

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**SCIENZE MEDICO-CHIRURGICHE  
GASTROENTEROLOGICHE E DEI TRAPIANTI**

**Ciclo 22**

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED 09**

**TITOLO TESI**

**I LINFOCITI T REGOLATORI NELLA PATOLOGIA EPATICA DA  
HCV: DALL'EPATITE CRONICA AL TRAPIANTO**

**Presentata da: Dott.ssa Silvia Ferri**

**Coordinatore Dottorato  
Prof. Massimo Campieri**

**Relatore  
Prof. Francesco B. Bianchi  
Co-relatore facente funzione per il relatore  
Prof. Marco Lenzi**

**Esame finale anno 2009**

## ABSTRACT

La storia naturale dell'epatopatia HCV-relata passa dall'epatite cronica alla cirrosi ed eventualmente all'epatocarcinoma fino ad arrivare alla possibile necessità del trapianto di fegato. HCV non esercita citolisi diretta, pertanto i fattori immunologici giocano il duplice ruolo di determinare l'evoluzione dell'infezione e il danno epatico. All'interno del sistema immunitario esistono linfociti in grado di inibire l'attivazione delle cellule effettrici modulando la risposta immunitaria; la popolazione regolatoria meglio conosciuta è costituita dai cosiddetti T-reg caratterizzati dal fenotipo CD4+CD35<sup>hi</sup>Foxp3+.

Scopo di questo studio è stato determinare fenotipo e funzione dei T-reg, valutandone le correlazioni con caratteristiche cliniche e parametri biochimici e virologici, nelle diverse fasi della malattia epatica da HCV, a partire dall'epatite cronica, passando per la cirrosi, l'epatocarcinoma e terminando con il follow-up post-trapianto di fegato.

Sono stati reclutati 80 pazienti con infezione cronica da HCV non in trattamento antivirale, di cui 52 con epatite cronica, 12 con cirrosi e 16 con epatocarcinoma. Di questi, 11 sono andati incontro a trapianto di fegato e sono stati poi seguiti fino a 36 mesi di follow up. Ventinove soggetti avevano transaminasi persistentemente nella norma e 28 mostravano ALT costantemente oltre 2.5x i valori normali. Quaranta donatori di sangue sono stati utilizzati come controlli sani. Marcatori di superficie (CD4, CD25) ed intracellulari (Foxp3) sono stati valutati in citofluorimetria su sangue intero periferico per tutti i soggetti al basale ed ogni 2-4 settimane dopo trapianto. In una quota di pazienti i T-reg sono stati estratti dai linfociti del sangue periferico con metodi immunomagnetici e la loro funzione valutata come percentuale di inibizione di proliferazione e produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule bersaglio CD4+CD25- in esperimenti di co-coltura effettuati al basale e dopo 24-36 settimane dal trapianto.

La percentuale di T-reg e l'espressione del Foxp3 sono risultate aumentate nei soggetti con HCV rispetto ai controlli sani, in particolare in coloro con cirrosi, HCC e nei pazienti con transaminasi normali indipendentemente dallo stadio di malattia, correlando inversamente con i livelli di transaminasi e direttamente con il punteggio MELD. La produzione di IFN- $\gamma$  è incrementata in tutti i pazienti HCV ma efficacemente controllata solamente dai T-reg dei pazienti con transaminasi normali. Dopo il trapianto di fegato, si verifica una precoce e reversibile riduzione delle T-reg circolanti. Alla 24<sup>ma</sup> e 36<sup>ma</sup> settimana dal trapianto la percentuale dei T-reg circolanti è sovrapponibile al basale e i loro effetti, sia in termini di proliferazione che di produzione di IFN- $\gamma$ , sulle cellule bersaglio, già dotate di una ridotta attività intrinseca, appaiono particolarmente incisivi.

In conclusione, l'epatopatia cronica da HCV è caratterizzata da una popolazione di T-reg espansa che però, con l'eccezione dei soggetti con transaminasi normali, non appare in grado di limitare il danno epatico immuno-mediato e potrebbe favorire lo sviluppo e la crescita di lesioni tumorali nei pazienti con malattia avanzata. Il trapianto di fegato, probabilmente a causa della terapia immunosoppressiva, si associa ad un marcato e transitorio declino dei T-reg le cui numerosità e funzione vengono completamente recuperate a sei mesi dall'intervento. La migliore conoscenza dei meccanismi alla base della cinetica e della funzione delle cellule regolatorie potrà fornire utili strumenti per il loro utilizzo come adiuvanti nella terapia dell'epatopatia cronica HCV relata.

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	1
La patologia epatica da HCV.....	1
<i>Epidemiologia</i> .....	1
<i>Patogenesi</i> .....	2
<i>Storia naturale</i> .....	4
<i>Terapia</i> .....	7
Infezione da HCV e cellule T regolatorie.....	11
<i>Immunopatogenesi dell'epatite C</i> .....	11
<i>Cellule T-regolatorie</i> .....	12
<i>Cellule T regolatorie CD4+CD25+ (T-reg)</i> .....	13
<i>T-reg e malattia epatica da HCV</i> .....	15
SCOPO DELLO STUDIO.....	23
PAZIENTI E METODI.....	24
Pazienti.....	24
Citofluorimetria a flusso.....	26
Separazione e purificazione cellulare.....	27
Studi di funzione.....	28
Analisi statistiche.....	29
RISULTATI.....	30
Caratteristiche cliniche e laboratoristiche.....	30
Percentuale e fenotipo delle cellule T regolatorie.....	31
Studi di funzione.....	33
DISCUSSIONE.....	35
TABELLE E FIGURE.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	51

# INTRODUZIONE

## La patologia epatica da HCV

### Epidemiologia

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) costituisce un importante problema di salute pubblica determinando una delle più frequenti cause di malattia epatica cronica (1,2). Si stima che in tutto il mondo oltre 180 milioni di individui siano portatori cronici dell'infezione, con un gradiente Sud-Nord, essendo la più bassa prevalenza riportata in Nord Europa (<1%) e la più elevata in Egitto (15-20%), e che la patologia epatica da HCV sia alla base del 27% delle cirrosi e del 25% dei casi di epato-carcinoma (HCC) in tutto il mondo (2). Negli Stati Uniti l'infezione da HCV costituisce la principale causa di morte correlata alla patologia epatica e la più frequente indicazione al trapianto di fegato (3,4). Anche in Italia il virus dell'epatite C rappresenta attualmente la più importante causa di malattia cronica di fegato, con una prevalenza dell'infezione che varia notevolmente in rapporto alle diverse aree geografiche, passando dall'1.8-3.2% di alcune località del nord (5) ad oltre il 16% di un comune della Campania (6). La prevalenza dell'epatite C nel nostro Paese aumenta stabilmente con l'età, essendo principalmente rappresentata negli ultra-cinquantenni, suggerendo come il rischio di acquisizione dell'infezione fosse particolarmente elevato durante gli anni '50 e '60 del secolo scorso. Ci sono inoltre realtà territoriali definite iper-endemiche in cui le persone anziane hanno una prevalenza dell'infezione 20 volte superiore alla media nazionale e 2 volte superiore alla media di soggetti di pari età ma provenienti da differenti aree geografiche (2).

La trasmissione del virus dell'epatite C avviene pressoché esclusivamente per via parenterale o parenterale in apparenza (7). Infatti, nonostante la documentata presenza del virus in molteplici fluidi biologici quali la saliva (8), le lacrime, le urine ed il liquido seminale, la trasmissione all'interno dei nuclei familiari, quella materno-fetale e la diffusione per via sessuale appaiono estremamente limitate (9, 10). La trasmissione per via sessuale, in particolare, appare riservata a soggetti con comportamenti a rischio, partner multipli e concomitante presenza di altre malattie sessualmente trasmissibili (11, 12).

Si ritiene che la larga diffusione del virus in Italia nel secolo scorso sia avvenuta prevalentemente mediante l'utilizzo di emoderivati infetti (2,7) e di materiali riutilizzabili, quali ad esempio siringhe di vetro, non adeguatamente sterilizzati. Con l'introduzione dei materiali monouso e di metodiche laboratoristiche di screening per i donatori e gli

emoderivati (dopo il 1989), la trasmissione iatrogena del virus è stata quasi completamente eliminata (dati attuali su infezioni post-trasfusione: 1/400000), pur permanendo una ridotta quota di infezioni a seguito di interventi chirurgici (13) e odontoiatrici e manovre diagnostico-terapeutiche invasive (14) (colonscopie, dialisi, ecc.). Nelle popolazioni giovanili la presenza dell'infezione è quasi esclusivamente limitata a soggetti che assumono comportamenti "a rischio", ovvero assunzione di sostanze stupefacenti per via endovenosa, trattamenti estetici (tatuaggi, piercing, manicure, pedicure), rapporti sessuali non protetti con partner multipli.

Le previsioni per il prossimo futuro non sono incoraggianti, in quanto si ritiene che la mortalità dovuta a patologia epatica da HCV, sia essa per insufficienza epatica o epatocarcinoma, sia destinata a crescere nei prossimi due decenni (15).

### Patogenesi

Il virus dell'epatite C è un virus a RNA appartenente alla famiglia dei Flaviviridae, identificato per la prima volta nel 1989 (16).

