnosi precoce.

In passato gli epatocarcinomi venivano diagnosticati quando ormai sintomatici e quindi in stadio avanzato. Le recenti acquisizioni relative alla storia naturale di questa neoplasia hanno tuttavia documentato che l'epatocarcinoma è perlopiù un tumore a lenta crescita la cui storia naturale è spesso parallela a quella della sottostante cirrosi [50].

L'insorgenza dell'epatocarcinoma non associato a cirrosi, una volta che sia stata esclusa un'infezione da virus epatitici, può essere attribuita all'effetto genotossico di alcune sostanze, quali: 1) micotossine contaminanti i cibi (es. aflatossina) particolarmente diffuse in alcune aree africane ed asiatiche; 2) contaminanti ambientali di origine industriale (es. azo-coloranti, amine aromatiche, nitrosamine, cloruro di vinile, solventi organici, pesticidi, arsenico, ecc.) o derivati dalla combustione del tabacco (es. benzopirene), che possono indurre la comparsa di epatocarcinoma nell'animale da esperimento e che sono stati messi in relazione, seppure aneddoticamente, con l'insorgenza di epatocarcinoma in pazienti

esposti; 3) composti radioattivi [51].

Esistono, inoltre, diverse malattie congenite ad interessamento epatico nelle quali la comparsa del tumore non è necessariamente preceduta dallo sviluppo di cirrosi, queste sono: l'ipercitrullinemia, la glicogenosi (soprattutto il tipo I), il deficit di  $\alpha$ 1-antitripsina, la porfiria acuta intermittente, la sindrome di Alagille, fibrosi epatica congenita, l'ostruzione della vena cava inferiore (con sindrome di Bud Chiari) e l'emocromatosi [51].

La carcinogenesi del fegato "sano" è stata anche messa in relazione con l'uso di androgeni anabolizzanti C17 alchilati, mentre a tutt'oggi rimane dubbio il ruolo svolto dai contraccettivi orali (estrogeni). L'uso di contraccettivi orali aumenta il rischio relativo di sviluppo del tumore nelle donne in aree ipoendemiche. Sono anche segnalati casi di epatocarcinoma nel contesto di lesioni focali epatiche benigne, come l'iperplasia nodulare rigenerativa e l'adenoma [51].

Infine, si vanno definendo con sempre maggiore chiarezza le basi molecolari di una possibile "familiarità" per epatocarcinoma che non si accompagna a cirrosi. In uno studio recente, 3/13 (23%) pazienti europei con epatocarcinoma non associato a cirrosi presentava una mutazione germinale del gene "tumor suppressor" p16INK4 (MTS1), evento presente anche in 1/12 casi con tumore e cirrosi [51].

### 2.3 Meccanismi molecolari

La patogenesi molecolare dell'epatocarcinoma è particolarmente complessa. I meccanismi predominanti sono sostanzialmente due: 1) alterata rigenerazione epatica nell'ambito di epatopatia cronica/cirrosi secondaria a danno tissutale severo e cronicizzato quale quello

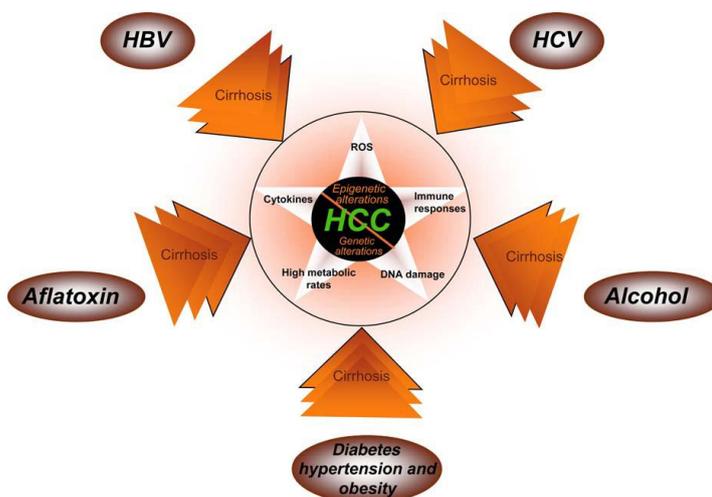


Figura 6: Reviews in Mutation Research 2011, Herceg Z

causato dai virus epatitici, ma anche da fattori tossici esogeni (ad esempio, l'alcol o l'aflatossina B) ed influenze metaboliche (ad esempio, la resistenza all'insulina, l'obesità, il diabete mellito di tipo II o la dislipidemia in steatoepatite non alcolica-19) ; 2) mutazioni in uno o più oncogeni o geni onco-soppressori [52].

Alcune delle vie di trasduzione

del segnale che sono alterate negli epatocarcinomi sono attualmente al centro di studi sperimentali, poiché potrebbero rappresentare il bersaglio di nuove terapie antiproliferative mirate e pertanto dotate di maggiore efficacia e di minore tossicità sistemica. Tra queste, vanno ricordate la via del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (vascular endothelial growth factor - VEGF), la via del fattore di crescita derivato dalle piastrine (platelet derived growth factor - PDGF), la via del fattore di crescita dell'epidermide (epidermal growth factor), la via del fattore di crescita insulino-simile (insulin-like growth factor- IGF), la via del fattore di crescita degli epatociti (hepatocyte growth factor - HGF), il sistema WNT/ $\beta$ -catenina e la proteina MAP-chinasi [52].

Alla base dello sviluppo di epatocarcinoma, oltre ad una eziologia legata ai fattori predisponenti un danno epatico, si aggiungono fattori molecolari che includono fattori genetici ed epigenetici.

Con il termine epigenetica si intendono tutti i cambiamenti nei tratti fenotipici di una cellula, le cui modificazioni non sono codificate dal proprio DNA. I meccanismi epigenetici possono essere interpretati come una interferenza che si interpone tra il genoma e l'ambiente circostante. Nell'uomo, eventi epigenetici associati a fattori considerati di stress possono giocare un ruolo molto importante nello sviluppo di numerosi eventi patologici maligni. Infatti, la presenza di aberranti alterazioni epigenetiche, predispongono l'organismo a modificazioni genetiche ma le stesse modificazioni possono a loro volta, indurre alterazioni epigenetiche. Eventi epigenetici e genetici possono quindi, insieme, destabilizzare il genoma ed indurre una trasformazione in senso oncogenico, anche in HCC.

Nell'ultima decade, sono state meglio descritte le alterazioni epigenetiche a cui si può imputare l'epatocarcinogenesi e coincidono con una aberrante metilazione dei geni promotori e con una disregolazione della espressione dei microRNA (miRNA) i quali, insieme, determinano una instabilità genomica nella maggioranza delle neoplasie che colpiscono il genere umano. Studi finalizzati alla comprensione di queste alterazioni molecolari in HCC, hanno messo in luce accumuli di alterazioni genetiche ed epigenetiche, che determinano una attivazione anormale o una inattivazione di singoli o multipli pathway cellulari inclusi quelli della proliferazione cellulare, sopravvivenza cellulare, differenziazione ed angiogenesi. In aggiunta a quanto fin'ora descritto, bisogna aggiungere che le ipotesi più accreditate in ambito di HCC vedono coinvolti geni come p53/ARF, RB/INK4A e Wnt/N-catenina [53].

La frequente perdita di eterozigosi (LOH) nel cromosoma 8p in soggetti con HCC, suggerisce l'inattivazione del gene Deleted in Liver Cancer 1 (DLC-1) che svolge un ruolo

centrale nella patogenesi del carcinoma epatico mentre, ad uno stadio avanzato di malattia, si possono associare mutazioni somatiche a molti geni oncosoppressori, come TP53, p16 ed RB, a molti oncogeni, come c-MYC e la  $\beta$ -catenina, e ad altri geni associati a carcinogenesi, come la E-caderina e la ciclina D1 [54]. Tuttavia, il significato e la sequenza con cui si manifestano questi eventi genetici, rimane ancora da chiarire. Mentre le mutazioni germinali si riflettono nella storia familiare della neoplasia, molti dei fattori di rischio associati a mutazioni somatiche, dovrebbero essere identificati quando, ad un evento di HCC, si può osservare una associazione con un particolare fattore di rischio. In entrambi i casi, generalmente, le conseguenze sono rapide ma in caso contrario, lo sviluppo di HCC avviene mediante un processo lungo, con fasi distinte; il tempo che intercorre tra l'esposizione ai fattori di rischio e l'insorgenza del cancro è indicativo di come l'esposizione ai fattori di rischio, la cirrosi epatica, lo stile di vita e gli stimoli ambientali, possono favorire una fase in cui modificazioni aberranti epigenetiche favoriscono la stessa insorgenza della neoplasia (figura 7)[53].

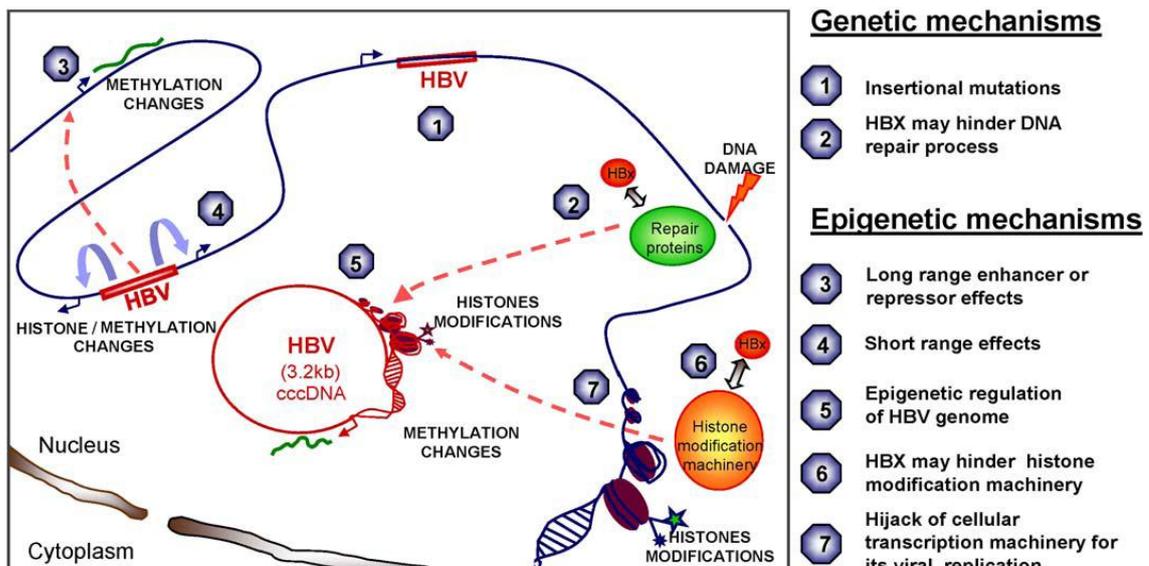


Figura 7: Reviews in Mutation Research 2011, Herceg Z

### p53/ARF

Il pathway p53/ARF è coinvolto in una varietà notevole di funzioni cellulari come la regolazione del ciclo cellulare, l'apoptosi e la riparazione del DNA. Uno stress cellulare, attiva questo pathway attraverso l'attivazione della proteina p53 che funge da induttore del network trascrizionale mediante attivazione di geni responsivi ad uno stimolo p53 dipendente. Il circuito innescato dalla attivazione di p53 è in grado di interagire con importanti segnali cellulari come Wnt- $\beta$ catenina, RB/INK4A ed il pathway p38 MAP. Poiché p53 è coinvolto nel mantenimento della risposta cellulare, una distruzione del

pathway p53/ARF potrebbe essere osservato in molti tipi di neoplasia, incluso l'epatocarcinoma. Nonostante l'esistenza di meccanismi auto-regolatori per p53, la proteina MDM2 riveste un ruolo chiave in questi processi.

Il gene p53 è localizzato sul cromosoma 17p13.1 ed è codificato per fungere da oncosoppressore. In modelli di HCC, si è osservata una alterazione puntiforme all'interno della sequenza genica che codifica per questo gene, nella regione esonica conservata, accompagnata dalla perdita del braccio corto del cromosoma 17. Non è possibile definire con certezza quale sia la mutazione che colpisce p53 in quanto, le mutazioni puntiformi osservate durante HCC, variano notevolmente a seconda della eziologia neoplastica e della patogenesi molecolare. Ad esempio 1) l'aflatossina B1 (figura 8) determina una variazione dei nucleotidi C:G in T:A al codone 249 di p53; ma, in modelli murini transgenici, anche 2) HBx, insieme alla AFB1, può determinare la stessa mutazione puntiforme sopradescritta, con la medesima localizzazione. In caso di mutazioni non correlate ad una esposizione alla AFB1, le alterazioni, sono confinate alla regione altamente conservata sull'esone 5-9. Sono coinvolte, di nuovo, 3) la proteina HBx con la sua capacità di legare direttamente p53 e fungere da elemento disturbatore nella capacità di legame per il DNA, nella trascrizione e nella induzione della apoptosi. In aggiunta, 4) ossido nitrico (NO), che induce un rilascio di citochine infiammatorie TNF $\alpha$  ed IFN- $\gamma$  in presenza di infezione da HCV, che determina, a sua volta, mutazioni in geni coinvolti nel controllo della carcinogenesi [53].

#### RB/INK4A

Il pathway RB/INK4A, svolge un ruolo centrale nella regolazione della fase G1-S in ambito della progressione del ciclo cellulare. L'attività del gene RB è strettamente dipendente dalla sua fosforilazione, e lo stesso stato fosforilato, si accompagna con l'attivazione di CDK. RB fosforilato sequestra E2Fs, il quale è responsabile della trascrizione di molti geni quali ciclina E, capace di legare CDK2, inducendo la replicazione del DNA durante il ciclo cellulare (figura 8). La maggior parte dei tumori, incluso il carcinoma epatocellulare, spesso arreca aberrazioni ai membri di questo pathway. Nell'81% dei casi di HCC si riscontrano alterazioni in almeno una componente del pathway RB/INK4A; inoltre il 18-48% di questo tipo di tumori presenta una perdita cromosomale nella regione 13q14, dove appunto risiede il gene RB. In aggiunta a questa perdita, si osservano altre alterazioni strutturali determinate da una delezione interstiziale nel gene sopra nominato che suggeriscono come, una doppia modificazione in questo locus, può determinare una completa inattivazione della proteina RB. Rispetto a quanto osservato nel tessuto epatico non neoplastico, nel 30-50% degli epatocarcinomi è possibile descrivere una down-

regolazione della proteina oggetto di studio e una inattivazione, da imputare alla metilazione del promotore RB [53].

#### Gene CDKN2A (p14<sup>ARF</sup>)

Il gene CDKN2A codifica per due geni oncosoppressori quali p14<sup>ARF</sup> e p16<sup>INK4a</sup> che si localizzano entrambi al secondo esone. p14<sup>ARF</sup> interagisce con la proteina MDM2, responsabile della degradazione di p53 e responsabile del controllo del ciclo cellulare durante la fase G1-S. Questo gene è spesso mutato o deletato in una grande varietà di tumori incluso HCC. Generalmente infatti il 7% di epatocarcinomi, evidenzia una delezione omozigotica del gene CDKN2A e una inattivazione del gene p14<sup>ARF</sup> dovuta, anche in questo caso, alla metilazione del suo gene promotore [53] (figura 8).

#### Gene CDKN1A

Sebbene le alterazioni nelle sequenze genomiche dei geni oncosoppressori CDKN1A e CDKN1B siano rare in HCC, una down regolazione di queste proteine regolatrici del ciclo cellulare sono spesso descritte. Il gene p21<sup>WAF1</sup> è il prodotto di CDKN1A ed è regolato dall'oncosoppressore p53 e a sua volta p21<sup>WAF1</sup> regola l'attività della chinasi ciclina dipendente (CDK) 2 e 4, coinvolte rispettivamente nel controllo della fase G1-S e della fase G2-M del ciclo cellulare (figura 8). In ambito di HCC, è stata osservata una down regolazione di p21<sup>WAF1</sup> associata con la progressione tumorale e cattiva prognosi neoplastica. Recentemente è stato scoperto come la proteina HBx di HBV e la proteina del core di HCV siano in grado di sopprimere la trascrizione di p21<sup>WAF1</sup> [53].

#### Gene CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>)

Come già accennato, p16<sup>INK4a</sup> è un oncosoppressore codificato dal gene CDKN2A, importante per la regolazione del ciclo cellulare attraverso inibizione di CD4A e il controllo della progressione del ciclo alla fase G1. Nell'HCC si possono descrivere alterazioni di p16<sup>INK4a</sup> ed in particolare, delezioni omozigotiche o mutazioni puntiformi. Anche in questo caso il meccanismo principale per l'inattivazione di questo gene è la metilazione del suo promotore riscontrabile nel 40-70% degli epatocarcinomi [53] (figura 8).

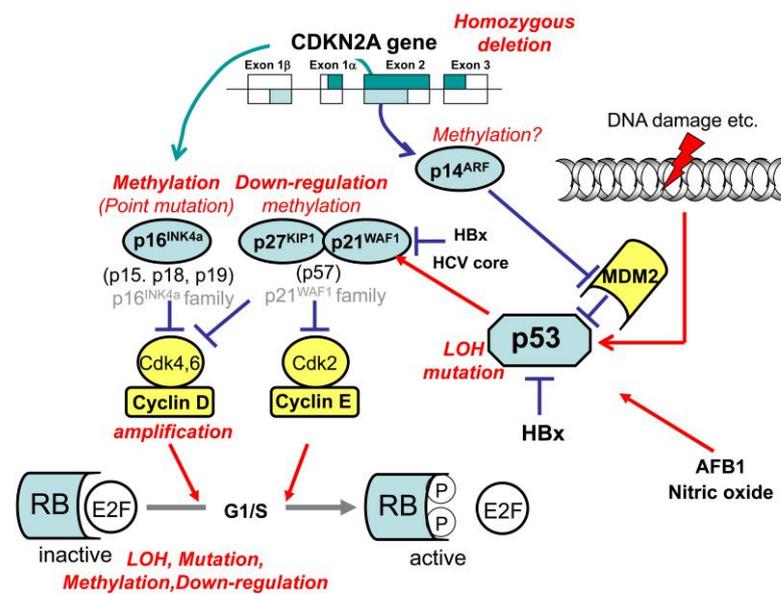


Figura 8: Current Genomics 2011, Nishida

Come descritto in questi paragrafi, esiste una chiara e forte associazione tra i pathways RB/INK4A e p53/ARF in materia di regolazione della professione del ciclo cellulare e apoptosi.

### Wnt/ $\beta$ -catenina

L'attivazione del pathway Wnt/ $\beta$ -catenina, favorisce l'espressione di numerosi geni indispensabili per la crescita cellulare come c-myc e la ciclina D1, e riesce a fare ciò mediante la traslocazione della  $\beta$ -catenina nel nucleo e la sua successiva interazione con fattori trascrizionali.

Infatti, la  $\beta$ -catenina è in grado di formare dei complessi con le proteine, e la capacità di fare ciò dipende da tirosin chinasi e serin kinasi come la glicogeno sintetasi (GSK)-3 $\beta$ . Oltre alle proteine però, la  $\beta$ -catenina è in grado di legare molecole di adesione, fattori di trascrizione e l'axina, un componente del pathway Wnt. La  $\beta$ -catenina è strettamente associata con la axina in un complesso assieme con GSK-3 $\beta$  e la APC (adenomatosis polyposis coli) il quale, induce la fosforilazione della  $\beta$ -catenina e la successiva degradazione della stessa da parte del proteasoma. Questo processo viene meno quando l'attività di GSK-3 $\beta$  viene inibita in seguito al legame di Wnt con i suoi recettori, dando la possibilità alla  $\beta$ -catenina di traslocare nel nucleo e determinare l'attivazione del pathway di risposta molecolare [53] (figura 9).

### Gene CTNNB1

La  $\beta$ -catenina è codificata dal gene CTNNB1 ed esso ricopre un ruolo importante in molti

aspetti della biologia epatica, incluso la epatocarcinogenesi. Per quanto evidenziato in HCC, mutazioni puntiformi o delezioni nei siti di fosforilazione nelle vicinanze dei codoni dell' esone 3, sono responsabili di una deregolazione genica alla base della patogenesi HCC. Una percentuale compresa fra il 10 e 30% di carcinomi epatocellulari reca mutazioni nel gene CTNNB1 che risultano nell' accumulo della  $\beta$ -catenina nel nucleo [53].

#### Gene axin

Come descritto brevemente sopra, questa proteina interagisce con APC,  $\beta$ -catenina e la GSK-3 $\beta$ . Mutazioni nel gene che codifica la axina, sono associata allo sviluppo di epatocarcinoma, epatoblastoma e altre neoplasie. In particolare, mutazioni nella isoforma del gene AXINA1 sono rilevabili nel 5-9% di HCC o nelle linee cellulari di HCC, mentre modificazioni nella isoforma del gene AXINA2, sono descritte nel 3% dei carcinomi o nelle stesse linee cellulari [53] (figura 9).

#### Gene APC

Insieme alla  $\beta$ -catenina e alla GSK-3 $\beta$ , la APC forma un complesso e contribuisce alla regolazione dei livelli di  $\beta$ -catenina nel nucleo, mediando la sua stessa degradazione attraverso l' azione del proteasoma. Anche l' inattivazione di questo gene, come per gli altri, può indurre lo sviluppo di HCC in seguito alla metilazione del suo promotore accompagnata a volte, anche dalla perdita cromosomale del locus APC [53].

#### Gene CDH1 (E-caderina)

La E-caderina è una glicoproteina di adesione calcio-dipendente importante per la formazione dello strato epiteliale della cellula. La cederina si trova in associazione con la catenina agendo da regolatore della funzionalità di questo gene. In recenti studi è stata evidenziata la fosforilazione della  $\beta$ -catenina attraverso il pathway EGF, associata con il potere infiltrante e il potere metastatico del tumore, causato dalla soppressione della funzionalità adesiva della caderina. Questa alterazione genica è possibile descriverla anche nell' HCC in cui la sua progressione è determinata da una perdita di funzione del gene, il quale permette un aumento della proliferazione, l' invasione e l' insorgere di metastasi. L' analisi della espressione della E-caderina nell' epatocarcinoma, dimostra come nel 56% dei casi di HCC c' è una down-regolazione della espressione del gene in esame, che correla con le dimensioni della massa tumorale, il potere accrescitivo e la capacità di sopravvivere ai meccanismi di difesa che fisiologicamente si innescano in presenza di neoplasia [53] (figura 9).

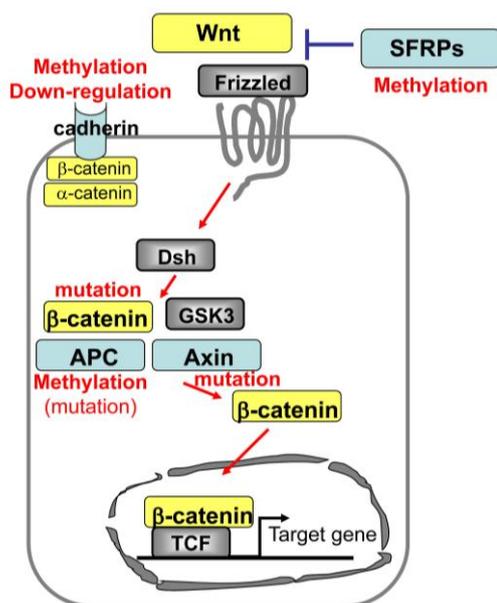


Figura 9: Current Genomics 2011, Nishida

In questi paragrafi si sono volute riassumere le alterazioni genetiche ed epigenetiche che colpiscono numerosi geni e i pathway oncogenici in cui sono coinvolti, determinanti quindi lo sviluppo di HCC. Ugualmente a ciò che accade in altre neoplasie, l'epatocarcinogenesi è associata ad un accumulo delle suddette alterazioni in geni coinvolti nella carcinogenesi che includono mutazioni puntiformi, alterazioni cromosomali, una aberrante metilazione del DNA ed una alterazione della espressione di miRNAs. Questi appartengono ad una classe di geni non codificanti, coinvolti nella regolazione post-trascrizionale, spesso alterati in HCC.

## 2.4 Storia naturale

La storia naturale dell'epatocarcinoma che insorge su cirrosi è conosciuta in modo parziale. Studi prospettici di sorveglianza condotti in pazienti con epatopatia cronica hanno dimostrato che nella maggioranza dei casi l'epatocarcinoma si sviluppa inizialmente come tumore singolo. Non è chiaro se la minoranza (30%) di tumori plurifocali all'esordio prenda origine da un unico clone di cellule neoplastiche, che precocemente metastatizza nel fegato, oppure, come sembra più probabile, che questo origini da più cloni cellulari che si sviluppano indipendentemente. La velocità di crescita dell'epatocarcinoma, intesa come tempo di raddoppiamento della massa neoplastica, varia da 1 mese a 20 mesi [55]. Vista questa variabilità, le dimensioni alla diagnosi, sono scarsamente utili nel predire in modo efficace la sopravvivenza del paziente.

L'epatocarcinoma è un tumore a lento accrescimento che può insorgere su fegato sano o su cirrosi. Può trattarsi di un nodulo unico o di più noduli, a dimostrazione di un'origine pluricentrica, frequente nel soggetto cirrotico.

Il nodulo primitivo tende ad accrescersi indefinitivamente ed è in grado di dare luogo ad una germinazione neoplastica extracapsulare definita stellitosi; frequenti sono anche le metastasi in altri distretti epatici che si diffondono per via venosa.

Se l'accrescimento per contiguità può coinvolgere il diaframma la progressione neoplastica può dare formazione di metastasi nei linfonodi, nel peduncolo epatico e nel polmone; meno frequenti sono invece, localizzazioni ossee, cerebrali e surrenaliche [56].

Nella sua evoluzione, la neoplasia invade le vene sovraepatiche e la vena porta, determinando così progressive trombosi sino alla vena cava, con embolie polmonari, occlusione completa dell'atrio destro e trombosi del tronco portale con gravi emorragie conseguenti a varici esofagee.

La causa più frequente di morte è rappresentata dall'insorgere di una insufficienza epatica nel 35% dei soggetti colpiti da HCC, dalla diffusione di metastasi fino ai polmoni nel 21% dei soggetti mentre nel 16% dei casi, il decesso insorge appunto, per una emorragia aggravata da varici esofagee.

L'epatocarcinoma è una neoplasia a prognosi molto sfavorevole: il 90% dei pazienti con diagnosi di HCC muore in conseguenza della patologia. Questo è dovuto alla rara possibilità di una diagnosi precoce in quanto è molto frequente una diagnosi occasionale dal momento che la localizzazione della neoplasia, le sue dimensioni e la riserva funzionale epatica, rendono il carcinoma asintomatico fino ad uno stadio tardivo per interventi terapeutici risolutivi. Sul piano clinico, i pazienti manifestano sintomi sovrapponibili al quadro clinico di soggetti affetti da cirrosi epatica. Si può riscontrare anoressia, flatulenza o diarrea; dispnea, ascite, ingrossamento del fegato già alla palpazione, e sierologicamente, aumento dei valori fisiologici di alfafetoproteina (AFP) e antigene carcinoembrionale (CEA). I valori di quest'ultimo, sembrano alterarsi principalmente negli epatocarcinomi metastatici, e sembra essere poco utile nei casi di epatocarcinomi confinati al fegato [55].

## 2.5 Anatomia patologica

A livello macroscopico, l'epatocarcinoma si presenta spesso come una massa di colorito biancastro, spesso con aree giallognole/brunastre che rappresentano aree di necrosi. All'interno della massa tumorale le vene epatiche e le vene centrolobulari sono spesso completamente obliterate dall'infiltrazione carcinomatosa [55].

Microscopicamente, le cellule tumorali mostrano spesso una morfologia simile alle cellule normali, manifestando tre varietà di struttura:

- Trabecolare: architettura simile a quella del lobo epatico, spesso con travate irregolari costituite da file di cellule che delimitano fenditure simil sinusoidali
- Acinare: con cellule disposte in maniera raggiata intorno a un lume con aspetto simil ghiandolare
- Solido-scirroso: architettura disordinata con elementi pleomorfi. Lo stroma scarso e travate connettivali di entità variabile

Le cellule di HCC sono generalmente più piccole rispetto alle dimensioni di una cellula normale, mostrano una forma poligonale con all'interno granuli di citoplasma; occasionalmente invece, possono essere osservate, cellule atipiche con una dimensione molto grande o la variante a cellule chiare [57], da abbondante contenuto di lipidi e glicogeno, che può simulare metastasi da neoplasie del rene o del surrene [58]. Il citoplasma è ricco di eosinofili con una tendenza di crescita nel numero dei basofili, parallelamente all'aumento del potere infiltrante del tumore

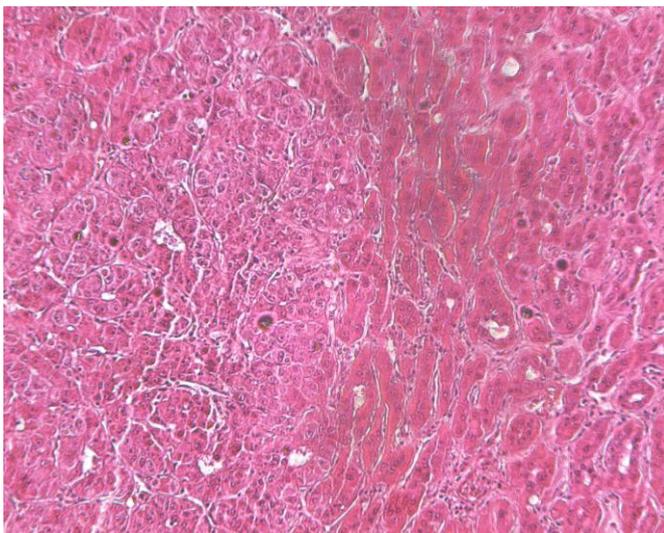


Figura 10: Foto al microscopio ottico (10x) di HCC colorato in ematossilina/eosina

stesso. Il nucleo è ipercromatico e di dimensioni variabili. La porzione centrale della massa neoplastica è spesso necrotica con la localizzazione delle cellule maligne all'interno delle vene peri-portale.

L'epatocarcinoma colonizza precocemente i vasi linfatici, diffondendosi attraverso il sistema linfatico peri-portale. All'interno della stessa massa, possono essere

presenti noduli neoplastici a diverso grado di differenziazione e malignità.

Di epatocarcinoma se ne riconoscono diversi quadri macroscopici [55]:

- forma espansiva o nodulare: frequente nei soggetti cirrotici; con crescita espansiva e nodulare, delimitato dal parenchima attiguo da una capsula fibrosa.
- forma infiltrativa o massiva: frequente nei soggetti non cirrotici; presenta una crescita infiltrativa senza confine con il parenchima sano. Sono visibili satelliti sparsi per disseminazione intraportale da trombi neoplastici.
- forma mista: si osserva una crescita espansiva a carattere infiltrativo.
- forma diffusa: dove la localizzazione dei noduli neoplastici è uniformemente distribuita in tutto il fegato, di solito cirrotico.