Il genoma virale è rappresentato da una singola catena di RNA lunga circa 9.6 kilobasi che viene trascritta in un'unica grande poliproteina di circa 3011 aminoacidi, da cui derivano 10 polipeptidi, strutturali e non strutturali (17). I primi sono rappresentati da un core nucleocapsidico (C) e due glicoproteine dell'envelope (E1 e E2); all'interno della proteina E2 sono localizzate due regioni definite ipervariabili, considerate, a causa della loro continua mutazione, target di una selettiva pressione immunologica da parte degli anticorpi virus-specifici. La proteina E2 contiene inoltre il sito di legame per CD81, molecola espressa sugli epatociti e sui linfociti B che pare abbia funzione di recettore cellulare o di co-recettore per il virus. Le proteine non strutturali, classificate da NS2 a NS5, hanno attività enzimatica, in particolare NS3 fungerebbe da elicasi e proteasi e NS5 da polimerasi RNA-dipendente, indispensabili per la replicazione virale. Si tratta pertanto di potenziali obiettivi della terapia antivirale, così come lo sono le regioni non trascritte presenti ad entrambe le estremità del genoma virale, dal momento che appaiono altamente conservate e coinvolte in fasi critiche della replicazione virale. Infatti la regione non trascritta 5' contiene il sito di ingresso ribosomiale essenziale per l'inizio della trascrizione della poliproteina, mentre nella regione non trascritta 3' si trovano sequenze fondamentali sia per la replicazione che per la trascrizione virale.

Sulla base delle sequenze genomiche sono stati identificati 6 distinti genotipi di HCV (18) e più di 50 sottotipi. Essi sono distribuiti geograficamente in modo disomogeneo: negli Stati Uniti, in Europa e in Australia i genotipi 1a e 1b sono i più comuni (75% sul totale dei casi di epatite C), seguiti dai genotipi 2 e 3 (che costituiscono il 10-30% del totale, presentano una distribuzione mondiale diffusa e sono particolarmente comuni nel nord Italia). In Giappone prevale il genotipo 1b, seguito da genotipo 2. Gli altri genotipi sono invece virtualmente assenti in questi paesi, ma sono comuni in altre aree, come l'Egitto nel caso del genotipo 4, l'Africa del sud per il genotipo 5 e il sud-est asiatico per il 6. La determinazione del genotipo è importante in quanto ha un valore predittivo in termini di risposta alla terapia antivirale, migliore per i genotipi 2 e 3 rispetto ai genotipi 1 e 4 (19).

In vivo, la replicazione del virus è estremamente attiva e stimabile nella produzione giornaliera di un numero di particelle virali variabile da  $10^{10}$  a  $10^{12}$ , anche nella fase cronica dell'infezione, con un rapido turn-over virale associato ad una vita media dei virioni di 2-3 ore (20).

La replicazione si avvale di una RNA-polimerasi RNA-dipendente priva della funzione di "proofreading". A ciò consegue l'elevata frequenza di mutazioni genetiche, che si accumulano soprattutto a livello delle due regioni ipervariabili di E2, responsabile dell'evoluzione di una popolazione di quasispecie con una sequenza nucleotidica variabile, nell'ambito del medesimo individuo infetto, dall'1 al 5%. Le rapide mutazioni delle proteine dell'envelope costituiscono uno dei fenomeni ipotizzati alla base della fuga del virus dal controllo da parte del sistema immunitario.

Il virus replica nel citoplasma degli epatociti (suo target naturale probabilmente insieme ai linfociti B), senza determinare citolisi diretta. Il danno epatico appare infatti generato principalmente dalla risposta del sistema immunitario all'infezione tramite citotossicità diretta ed elaborazione a livello epatico di citochine infiammatorie che finirebbero col danneggiare anche gli epatociti "by-stander" e non direttamente infettati (21). Tra i numerosi componenti del sistema immunitario, le cellule T in particolare svolgono un ruolo chiave nell'immunopatogenesi dell'infezione: è stato infatti dimostrato che nell'infiltrato flogistico intraepatico dei soggetti infetti è presente una forte risposta sia di linfociti T CD4+ diretta verso antigeni strutturali e non strutturali di HCV, sia di linfociti T CD8+ diretti verso le regioni core, E1, E2, NS2 di HCV (19,21). D'altro canto, una risposta immunitaria CD4+ e CD8+ virus-specifica vigorosa e sostenuta è necessaria per ottenere la clearance virale, mentre quando, più spesso, la risposta immunitaria cellulare risulta insufficiente ad eradicare l'infezione, assistiamo alla cronicizzazione dell'epatite (22-24).

### Storia naturale

La determinazione quantitativa ed ancor più qualitativa dell'RNA virale tramite PCR o amplificazione trascrizione-mediata (TMA) su siero rappresenta il metodo più sensibile e specifico per valutare lo stato dell'infezione da parte di HCV risultando positiva della maggior parte dei pazienti entro 1-2 settimane dall'infezione (25,26).

Gli anticorpi anti-HCV, svelabili mediante metodica ELISA, compaiono più tardivamente (6-8 settimane dopo l'infezione con i test di terza generazione) al momento o poco dopo l'eventuale inizio dei sintomi; di conseguenza la negatività al test per gli anticorpi anti-HCV all'inizio dei sintomi rende tale screening non completamente attendibile da un punto di vista diagnostico. Col tempo tutti i soggetti infettati sviluppano una reattività anticorpale specifica, che generalmente permane a lungo termine come segno di acquisizione dell'infezione, tranne in rare eccezioni in cui scompare una volta superata la fase acuta (27). Le transaminasi iniziano a crescere dalle 2 alle 8 settimane dopo la comparsa dell'RNA virale, raggiungendo livelli di picco molto variabili, da alterazioni modeste fino a valori anche dieci volte superiori al normale.

Circa un terzo degli adulti con epatite C acuta sviluppa anche sintomi clinici, spesso aspecifici, come malessere, astenia, nausea e ittero (28), tra la terza e la dodicesima settimana dall'infezione. Nella forma acuta autolimitante i sintomi perdurano per diverse settimane e si attenuano quando i livelli di ALT decrescono; è possibile un decorso severo e prolungato, ma la forma fulminante è rara.

La cronicizzazione dell'infezione, variabile complessivamente tra il 74 e l'86% dei casi, appare correlata a numerosi fattori di natura sia virale, quale il continuo emergere di mutazioni genetiche in grado di evadere la risposta immunitaria, sia dell'ospite, in termini di scarsa efficacia della risposta immunitaria, in particolare quella cellulo-mediata (24). È stato infatti documentato come una risposta linfocitaria forte e multi-specifica, con la partecipazione dei linfociti T CD4+ e CD8+, le cellule NK e i linfociti B, in associazione con una corretta attività delle cellule dendritiche, sia associata alla clearance virale e alla risoluzione dell'infezione. Al contrario, nei pazienti con infezione cronica la risposta T-linfocitaria antivirale è generalmente debole, scarsamente specifica e/o ritardata e associata ad una limitata attivazione B-linfocitaria. In conclusione, un'interazione coordinata tra immunità naturale, linfociti T CD4+ e CD8+ virus-specifici e ben funzionanti appare necessaria per raggiungere una clearance virale permanente (24, 29-31).

Le ragioni per cui alcuni pazienti manifestano una reattività immunitaria valida nei confronti degli antigeni virali ed altri invece, peraltro senza altri segni di immunodeficienza, ne sono privi, non sono note e sono tuttora oggetto di studio. Fattori correlati ad una minore incidenza di evoluzione verso la cronicizzazione sono l'età minore al momento dell'infezione, il sesso femminile, la razza diversa da quella nera e la severità della patologia in fase acuta (presenza di sintomi o ittero) (28).

Dato l'andamento tipicamente oscillante di viremia e transaminasi, con fasi in cui l'HCV-RNA può risultare anche non titolabile soprattutto con le metodiche quantitative e i valori delle ALT normali, per valutare l'effettiva risoluzione dell'infezione è necessario un follow-up della durata di 6-12 mesi, periodo trascorso il quale la clearance spontanea del virus è altamente improbabile. (32)

Una volta instaurata l'epatite cronica, i livelli sierici dell'HCV-RNA tendono a stabilizzarsi, fino a raggiungere uno stato stazionario in cui il rilascio di particelle virali è controbilanciato da una costante degradazione periferica, mentre l'infezione di nuovi epatociti è compensata dall'apoptosi di altre cellule infette. La maggior parte dei pazienti con epatite C in fase cronica presenta un decorso totalmente asintomatico per lunghi periodi di tempo, tanto che il riscontro dell'infezione avviene per lo più occasionalmente a seguito del rilievo di ipertransaminasemia in corso di accertamenti eseguiti per altri motivi. Le transaminasi sono infatti generalmente elevate in modo continuo o intermittente, anche se almeno un terzo dei pazienti ha valori di ALT persistentemente normali.