## 2.6 Biomarcatori

### AFP

L' alfafetoproteina è stata scoperta nel 1956 da Bergstrand and Czar [59], i quali utilizzarono la carta per effettuare la separazione elettroforetica della AFP umana nel siero. La prima evidenza di utilità della AFP come marker diagnostico di HCC è stata descritta nel 1964 da Tatarinov e nel 1968 da Abelev [60].

Il gene dell' alfafetoproteina umana è localizzato sul cromosoma 4 (4q11-q13) e fa parte della superfamiglia dei geni albuminoidi i quali codificano anche per altre numerose proteine, inclusa l' albumina e la vitamina D [61].

L' alfafetoproteina è una glicoproteina di 591 aminoacidi con un peso molecolare di circa 70 KDa la cui sintesi avviene a livello delle cellule endodermiche del sacco vitellino nelle fasi precoci di sviluppo fetale e successivamente a livello degli epatociti embrionali [62]. La sua concentrazione massima nel siero è di 3 g/L nelle settimane comprese tra la dodicesima e la sedicesima settimana di sviluppo fetale ed, entro i successivi diciotto mesi, i valori iniziano a decrescere per poi stabilizzarsi ai livelli normali di 10 µg/L per poi raggiungere la concentrazione in età adulta di circa 5-10 µg/L [61].

Infatti, in età adulta, la sintesi sierica della AFP è repressa ma si osservano concentrazioni elevate nel siero di donne in gravidanza, in presenza di patologie neoplastiche, come HCC, carcinoma pancreatico e testicolare [62-63], carcinoma gastrico [64] e durante altre condizioni non neoplastiche come epatiti croniche e cirrosi.

L' esatta funzione biologica di questa molecola rimane ancora poco chiara; per le sue

analogie con l'albumina, essa sembra essere coinvolta nel trasporto molecolare di differenti ligandi come la bilirubina, gli acidi grassi, i retinoidi, gli steroidi, metalli, flavonoidi, fitoestrogeni e di una varietà di farmaci [60-65-66]. Inoltre, l' AFP svolge un' attività immunosoppressiva e di controllo nella regolazione della proliferazione cellulare [65].

Da quando Tatarinov ha scoperto l' AFP nel siero di soggetti con carcinoma epatocellulare [67], questa proteina è divenuto il marker diagnostico per eccellenza per la neoplasia epatica. L' associazione tra AFP sierica e HCC è stata ampiamente descritta [61-68-69], tuttavia, nonostante questa chiara associazione, la sensibilità e la specificità come marker diagnostico è bassa, con range di valori per la sensibilità del 25-30% per tumori di dimensioni >3cm e del 52% per tumori con dimensioni >3cm e con una specificità del 76-96% indipendentemente dalle caratteristiche tumorali [70-71].

Per questa ragione, l'utilizzo dell'AFP come screening e come marcatore di HCC, in mancanza di biomarcatori più efficaci, è tuttora in uso nei soggetti ad alto rischio di sviluppo di epatocarcinoma (cirrotici), ma c'è una pressante necessità di individuare molecole con caratteristiche di specificità e sensibilità migliori per la diagnosi precoce.

#### *Des-γ-carbossiprotrombina*

La des-γ-carbossiprotrombina (DCP), conosciuta anche come proteina indotta dalla assenza di vitamina K o meglio, antagonista II (PIVKA-II), è conosciuta per essere un marcatore tumorale per l' epatocarcinoma [70]. Evidenze scientifiche indicano la significativa relazione che intercorre tra elevati livelli di DCP e peggiori caratteristiche clinico-patologiche del tumore, e sua relativa prognosi.

La DCP altro non è che una anomala protrombina, fattore della coagulazione sintetizzato nel fegato secondo meccanismi vitamina k-dipendenti, che ha perso la sua capacità di interagire con gli altri fattori della coagulazione. La differenza che intercorre tra la des-γ-carbossiprotrombina e la normale protrombina, risiede nella composizione dei residui amminoacidici: la protrombina infatti, ha al dominio N-terminale, 10 Gla (acidi glutammici γ-carbossilati) mancanti invece nella DCP, dovuti all' assenza di vitamina K che catalizza le reazioni di trasformazione da parte della γ-glutamyl-carbossilasi [71].

Le esatte cause di una overespressione della DCP nei tessuti neoplastici sono ancora poco noti e i dati presenti in letteratura risalgono a studi condotti intorno alla fine

degli anni '80 inizio anni '90, senza tuttavia informazioni certe e recenti [72-73-74]. Un recente studio condotto da Hamamura et al evidenzia una positività per DCP in pazienti affetti da epatite B, con dimensioni notevoli di HCC e una costante crescita cellulare, ed infatti queste caratteristiche, segno di una malattia neoplastica in stadio avanzato, sono indicative elevati livelli di DCP in associazione con l' invasione della vena porta e presenza di metastasi intra-epatiche [75].

Appare chiaro quindi, il ruolo della Des-  $\gamma$ -carbossiprotrombina nel predire l' invasione della vena porta da parte di HCC e la prognosi di una eventuale terapia neoplastica.

Il meccanismo per il quale la DCP favorisce la crescita delle cellule neoplastiche può essere essenzialmente descritto come stimolante la crescita attraverso il pathway Met-JAK-STAT, analogamente al processo mediato dal fattore di crescita degli epatociti (HGF) [70].

### Glypican-3

Recentemente i ricercatori stanno focalizzando la loro attenzione alla ricerca di nuovi marcatori sierologici che permettano di fare diagnosi precoce di HCC. La loro attenzione si è dunque concentrata sulla GPC3; proteina oncofetale appartenente alla famiglia dei proteoglicani e down-regolata nel carcinoma mammario, nel carcinoma ovarico e nell' adenocarcinoma polmonare ma up-regolata in HCC. Molti studi riportano una overespressione della GPC3 nel siero di soggetti affetti da HCC rispetto a quanto osservato in soggetti sani e con una sua espressione anche nel fegato di pazienti con HCC nel 75% dei casi studiati.

Si tratta di una proteina capace di stimolare la crescita tumorale formando attraverso la stimolazione del pathway di interazione di tipo Wingless [76].

Tuttavia, questa proteina appartiene a quella classe di marcatori non studiati adeguatamente, con un potenziale predittivo e diagnostico non ancora del tutto chiarito.

### Squamous cell carcinoma antigen

L' antigene del carcinoma squamoso (SCCA) è un membro della famiglia delle serpine, inibitori delle serin proteasi caratterizzate da un alto peso molecolare. In un passato nemmeno troppo lontano, sono state identificate due isoforme, SCCA1 e SCCA2, codificate da due geni omologhi; entrambe le proteine sono fisiologicamente espresse nello strato sopra-basale dell' epitelio squamoso multistratificato. Tuttavia, SCCA è stato rilevato anche in epiteli multistratificati caratterizzati da una invasione da parte di cellule maligne in organi quali la cervice, il polmone, la testa ed il collo.

In molti studi, uno dei quali quello condotto da Beneduce et al. [76], le varianti SCCA, espresse nel tessuto tumorale, sono rilevabili nel siero di pazienti con HCC ma associate con le IgM a formare dei complessi circolanti ICs. Sebbene gli altri marcatori tumorali abbiano una espressione compresa tra il 6 ed il 40%, l'espressione del marcatore SCCA-IgM, valutata mediante ELISA, si aggira intorno al 70% rispetto a quanto rilevato nella popolazione sana, la cui espressione si aggira ai limiti rilevabili.

La concentrazione del complesso circolante SCCA-IgM nei differenti stadi di neoplasia, riflette essenzialmente il grado di overespressione dell' SCCA valutato nel fagato attraverso esami di immunistochemica.

L' SCCA-IgM è un marcatore che non si va sovrapporre alla AFP bensì offre la possibilità di aumentare la sensibilità nella diagnosi di HCC.

Risultati preliminari indicano che una aumentata espressione della proteina in esame, è indice di un precoce evento di carcinogenesi epatica, in quanto, studi eseguiti con l' immunistochemica su noduli displastici morfologicamente precursori di HCC, indicano aumentati livelli di SCCA rispetto a noduli epatici, morfologicamente indicatori di neoplasia benigna nei quali non si osserva la presenza della proteina.

## **2.7 Sistemi di prevenzione**

I sistemi di prevenzione di HCC essenzialmente si basano sulle procedure di prevenzione o cura delle cause sottostanti allo sviluppo del tumore; ed essendo HCC una patologia generalmente secondaria ad una sottostante patologia epatica, a varia eziologia, la prevenzione o la cura della patologia epatica rimane il sistema preventivo più efficace per HCC.

A proposito di epatite B, è disponibile un sicuro ed efficace vaccino contro l' infezione che deve essere somministrato a tutti i nuovi nati e a persone immunosopresse con un elevato rischio di infezione. Il programma nazionale di vaccinazione ha drasticamente ridotto la prevalenza di infezione da HBV con conseguente riduzione dell' incidenza di epatocarcinoma [76].

Inoltre, vi è evidenza del fatto che il trattamento antivirale riesce a controllare l' infezione da HBV in soggetti HBsAg positivi, ed eradicare l' infezione da HCV senza tuttavia riuscire ad eliminarlo completamente. Dai risultati di uno studio randomizzato e i risultati di uno non randomizzato in pazienti affetti da HCV senza evidenza di cirrosi, i soggetti trattati con interferone avevano un calo notevole della

carica virale con un rischio pari al 57-75% di sviluppo di epatocarcinoma [77]. Pertanto il trattamento con i farmaci antivirali disponibili (interferone peghilato per HBV e HCV, analoghi nucleosidici/nucleotidici per HBV), e il miglioramento delle percentuali di risposta grazie ai nuovi farmaci in sperimentazione, sicuramente rappresentano armi efficaci nella riduzione dell'incidenza di HCC.

Specificamente nell'infezione da HBV, in virtù dell'integrazione del genoma virale, così come della stabilità dell'intermedio replicativo cccDNA, estremamente difficile da eradicare, il rischio di sviluppo di HCC va tenuto in conto anche quando viene raggiunta la sierconversione con perdita dell'antigene S e sviluppo del relativo anticorpo, ossia quando l'infezione viene considerata formalmente "guarita". Questo status viene definito "infezione occulta", e l'entità di sviluppo di HCC in questa condizione rappresenta un argomento di grande attualità scientifica su cui convergono numerose ricerche attuali.

## **2.8 Approcci terapeutici**

Esistono approcci curativi o palliativi per il trattamento dell'epatocarcinoma, la cui scelta viene fatta in relazione allo stadio della neoplasia e alle risorse disponibili.

Le linee guida per la stadiazione di HCC emesse dalla Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) sono state proposte come standard per poter fare una prognosi in pazienti con HCC [79]. Queste linee guida incorporano alla condizione fisica del paziente, il numero e le dimensioni dei noduli, i sintomi e la funzionalità epatica determinata secondo la classificazione Child-Pugh.

Per soggetti che presentano cirrosi complicata da una lesione neoplastica allo stadio iniziale, l'approccio utilizzato è la resezione chirurgica, i cui risultati sono quanto più positivi, tanto più le dimensioni della massa neoplastica sono ridotte, con assenza di ipertensione portale e livelli di bilirubina nella norma. A 5 anni, il rischio di recidiva dopo resezione chirurgica è pari al 70 % e questo dato è da imputare al fatto che nonostante il trattamento della neoplasia, la sottostante infezione epatica cronica virale permane. Se il soggetto manifesta ipertensione portale o più noduli neoplastici, la scelta per il trattamento cade sul trapianto di fegato a cui è associato un basso rischio di recidiva eliminando la causa principale di malattia rappresentata dalla infezione cronica da HBV [79].

Per i pazienti con una cirrosi compensata, senza invasione vascolare ma con lesioni multifocali, sono da considerarsi ad uno stadio intermedio di malattia, la scelta del

trattamento va verso la chemioembolizzazione transarteriale (TACE) o verso la radioembolizzazione con una percentuale di recidiva a due anni dal trattamento. Tuttavia, l' utilizzo della TACE è associata nel 50% dei pazienti, con una sindrome postembolizzazione che determina la comparsa di febbre e dolore addominale dovuto ad una ischemia epatica. E' ovvio, in quanto è il nome stesso che lo indica, che l' embolizzazione non può essere eseguita senza l' utilizzo di farmaci chemioterapici, la cui scelta può essere effettuata tra i noti farmaci appartenenti a questa categoria. La radioembolizzazione con microsferi di ittrium-90, viene utilizzata come trattamento palliativo per pazienti con Child-Pugh di classe A e una neoplasia ad uno stadio intermedio [79].

I pazienti che mostrano sintomatologia associata ad uno stadio intermedio di neoplasia con invasione vascolare e/o una diffusione extraepatica sono da considerarsi come soggetti aventi una malattia in stadio avanzato e non candidabili a terapie radicali. Il trattamento per eccellenza è una terapia orale con chemioterapici ed in particolare con l' agente Sorafenib: una piccola molecola inibitrice multichinasica con potere antiproliferativo e antiangiogenetico [79].

# ***CAPITOLO 3***

---

## ***Proteina x del virus dell'epatite B***

In questo capitolo verrà descritto il ruolo della proteina x (HBx), proteina non strutturale codificata dal virus dell'epatite B, con ruolo chiave nel processo di infezione da parte di HBV, nella replicazione, nella patogenesi e nella possibile carcinogenesi. L'esatto ruolo di HBx nella replicazione virale è stato ampiamente dimostrato mentre rimane controverso, il suo coinvolgimento nella progressione verso lo sviluppo di HCC. L'insorgere di epatocarcinoma è il risultato di una infiammazione cronica che coinvolge proteine virali di HBV.

Chiarire il ruolo della proteina HBx nella replicazione virale e i suoi effetti sulla biologia degli epatociti potrebbe aiutare gli studiosi, ad interpretare meglio il coinvolgimento della proteina nella progressione tumorale [80].

### **3.1 Caratteristiche generali di HBx**

Il gene che codifica per HBx è il più piccolo dei quattro open reading frames presenti sul genoma virale di HBV; esso contiene 452 nucleotidi che codificano per 154 aminoacidi per una dimensione totale di circa 17.5 kDa. Il nome, proteina x, le fu assegnato in considerazione della iniziale non conoscenza del proprio ruolo e per la mancanza di omologie con altre proteine. La delezione del gene X dal genoma virale ha come risultato un'infezione virale silente nella quale il paziente risulterà negativo per il marker di superficie (HBsAg), negativo per l'antigene core (HBcAg) e per l'antigene e (HBeAg).

La proteina è altamente conservata all'interno delle varianti geniche virali; è localizzata nel citoplasma e in misura minore, nel nucleo degli epatociti.

Le funzioni di HBx non sono ad oggi completamente chiarite, tuttavia è noto il suo ruolo chiave di gene regolatore nella replicazione virale di HBV e del suo coinvolgimento per la stabilizzazione dell'infezione virale [10] senza tuttavia informazioni circa il suo coinvolgimento nello sviluppo dell'infezione.

È una proteina multifunzionale che opera attraverso l'interazione proteina-proteina come transattivatore di promotori virali, cellulari, ed enhancer. HBx non interagisce

direttamente con il DNA ma è in grado di determinare un'attivazione trascrizionale attraverso l'interazione con fattori nucleari di trascrizione e attraverso la modulazione per il pathway citoplasmatico di trasduzione del segnale, incluso Ras, Raf, c-jun, MAPK, NF $\kappa$ B, Jak-Stat e il pathway delle proteine C-chianasi [81]. Questa attivazione trascrizionale è essenziale per la replicazione virale. L'attivazione del segnale sopra descritto, contribuisce allo sviluppo di HCC mediato da HBx attraverso la transattivazione di oncogeni che stimolano la proliferazione degli epatociti. La proteina x inoltre promuove la progressione del ciclo cellulare e inattiva i fattori che la regolano attraverso una cascata a feedback negativo. In aggiunta, inattiva e down-regola il gene oncosoppressore p53, altri geni appartenenti alla stessa famiglia e fattori legati alla senescenza cellulare [82].

Topi HBx transgenici sono stati utilizzati per studiare gli effetti che lo stesso gene HBx ha sull'epatocarcinogenesi; questi studi hanno dimostrato che l'espressione del gene HBx altera il fisiologico ciclo di crescita cellulare conferendo alle cellule murine, caratteristiche neoplastiche. In aggiunta a ciò, da questi studi è emerso la non essenzialità di HBx per la replicazione virale ma è emersa anche la conferma che il gene X può supportare l'avvio della replicazione virale, attraverso l'attivazione di geni virali. In vivo HBx è un cofattore per l'epatocarcinogenesi [81].

### **3.2 HBx e regolazione apoptotica**

L'apoptosi è essenziale per l'eliminazione delle cellule che si trovano nella fase di senescenza, è utile per eliminare cellule danneggiate e soprattutto per la eliminazione di cellule infette.

Dalla letteratura sulla biologia di HBV, emergono risultati contrastanti circa l'associazione della espressione di HBx con la promozione o inibizione della apoptosi. Numerosi dati, chiariscono l'importante ruolo del gene X nel mediare il processo apoptotico, nel sintetizzare cellule coinvolte nella stimolazione pro-apoptotica o contrariamente, nel prevenirla. Se non esiste ad oggi la certezza del ruolo di HBx nei confronti del processo apoptotico, questo è probabilmente dovuto al fatto che per allestire gli studi vengono utilizzati spesso modelli differenti, a volte anche dissimili dalle condizioni naturali di infezione dando luogo a risultati discrepanti tra loro. A supporto di quanto detto infatti, possono essere riportati degli esempi: alcuni studi dimostrano un costante ciclo di morte degli epatociti in ratti esperimenti HBx mentre ad esempio, ciò non si riscontra nell'epitelio mammario del ratto. Ugualmente, stessa condizione di discrepanza sull'attività pro-apoptotica di HBx, si osserva in colture con linee cellulari.

HBx è localizzata sia nel citoplasma che nel nucleo degli epatociti e questo conferisce alla proteina la possibilità di interagire con numerosi fattori regolatori della trascrizione e stimolare fattori trascrizionali sia cellulari che virali [80].

Ad esempio, HBx stimola l'attività trascrizionale di proto-oncogeni come c-Myc, N-myc a jun, e fattori di trascrizione come la proteina attivatrice-1 (AP-1), NFκB, e CREB [82-83]. E' stata inoltre trovata una associazione con molti geni come TNF, TGF-β, EGF-receptor, IL-8 e p53 oltre che avere la capacità di interazione con il pathway di riparazione del DNA [84]. Studi recenti, suggeriscono che l'espressione di HBx in cellule di epatoma HepG2 regola l'espressione di 39 geni tra cui regolatori del ciclo cellulare, oncogeni ed effettori della apoptosi [85].

La regolazione della apoptosi coinvolge quindi, le attività di tre tipi di proteine:

1. effettori ed iniziatori della apoptosi, come le caspasi e i "recettori di morte", incluso TNF-α e Fas
2. induttori o soppressori della apoptosi, ad esempio Bcl-2
3. proteine mediatrici, incluse p53, Fos, Jun e Myc

L'inibizione della apoptosi HBx mediata avviene per interazione del gene x con le proteine regolatrici TNF, Fas, p53 o TGF-β [80-86] e per il blocco delle attività delle caspasi, attraverso la formazione del complesso con la proteina anti-apoptotica survivina, over-espressa nell'epatocarcinoma [81].

In opposizione a quanto appena detto, il gene HBx può anche essere coinvolto nell'aumentare la sensibilità all'apoptosi stessa; è il danno mitocondriale a conferire al gene X la capacità di fungere da stimolo pro-apoptotico, in seguito alla interazione con i canali anionici a voltaggio dipendenti che, causando un'alterazione del potenziale di membrana, favoriscono il rilascio di citocromo c [87-88]. Il mitocondrio ha un ruolo centrale nella vita di una cellula eucariotica. Negli ultimi anni, è diventata evidente la sua importanza nei processi di morte cellulare: questo ruolo non può essere spiegato unicamente da una perdita di funzione e nel conseguente deficit di riserva energetica, di cui, in condizioni normali, il mitocondrio è il generatore. In realtà, gli eventi che colpiscono questo organello sono il risultato di un processo attivo, mediato da meccanismi effettori, regolati in base alle diverse condizioni cellulari. Nell'apoptosi, i principali effetti sulla funzionalità mitocondriale riguardano la perdita del controllo sulla catena respiratoria e sul mantenimento del volume dell'organello, la permeabilizzazione della membrana esterna ai soluti e alle proteine, il calo della differenza del potenziale transmembranario. Tutti questi eventi costituiscono un momento essenziale della cascata apoptotica e contribuiscono alla sua prosecuzione.

Tuttavia, questi dati non sembrano essere confermati da quanto osservato durante la replicazione di HBV nelle colture cellulari e in corso della naturale infezione [80].

### **3.3 HBx e il ciclo cellulare**

Il gene X di HBV può indurre l'arresto delle cellule dopo la fase G<sub>0</sub> e indurre il loro rientro nel ciclo cellulare agendo attraverso dei segnali di trasduzione di numerosi fattori come la chinasi Src, MAPK e JNK. Se HBx è in grado di promuovere la progressione del ciclo cellulare o di determinare la stasi delle cellule in una fase borderline tra la fase G<sub>1</sub> e la fase S, dipende interamente dalla presenza di altri fattori. Quando la crescita di cellule transfettate con HBx è arrestata, si è visto che fornendo un terreno aggiunto di siero, le cellule progredivano molto rapidamente attraverso le fasi del ciclo cellulare, in misura maggiore rispetto a cellule non transfettate con HBx. Ma in assenza di siero, le cellule esprimenti HBx escono dalla fase G<sub>0</sub> e permangono in una fase di stasi tra la fase G<sub>1</sub> e la fase S [89]. Tuttavia non è ben chiaro se la progressione del ciclo cellulare è indotta durante la replicazione virale o se rappresenta una conseguenza di una over-espressione di HBx.

In linee cellulari e in colture primarie di epatociti HBx altera l'espressione dei geni regolatori del ciclo cellulare p21 e p27, influenzando il profilo di progressione in queste cellule. Tuttavia non è ancora ben noto, se HBx induce o inibisce l'espressione di questi geni regolatori e questa mancanza di certezze è da imputare alla influenza dei sistemi allestiti per gli studi o ai livelli di espressione dello stesso gene X [90].

La progressione del ciclo cellulare HBx indotta in cellule immortalizzate, spiega il possibile ruolo del gene X nella carcinogenesi dovuta ad una infezione da HBV in quanto, inducendo la progressione del ciclo cellulare di epatociti in fase quiescente, HBx rende questi molto sensibili ai segnali carcinogenetici i quali, quando combinati con la reazione immunitaria HBV indotta e l'interazione di HBx con altre proteine cellulari, può determinare la trasformazione epatocitaria [80-91]. Mentre ciò può rivelarsi deleterio per l'ospite, l'induzione della progressione del ciclo cellulare è necessaria indurre l'espansione cellulare e quindi, per favorire la disponibilità di deossinucleotidi trifosfati, richiesti per la replicazione virale [92].

### **3.4 HBx e la risposta immunitaria**

Il virus dell'epatite B è un virus non citopatico per cui, il danno che deriva dall'infezione, è la conseguenza dell'attivazione del sistema immunitario che attraverso meccanismi

citolitici, contrasta gli epatociti infetti [93].

HBx induce l'attivazione di numerosi geni associati alla risposta immunitaria e in contrasto con quanto ci si potrebbe aspettare, HBx favorisce una up-regolazione di fattori pro-infiammatori come TNF- $\alpha$ , iNOS ed IL-6 [94] ma nessuna attività verso proteine immunosoppressive come IL-10. TNF- $\alpha$  è una citochina chiave nel processo di difesa dell'ospite ed svolge la propria attività sia in corso di risposta immunitaria innata che in corso di risposta immunitaria adattativa. Questa citochina pleiotropica, media numerosi processi patofisiologici nel fegato, inclusa la rigenerazione, la cronicizzazione di una infezione, la cirrosi fino all'insorgere dell'epatocarcinoma.

Negli epatociti, il TNF- $\alpha$  e in maniera simile anche ad iNOS, è responsabile dell'innesco di un pathway sia proliferativo che apoptotico; nello specifico ad esempio, HBx induce l'espressione di iNOS il quale ha così, due effetti contrastanti sugli epatociti: da un lato inibisce la replicazione virale ma dall'altro promuove il rilascio di IL-6 che è essa stessa promotrice della proliferazione [95-96].

Così, HBx può modulare il rilascio di numerose citochine e alterare il bilancio tra stimoli proliferativi e stimoli apoptotici. Solo recentemente, ad HBx si aggiunge il ruolo di attenuatore della risposta immunitaria contro una infezione virale promuovendo la degradazione della proteina MAVS, un componente essenziale del pathway che viene attivato in risposta alla presenza di un virus e che determina l'attivazione di NF $\kappa$ B e promuove il rilascio di IFN di tipo B [95]. In conseguenza di ciò quindi, la degradazione di MAVS indotta da HBx, indebolisce il rilascio di IFN- $\beta$  ed indebolisce la risposta immunitaria, impedendo così il fenomeno apoptotico degli epatociti infetti e promuovendo la sopravvivenza e l'evasione dal sistema immunitario da parte di HBV [97].

### **3.5 HBX e il suo ruolo nell'insorgenza della fibrosi e nella angiogenesi**

I dati relativi al ruolo che la proteina X ha nel favorire l'insorgenza della fibrosi epatica e nel processo di angiogenesi sono ancora pochi e questo è dovuto al fatto che i risultati ottenuti da esperimenti *in vitro* non sono supportati da evidenze osservate su studi effettuati *in vivo*. Non ci sono evidenze riguardo la capacità di HBV di infettare le cellule stellate epatiche (HSCs) la cui attivazione è centrale nella insorgenza di fibrosi e quindi di cirrosi, in un fegato con un danno cronico. Ma, dagli studi esaminati, emerge che se HBx è legato alla fibrosi epatica bisogna assumere che HBV infetta gli epatociti che a loro volta rilasciano sostanze pro-fibrogeniche che attivano le HSCs [98]. A questo proposito, Martin-Vilchez e collaboratori, dimostrano come HBx induca l'attivazione paracrina e la

proliferazione delle cellule stellate indotta dal TGF- $\beta$ , la quale rappresenta la principale citochina pro-fibrogenica. Inoltre, HBx stimola e migliora il rilascio di collagene-1 e delle metalloproteasi della matrice (MMP-2) da parte delle HSCs, promuovendo così il rimodellamento della stessa matrice extracellulare [100]. Questi risultati sono sovrapponibili a quelli secondo cui, HBx regola MMP-1 il quale a sua volta attiva MMP-2 e up-regola MMP-9, suggerendo come HBx sia capace di alterare l' espressione di molte MMPs durante la progressione della malattia verso la fibrosi, la cirrosi e quindi il carcinoma [99-100].

HBx è implicata nel processo angiogenetico e nel processo metastatico determinando l' aggressività delle cellule tumorali, agendo da modulatore della ipossia indotta dalla angiogenesi nelle epatiti croniche B. Essa favorisce una up-regolazione del gene HIF-1 $\alpha$  che a sua volta induce la trascrizione della citochina VEGF, che è una importante fattore coinvolto nella generazione del processo angiogenetico [101].

Come descritto anche in precedenza, altre molecole pro-angiogenetiche regolate dalla espressione del gene HIF-1 $\alpha$ , sono a loro volta, regolate dalla espressione di HBx. Determinando una overespressione delle MMP-1, MMP-3 e MMP-9, HBx può favorire l' insorgere di metastasi assieme all' aumentata neo-angiogenesi e quindi HBx, ha la possibilità di determinare il potere infiltrante della neoplasia epatica [99-100-102].

Tuttavia, un ruolo in questo processo è da imputare anche alla angiopoietina-2 che riveste una specifica funzione di regolatrice del processo di vascolarizzazione e del processo di angiogenesi nel tessuto epatico infetto da HBV [103].

### **HBx e HBxAb**

Il coinvolgimento della proteina x di HBV nel determinare lo sviluppo di HCC è stato proposto in seguito ad osservazioni per cui, soggetti HBsAg positivi con attiva replicazione virale complicata da neoplasia, mostravano un pattern sierologico positivo per anticorpi diretti contro HBx [97-100]. Si è osservato che nell' 85%-90% dei casi HCC studiati, le sequenze HBx sono integrate nel DNA con una delezione della estremità in 3' generando un proteina troncata [104-105]; è pur vero che ancora oggi non è stato chiarito il ruolo che questa modificazione possa avere sullo sviluppo di HCC HBx-indotto ma recenti studi ipotizzano una perdita della attività pro-apoptotica della stessa HBx. Ed in aggiunta, HBx troncata, è capace di trasformare linee cellulari di tessuto epatico favorendo la proliferazione cellulare [104].

Ci sono ancora scarse evidenze per cui HBx possa determinare una trasformazione

direttamente ed indirettamente in modelli animali e in linee cellulari ed esistono risultati contrastanti in quanto non è stata documentata la trasformazione in cellule esprimenti un genoma virale intatto. Nonostante questo, ci sono studi che illustrano il potere trasformante di HBx in cellule immortalizzate [106], in fibroblasti primari umani [107] e su epatociti di roditori immortalizzati [108]. In contrasto, altri studi mostrano che gli effetti apoptotici di una aumentata espressione di HBx, sopprimono la trasformazione mediata dagli oncogeni in linee primarie di fibroblasti embrionali di ratto anche se questa espressione in presenza di epatite cronica è bassa.

Allo stesso modo, una analisi del potere oncogeno di HBx in topi transgenici, esibisce risultati divergenti da imputare al ceppo dell'animale, alle sequenze transgeniche e ai siti di integrazione e queste stesse caratteristiche, determinano una permanente espressione di HBx e suoi livelli [97].

Degli studi descrivono la proteina x come agente che causa la trasformazione cellulare in qualche ceppo murino con di per se una forte tendenza a sviluppare epatocarcinoma [109] mentre, altri studi in contrapposizione, non sono riusciti a confermare questo elevato rischio di sviluppare HCC [110]. Per cui, ciò che si evince della proteina HBx è una assenza di per se ad avere potere oncogeno; ma un processo di necroinfiammazione e il processo di rinnovamento epatico, predispone l'organo ad un processo di mutagenesi. Ma è lecito pensare HBx come promotore per lo sviluppo di neoplasia epatico; molti ricercatori hanno descritto l'espressione di HBx nel fegato di topo come induttore della proliferazione e svolgendo un ruolo nel fenomeno apoptotico, agendo andando a cooperare con c-myc o carcinogeni chimici a favorire la carcinogenesi [97]. In aggiunta, Wang e colleghi, hanno dimostrato come HBx possa promuovere HCC in topi deficienti di p-21. Ed infine, studi recenti, hanno scoperto che HBx induce una iperplasia attraverso la sinergia con oncogeni e geni oncosoppressori ma, senza avere una sinergia con NRAS nel guidare il processo di carcinogenesi [111].