Alla biopsia epatica, indipendentemente dai livelli di transaminasi, la maggioranza dei pazienti presenta un grado variabile di coinvolgimento necro-infiammatorio, la cui entità rappresenta il fattore prognosticamente più attendibile nel prevedere una futura progressione della malattia fino allo sviluppo della cirrosi, evento che si verifica nel 15-20% dei soggetti infetti nell'arco di 20-30 anni. (33,34)

L'incidenza del carcinoma epatocellulare su cirrosi (HCC) varia dall'1 al 4% all'anno, con una prevalenza dell'1-3% a distanza di 30 anni dall'infezione (35) e con un significativo trend in incremento riconducibile principalmente al prolungamento della sopravvivenza tra i pazienti cirrotici. L'HCC rappresenta attualmente la quinta neoplasia più frequente nel mondo ed è associato ad una scarsa prognosi; la cirrosi epatica da HCV rappresenta la base su cui in Italia si sviluppa oltre la metà dei casi di HCC, con un rischio di insorgenza pari a 25 volte quello della popolazione sana. Le terapie ad oggi disponibili (ablazione locale, resezione chirurgica, trapianto di fegato) sono efficaci e radicali solo per neoplasie localizzate; quando come spesso accade la diagnosi viene posta in stadio avanzato di



malattia la sopravvivenza media è di 7-8 mesi, nonostante i recenti progressi di nuovi agenti chemioterapici anti-tumorali (in primo luogo Sorafenib) per la terapia dell'HCC in stadio avanzato (36,37).

I fattori di rischio correlati ad una maggiore incidenza di HCC non sono appannaggio del virus ma sostanzialmente legati all'ospite, ovvero: età più avanzata al momento dell'infezione, sesso maschile, coinfezione con altri virus come HBV e HIV, fattori metabolici di danno epatico (obesità, diabete, steatosi epatica, emocromatosi genetica), abitudini voluttuarie (abuso etilico oltre i 60 mg die e fumo di sigaretta).

La storia naturale dell'infezione da HCV comprende anche una varietà di manifestazioni extraepatiche che possono interessare praticamente tutti gli organi ed apparati (38). La rilevanza di tali associazioni varia molto, potendo oscillare da manifestazioni la cui connessione con il virus è circostanziata non solo da evidenze epidemiologiche ma anche da dati di tipo patogenetico, fino a forme per il momento solo aneddotiche. Ai primi posti si trovano disordini di tipo linfoproliferativo, in particolare la crioglobulinemia mista (CM) (38,39) che è, in assoluto, la patologia extraepatica più strettamente connessa con l'infezione da HCV che viene infatti riscontrata nel 90% dei soggetti affetti da CM. D'altro canto, fino al 50% dei pazienti con epatite cronica C possiede crioglobuline circolanti, sebbene la sindrome clinica (caratterizzata da una serie variegata di sintomi, dalla classica triade "astenia, porpora ed artralgia", fino ai più gravi coinvolgimenti nervoso e renale) si sviluppi solamente in un 10-15% di questi (40,41). Un'altra associazione statisticamente significativa è quella tra infezione da HCV e linfoma non Hodgkin a cellule B, anche a prescindere da una preesistente MC, della quale il linfoma può comunque rappresentare un'evoluzione (42). Frequente è anche l'associazione dell'infezione cronica da HCV e la presenza di autoanticorpi non-organo specifici, la cui presenza appare indicare una malattia biochimicamente più aggressiva (43,44). Rimane da definire il ruolo fisiopatologico svolto dall'HCV nell'insorgenza di altre più rare manifestazioni extraepatiche riscontrabili con maggiore frequenza in corso di epatite cronica C rispetto alla popolazione generale, quali artriti siero-negative, sindrome sicca, lichen planus.

## Terapia

L'obiettivo della terapia in corso di epatite cronica da HCV è l'arresto della progressione dell'epatopatia; a tale scopo viene perseguita l'eradicazione dell'infezione (risposta virologica sostenuta [SVR] definita come HCV-RNA non dosabile nel siero del paziente a sei mesi dal termine della terapia) con normalizzazione delle transaminasi e miglioramento dell'istologia epatica. Fattori in grado di predire in senso positivo la SVR sono di ordine virale (genotipi con buone o meno buone probabilità di risposta, rispettivamente 2 e 3 contro 1 e 4; carica virale pre-terapia bassa o alta; risposta virologica precoce ad uno e tre mesi di trattamento, rispettivamente RVR [rapid virological response] and EVR [early virological response]) (45,46) e dell'ospite (età minore o avanzata; individui normopeso o obesi; grado di fibrosi epatica).

La terapia dell'epatite cronica HCV-relata si fonda attualmente sull'utilizzo combinato di interferone alfa peghilato (peg-IFN, ossia IFN legato ad una molecola inerte di glicole polietilene che ne incrementa il peso molecolare complessivo e conseguentemente ne prolunga l'emivita plasmatica) e ribavirina, con raggiungimento della SVR complessivamente nel 60% dei casi. In particolare, la SVR è raggiunta nel 50% circa dei pazienti con genotipo 1 o 4 e nel 70-80% di quelli con genotipo 2 o 3. (45-47)

La durata del trattamento varia in base al genotipo virale e al tipo di risposta in corso di terapia: le attuali indicazioni prevedono 6 mesi di trattamento per genotipi 2 e 3 e 12 mesi per i genotipi 1 e 4 con interruzione del trattamento nel caso in cui l'HCV-RNA rimanga dosabile rispettivamente al terzo ed al sesto mese di terapia (1). Gli studi più recenti sono volti ad individuare sottogruppi di pazienti con caratteristiche favorevoli (RVR, genotipi 2 e 3), che potrebbero beneficiare di trattamenti più brevi e viceversa altri (genotipi 1 e 4 con negativizzazione tardiva dell'HCV-RNA) per i quali un prolungamento del trattamento potrebbe aumentare le probabilità di SVR (1). Non esistono dati sufficienti per formulare raccomandazioni sulle schedule di trattamento dei pazienti infetti da HCV di genotipo 5 o 6.

Notevole importanza rivestono la valutazione attenta di chi trattare e uno stretto monitoraggio in corso di terapia antivirale, procedure che consentono di limitare i numerosi effetti collaterali, più spesso di lieve entità ma talora anche incompatibili col prosieguo della terapia o pericolosi per la vita. I più comuni affetti avversi sono costituiti da una sintomatologia simil-influenzale, con astenia, cefalea, artromialgie e febbre, che occorre in oltre la metà dei pazienti soprattutto nel primo periodo di trattamento, e sintomi psichiatrici

(depressione, ansia, irritabilità, insonnia) che si manifestano intorno al terzo mese dal 22 al 31% dei pazienti. Nei casi più gravi i sintomi psichiatrici possono arrivare alla franca psicosi, fino ad ideazioni di suicidio e di omicidio. Assai frequenti anche le alterazioni ematologiche (neutropenia, piastrinopenia, anemia, soprattutto da ribavirina) e i disturbi gastrointestinali con anoressia e calo ponderale. L'IFN può inoltre indurre malattie autoimmuni, in primo luogo tiroiditi autoimmuni, o peggiorare quelle preesistenti. Segnalati inoltre iperuricemia, rash cutanei, alopecia, prurito, tosse. (48)

Sebbene nel corso degli anni si siano realizzati notevoli progressi in termini di percentuale di SVR, una significativa quota di pazienti rimane non-responder. Sulla scorta dell'esperienza maturata soprattutto nell'infezione da HIV, la ricerca in questi ultimi anni è stata indirizzata allo studio e sviluppo di farmaci più efficaci e tollerabili, prendendo in considerazione molecole con potere inibitorio verso alcune attività enzimatiche di HCV, tra cui proteasi, elicasi e polimerasi, ed altri potenziali bersagli come il sito di ingresso ribosomiale ed il recettore di superficie CD81, nonché nuovi farmaci immunomodulatori; tali ricerche, seppur promettenti, sono tuttavia ancora in fase sperimentale (49,50). Inoltre, il fatto che alcuni pazienti riescano ad ottenere una clearance virale immuno-mediata spontanea, suggerisce la possibilità dell'induzione terapeutica di una risposta immunitaria antivirale specifica, in grado di contribuire alla clearance virale nei pazienti con infezione cronica. Recenti trials clinici di vaccinazione terapeutica hanno documentato come l'immunoterapia specifica possa ridurre la carica virale in alcuni pazienti, sebbene allo stato attuale non sia ancora in grado di risolvere la malattia (31).

Quando le strategie terapeutiche attualmente disponibili non sono sufficienti ad impedire la progressione dell'epatopatia verso la cirrosi scompensata e l'epatocarcinoma, il trapianto di fegato appare l'unica alternativa efficace. I pazienti trapiantati per cirrosi epatica HCV positiva sperimentano invariabilmente la reinfezione dell'organo trapiantato (51). La progressione della fibrosi in questi pazienti risulta accelerata in confronto ai soggetti immunocompetenti e la percentuale di recidiva di cirrosi raggiunge il 30% a 5 anni dal trapianto (52). La recidiva dell'infezione deve essere attentamente discriminata dal rigetto acuto poiché la terapia del rigetto può avere effetti deleteri sull'infezione e come d'altro canto il trattamento antivirale basato sull'interferone può esacerbare la reazione dell'ospite verso l'organo trapiantato (53,54). Nonostante la recidiva epatitica non sia frequente durante il primo mese dopo il trapianto, periodo in cui generalmente si verificano gli episodi di rigetto acuto, c'è spesso una sovrapposizione di questi due eventi e poiché si

presentano con caratteristiche istologiche simili, la distinzione fra questi due evenienze è spesso problematica (55).