# ***CAPITOLO 4***

---

## ***Ruolo delle citochine nell'epatocarcinoma***

Una componente del sistema immunitario che modula nell'ospite, la risposta immunitaria sono le citochine, secrete da proteine legate alla membrana, il cui ruolo è quello di regolare la crescita cellulare, il differenziamento e l'attivazione del sistema immunitario. Le citochine vengono rilasciate in seguito a numerose condizioni di stress cellulari, come le infezioni, le infiammazioni e il danno da cui si sviluppa il carcinoma. Queste proteine vengono distinte in due categorie: citochine proinfiammatorie e citochine anti-infiammatorie, e ne esistono alcune non raggruppabili in nessuna delle categorie; infatti, molte di queste, hanno funzioni pleiotropiche e possono agire in sinergia tra loro.

Molte citochine prodotte dalle cellule T del sistema immunitario CD4+, sono definite Th1 o Th2 ed appartengono alla famiglia delle interleuchine (ILs): tra le citochine Th1 possiamo inserire IL1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12p35, IL-12p40 ed IL-15 ad attività pro-infiammatoria, ma non citochine come TNF- $\alpha$  ed IFN- $\gamma$ , mentre tra le citochine Th2 si annoverano IL-4, IL-8, IL-10 ed IL-5, induttrici di risposte anti-infiammatorie. La funzione di queste molecole, è quella di stimolare la risposta immunitaria nella cellula ospite, al fine di controllare lo stress cellulare e minimizzare il conseguente danno cellulare. La risposta immunitaria dell'ospite allo stress, determina una alterazione nella espressione citochinica con impatto pro-carcinogenico [112].

Il fegato ospita un elevato numero di cellule suscettibili all'azione delle citochine e un elevato numero di recettori per le stesse, come IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6. Cellule non parenchimali, come i macrofagi epatici (cellule di Kupffer), sono ricche di citochine e l'azione di queste cellule immunitarie, può essere influenzata dall'ambiente circostante. Anche l'endotelio sinusoidale epatico può produrre una grande varietà di citochine ed infatti, le cellule NKT sono aumentate durante una infezione cronica inducendo così, il rilascio di citochine ad attività profibrotica come IL-4 ed IL-13 [113].

Le citochine, sono inoltre implicate nella rigenerazione epatica e possono anche contribuire ad un costante danno epatico che ha come risultato la cirrosi, la fibrosi ed l'epatocarcinoma. Gli effetti dell'azione delle citochine nella tumorigenesi e nella progressione, è un processo molto complesso che vede come protagonisti una attività

pleiotropica e una apparente ridondanza di azione delle citochine. Nonostante ciò, molti esperimenti hanno chiarito la complessa associazione tra citochine e l'insorgenza di tumore e di come, manipolando il bilancio citochinico, è possibile contrastare la progressione tumorale.

#### **4.1 Interleuchina 8**

Le chemochine sono conosciute non soltanto per la loro capacità di mediare il reclutamento delle cellule infiammatorie come i neutrofili o i linfociti, ma anche per la loro capacità di regolare il bilancio delle cellule Th1/Th2, mediare l'attivazione delle cellule dendritiche ed infine, per essere fortemente coinvolte nella risposta immunitaria. In aggiunta, l'attivazione delle chemochine, facilita la neovascolarizzazione e la fibrosi, ed avendo attività sulla crescita cellulare, la loro associazione con la trasformazione neoplastica è diventata evidente [114].

Senza la capacità di creare una rete di nuovi vasi, la crescita tumorale sarebbe limitata ed infatti, la neoangiogenesi è strettamente associata con la progressione tumorale, il potere infiltrante, e la capacità di metastatizzare e una peggiore prognosi. Alterazione del bilancio di fattori angiogenici e fattori angiostatici, determina il fenotipo infiltrante del tumore.

IL-8 è una citochina pleiotropica appartenente alla superfamiglia delle chemochine CXC, importante fattore chemotattico per i leucociti e un potente induttore della angiogenesi in vivo ed in vitro. Essa è prodotta dai macrofagi e da un numero elevato di cellule come gli epatociti, dopo esposizione a stimoli infiammatori. Infatti, la stimolazione con numerosi fattori, incluso il liposaccaride IL-1 e il TNF- $\alpha$ , determina la rapida e massiva produzione della IL-8 la quale contribuisce alla progressione tumorale attraverso il suo potenziale mitogeno ed angiogenico. L'IL-8 è una chemochina infiammatoria coinvolta nella risposta precoce ad uno stimolo patologico; è prodotta in molte linee cellulari di tumore incluso HCC [115].

La concentrazione sierica della IL-8 aumenta parallelamente alla progressione del danno epatico ed infatti i livelli sono significativamente aumentati in pazienti con uno stadio avanzato di HCC con metastasi e cattiva prognosi. Mediante analisi di immunistochemica, si è notata la presenza di IL-8 all'interno del citoplasma di cellule epatiche tumorali e questo suggerisce che l'espressione della citochina è aumentata durante la trasformazione neoplastica degli epatociti in corso di infezione cronica. E' espressa inoltre, nelle cellule endoteliali vascolari del tumore, suggerendo come l'attività angiogenetica della IL-8 contribuisce alla crescita di HCC [114].

Si può concludere dunque, che l' espressione della IL-8 correla con i fattori clino-patologici di HCC ma secondo meccanismi non ancora ben chiariti; si potrebbe ipotizzare, che l' mRNA della citochina IL-8, prodotta dalle cellule tumorali, aumenta la attività di alcune metalloproteasi (MMP-2, MMP-7 e MMP-9) e di collagenasi, in linee cellulari di epatoma (HepG2) determinando così, un aumento del potere invasivo della neoplasia [115].

#### **4.2 Interleuchina 6**

L' interleuchina 6 (IL-6) è una citochina pleiotropica con un ruolo centrale nel processo di ematopoiesi, nel differenziamento e nella crescita di cellule con diversa origine istologica come, cellule endoteliali, cheratinoidi, cellule neuronali, osteoclasti ed osteoblasti. Inoltre, IL-6 induce una risposta acuta a livello epatico attraverso la modulazione della trascrizione di geni epatici durante l' infiammazione [116].

IL-6 esercita la propria attività biologica attraverso differenti meccanismi : essa può legare il proprio recettore di membrana presente sugli epatociti o, in alternativa, IL-6 ed il suo recettore solubile, entrambi prodotti mediante lo splicing alternativo, possono contribuire alla attivazione di cellule che non esprimono sulla membrana IL-6R, attraverso un processo definito di "transignaling" [117].

Alterati livelli di questa citochina, possono essere riscontrati in numerose condizioni patologiche croniche, come la cirrosi, la psoriasi, la artrite e HIV ed è essa stessa, in grado di regolare la crescita cellulare agendo da fattore di crescita paracrino ed autocrino in molte neoplasie. La presenza del recettore IL-6R sugli epatociti, la up-regolazione della espressione di IL-6 la cui produzione è HBx indotta e l' aumento della espressione epatica della citochina durante la malattia in fase cirrotica, ha reso la stessa, una affascinante citochina da studiare in materia di HCC [116].

Come già descritto, la cirrosi è solitamente associata con un incremento della espressione epatica di molte citochine tra cui IL-6 e durante una infezione cronica da HBV, la proteina x up-regola la citochina in un meccanismo che coinvolge il nuclear factor kB. IL-6 inoltre, favorisce l' espressione di agenti mitogeni, motogeni, morfogenici e pro-neoangiogenici solitamente aumentati durante la neoplasia epatica. Essa può determinare, mediante una riduzione della efficienza della apoptosi Fas indotta, una diminuzione della capacità apoptotica delle cellule tumorali conferendo così, un vantaggio per la sopravvivenza cellulare; infine, IL-6 promuove la disfunzione delle cellule natural killer rendendo possibile una evasione da parte del tumore alla sorveglianza immunitaria [116].

### 4.3 Interleuchina 10

IL-10 è una citochina immunoregulatoria prodotta dalle cellule Th2 con capacità di attenuare la risposta immunitaria. Essa infatti, riesce a sopprimere la produzione di citochine e la proliferazione non soltanto delle cellule CD4+ ma anche delle cellule CD8+ e regolare l'attivazione delle cellule B dell'immunità. IL-10 può inoltre, alterare la funzionalità delle cellule presentanti l'antigene come le cellule dendritiche, le cellule di Langherans e i macrofagi che però, a loro volta, producono IL-10. In aggiunta, il rilascio di questa citochina, può essere mediato anche da cellule T regolatorie (T reg) e da cellule CD25+Foxp3+CD4+ [118].

Inoltre, questa citochina è rilasciata a livello epatico dagli stessi epatociti, dalle cellule endoteliali sinusoidali, dalle cellule di Kupffer e dalle cellule stellate.

IL-10 ha una attività anti-infiammatoria che svolge mediando la sintesi di citochine come IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$  nei macrofagi attivati, inibendo il rilascio di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule T dell'immunità e svolgendo una attività antifibrotica [119].

Il recettore per IL-10 è composto da due distinte subunità identificate con la sigla IL-10R1 e IL-10R2; la prima, rappresenta una subunità in grado di legare unicamente la citochina IL-10 ed è espressa dalla maggior parte delle cellule ematopoietiche, mentre la subunità R2 non è unicamente destinata al legame con IL-10, bensì può fungere da recettore anche per un elevato numero di citochine di classe II, quali IL-22, IL-26, IL-28A, IL-28B ed infine IL-29 [120]. Nonostante l'espressione della IL-10 e del suo recettore IL-10R sia a carico di numerosi tipi cellulari, e nonostante sia nota l'abilità ad inibire la risposta T cellulare, il ruolo di questa citochina durante l'infezione rimane controverso. Una spiegazione potrebbe essere imputata al fatto che sebbene la IL-10 abbia potere immunosoppressivo, IL-10 può fungere da stimolatore in determinate condizioni. Ad esempio, IL-10 riesce ad indurre la proliferazione delle cellule B, la proliferazione e l'attivazione delle NK e potrebbe aumentare la citotossicità delle cellule T CD8+ [121].

Come mostra la figura 11, IL-10 può determinare l'outcome dell'infezione virale. In seguito ad infezione virale infatti, IL-10 può essere prodotta da numerosi tipi cellulari incluso DC, macrofagi, cellule B, cellule T e cellule T regolatorie e nelle fasi iniziali della infezione, sopprimere l'attivazione della risposta immunitaria adattativa alterando la funzionalità delle cellule APC o di cellule T naive e di conseguenza, esacerbando la disfunzione delle cellule T. L'inattivazione della risposta immunitaria induce la persistenza virale ed eventualmente la completa terminazione della risposta CD8+ specifica [122].

IL-10 può inoltre, modulare la sua stessa espressione attraverso un meccanismo a feedback: successivamente alla fase di priming delle cellule T, questa citochina può influenzare le proprietà e il differenziamento delle cellule effettrici e cellule T di memoria, rispettivamente, attenuando la funzione effettrice e alterando la formazione delle cellule T di memoria. Una precoce inibizione della IL-10/IL-10R, previene questa attenuazione della risposta T cellulare determinando l'acquisizione della funzionalità effettrice da parte delle stesse cellule T le quali, sono causa di una rapida eliminazione del virus. L'inibizione della IL-10/IL-10R consente inoltre, la formazione delle cellule di memoria e la loro attività (figura 11) [122]

Tuttavia, rimane sospesa, la necessità di definire con precisione quali cellule rilasciano IL-10 e come la sua espressione viene indotta e se IL-10 ha un ruolo esclusivamente confinato alla fase precoce di infezione o un ruolo durante tutto il fenomeno della infezione.

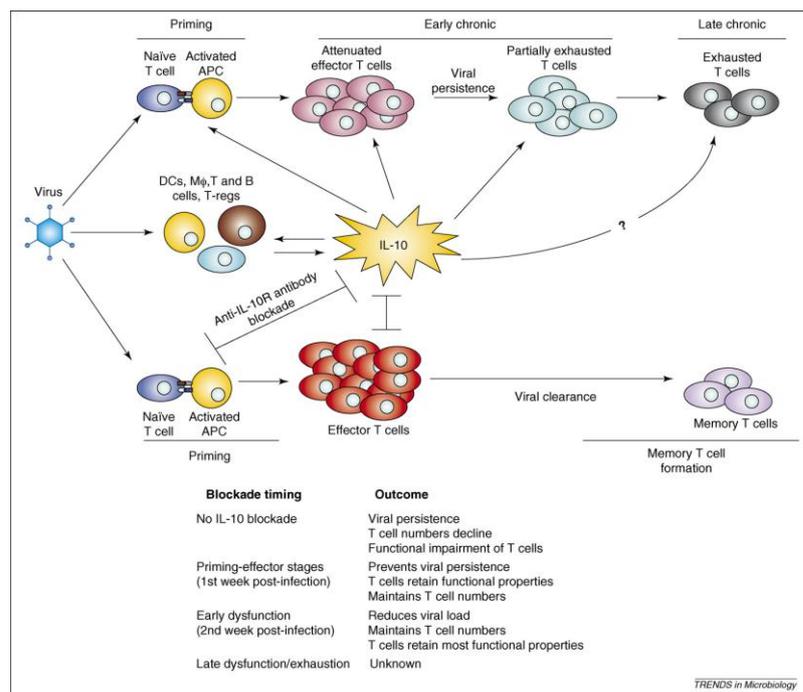


Figura 11: TRENDS in microbiology, 2007, Shawn D. Blackbourn

# ***PARTE SPERIMENTALE***

---

## ***Scopo dello studio***

Il carcinoma epatocellulare (HCC) costituisce un problema sanitario di grande rilevanza, dal momento che nel mondo rappresenta la quinta neoplasia in ordine di frequenza con un'incidenza annua di circa 1 milione di nuovi casi.

Per il trattamento dell'HCC sono disponibili diverse opzioni terapeutiche, quali la resezione chirurgica, le terapie ablative locali ed il trapianto ortotopico di fegato che, sebbene abbiano notevolmente migliorato la prognosi, non sempre sono fattibili.

In questa prospettiva, grande attenzione è rivolta alla ricerca di nuovi marcatori biologici di malattia che consentano un'individuazione quanto più possibile precoce dell'HCC; ad oggi il marcatore sierologico utilizzato più frequentemente per la diagnosi di carcinoma epatocellulare è l'alfafetoproteina, proteina fisiologicamente espressa durante la fase fetale, e presente nell'adulto nel siero a basse concentrazioni, che aumentano durante la gravidanza, o in processi patologici, tra cui HCC. Tuttavia, lo screening con questo marcatore risente di numerose limitazioni, che giustificano gli sforzi attualmente in corso per individuare nuovi biomarcatori, dotati di sensibilità e specificità elevati soprattutto nelle fasi precoci di insorgenza tumorale, che, se individuate, rendono qualsiasi intervento terapeutico più efficace.

HCC su malattia HBV rappresenta un modello di studio piuttosto complesso, in quanto sviluppa su fegato cirrotico, sede di un processo infiammatorio di lungo corso; ma il virus di HBV possiede delle caratteristiche virologiche peculiari, tra cui:

- la possibilità di integrare nel genoma dell'ospite;
- la difficoltà di eradicazione, anche quando l'infezione risulti sierologicamente pregressa, per la formazione di intermedi replicativi molto stabili (cccDNA), che continuano a sostenere una replica virale, seppure se a bassissimo livello;
- la codifica per la proteina regolatoria HBx, che modula l'espressione di geni critici per il ciclo cellulare, la proliferazione e l'apoptosi, e considerato un cofattore per lo sviluppo di HCC.

Nonostante il ruolo chiave esercitato dal sistema immunitario per il controllo della malattia da HBV e della sua progressione, si dispone di pochissime informazioni circa le caratteristiche della risposta immunitaria nei confronti di HBx, e del suo ruolo in

HCC, il cui significato è tuttora controverso.

Inoltre, è stato dimostrato che alcune citochine sieriche, perlopiù ad attività proinfiammatoria ed angiogenetica, presentano livelli più elevati in pazienti con HCC, che sembrano associati anche ad una prognosi sfavorevole. Tuttavia, l'utilità di queste citochine nella pratica clinica non è nota in quanto non ci sono dati sulla concentrazione di questi marcatori nelle varie fasi cliniche dell'infezione da HBV ed in particolare in quella che prelude la comparsa del tumore.

Alla luce di queste premesse, questo studio di natura cross sectional si propone di valutare la risposta immunitaria specifica, sia in termini di frequenza che di ampiezza, diretta contro l'antigene x dell'HBV, e di dosare i livelli sierici di alcune citochine in pazienti affetti da HCC e di confrontare questi dati con quelli ottenuti da pazienti con malattia da HBV nelle distinte fasi della storia naturale, e in particolare nelle fasi che "precedono" l'insorgenza di HCC, quali la cirrosi, l'epatite cronica, e l'infezione inattiva.

# ***PARTE SPERIMENTALE***

---

## ***Materiali e Metodi***

### **Pazienti**

In seguito ad approvazione dello studio da parte del comitato etico e firma del consenso informato, sono stati complessivamente arruolati 70 pazienti affetti da infezione da virus B dell'Epatite (HBV) con differenti profili di malattia, ed in particolare :

- ✚ 15 pazienti affetti da epatite cronica B complicata dalle presenza di epatocarcinoma
- ✚ 11 pazienti con infezione cronica B ed evidenza di lesioni pre-cancerose agli esami strumentali, in particolare noduli macrorigenerativi
- ✚ 14 pazienti con cirrosi epatica su infezione da HBV
- ✚ 15 pazienti con infezione cronica, definita dal seguente pattern: HBV-DNA >2000 UI/mL e AST/ALT costantemente elevate
- ✚ 15 pazienti con infezione cosiddetta inattiva, definita dal seguente pattern: HBV-DNA <2000 UI/mL e AST/ALT nella norma

### **Risposte immunitarie virus- specifiche**

#### ***1. Prelievo del campione***

Ad ogni paziente è stato effettuato un prelievo di circa 40mL di sangue venoso periferico che è stato raccolto in provette vacutainer sterili pretrattate con anticoagulante. Il campione è stato poi immediatamente processato, per la separazione di siero/plasma e per l'isolamento delle cellule mononucleate di sangue periferico.

#### ***2. Separazione di cellule mononucleate (PBMCs) di sangue periferico***

Le cellule mononucleate (peripheral blood mononuclear cells-PBMCs) sono state separate mediante gradiente di densità,, attraverso i seguenti passaggi:

- a. Diluizione del campione in proporzione 1:1 con terreno di Hank's senza magnesio e bicarbonato;
- b. Stratificazione del sangue diluito su gradiente di densità Histopaque 1077 in proporzione 3:1;
- c. Centrifugazione a temperatura ambiente a 1500 rpm per 30 minuti;
- d. Raccolta dell'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia fra plasma e gradiente;
- e. Due lavaggi con terreno di Hank's mediante centrifugazione a temperatura ambiente a 1700 rpm per 10 minuti;
- f. Risospensione del pellet cellulare in terreno RPMI 1640 addizionato di antibiotici (penicillina/streptomina 5000 U), HEPES Buffer 1M, glutammina 1% e 10% di Siero Bovino Fetale (FBS) precedentemente scomplementato;
- g. Conta Cellulare: una volta ottenuta la sospensione cellulare, si procedeva alla conta cellulare e la valutazione della vitalità con trypan blue.
- h. Criopreservazione: le cellule venivano quindi suddivise in aliquote da circa 10 milioni e risospese in soluzione di congelamento (FBS al 1% di Dimetilsolfossido). Venivano dunque congelate overnight a -80°C in un apposito Cryobox, contenitore contenente alcool isopropilico che garantisce una graduale diminuzione della temperatura (circa 1°C al minuto). Il giorno successivo venivano trasferite in azoto liquido per la conservazione a lungo termine, fino al momento dell'utilizzo.

### 3. Stimolazione e generazione delle linee HBV specifiche:

Sulla base delle evidenze riportate in letteratura [123], è stato utilizzato l'approccio sperimentale dell'utilizzo delle linee T cellulari; è difatti noto che i linfociti HBV specifici in corso di epatite cronica, se presenti, sono quasi completamente anergici, soprattutto in presenza di alte quantità di virus circolante, e dunque incapaci di produrre citochine; la generazione di linee cellulari ha dunque lo scopo di far sì che, mediante l'aggiunta dei peptidi virali, le cellule specifiche proliferino in seguito alla stimolazione e si espandano clonalmente, aumentando le possibilità di rilevarne la presenza mediante test funzionali, che si basano ossia sulla capacità di produzione di citochine.

#### **Peptidi sintetici virus- specifici**

I peptidi utilizzati per lo studio della risposta immunitaria cellulare HB-x specifica consistevano di 20 "overlapping peptides" (OLP), frammenti peptidici costituiti da 18 a 20 unità, sovrapponibili in 10 amminoacidi nella loro porzione terminale, in modo che

allineando tutti i peptidi si ottiene la sequenza completa della proteina virale di interesse. In particolare, è stata utilizzata la sequenza consenso della proteina X di HBV (tabella 2) relativa al genotipo virale D, in quanto dall'epidemiologia dell'infezione da HBV è noto come il genotipo D sia quello maggiormente circolante nella popolazione italiana.

I peptidi sono stati prodotti attraverso la tecnica Fmoc.

Questo sistema sperimentale presenta numerosi vantaggi, in primo luogo la possibilità di poter testare tutti i pazienti a prescindere dal loro aplotipo, dal momento che non sono ristretti. Inoltre, la lunghezza aminoacidica, consente di rilevare contemporaneamente sia risposte CD4 che risposte CD8.

Tutto il materiale sopradescritto è stato fornito dal peptide synthesis facility, centro di malattie infettive del Massachusetts General Hospital.

Per la stimolazione delle cellule sono state utilizzate 10 milioni di PMBCs, scongelate e risospese in terreno RPMI 1640 addizionato di antibiotici (penicillina/streptomina 5000 U), Hepes Buffer 1M, glutammina 1% e 10% di FBS (R10).

Stimolazione HB-x specifica: Le PBMCs venivano suddivise in due aliquote equivalenti; metà delle cellule venivano destinate a funzionare come "cellule presentanti l'antigene" (APC) e venivano trattate col peptide affinché questo venisse processato e presentato alla restante parte dei linfociti, impiegata a costituire la componente effettrice. In dettaglio, le cellule venivano centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti, e stimolate con 20 µl di un pool di peptidi costituito da tutti i singoli peptidi OLP alla concentrazione di 0.2 mg/ml. La stimolazione proseguiva per 90 minuti in termostato (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Al termine dell'incubazione le cellule venivano lavate al fine di rimuovere il pool di peptidi in eccesso e venivano unite alla restante parte di cellule (cellule effettrici) non stimolate. Entrambe le componenti venivano risospese in terreno R10 e seminate in piastre per colture cellulari da 24 pozzetti. La coltura proseguiva veniva effettuata in termostato per due settimane e prevedeva, dopo 72 ore, l'aggiunta di Interleuchina-2 alla concentrazione di 50 UI/mL.

#### 4. Allestimento del saggio Elispot

Prima di allestire il saggio Elispot, era necessario preparare le cellule espanse in coltura al fine di eliminare la quota residua di IL-2. Pertanto almeno 12 ore prima del test, le cellule venivano raccolte dalla piastra e sottoposte a tre cicli di lavaggio con terreno R10. Le cellule venivano lasciate incubare overnight al fine di diminuire l'effetto attivatorio sui linfociti normalmente indotto dall' IL-2.

La procedura Elispot prevedeva i seguenti passaggi:

**“Coating”**: il giorno precedente al test venivano preparate le piastre a 96 pozzetti, dotate di una membrana di nitrocellulosa, su cui veniva fatto adsorbire l’anticorpo anti-IFN $\gamma$  alla diluizione di 1:2000 . Le piastre così preparate venivano poste overnight a 4°C.

Il giorno successivo si procedeva all’**allestimento** della piastra, che comportava i seguenti passaggi:

- a. Lavaggio per 6 volte con PBS (Phosphate buffered saline) all’1% di FBS;
- b. Aggiunta di 30  $\mu$ L di terreno R10;
- c. Aggiunta dei singoli peptidi HBV specifici alla concentrazione di 0.2 mg/mL in volume di 20  $\mu$ L [Tab. 2], ad eccezione di quelli allestiti per il controllo negativo e per il controllo positivo, realizzato con 20  $\mu$ L di PHA;
- d. Semina delle cellule in numero di 50.000-100.000, a seconda della disponibilità dopo la coltura;
- e. Incubazione overnight in atmosfera controllata (5% CO $_2$ , 37 °C).

Al termine dell’incubazione si procedeva allo **sviluppo immunoenzimatico**, attraverso i seguenti passaggi:

- a. Lavaggio con PBS 1X (200  $\mu$ L per pozzetto) per 6 volte;
- b. Aggiunta dell’ anticorpo secondario biotinilato anti-IFN- $\gamma$  alla diluizione di 1:2000 (100  $\mu$ L) ed incubazione a temperatura ambiente per un’ora;
- c. Lavaggio con PBS 1X (200  $\mu$ L per pozzetto) per 6 volte;
- d. Aggiunta del terzo anticorpo, la Streptavidina, diluizione di 1:2000 (100  $\mu$ L) ed incubazione a temperatura ambiente, per un’ora, al buio;
- e. Lavaggio con PBS 1X (200  $\mu$ L per pozzetto) per 6 volte;
- f. Aggiunta di cromogeno (BCIP/NBT), fino allo sviluppo della reazione colorimetrica, con formazione di spot blu, usualmente per 15 minuti;
- g. Stop della reazione attraverso l’eliminazione dei reagenti;
- h. Disinfezione della piastra attraverso soluzione di Tween 20 e lavaggio con acqua corrente.

**Letture** della piastra e analisi dei risultati.

La lettura veniva eseguita con Elispot Reader, AID ELISpot Reader (Autoimmun Diagnostika, Germany).

Il calcolo del “background”, per l’analisi dei risultati veniva effettuato calcolando i seguenti

valori numerici:

- a. tre volte il valore della media degli spot dei pozzetti negativi
- b. Tre volte il valore della deviazione standard dei pozzetti negativi sommato alla media.

Fra i due valori numerici ottenuti, veniva scelto come valore soglia quello più alto; veniva pertanto considerato positivo ogni valore di numero di spot eccedente il valore soglia.

**Tabella 1: Sequenze Peptidiche delle Proteina X di HBV**

<b>Proteina X</b>	HBV-D-78	aamaarlccqldpardvl
	HBV-D-79	cqldpardvlclrpvga
	HBV-D-80	dvlclrpvgaesrgrpf
	HBV-D-81	vgaesrgrpfsfgslgtl
	HBV-D-82	rpfsgslgtlsspspsav
	HBV-D-83	tlsspspsavptdhgahl
	HBV-D-84	avptdhgahlslrglpv
	HBV-D-85	ahslrglpvcafssa
	HBV-D-86	glpvcafssagpcalrf
	HBV-D-87	ssagpcalrftsarrm
	HBV-D-88	alrftsarrmettvnah
	HBV-D-89	rrmettvnahqilpkvlh
	HBV-D-90	ahqilpkvlhkrtlglsa
	HBV-D-91	lhkrtlglsamsttdlea
	HBV-D-92	samsttdleayfkdcflk
	HBV-D-93	eayfkdcflkdweel
	HBV-D-94	dclfkdweelgeeirlkv
	HBV-D-95	elgeeirlkvfvlggcrh
	HBV-D-96	kvfvlggcrhklvcapa
	HBV-D-97	crhklvcapapcnfftsa

### **Analisi delle citochine sieriche**

Il dosaggio delle citochine (IL-6, IL-8 e IL-10) è stato effettuato su campioni di siero attraverso saggi immunoenzimatici ELISA, mediante Kit disponibili in commercio (eBiosciences). Brevemente, il campione veniva incubato in piastre pre-coattate con l'antigene specifico per la citochina di interesse. Attraverso successive incubazioni e lavaggi, al fine di rimuovere la componente non specifica non legata, veniva aggiunto nell'ordine un anticorpo secondario anti-citochina biotinilato e la streptavidina coniugata alla perossidasi. Prima dell'aggiunta della soluzione substrato, al fine di incrementare la sensibilità del sistema, il protocollo prevedeva una reazione di amplificazione basata su metodologia TSA (Tyramide Signal Amplification), consistente nell'aggiunta di due reagenti capaci di moltiplicare le molecole per ossidasi-prodotte disponibili al substrato. Dopo l'aggiunta del substrato per ossidasi-specifico, ottenuto il viraggio colorimetrico, veniva aggiunto acido solforico e misurata la densità ottica a 450 nm. I livelli di citochina venivano dunque estrapolati interpolando i valori di densità ottica attraverso una curva di taratura ottenuta da campioni standard a concentrazione nota.

# PARTE SPERIMENTALE

## Risultati

Lo studio è stato condotto complessivamente su 70 pazienti affetti da infezione cronica da HBV, 15 di essi con malattia complicata da epatocarcinoma, e i restanti 55 con infezione da HBV a differente grado di severità.

Le principali caratteristiche demografiche e cliniche sono elencate in tabella 1.

	HCC N=15	CIRROSI CON MACRONODULI N=11	CIRROSI SENZA MACRONODULI N=14	CHB N=15	IC N=15
<b>Età (mediana Range)</b>	60 [50-67]	64 [39-71]	55 [40-68]	45 [31-70]	53 [24-75]
<b>Sesso (M/F)</b>	14/1	9/2	9/5	11/4	11/6
<b>HBV-DNA UI/mL</b>	95 [0-95858812]	0 [0-1677262]	174 [0-10000000]	53733 [0-114415372]	493 [0-2000]
<b>HBeAg+/-</b>	1/14	1/10	3/11	0/15	0/15
<b>AFP ng/mL</b>	9,5 [2-381]	2 [1-5]	2 [1-7]	NA	NA
<b>Terapia anti HBV /Naives</b>	12/3	10/1	10/4	1/14	0/15

I risultati della risposta T cellulare HBx specifica, valutati mediante metodica Elispot in seguito a stimolazione con peptidi sintetici specifici per HBx e generazione di linee specifiche, sono stati espressi attraverso i due principali parametri utili a definire la risposta immune, ed in particolare:

- ✚ la frequenza di risposta: corrisponde al numero di peptidi riconosciuti da ciascun paziente;

- ampiezza o intensità di risposta: si ottiene dalla somma di tutti gli spot relativi a tutte le risposte per ciascun paziente; è espressa attraverso l'unità Spot forming Unit per milione di PBMCs (SCF/10<sup>6</sup> PBMCs).

1. Frequenza di risposte nei confronti della proteina x:

Il primo risultato che emerge dallo studio è che nel comparto periferico dei pazienti con infezione cronica da HBV, è possibile rilevare una risposta T-cellulare proteina X-specifica e che tale risposta è più frequente in pazienti affetti da HCC rispetto ai gruppi di controllo. Dei 15 pazienti testati con HCC, 10 / 15 mostrano delle risposte anti-HBx, ossia il 67% e degli 11 pazienti testati con infezione HBV ed evidenza strumentale di macronoduli di rigenerazione, 5 campioni mostrano una positività di risposta nei confronti della proteina X, ossia il 54%. Tale differenza nella frequenza di risposta è statisticamente significativa tra il gruppo HCC e i gruppo di controllo con cirrosi con il gruppo di portatori inattivi (IC) (Figura 1).