I farmaci più utilizzati per la gestione dell'immunosoppressione nel trapianto di fegato sono gli inibitori della calcineurina (CNI: ciclosporina, tacrolimus) (56,57) che, impedendo la de-fosforilazione di alcuni fattori di trascrizione fondamentali per la produzione di IL-2 e del suo recettore ad alta affinità, bloccano di fatto il signalling e l'attivazione linfocitaria. Queste molecole si sono dimostrate altamente efficaci nel prevenire il rigetto e nel consentire la sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato e del paziente, ma sono gravate da nefro e neuro-tossicità non trascurabili, paiono favorire l'incidenza di neoplasie "de novo" ed il loro ruolo nella recidiva di infezione da HCV è ancora oggetto di indagine (58). Per questi motivi, nuove strategie immunosoppressive sono in studio allo scopo di limitare l'utilizzo di CNI e, nel campo dei trapianti, sirolimus ed everolimus, farmaci appartenenti alla classe m-TOR, appaiono i più promettenti. Questi farmaci hanno un'attività anti-proliferativa ed immunosoppressiva bloccando i linfociti T in una fase diversa dagli CNI inattivando l'enzima "Mammalian Target of Rapamycin" e prevenendo a valle la cascata innescata dell'interleuchina 2 con conseguente blocco del ciclo cellulare in G1 (59). Un'altra strategia utilizzata allo scopo di prevenire il rigetto acuto consentendo nel contempo una riduzione precoce degli steroidi e minimizzando gli effetti tossici degli inibitori della calcineurina è l'induzione con anticorpi monoclonali diretti contro la catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-2 (CD25), ovvero basiliximab o daclizumab, il cui razionale risiede nella inibizione della proliferazione T cellulare indotta dall'IL-2. Alcuni lavori recentemente pubblicati hanno documentato l'efficacia di questa terapia induttiva nel prevenire il rigetto del fegato trapiantato senza lo sviluppo di significativi eventi avversi (60,61) anche se tali risultati non sono concordi in tutte le esperienze (62).

Nel complesso dunque si avverte la necessità di una gestione della terapia medica nel post-trapianto sempre più personalizzata, capace di integrare e di ottimizzare i tempi dei due trattamenti fondamentali, quello antivirale e quello immunosoppressivo. Per questo motivo sono in studio marcatori specifici che aiutino a distinguere più agevolmente tra recidiva epatitica e rigetto, oltre che parametri che permettano di identificare i soggetti a più alto rischio di recidiva epatitica severa data l'estrema variabilità inter-individuale nell'esordio e nella progressione dell'infezione su fegato trapiantato. Utile in questo senso appare la determinazione mediante tecniche di immunoistochimica degli antigeni di HCV su tessuto bioptico, metodica sensibile e specifica per valutare la re-infezione d'organo (63). Inoltre lo studio della risposta Th1 selettiva ed orientata verso antigeni virali e la titolazione degli

anticorpi neutralizzanti anti-HCV, elementi caratteristici dell'infezione virale nel soggetto immunocompetente, potrebbero essere d'aiuto anche nel valutare la cinetica della reinfezione nel paziente trapiantato (64,65).

## **Infezione da HCV e cellule T regolatorie**

### *Immunopatogenesi dell'epatite C*

L'infezione da HCV attiva il sistema immunitario che mette in atto un ampio spettro di risposte dell'immunità innata e acquisita allo scopo di difendere l'ospite dall'infezione stessa. Macrofagi, cellule NK e neutrofili producono citochine infiammatorie e antivirali che costituiscono la prima risposta all'infezione. Le cellule dendritiche attivate inducono la differenziazione delle cellule T naive in cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> virus-specifiche che costituiscono la base della risposta immune acquisita; le cellule CD4<sup>+</sup> tipo 2 (Th2) inducono le cellule B a produrre anticorpi antivirali mentre le cellule CD4<sup>+</sup> tipo 1 (Th1) secernono IFN $\gamma$  e attivano la proliferazione massiva di cellule CD8<sup>+</sup> citotossiche (Tc) che distruggono le cellule infettate e secernono citochine infiammatorie (66,67)

Questi complessi meccanismi molecolari e cellulari rendono possibile il controllo e, nei casi migliori, l'eliminazione del virus nella fase acuta dell'infezione. Tuttavia, nella maggioranza dei soggetti infetti il virus dell'epatite C è in grado di evadere le risposte immunitarie dell'ospite, determinando un'infezione persistente.

I meccanismi alla base della perdita di efficacia della risposta immune nella maggioranza dei soggetti infetti, peraltro immunocompetenti, non sono ancora completamente compresi; tra quelli ipotizzati vi sono il sovvertimento della risposta immunitaria innata da parte di fattori virali, l'emergere di ceppi virali mutati che evadono la risposta immune tramite il meccanismo delle quasispecie e la disfunzione/inefficienza dei linfociti T effettori (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>).

E' stato infatti documentato che una risposta linfocitaria forte e multi-specifica nei confronti di diversi determinanti antigenici virali, con la partecipazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, le cellule NK e i linfociti B, in associazione con una corretta attività delle cellule dendritiche, è associata alla clearance virale e alla risoluzione dell'infezione. Al contrario, nei pazienti con infezione cronica la risposta T-linfocitaria antivirale è generalmente debole, scarsamente specifica e/o ritardata e associata ad una limitata attivazione B-linfocitaria (24, 29-31). La comprensione del perché alcuni pazienti manifestino una reattività immunitaria valida nei confronti del virus mentre altri ne siano privi appare quindi fondamentale, anche per l'eventuale sviluppo di una immunoterapia efficace (31).

In questo contesto, gli studi più recenti hanno rivolto l'attenzione al possibile ruolo svolto dai linfociti T regolatori. Tali cellule agiscono infatti sopprimendo le risposte immuni non

solo verso il self, ma anche verso antigeni non self (44-46) inclusi quelli virali (47), potendo quindi svolgere un ruolo chiave nella persistenza dell'infezione da HCV. D'altro canto, essi rivestono anche un fondamentale ruolo protettivo, limitando il danno tissutale immuno-mediato. Il virus dell'epatite C infatti non esercita un effetto citopatico diretto sugli epatociti che infetta e diversi studi hanno dimostrato come la risposta immunitaria antivirale, ed in particolare quella cellulo-mediata, sia il principale fattore responsabile del danno epatico in corso di infezione da HCV (21).

### Cellule T regolatorie

Il primo studioso a suggerire l'esistenza di cellule con attività immunosoppressiva fu Gershon nei primi anni '70 (68-71) il quale coniò la definizione di linfociti T "suppressor". Poiché non fu possibile caratterizzare allora né le cellule, né tanto meno i meccanismi alla base dell'immunoregolazione, questa teoria venne sostanzialmente abbandonata fino agli anni '90, quando nuovi studi, condotti in diversi laboratori su modelli animali di malattie autoimmuni, fornirono prove convincenti dell'esistenza di sottopopolazioni T linfocitarie con un ruolo critico nella prevenzione dell'autoimmunità (72-75).

Nel 1995, Sakaguchi et al. descrissero infatti una sottopopolazione di cellule T CD4+ con elevata espressione sulla superficie cellulare della catena alfa del recettore per l'IL-2 (CD25), la cui deplezione nel topo causava malattie autoimmuni e risposte aumentate agli antigeni esterni (75). Cellule simili vennero identificate anche nell'uomo poco tempo dopo e denominate "T-reg" (76-78).

Ad oggi sono state riconosciute diverse sottopopolazioni di cellule T regolatorie, la cui caratteristica comune è la capacità di sopprimere l'attivazione, la proliferazione, la differenziazione e le funzioni di molte cellule effettrici: linfociti T CD4+ e CD8+ (79,80), linfociti B (81), cellule NK (82) e NKT (83), cellule dendritiche (84). Esse sono necessarie per sopprimere le risposte immuni nei confronti degli antigeni autologhi prevenendo così lo sviluppo di patologie autoimmuni (85,86), ma appare sempre più evidente il loro coinvolgimento anche nel controllo dell'immunità antitumorale, nel cui contesto potrebbero essere almeno in parte responsabili del fallimento dell'immuno-sorveglianza, (87,88) e della risposta immune verso il non self (89-91), cioè nelle infezioni acute e croniche da batteri, virus (92), parassiti e funghi. In quest'ultimo contesto, le cellule regolatorie potrebbero svolgere due ruoli assai diversi, da un lato limitando il danno immunomediato, dall'altro contribuendo alla persistenza dell'infezione (89-90,93). I

linfociti T regolatori comprendono numerose popolazioni cellulari, tra cui linfociti NKT, cellule CD4<sup>+</sup> secernenti Il-10 (Tr1), o TGF- $\beta$  (Th3), linfociti T “doppi negativi” (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), cellule T  $\gamma\delta$  ed alcuni sottogruppi di linfociti CD8 (94). La popolazione regolatoria meglio conosciuta e studiata è costituita dalle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, cosiddette T-reg .