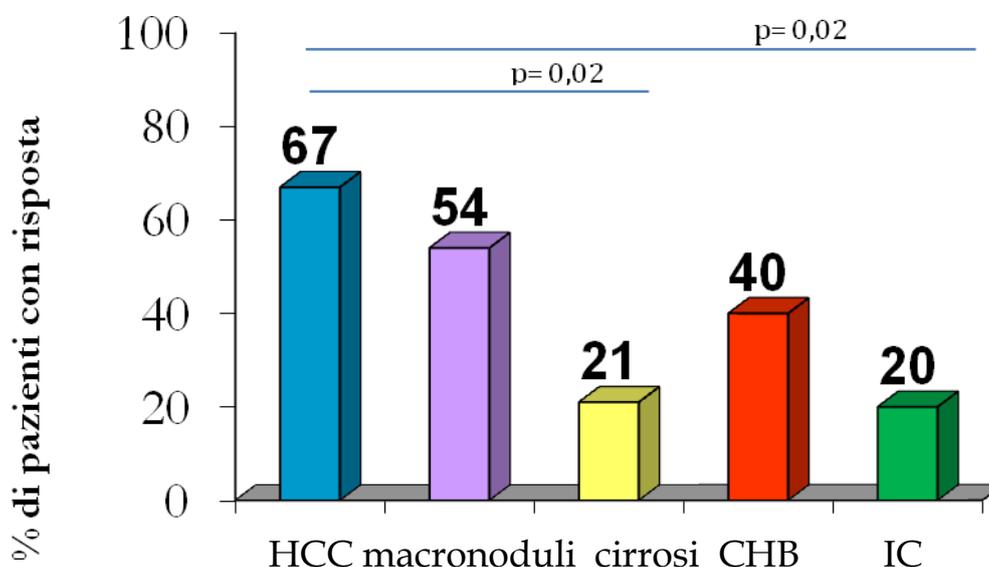


Figura 1: frequenza di risposte HBx-specifiche

2. Ampiezza delle risposte x-specifiche:

Inoltre, sul totale dei pazienti con reattività anti-HBx (N=27), la maggior parte di essi (N=18, 67%) ha presentato risposta contro più di una sequenza della proteina, ad indicare

una risposta multispecifica. Al fine di verificare se esistessero delle sequenze maggiormente bersaglio della risposta immune, e se queste in qualche modo segregassero nei distinti gruppi clinici, le risposte sono state caratterizzate qualitativamente, attraverso l'analisi delle singole sequenze: focalizzando l'attenzione sui tre gruppi con maggior numero di risposte (HCC, cirrosi con macronoduli e CHB), la regione centrale della proteina, compresa tra il peptide 86 e il peptide 90 (tabella 2) è target di circa la metà delle risposte complessive (Figura 2). Inoltre, le risposte di questa parte di proteina sono risultate anche particolarmente vigorose (di ampiezza più elevata rispetto alle restanti), ad indicare che in queste sequenze sono inclusi epitopi piuttosto immunogeni.

**Tabella 2: Sequenze Peptidiche delle Proteina X di HBV**

<b>Proteina X</b>		
	HBV-D-78	aamaarlccqldpardvl
	HBV-D-79	cqldpardvclrpvga
	HBV-D-80	dvlclrpvgaesrgrpf
	HBV-D-81	vgaesrgrpfsrglgtl
	HBV-D-82	rpfsgslgtlsspspsav
	HBV-D-83	tlsspspsavptdhgahl
	HBV-D-84	avptdhgahlsrlglpv
	HBV-D-85	ahlsrlglpvcafssa
	HBV-D-86	glpvcafssagpcalrf
	HBV-D-87	ssagpcalrftsarrm
	HBV-D-88	alrftsarrmettvnah
	HBV-D-89	rrmettvnahqilpkvlh
	HBV-D-90	ahqilpkvlhkrtlglsa
	HBV-D-91	lhkrtlglsamsttdlea
	HBV-D-92	samsttdleayfkdcflk
	HBV-D-93	eayfkdcflkdweel
	HBV-D-94	dclfkdweelgeeirlkv
	HBV-D-95	elgeeirlkvfvlggcrh
	HBV-D-96	kvfvlggcrhklvcapa
	HBV-D-97	crhklvcapapcnfftsa

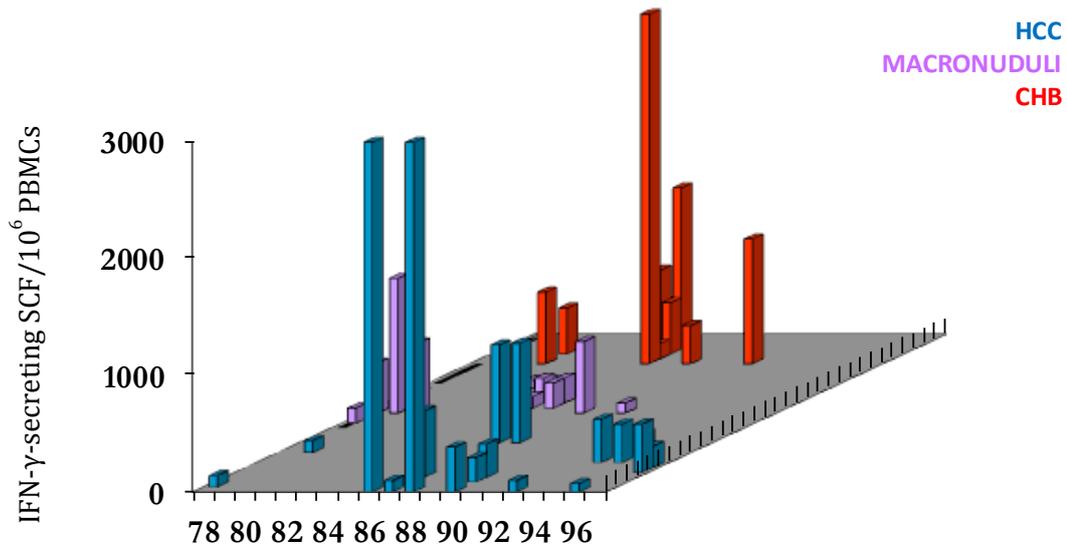


Figura 2: Ampiezza delle risposte verso la proteina X di HBV

Nonostante l'esiguità della casistica, si è tentato di correlare la risposta immunitaria HBx-specifica con parametri clinici di malattia, come le caratteristiche della neoplasia (tumore singolo o multifocale), livelli di AFP, score di MELD, ma nessuno di questi parametri è risultato correlare con la presenza/assenza di risposta anti-HBx.

A livello descrittivo, i pazienti senza risposta, presentavano in prevalenza tumore multifocale (4/5) e livelli mediani lievemente superiori di AFP (tabella 3)

Non è stata ricercata eventuale correlazione con i livelli di HBV-DNA, in quanto la maggior parte dei pazienti in studio era in trattamento antivirale (tabella 3).

Questa ricerca sui gruppi di pazienti non in terapia (CHB e IC) non ha mostrato associazioni fra risposta anti-HBx e livelli di replica virale.

**Tabella 3: associazione risposte HBx-specifiche con parametri clinici**

	HCC senza risposta HBx N=05	HCC con risposta HBx N=10
HCC singolo/multifocale	1/4	4/6
AFP ng/L	12 [2-381]	4 [3-1210]
Terapia anti HBV/naive	9/3	9/1

### 3. Dosaggio delle citochine sieriche:

Il dosaggio sierico delle citochine IL-6, IL-8, IL-10, è stato eseguito mediante ELISA sui pazienti dei gruppi con malattia più avanzata (HCC, e cirrosi con o senza macronoduli).

Il dosaggio della IL-8 (figura 3) ha evidenziato livelli lievemente aumentati della citochina in soggetti con HCC rispetto ai livelli dosati nel gruppo dei macronoduli di rigenerazione e delle cirrosi, ma questa differenza non è risultata statisticamente significativa.

Per quanto riguarda invece IL-6, solo 4 pazienti sul totale hanno mostrato livelli dosabili di citochina, mentre IL-10 è risultata in tutti i pazienti al di sotto del limite di sensibilità del test (< 1 pg/mL) (dati non mostrati).

In sintesi, non è stato riscontrato alcun ruolo diagnostico o indicativo di progressione di malattia per le citochine esaminate.

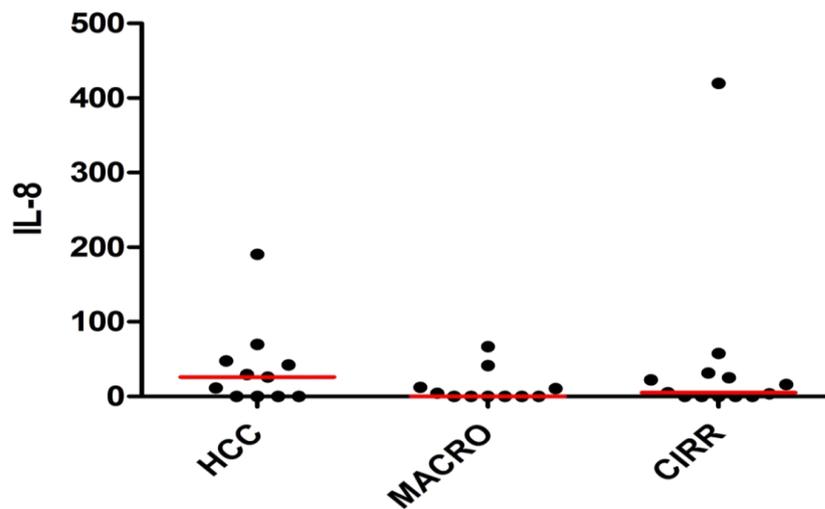


Figura 3: dosaggio della citochina IL-8

# ***PARTE SPERIMENTALE***

---

## ***Discussione***

L'epatocarcinoma (HCC) costituisce un problema di rilevante importanza clinica, considerando che rappresenta la terza causa di morte per neoplasia, con circa 600.000 decessi annui; le caratteristiche di questa forma di tumore sono tali da farlo diventare spesso sintomatico ad uno stadio già avanzato, e risulta pertanto associato a prognosi sfavorevole. C'è quindi una elevata necessità di disporre di nuovi sistemi diagnostici, che consentano con elevata sensibilità e specificità una diagnostica precoce.

Fra i più comuni fattori di rischio per l'insorgenza di HCC, c'è l'epatite cronica da virus B (HBV), una malattia a lenta evoluzione sostenuta da un virus con un potere oncogeno diretto.

HCC su HBV rappresenta pertanto un modello piuttosto complesso di carcinoma epatocellulare: con le altre patologie croniche epatiche, condivide infatti la patogenesi infiammatoria cronica, in cui la necrosi e la rigenerazione epatocellulare inducono il processo rigenerativo-fibrotico, condizione che predispone allo sviluppo neoplastico. E in aggiunta, per le peculiari caratteristiche virologiche di HBV, possiede meccanismi pro-carcinogenetici diretti, tra cui l'integrazione nel genoma ospite, in maniera analoga ai retrovirus, benchè sia un virus a DNA, e la produzione di antigeni a significato oncogeno.

Numerose evidenze hanno messo in risalto come la risposta immunitaria HBV specifica sia uno dei principali fattori determinanti il destino dell'infezione, dal momento che i soggetti che "controllano" l'infezione mostrano risposte immuni vigorose e dirette contro diverse regioni del virus, mentre coloro che la cronicizzano dopo la fase acuta si caratterizzano per risposte deboli se non completamente assenti [123-124].

Sebbene entrambe le componenti dell'immunità acquisita, sia la risposta umorale che la risposta cellulo-mediata, siano necessarie alla "difesa" contro HBV, la risposta T cellulare è ritenuta il meccanismo effettore finale in grado di determinare la risoluzione dell'infezione, che avviene attraverso un'efficace coordinazione dei due bracci: le cellule T helper, che tramite una robusta produzione di citochine mediano lo sviluppo della risposta citotossica e di quella anticorpale; e le cellule CD8, che attraverso meccanismi litici e non litici eliminano gli epatociti infetti, che esprimono antigeni virali sulla loro superficie, nel contesto del complesso di istocompatibilità di classe I.

Il primo risultato del presente lavoro dimostra che la frequenza maggiore di risposte anti-HBx si riscontra in soggetti affetti da infezione HBV complicata da HCC e in pazienti con evidenza strumentale della presenza di macronoduli di rigenerazione, mentre tali risposte risultano poco frequenti nei pazienti cirrotici e nei pazienti con infezione inattiva. Sebbene i pazienti con HCC mostrino una maggiore attività immunologica verso HBx rispetto ai gruppi di controllo, questa non risulta essere associata all'estensione di HCC o allo stadio della malattia epatica: va comunque tenuto presente che questa analisi sicuramente riflette l'esiguo numero di casi del sottogruppo, e della loro eterogeneità, in termini di trattamento e di attività replicativa. Nonostante questa considerazione, i dati disponibili sull'immunologia dell'infezione da HBV indicano che pazienti con una malattia in stadio avanzato, tendono ad avere reattività antivirale debole o nulla, ossia che il profilo immunologico è inversamente proporzionale allo stadio di malattia [126]. I dati del presente studio discordano da uno studio di natura cross-sectional pubblicato di recente [126], che non individuava alcuna risposta alla proteina X nel gruppo di pazienti con HCC. Questa differenza è probabilmente dovuta all'approccio sperimentale utilizzato, dal momento che nel lavoro citato venivano utilizzati come peptidi singoli epitopi, e HLA-A2 ristretti.

In linea invece con il risultato del presente lavoro, studi effettuati a livello istologico hanno mostrato l'espressione di antigene X da parte di HCC e anche che è possibile rilevare sia l'antigene che il relativo anticorpo nel sangue periferico di pazienti affetti da HBV, e in misura maggiore in pazienti con cirrosi epatica e HCC [127]. Complessivamente, queste osservazioni fanno presupporre che HCC induca una aumentata espressione della proteina X, e che questa sia in grado, almeno nel sangue, di indurre una risposta sia anticorpale che cellulo-mediata.

Inoltre, l'analisi di tipo qualitativo che è stata condotta sui tre gruppi clinici che hanno dato maggior risposte anti-HBx, ha fatto emergere che a prescindere dal gruppo clinico di appartenenza, si identifica una zona particolarmente immunogena, localizzata nella parte centrale della sequenza proteica, maggiormente bersaglio di risposta immunitaria, anche con ampiezza elevata, in particolar modo per determinate sequenze. Questo indica che nella proteina X sono presenti sequenze particolarmente immunogeniche, che sarà necessario caratterizzare sotto il punto di vista genetico, ossia per quali fenotipi di istocompatibilità siano ristrette.

L'analisi delle citochine, sebbene effettuata su un campione esiguo di pazienti, non ha confermato i dati presenti in letteratura, secondo i quali il dosaggio delle citochine sieriche IL-6, IL-8 ed IL-10 sarebbero aumentati in soggetti con epatocarcinoma. Anche un lavoro

di recente pubblicazione su *Journal of Hepatology*, ha dimostrato come l' espressione di HBx stimoli in vitro la produzione di IL-6, dimostrando una associazione fra proteina x ed IL-6 con implicazioni nella epatocarcinogenesi [128].