### Cellule T regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T-reg)

Classicamente, le cellule regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sono suddivise in due sottogruppi principali: T-reg “naturali” (nT-reg) che si sviluppano durante il normale processo di maturazione dei linfociti T nel timo, in seguito all’interazione con antigeni self, e T-reg “indotti” (iT-reg) che si sviluppano in periferia. Le cellule nT-reg sono il risultato di una interazione tra il recettore delle cellule T in fase di maturazione (TCR) ed antigeni presentati loro in associazione a molecole MHC di classe II dalle cellule dello stroma timico, nei corpuscoli di Hassal. L’avidità di questo legame, che deve essere sufficientemente alta da garantire la sopravvivenza delle cellule T, ma non tanto da indurre delezione clonale, e la presenza di molecole accessorie quali CD28, B7 e CD40, sono fondamentali per il differenziamento di tali cellule T verso un fenotipo regolatore. (95) Gli iT-reg invece verrebbero indotti in periferia a partire da cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> mature in condizioni di stimolo antigenico sub-ottimali come per esempio la presenza di TGF- $\beta$  e l’esposizione continua a basse dosi di antigene (96-98).

Nella maggior parte degli studi, le T-reg sono state identificate valutando l’espressione del CD25 (ossia la subunità  $\alpha$  del recettore per l’interleuchina 2) insieme al CD4. Tali cellule, inizialmente descritte nel topo, dimostrarono un potente effetto regolatore sia in vitro, inibendo la proliferazione di cellule autologhe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>, che in vivo, prevenendo lo sviluppo di colite autoimmune in animali geneticamente predisposti (72,76). Successivamente, una popolazione cellulare con simili caratteristiche venne identificata anche nell’uomo (77) ma, mentre nei topi le cellule T regolatorie sono state caratterizzate con precisione, lo studio della loro controparte nell’uomo è stata più difficoltosa e controversa, a causa della mancanza di marcatori specifici per identificare accuratamente queste cellule. Infatti il CD25 nell’uomo non è un marcatore esclusivo delle T-reg, poiché viene espresso anche da cellule T effettrici in seguito alla loro attivazione da parte dell’antigene, sebbene generalmente il livello di espressione in questo caso non raggiunga quello delle T-reg .



Le T-reg esprimono costitutivamente anche una serie di altre molecole di superficie, quali CTLA-4 (antigene citotossico linfocitario 4), GITR (recettore per il TNF glucocorticoide-indotto), CD103 (integrina  $\alpha E\beta 7$ ) CD45RO (fenotipo di cellule di memoria) e CD62L mentre tipicamente esprimono bassi livelli di CD127 (CD127<sup>low</sup>) (99-101); tuttavia, come il CD25, queste molecole non sono specifiche per le T-reg e possono essere espresse anche da cellule T effettrici attivate e da cellule non-T (ad esempio il CD103 dalle cellule dendritiche). Recentemente è stata identificata un'altra molecola di membrana, detta LAG-3, che pare espressa selettivamente sulle T-reg e che potrebbe anche essere coinvolta nell'espletamento della loro funzione soppressiva, ma ulteriori studi sono necessari per chiarirne il ruolo (102).

La ricerca di un marcatore che potesse con maggiore certezza identificare le T-reg ha portato all'identificazione nel topo di un fattore di trascrizione, chiamato Foxp3, specificamente espresso dalle cellule regolatorie CD4+CD25+ (103). Il gene *Foxp3* e la sua corrispondente proteina, chiamata scurfina, erano già noti agli immunologi poiché una loro mutazione è alla base della sindrome umana chiamata IPEX, una rara immunodeficienza legata al cromosoma X caratterizzata da disordini autoimmunitari a carico di numerose ghiandole endocrine, malattie infiammatorie intestinali, dermatite atopica ed infezioni fatali (104). La stretta somiglianza del corrispettivo murino della sindrome IPEX con animali privi di T-reg ha portato alla scoperta della relazione fra T-reg e Foxp3, elemento fondamentale per lo sviluppo e la funzione di questa sottopopolazione cellulare. Purtroppo però, mentre l'espressione di Foxp3 appare una prerogativa esclusiva delle T-reg nel topo, lo stesso non si può dire dell'uomo, in cui Foxp3 può essere espresso temporaneamente nei linfociti T attivati indipendentemente dalla funzione regolatoria (105-107), perdendo quindi il ruolo di marcatore specifico di T-reg. In conclusione, sebbene nessuno dei marcatori ad oggi disponibili sia esclusivo delle T-reg, la loro presenza contemporanea ed il loro livello di espressione li rende il migliore strumento per identificare fenotipicamente questa popolazione cellulare mentre la metodica più affidabile per valutarne l'azione è costituita dagli studi funzionali.

Dal punto di vista funzionale, le T-reg sono in grado di inibire diversi tipi cellulari coinvolti sia nell'immunità naturale che acquisita, sopprimendone la proliferazione e modificandone la secrezione di citochine (108,109). Per essere attivate richiedono la stimolazione del TCR, ma una volta messe in azione la soppressione può probabilmente avvenire anche in modo non-antigene specifico e a carico di cellule cosiddette "spettatrici" (110).

Le T-reg sono anergiche in vitro, ovvero non proliferano e non producono citochine in risposta agli stimoli convenzionali, e mostrano una spiccata tendenza all'apoptosi (111). Numerosi studi hanno cercato di chiarire i meccanismi molecolari alla base della funzione regolatoria di queste cellule, ma i dati a disposizione non hanno ancora completamente chiarito il quadro. Quanto sembra essere assodato, almeno stando agli esperimenti effettuati in vitro, è la necessità da parte delle T-reg di un contatto diretto con la cellula bersaglio per poter espletare completamente la loro attività soppressiva, ridimensionando il ruolo dei fattori solubili (112,113). Le ipotesi sui meccanismi d'azione con cui le T-reg inibiscono proliferazione e funzione delle cellule bersaglio sono numerose: potrebbero competere direttamente per ligandi co-stimolatori sulle cellule presentanti l'antigene (APC) (108), sottrarre fattori di crescita essenziali come l'interleuchina-2 che si legherebbe preferenzialmente alle T-reg, più ricche di recettori per questa citochina (109,114), trasmettere direttamente segnali inibitori ancora non bene identificati o ancora inibire l'azione delle APC, stimolando la produzione di metaboliti immunosoppressivi (115) o perturbandone la capacità di presentare l'antigene. Dati più recenti sembrano sottolineare l'importanza di due molecole di membrana (CTLA-4 e LAG-3) per la funzione inibitoria delle T-reg, ma sono necessari ulteriori lavori a conferma di queste ipotesi (116,102). Data la relativa esiguità numerica delle T-reg, è verosimile che in vivo vengano utilizzati meccanismi capaci di amplificare la loro azione soppressiva, sia tramite l'alterazione delle APC che, come recentemente ipotizzato, tramite il transitorio conferimento di capacità regolatorie a cellule che ne erano prive, fenomeno questo denominato "tolleranza contagiosa" (117). Secondo dati di recente acquisizione le T-reg sarebbero anche in grado di secernere granzyme A ed uccidere i linfociti CD4+ e CD8+ in modo perforina-dipendente (Figura 1).

### *T-reg e malattia epatica da HCV*

Negli ultimi dieci anni sono stati condotti numerosi studi allo scopo di chiarire l'effettivo ruolo delle cellule T-regolatorie nell'infezione da HCV, che appare complesso e per certi aspetti controverso (118-121), da un lato dannoso poiché potrebbe favorire la cronicizzazione dell'infezione, ma dall'altro positivo poiché limiterebbe il danno epatico immuno-mediato.

Pressoché tutti gli studi (113,122-126) concordano nel descrivere un'aumentata frequenza di cellule T con fenotipo e funzioni regolatorie nel sangue periferico e nel fegato dei soggetti con infezione cronica da HCV rispetto ai soggetti sani e a quelli guariti dall'infezione (spontaneamente o dopo terapia antivirale), suggerendo che i T-reg contribuiscano alla persistenza dell'infezione stessa.

Gli studi condotti su soggetti con infezione da HCV in fase acuta, di difficile identificazione visto il frequente decorso asintomatico della stessa, sono poco numerosi e forniscono risultati contrastanti. Smyk-Pearson e collaboratori (127) hanno descritto un'aumentata espressione di FOXP3 e una più elevata soppressione delle cellule T effettrici da parte dei T-reg nei pazienti con infezione acuta da HCV rispetto ai controlli sani, ma senza differenze in questa fase tra i pazienti che in futuro avrebbero sviluppato un'infezione persistente e quelli che sarebbero andati incontro a risoluzione spontanea; a distanza di sei mesi la clearance virale era associata ad una riduzione dell'attività soppressiva dei T-reg, cosa che non avveniva nei pazienti con infezione cronicizzata. Perrella et al. hanno invece riportato un aumento significativo in frequenza ed attività soppressiva dei T-reg nella fase acuta dell'infezione da HCV rispetto ai controlli sani nei pazienti che a sei mesi dalla diagnosi avrebbero mostrato persistenza dell'infezione e non in quelli che sei mesi dopo avrebbero eliminato il virus, suggerendo quindi che un'elevata frequenza di T-reg all'esordio dell'infezione possa predirne la cronicizzazione (128).

La popolazione di T-reg circolante in corso di infezione cronica da HCV appare eterogenea includendo sia cellule di origine timica che linfociti a conversione periferica. Ci sono chiare evidenze che i T-reg in corso di infezione da HCV possano essere virus-specifici (122-124,126), in particolare da studi in vitro è emerso come uno stimolo con antigeni di origine virale determini l'espansione di cellule regolatorie HCV-specifiche, analogamente a quanto avviene per quelle ad azione citotossica. Vari studi hanno analizzato anche l'attività delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nei pazienti con epatite cronica da HCV, con risultati contrastanti in termini di capacità soppressiva delle cellule bersaglio: secondo alcuni la funzione regolatoria in questi soggetti non differisce significativamente da quella di

controlli sani o pazienti guariti mentre altri autori riportano un significativo incremento dell'attività soppressoria (113,123). In particolare, Boettler et al. (113) hanno dimostrato mediante studi di deplezione in vitro e co-culture che le cellule T CD4+CD25+ inibiscono la proliferazione dei linfociti T CD8+ HCV-specifici e la produzione di IFN $\gamma$  da parte di questi ultimi. La soppressione, dose-dipendente e determinata dal contatto cellula-cellula indipendentemente dalle citochine inibitorie IL-10 e TGF $\beta$ , è più efficace nei pazienti con infezione cronica rispetto a quelli guariti o ai controlli sani. Inoltre, lo stesso studio ha evidenziato che l'azione soppressiva dei T-reg nei pazienti cronicamente infetti da HCV non è rivolta solo verso i linfociti T CD8+ HCV-specifici, ma anche verso i CD8+ specifici per il virus dell'influenza. Questi risultati suggeriscono che l'infezione cronica da HCV possa determinare un'espansione di cellule T-reg CD4+CD25+ in grado di sopprimere le risposte delle cellule T CD8+ anche verso antigeni diversi dal ligando per cui sono state selezionate. Questa possibilità è supportata anche da studi su modelli in vitro che mostrano come i T-reg richiedano di essere attivati mediante il loro TCR per esercitare l'azione soppressiva, ma che possano poi svolgere la loro funzione in modo non specifico (110). Alcuni studi recenti hanno inoltre dimostrato che, tra i pazienti con infezione cronica da HCV, l'attività soppressiva esercitata dai T-reg appare maggiore nei pazienti con transaminasi persistentemente normali rispetto a quelli con transaminasi elevate (129,130). Questo dato supporta l'ipotesi di un possibile ruolo protettivo dei T-reg nei confronti del danno epatico immuno-mediato in corso di infezione da HCV, e suggerisce che i pazienti HCV-positivi con transaminasi persistentemente normali siano caratterizzati da una predominanza della risposta immune a carattere regolatorio.

Nel complesso quindi la dinamica della popolazione T-reg durante l'infezione da HCV sarebbe caratterizzata da un'espansione durante la fase acuta dell'infezione (128) che si mantiene nell'infezione cronicizzata (113,122-126) per poi ridursi, tornando paragonabile ai controlli sani, dopo guarigione spontanea o indotta dalla terapia (113).

Mancano ad oggi dati chiari sull'eventuale ruolo svolto dai T-reg nella progressione di malattia nei pazienti affetti da epatite cronica HCV-relata. Uno studio condotto in oriente su pazienti con epatite cronica HBV-relata ha evidenziato un aumento della percentuale di linfociti T CD4+CD25+ nel sangue periferico dei pazienti con epatite B cronica severa (definita come storia di epatopatia HBV-relata presente da più di 6 mesi, con bilirubina>10X e PT<40%) rispetto a quelli con epatite cronica senza questi criteri di severità, ai controlli sani e ai pazienti con epatite acuta, suggerendo che i T-reg possano influenzare anche la progressione dell'epatopatia e quindi la sua prognosi (131). Non è

noto se tali considerazioni siano applicabili anche al contesto dell'epatopatia da HCV, anche se uno studio recentemente condotto da Delhem et al (132), riportando una maggiore presenza di cellule regolatorie Tr1 nelle biopsie epatiche di pazienti con fibrosi epatica più severa e in quelli con HCC rispetto a coloro affetti da epatite cronica non evoluta, supporta indirettamente questa ipotesi.

Inoltre, si sta studiando il ruolo delle T-reg nell'epatocarcinoma (HCC), alla ricerca di eventuali nuovi approcci terapeutici in considerazione dei ridottissimi effetti ottenuti fino ad oggi con differenti regimi chemioterapici.

Nelle neoplasie, il sistema immunitario sviluppa una risposta immune tumore-specifica, che però tipicamente non è in grado di controllare la crescita e la diffusione delle cellule maligne; evidenze in aumento indicano che l'effetto soppressivo dei T-reg è almeno in parte responsabile del fallimento nell'eliminazione immuno-mediata delle cellule tumorali (87,88). Una più approfondita conoscenza di tali meccanismi appare necessaria per poter progettare futuri approcci di tipo immunoterapico al trattamento delle neoplasie (133). Modelli sperimentali hanno mostrato infatti che la rimozione delle cellule T CD25+ cambia la risposta immunitaria ai tumori sia in vitro che in vivo, potendo stimolare un'efficace risposta immune antitumorale (134-136). Vari gruppi hanno riportato un aumentato numero di cellule T CD4+CD25+ nel sangue periferico di pazienti affetti da svariate neoplasie (137-139) e alcuni studi hanno anche descritto un'elevata percentuale di linfociti T CD4+CD25+ tra i linfociti infiltranti il tumore (TILs) in pazienti con neoplasia polmonare, ovarica, mammaria e pancreaticata (139-142). In particolare, Woo et al. (140) hanno riportato che i linfociti T CD4+CD25+ sono presenti in numero elevato nei TILs di pazienti con cancro del polmone, e che tali cellule una volta isolate dal tumore sono in grado di inibire potentemente la proliferazione dei linfociti T autologhi del sangue periferico, ma non quella di linfociti T allogenici, suggerendo che i T-reg presenti nel tumore inibiscono selettivamente la risposta immune dell'ospite, contribuendo quindi alla progressione del cancro. Analogamente, Chackraborty et al. (142) hanno documentato come, in vitro, cellule T CD4+ derivate dai linfociti del sangue periferico e dai linfonodi coinvolti dalla neoplasia di pazienti affetti da melanoma, stimulate dalle cellule di melanoma autologhe, inibiscono selettivamente l'induzione di una risposta immunitaria citotossica verso le cellule di melanoma stesse. Ciò suggerisce l'esistenza di un'attivazione delle cellule T regolatorie indotta da antigeni tumorali che ostacola la risposta immune citotossica verso le cellule tumorali stesse.

Per quanto concerne specificatamente l'epatocarcinoma, alcuni studi hanno documentato un aumento dei T-reg nel sangue periferico dei pazienti affetti (138,143). In particolare, Ormandy et al. (143) hanno riportato un loro incremento rispetto sia ai controlli sani che ai pazienti con epatopatia cronica HCV e HBV relata ma senza HCC. La frequenza dei T-reg è risultata elevata anche nel liquido ascitico dei pazienti con HCC e tra i linfociti infiltranti la neoplasia, suggerendo quindi che queste cellule possano sopprimere l'attivazione immunitaria nel sito tumorale. Unitt et al. (144) hanno dimostrato che nei pazienti con HCC la percentuale di linfociti T CD4+CD25+ tra i TILs era superiore rispetto a quella degli stessi tra i linfociti intraepatici del tessuto epatico distante dal tumore. Yang et al. (145) hanno analizzato il numero di T-reg nel fegato di pazienti con HCC, studiando sia le aree di fegato coinvolte dalla neoplasia sia quelle libere dal tumore confrontandoli con lo stesso dato ottenuto sul tessuto epatico di pazienti con epatite cronica o cirrosi ma senza HCC e con controlli sani (donatori di fegato per trapianti da vivente). Lo studio ha documentato un significativo aumento dei T-reg nelle regioni peri-tumorali rispetto a quelle non coinvolte dalla neoplasia nei pazienti con HCC, e anche rispetto a pazienti con epatite cronica o cirrosi ma senza HCC, nonché ai controlli sani. Questo risultato suggerisce che le T-reg, probabilmente attivate da antigeni tumorali (146), inibiscono l'attivazione dei linfociti T CD8+ che divengono incapaci di esercitare la propria azione citotossica, come supportato dal riscontro di una forte correlazione inversa tra il numero di cellule T CD8+ e CD4+CD25+ nelle regioni marginali dell'HCC. Più di recente, due lavori cinesi (147, 148) hanno documentato nei pazienti con HCC un aumento di T-reg circolanti che si accumulano anche nel sito tumorale dove sopprimono l'attivazione dei linfociti T CD4+CD25- e CD8 associandosi ad una prognosi peggiore.