Infatti per quanto riguarda IL-6 ed IL-10 non è stato possibile dosarne i livelli in quanto i valori erano al di sotto del limite di sensibilità del test, mentre per IL-8 si è osservato un livello aumentato nei pazienti con HCC rispetto ai pazienti senza HCC, ma non in misura significativa. Anche per IL-8 pertanto l'utilità in termini di marcatore prognostico va effettivamente dimostrata in studi longitudinali.

Questo studio soffre principalmente di due limitazioni, ed in particolare:

1. nonostante la casistica complessiva sia consistente, l'analisi dei sottogruppi è limitata a numeri piuttosto esigui;
2. lo studio è di natura cross-sectional e non longitudinale, viene infatti effettuato il confronto fra HCC e gruppi "a rischio" di sviluppo di epatocarcinoma, mentre l'analisi sarebbe molto più informativa su pazienti seguiti nel tempo, e mirata sulle fasi che precedono l'effettivo sviluppo di HCC, nei pazienti in cui effettivamente insorge. Tuttavia, come noto, la progressione della malattia epatica si sviluppa in tempi tanto lunghi da rendere estremamente complicato un disegno dello studio di questo genere.

Sicuramente lo studio si dovrà completare valutando se l'espressione della proteina X a livello intraepatico si associa alla risposta immunologica, inoltre, aumentando la casistica e rendendola più uniforme, cercare di stabilire se il rilievo della risposta anti-HBx abbia un significato diagnostico o protettivo.

# **BIBLIOGRAFIA**

---

1. Ganem D. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN (ed): Virology. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996:2703-37
2. Chain BM, Myers R. Variability and conservation in hepatitis B virus core protein. *BMC Microbiology* 2005;5:33
3. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World Journal Gastroenterology* 2007;13:65-73
4. Heermann KH, Goldmann U, et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virology* 1984;52:396-402
5. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication *World J Gastroenterology* 2007;13:48-64
6. Thomas HC. The emergence of envelope and precore/core variants of hepatitis B virus: the potential role of antibody selection. *J Hepatol* 1995;22:1-8
7. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, et al. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 1991;324:1699-704
8. Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, et al. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* 1990;344:552-5
9. Tang H, Delgermaa L, Huang F et al. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for augmentation role in hepatitis B virus replication. *Jof Virology* 2005;79:5548-56
10. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional regulatory protein. *J of Gastroenterology* 2001;36:651-660
11. Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2046-50

12. Avantaggiati ML, Natoli G, Balsano C, et al. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene* 1993;8:1567-74
13. Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, et al. Modulation of intracellular signal transduction pathways by the hepatitis B virus transactivator pX. *J Hepatol* 1995;22:14-20
14. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982;29:403-15
15. Rabe B, Vlachou A, Pante N, et al. Nuclear import of the hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9849-54
16. Mason WS, Aldrich C, Summers J, et al. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus strand DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:3997-4001
17. Weiser B, Ganem D, Seeger C, et al. Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J Virol* 1983;48:1-9
18. Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, et al. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance - a review. *Gene* 1985;40:1-8
19. Gerken G, Kremsdorf D, Capel F, et al. Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection. *Virology* 1991;183:555-65
20. Kekule AS, Lauer U, Meyer M, et al. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990;343:457-61
21. Wallace LA, Carman WF. Surface gene variation of HBV: scientific and medical relevance. *Rev Vir Hep* 1997;3:5-16
22. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;2:588-91

23. Brunetto M, Stemler M, Schodel F, et al. Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HBeAg and not may be responsible for severe hepatitis. *Ital J Gastroenterol* 1989;21:151-55
24. Thomas HC, Carman WF. The host immune response may be responsible for selection of envelope and precore/core variants of HBV. *J Hepatol* 1991;13:S108-13
25. Bonino F, Brunetto MR, Rizzetto M, et al Hepatitis B virus unable to secrete e antigen. *Gastroenterology* 1991;100:1138-41
26. Nakahori S, Yokosuka O, Ehata T, et al. Detection of hepatitis B virus precore stop codon mutants by selective amplification method: frequent detection of precore mutants in hepatitis B e antigen positive healthy carriers. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:419-25
27. Ehata T, Omata M, Yokosuka O, et al. Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1992;89:332-338
28. Chuang WL, Omata M, Ehata T, et al. Precore mutations and core clustering mutations in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1993;104:263-71
29. Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, et al. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immunoglobulin and vaccine. *Pediatr Res* 1992;32:264-268
30. Knon SY, Lee CH. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *The Korean of Journal of Hepatology* 2011;17:87-95
31. Echevarria J.M., Avellòn A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J. Med. Virol.* 2006; 78:S36-S42
32. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Medicine* 2004;350 :1118-29
33. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathologie Biologie* 2010;58 :258-266
34. Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M. Viral Determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. *Journal of Medical Virology* 2002; 67:454-457
35. Perrillo RP, Chau KH, Overby LR, et al. Anti-hepatitis B core immunoglobulin M in the serologic evaluation of hepatitis B virus infection and simultaneous infection

- with type B, delta agent, and non-A non-B viruses. *Gastroenterology* 1983;85:163-167
36. Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver International* 2009;29 (S1):100-107
  37. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, et al. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994;94:907
  38. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108
  39. Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30
  40. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907-17
  41. El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-50
  42. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, et al. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterology* 2008;14(27):4300-08
  43. Wang J, Chenivesse X, Henglein B, et al. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990;343:555-557
  44. Chami M, Gozuacik D, Saigo K, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA 1 gene in the control of apoptosis. *Oncogene* 2000;19:2877-86
  45. Pang RWC, Won Joh J, Johnson PJ, et al. Biology of hepatocellular carcinoma. *Ann of surgical oncology* 2007;15(4):962-971
  46. Chirillo P, Falco M, Puri p, et al. Hepatitis B virus pX activates NF-kappa B-dependent transcription through a Raf-independent pathways. *J Virology* 1996;700:641-646
  47. Henkler F, Lopes AR, Jones M, et al. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virology* 1998;79:2737-42
  48. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-76
  49. Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, et al. Inflammation and liver cancer. *Steroid Enzymes and Cancer: Ann N.Y. Acad. Sci.* 2009;1155:206-221

50. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010 Feb;30(1):3-16.
51. Simonetti RG, Cammà C, Fiorello T, et al. Hepatitis C virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. A case-control study. *Ann Int Med* 1992;116:97-102
52. Whittaker S, Marais R, Zhu AX The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2010 Sep 9;29(36):4989-5005.
53. Nishida N, Goel A. Genetic and Epigenetic Signatures in Human Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Current Genomics* 2011;12:130-137
54. Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatology* 2006;21:15-21
55. Sherlock S, Dooley J. Disease of the Liver and Biliary System. *Blackwell Pub.* 11<sup>th</sup> Ed. 2002
56. Lee HS. Management of patients with hepatocellular carcinoma and extrahepatic metastasis. *Dig Disease* 2011;29(3):333-338
57. Wu PC, Lai CL, Lam KC, et al. Clear cell carcinoma of the liver. An ultrastructural study. *Cancer* 1983;52:504-7
58. Liu JH, Tsai HL, Hsu SM, et al. Clear cell and non –clear cell hepatocellular carcinoma: a case report and literature review. *Kaohsiung J Med Sci* 2004;20(2):78-82
59. Bergstrand CG, Czar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 1956;8:174
60. Abelev GI. Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data. *Cancer Res* 1968;28:1344-50
61. Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta* 2008;395:19-26
62. Yoshima H, Mizuochi T, Ishii M, Kobata A. Structure of the asparagine-linked sugar chain of alpha-fetoprotein purified from human ascites fluid. *Cancer Res* 1980;40:4276-81

63. Aggarwal P, Kehoe S. Serum tumor markers in gynaecological cancer. *Maturitas* 2010;67(1):46-53
64. Posner MR, Mayer RJ. The use of serologic tumor markers in gastrointestinal malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994;8(3):533-53
65. Terentiev AA, Moldogazieva NT. Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein. *Biochemistry* 2006;71:120-32
66. Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:377-408
67. Tatarinov Y. Detection of embryo-specific alpha-globulin in the blood serum of a patient with primary liver cancer. *Vopr Med Khim* 1964;10:90-91
68. Gambarin-Gelwan M, Wolf DC, Shapiro R, et al. Sensitivity of commonly available screening tests in detecting hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients undergoing liver transplantation. *Am J Gastroenterology* 2000;95:1535-38
69. Cedrone A, Covino M, Caturelli E, et al. Utility of alpha-fetoprotein in the screening of patients with virus-related chronic liver disease: does different viral etiology influence AFP level in HCC? A study in 350 western patients. *HepatoGastroenterology* 2000;47:1654-58
70. Inagaki Y, Tang W, Makuuchi M, et al. Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumor marker des-  $\gamma$ -carboxyprothrombin. *Liver International* 2011;31:22-35
71. Inagaki Y, Tang W, Xu H, et al. Des-  $\gamma$ -carboxyprothrombin: clinical effectiveness and biochemical importance. *BioScience Trends* 2008;2(2):53-60
72. Shah DV, Engelke JA, Suttie JW. Abnormal prothrombin in the plasma of rats carrying hepatic tumors. *Blood* 1987;69:850-54
73. Okuda H, Obata H, Nakanishi T, et al. Production of abnormal prothrombin (des-gamma-carboxyprothrombin) by hepatocellular carcinoma. A clinical and experimental study. *J Hepatology* 1987;4:357-363
74. Sakon M, Monden M, Gotoh M, et al. The effects the vitamin K on the generation of Des-  $\gamma$ -carboxyprothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterology* 1991;86:339-345

75. Hamamura K, Shiratori Y, Shiina S, et al. Unique clinical characteristics of patients with hepatocellular carcinoma who present with high plasma Des- gamma-carboxy prothrombin and low serum plasma alpha-fetoprotein. *Cancer* 2000;88:1557-65
76. Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B : a historical overview. *Vaccine* 2008;26:6266-73
77. Singal AK, Singh A, Jaganmohan S, et al. Antiviral therapy reduce risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatology* 2010;8:192-199
78. Negro F. Management of chronic hepatitis B: an update. *Swiss Med Weekly* 2011;141:w13264
79. El-Serag HB Hepatocellular Carcinoma *N Engl J Med* 2011;365:1118-27
80. Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J of Virology*. 2004;78(23):12725-34
81. Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus x antigen in the pathogenesis of chronic infection and the development of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1997;150:1141-57
82. Kew M. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J of Gastroenterology* 2011;26(1):144-152
83. Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006;147(2):58-66
84. Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344(6261):72-74
85. Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virology* 1992;66(2):983-91
86. Went MJ, Becker SA, Slagle BL. Dissociation of DDB1-binding and transactivation properties of the hepatitis B virus X protein. *Virus Res* 2000;68(1):87-92
87. Han J, Yoo HY, Choi BH, Rho HM. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem biophys Res Commun* 2000;272(2):525-30

88. Pan J, Duan LX, Sun BS, et al. Hepatitis B virus X protein protects against anti Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF- $\kappa$ B. *J Gen Virology* 2001;82:171-182
89. Bouchard M, Giannakopoulos S, Wang E, et al. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G<sub>1</sub> transit via Src kinase pathway. *J Virology* 2001;75:4247-57
90. Leach JK, Qiao L, Fang Y, et al. Regulation p21 and p27 expression by the hepatitis B virus X protein and the alternate initiation site X proteins, AUG2 and AUG3. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:376-385
91. Lee S, Tarn C, Wang WH, et al. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
92. Madden CR, Slagle B. stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis Markers* 2001;17:153-157
93. Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J of General Virology*. 2006;87:1439-49
94. Lara-Pezzi E, Majano PL, Gomez-Gonzalo M, et al. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. *Hepatology* 1998;28:1013-21
95. Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunology Reviews* 2000;174:160-171
96. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infection by the innate and adaptive immune response. *Ann Reviews of Immunology* 2001;19:65-91
97. Martin-Vilchez S, Lara-Pezzi E, Trapero-Marugàn M, et al. The molecular and pathophysiological implications of hepatitis B X antigen in chronic hepatitis B virus infection. *Rev Med Virology* 2011;21:315-329
98. Martin-Vilchez S, Sanz-Cameno P, Rodriguez-Munoz Y, et al. The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2008;47:1872-83

99. Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *The FASEB Journal* 2004;18:1123-25
100. Feitelson MA, Reis HM, Tufan NL, et al. Putative roles of hepatitis B X antigen in the pathogenesis of chronic liver disease. *Cancer Letters* 2009;286:69-79
101. Yoo YG, Oh SH, Park ES, et al. Hepatitis B virus protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor1-alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway. *J of Biological Chem* 2003;278:39076-84
102. Yu FL, Liu HJ, Lee JW et al. Hepatitis B virus X protein promotes cell migration by inducing matrix metalloproteinase-3. *J of Hepatology* 2005;42:520-527
103. Sanz-Cameno P, Martin-Vilchez S, Lara-Pezzi E et al. Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein. *American J of Pathology* 2006;169:1215-22
104. Ma NF, Lau SH, Hu L et al. COOH-terminal truncated HBV x protein plays key role in hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2008;14:5061-68
105. Tu H, Bonura C, Giannini C et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001;61:7803-10
106. Seifer M, Hohne M, Schaefer S et al. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J of Hepatology* 1991;13(4):S61-S65
107. Kim YC, Song KS, Yoon G et al. Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001;20:16-23
108. Oguey D, Dumenco LL, Pierce RH et al. Analysis of the tumorigenicity of the X gene of hepatitis B virus in a nontransformed hepatocyte cell line and the effects of cotransfection with a murine p53 mutant equivalent to human codon 249. *Hepatology* 1996;24:1024-33
109. Kim CM, Koike K, Saito I et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317-320
110. Lee TH, Finegold MJ, Shen RF et al. Hepatitis B virus transactivator X protein is not tumorigenic in transgenic mice. *J of Virology* 1990;64:5939-47

111. Wang Y, Cui F, Lv Y et al. HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2004;39:318-324
112. Budhu A, Wei Wang X. The role of cytokines in the hepatocellular carcinoma. *J of Leucocyte Biology* 2006;80:1197-1201
113. De Lalla C, Galli G., Aldrighetti L., et al. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J. Immunol.* 2004;173:1417-1425
114. Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N, et al. Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of Chronic hepatitis C. *Cancer Letters* 2007;251:36-42
115. Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, et al. Interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. 2005;12(10):800-807
116. Porta C, De Amici M, Quaglino S, et al. Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Annals of Oncology* 2008;19:353-358
117. Kallen KJ. The role of transsignaling via the agonist soluble IL-6 receptor in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:323-343
118. Blackburn SD, Wherry JE IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *TRENDS in Microbiology* 2007;15(4):143-146
119. Bouzgarrou N, Hassen E, Farhat K, et al. Combined analysis of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 gene polymorphism and chronic hepatitis C severity. *Human Immunology* 2009;70:230-236
120. Donnelly RP, et al. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biology* 2004;76:314-321
121. Moore KW, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunology* 2001;19:683-765
122. Shawn D. Blackburn and E. John Wherry. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *TRENDS in microbiology*, 2007;15(4):143-146
123. Boni C, Fisicaro P, Valdatta C et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. 2007;81(8):4215-25

124. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, A. Bertoletti, et al. Long –lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996; 98: 1185-1194
125. Rehermann B, Fowler P, Sidney J, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Clin Invest* ;ed 1995; 96: 1527-1534
126. Gehring AJ, Ho ZZ, Tan AT, et al. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2009;137(2):682-90
127. Zhang H, Wu LY, Zhang S, et al. Anti-hepatitis B virus X protein in sera is one of the markers of development of liver cirrhosis and liver cancer mediated by HBV. *J of Biomedicine and Biotechnology*. 2009; 2009:289068
128. Wen Qing X, Wen-feng F, Wei K, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway. *J of Hepatology* 2011;54:26-33