Infine, un recente campo di ricerca per le cellule regolatorie nell'ambito della malattia epatica da HCV è rappresentato dai pazienti sottoposti a trapianto di fegato per epatopatia terminale e/o epatocarcinoma. Questi pazienti sperimentano invariabilmente la reinfezione dell'organo trapiantato (51) con una progressione di fibrosi nettamente accelerata rispetto ai soggetti immunocompetenti (52). La recidiva dell'infezione deve essere attentamente discriminata dal rigetto acuto poiché le terapie delle due evenienze sono antitetiche e potenzialmente pericolose in caso di errata diagnosi. Purtroppo la sovrapposizione di rigetto acuto ed epatite virale da reinfezione del graft non è infrequente e la corretta interpretazione del quadro è resa più difficile da caratteristiche istologiche che spesso si sovrappongono (55). Inoltre la terapia immunosoppressiva volta ad evitare il rigetto

dell'organo trapiantato è gravata da numerosi effetti collaterali, soprattutto nel caso di utilizzo come immunosoppressori principali di farmaci appartenenti alla classe degli inibitori della calcineurina (CNI), oltre a poter favorire la progressione dell'infezione da HCV e lo sviluppo di neoplasie de novo. Per questi motivi la ricerca di molecole e dosaggi ideali per ogni singolo paziente nelle diverse fasi successive al trapianto costituisce una sfida estremamente attuale allo scopo di poter fornire al soggetto trapiantato una terapia "su misura". I fattori che determinano rigetto o tolleranza del graft non sono ancora completamente compresi, ed il contributo relativo di cellule naive, effettrici e di memoria non delineato. E' stato dimostrato sperimentalmente che la tolleranza nei confronti del fegato trapiantato non è dovuta ad ignoranza antigenica ma piuttosto ad un processo attivo che coinvolge attivazione, proliferazione ed infiltrazione delle cellule T nell'organo (149) (Figura 2). Per spiegare la possibilità, del tutto eccezionale, del fegato trapiantato di indurre tolleranza donatore-specifica sono stati ipotizzati diversi fattori, sulla base di modelli sperimentali in vitro e su animali, tra cui il rilascio di molecole MHC di classe I solubili da parte del donatore che andrebbero ad interagire con anticorpi, linfociti T o cellule presentanti l'antigene del ricevente (150-154); la presenza nel fegato trapiantato di un pool di cellule ematopoietiche del donatore che concorrerebbero a formare una sorta di microchimerismo permanente che antagonizzerebbe i linfociti T alloreattivi del ricevente (155,156) e che potrebbe anche dare origine a cellule dendritiche tolerogeniche piuttosto che immunogeniche (157,158) e l'azione diretta degli epatociti che, fungendo da cellule presentanti l'antigene in modo anomalo, determinerebbero lo sviluppo di linfociti citotossici "incompetenti" destinati alla morte cellulare (159). Più recentemente, diversi studi hanno analizzato il ruolo delle cellule regolatorie, ed i T-reg in particolare, nello sviluppo e nel mantenimento della tolleranza del fegato trapiantato. In un modello animale di trapianto di fegato, i T-reg apparivano fondamentali per indurre tolleranza soprattutto nelle primissime fasi del trapianto, mentre il loro ruolo sembrava ridursi col tempo (160). Anche nell'uomo i T-reg sembrano importanti per il mantenimento della tolleranza, attestandosi su valori più bassi nei soggetti con episodi di rigetto acuto (161) mentre la numerosità risultava significativamente incrementata in coloro divenuti tolleranti al graft rispetto ai pazienti dipendenti dagli immuno-soppressori (162). L'utilizzo dei farmaci immuno-soppressori che, a vario livello, vanno ad interferire con il metabolismo dell'interleuchina 2 (163,164) (Figura 3), citochina fondamentale oltre che per i linfociti effettori, anche per i T-reg che esprimono ad alta intensità la catena alfa del suo recettore (CD25), contribuisce a confondere un quadro già notevolmente complesso, rendendo

ancora più ardui gli studi sulla funzione delle cellule regolatorie nel trapianto. Infatti, se da un lato alcuni dati hanno dimostrato come l'esposizione ad inibitori della calcineurina (CNI) e anticorpi anti-CD25, a differenza della rapamicina (o sirolimus), inibisce significativamente la sintesi di Foxp3 da parte delle T-reg in volontari sani (165) e pazienti trapiantati di rene e trattati con CNI mostrassero una ridotta popolazione di T-reg circolanti se paragonati a pazienti in terapia con rapamicina (166), dall'altro, in una coorte di soggetti trapiantati di polmone, coloro che non sviluppavano rigetto avevano una percentuale di T-reg circolanti superiore a controlli sani appaiati per età, nonostante l'utilizzo della ciclosporina in associazione a steroidi ed eventualmente azatioprina o micofenolato mofetil (167). Una recente review riguardante i pazienti trapiantati di rene (168) conclude che gli inibitori della calcineurina inibiscono diversi meccanismi tollerogenici del sistema immunitario, compresi i T-reg, con effetto reversibile al passaggio a rapamicina/sirolimus che ha invece effetti benefici sulla tolleranza (169). Dati meno certi riguardano invece gli anticorpi monoclonali diretti contro il CD25, come il dacluzimab e il basiliximab. Infatti questi anticorpi furono inizialmente concepiti ritenendo che il CD25 identificasse selettivamente una popolazione di cellule effettrici attivate, mentre in realtà è espresso, e con intensità anche maggiore, anche dai T-reg. Gli unici dati presenti letteratura sull'effetto degli anticorpi diretti contro il CD25 sulle cellule T regolatorie riguarda pazienti trapiantati di rene. Dati preliminari ottenuti su piccole coorti di soggetti suggerirebbero che la terapia con daclizumab o basiliximab determini una riduzione reversibile e transitoria della popolazione regolatoria a causa della modulazione in negativo del CD25, ma senza apparentemente intaccarne il potenziale funzionale (170,171) .

Nel complesso, i dati finora raccolti indicano come i T-reg possano avere un duplice ruolo nell'epatopatia cronica HCV-relata: da un lato favorire la persistenza del virus e dall'altro prevenire un eccessivo danno immuno-mediato. I loro effetti sulla progressione della malattia non appaiono definitivamente chiariti, mancando in particolare dati sulla frequenza e l'attività dei T-reg nelle fasi più avanzate dell'epatopatia. Essi possono essere ritenuti almeno in parte responsabili della mancata eliminazione delle cellule tumorali nei pazienti con epatocarcinoma ed infine giocano probabilmente un ruolo chiave nel controllare la risposta immunitaria nei soggetti sottoposti a trapianto di fegato.

Molte domande restano ancora aperte, sia per le difficoltà di studiare una popolazione di cellule per la cui identificazione non sono stati ancora definiti marcatori fenotipici ottimali,



sia per la difficile accessibilità dell'organo bersaglio che limita molti degli studi al solo sangue periferico.

## **SCOPO DELO STUDIO**

Scopo di questo studio è stato determinare l'aspetto fenotipico e funzionale dei linfociti T regolatori, valutandone le correlazioni con caratteristiche cliniche e parametri biochimici e virologici, nelle diverse fasi della malattia epatica da HCV, a partire dall'epatite cronica, passando per la cirrosi, l'epatocarcinoma e terminando con il follow-up post-trapianto di fegato.

# PAZIENTI E METODI

## Pazienti

Ottanta pazienti consecutivi (HCV, età mediana 60 anni [range 23-92], 55% maschi) con epatopatia cronica HCV-relata, non in terapia antivirale, sono stati arruolati per lo studio tra Maggio 2008 e Maggio 2009.

Quaranta soggetti sani sono stati utilizzati come controlli (CS, età mediana 42 anni [range 26-66], 60% maschi).

Da tutti i soggetti arruolati sono stati prelevati campioni di sangue periferico, previo consenso informato, per l'estrazione delle cellule T regolatorie al fine degli studi fenotipici e di funzione; tali campioni sono stati anche utilizzati per la caratterizzazione laboratoristica dei pazienti (ALT, AST, gamma-GT, bilirubina totale, INR, protidemia totale e frazionata, immunoglobuline, creatinina, crioglobulinemia e criocrito, alfabeto-proteina, viremia, genotipo); tramite i parametri laboratoristici è stato calcolato il punteggio MELD di ogni paziente.

La diagnosi di epatopatia cronica HCV-relata è stata posta sulla base della positività (nota da oltre 6 mesi) degli anticorpi anti-HCV e dell'HCV RNA; l'RNA virale è stato determinato in tutti i pazienti tramite le metodiche bDNA (quantitativa) e/o TMA (qualitativa) ed il genotipo tramite PCR.

Cause concomitanti (virali, metaboliche e autoimmuni) di epatopatia sono state escluse mediante appropriate indagini sierologiche e biochimiche; in particolare tutti i pazienti sono risultati negativi per HBsAg e per markers sierologici di infezione in atto da EBV e CMV, né vi era evidenza di abuso etilico o di concomitante malattia epatica autoimmune (score per epatite autoimmune al di sotto del livello di "possibile" per ognuno di essi, negatività degli AMA). La durata presunta dell'infezione è stata dedotta dal primo riscontro di elevazione delle transaminasi in concomitanza con marcatori di HCV o in assenza di altre cause accertabili se tale rilievo è precedente al 1989.

I pazienti sono stati suddivisi in quattro gruppi a seconda della manifestazione HCV-relata prevalente: epatite cronica (EC, n=52), carcinoma epatocellulare (HCC, n=16), malattia di fegato terminale in lista per trapianto di fegato ma senza HCC (ESLD, n=12).

La diagnosi di HCC è stata sospettata mediante esame ecografico standard e confermata da almeno una delle seguenti indagini: ecografia con mezzo di contrasto (CEUS), tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto o risonanza magnetica (RM) con mezzo di contrasto.

Il gruppo complessivo dei pazienti, indipendentemente dalle caratteristiche cliniche, è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi in base al livello delle transaminasi: HCV[n.n.] (n=29) con ALT persistentemente nella norma (testate ad almeno tre prelievi consecutivi a distanza di 3 mesi l'uno dall'altro) e HCV[alt] (n=28) con livelli di ALT  $\geq 2.5$  volte il limite superiore di normalità; i pazienti con livelli di ALT solo lievemente alterati ( $< 2.5$  volte il limite superiore di normalità) non sono stati considerati in questa parte dello studio. Dieci pazienti appartenenti ai gruppi HCC (n=6) ed ESLD (n=4) sono stati sottoposti a trapianto ortotopico di fegato e seguiti per un periodo variabile tra 2 e 36 settimane dopo l'intervento (follow up mediano 16 settimane) e sottoposti a regime immuno-soppressivo secondo due protocolli: i soggetti del braccio A hanno ricevuto:

- 2 dosi endovena di basiliximab (anticorpo monoclonale anti-CD25) da 20 mg di cui una entro 6 ore dal trapianto ed una in quarta giornata.
- metilprednisolone 1 g endovena al momento della riperfusione seguito da 50 mg x 4 in prima giornata, 40 mg x 4 in seconda giornata, 30 mg x 4 in terza giornata, 20 mg x 4 in quarta giornata, 20 mg x 2 in quinta giornata e prednisone per os 25 mg dalla sesta giornata. In seguito, le dosi sono state ridotte con lo scopo di sospendere completamente la somministrazione di steroidi entro il sesto mese
- everolimus per os alla dose iniziale di 1,5 mg die (0,75 mg ogni 12 ore). Il range ematico desiderato varia tra 3 e 8 ng/ml

I pazienti assegnati al braccio di trattamento B riceveranno basiliximab e steroidi come i soggetti del braccio A insieme a:

- tacrolimus per os ad un dosaggio iniziale di 0,075-0,1 mg/kg die. Il range ematico desiderato varia tra 10 e 15 ng/ml durante la prima settimana dopo il trapianto, per scendere successivamente a 5-10 ng/ml.

Prelievi di sangue periferico per l'analisi fenotipica linfocitaria sono stati eseguiti a 2, 4, 8, 16, 24 e 36 settimane dal trapianto. Ai primi due time point è stata eseguita la sola analisi fenotipica mentre a 24 e 36 settimane dal trapianto è stata analizzata anche la funzione delle cellule regolatorie.

Le caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti sono riportate nella Tabella 1.

## **Citofluorimetria a flusso**

Un campione di sangue intero fresco di ogni soggetto arruolato è stato sottoposto ad analisi mediante citofluorimetria a flusso a tre colori per valutare la presenza di marcatori di superficie (CD4, CD25, CD45RO, CD62L) e intracellulari (FOXP3) che caratterizzano i T-reg.

Cinquanta microlitri di sangue sono stati incubati con anticorpi anti-CD4 coniugati a ficoeritrina-cianina (antiCD4-PE-Cy7) e con anticorpi anti-CD25 coniugati a ficoeritrina (antiCD25-PE) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Successivamente, sono stati sottoposti a un lavaggio con PBS 2% FBS, trattati con “Fix and Perm” (Caltag Medsystems, Buckingham, UK) per essere fissati e permeabilizzati e infine incubati con anti-FOXP3 coniugato con isotiocianato di fluorescina (FITC) (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA). Le cellule sono state infine risospese in PBS 2% FBS (siero fetale bovino) per essere immediatamente analizzate in citometria a flusso.

In alcuni campioni è stata effettuata anche la triplice marcatura di superficie con antiCD4-PE-Cy7, antiCD25-PE e anti-CD45RO coniugato con FITC oppure con antiCD4-PE-Cy7, antiCD25-FITC e anticorpi anti-CD62L coniugati con PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), al fine di valutare la co-espressione di marcatori cellulari accessori dei T-reg; anche tali cellule sono state risospese in PBS 2% FBS ed immediatamente analizzate al citofluorimetro.

I campioni sono stati acquisiti con un citofluorimetro FACSCanto II (Becton-Dickinson) ed analizzate col software FACSDiva.

Per ogni campione sono stati analizzati in media 25000 linfociti, caratterizzati come tali sulla base di parametri fisici (dimensione e granulosità cellulare). Sono successivamente state valutate: la percentuale di cellule esprimenti CD4+CD25+ ed in particolare quante con CD25 ad alta intensità (CD4+CD25<sup>hi</sup>); l'espressione percentuale di FOXP3 rispetto al totale delle cellule e rispetto a quelle CD4+CD25<sup>hi</sup> e l'intensità media di fluorescenza (MFI) del FOXP3 in queste ultime; e la percentuale di co-espressione di CD4/CD25/CD45RO o CD62L.

## **Separazione e purificazione cellulare**

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state separate a partire da 27 ml di sangue periferico raccolti in provette sterili trattate con EDTA e diluiti 1/1 con PBS 1 mM EDTA mediante centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll Histopaque, Sigma-Aldrich s.r.l., Milano, Italia).

Le cellule mononucleate sono state quindi raccolte e sottoposte a due lavaggi con PBS 1 mM EDTA; la vitalità di tali cellule, determinata tramite colorazione vitale con Tripan Blu, ha sempre superato il 99% del totale.

Le cellule T CD4+CD25+ sono state isolate dai PBMC con metodica immuno-magnetica tramite una selezione negativa per CD4 seguita da una selezione positiva per CD25 (Dynabeads Regulatory CD4+CD25+ T cell kit, Dynal Invitrogen, Oslo, Norvegia e CD4+CD25+ Regulatory T cell isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germania), ottenendo così due popolazioni separate: CD4+CD25+ e CD4+CD25-. I linfociti T CD4+CD25- sono stati usati come bersaglio dei T-reg CD4+CD25+ negli esperimenti di proliferazione.

La purezza delle due sottopopolazioni cellulari, verificata tramite citofluorimetria usando anticorpi anti-CD4 coniugati a PE-Cy7 e anti-CD25 coniugati con PE, superava il 95% per i T-reg CD4+CD25+ (Figura 4) e il 92% per i linfociti CD4+CD25-.

Le cellule T CD4+CD25+ così ottenute risultavano localizzate nella finestra dei CD4+CD25<sup>hi</sup> ad un'analisi mediante sorting cellulare (FACSaria cell sorting system, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), a conferma della loro effettiva caratterizzazione come T-reg.

## Studi di funzione

Una volta purificate, le cellule T CD4+CD25- sono state seminate in piastre di 96 pozzetti in numero di  $5 \times 10^5$ /pozzetto in un terreno di coltura standard per le cellule linfatiche (RPMI 1640 con aggiunta di L-glutamina 2mM, 100 U/ml di penicillina, 0.1 mg/ml di streptomicina, 2.5 µg/ml di amfotericina B e 10 % di FBS inattivato), a 37°C di temperatura e 5% di CO<sub>2</sub>, in presenza di un T cell expander in grado di preservare l'originale funzione delle cellule T (CD3/CD28 Dynabeads, Dynal Invitrogen, Oslo, Norvegia) ed IL-2 ricombinante (Chiron) ad una concentrazione di 30U/ml. In alcuni pozzetti sono state aggiunte cellule T CD4+CD25+ autologhe in rapporto di 1:4. E' stato scelto il rapporto di 1:4 poiché in esperimenti preliminari si è dimostrato quello più adatto a far sì che si venga esercitata, da parte delle cellule CD4+CD25+, una funzione regolatoria rilevabile (sono stati confrontati rapporti di 1:16, 1:8, e 1:4, 1:2). Le colture sono state protratte per 5 giorni.

Tutti i test funzionali sono stati condotti in duplicato.

La proliferazione cellulare è stata testata mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando il "Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay" (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguendo le istruzioni del produttore. In breve, le cellule sono state marcate in quarta giornata con 5-etinil-2'-deossiridina (EdU), un nucleoside analogo alla timidina che viene incorporato nel DNA durante la sintesi del DNA stesso. Dopo 16 ore di incubazione, le cellule sono state raccolte, lavate e marcate con anticorpi anti-CD4 coniugati con FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Dopo la fissazione e la permeabilizzazione, l'incorporazione di EdU è stata rivelata da una reazione "click" e la percentuale di cellule in fase S determinata mediante una citofluorimetria standard. La percentuale di inibizione è stata calcolata usando la formula:  $[1 - (\text{percentuale di cellule proliferanti in presenza di cellule T CD4+CD25+} / \text{percentuale di cellule proliferanti in assenza di cellule T CD4+CD25+})] \times 100$ .

Al quinto giorno, cellule in colture parallele sono state esposte, in presenza di Brefeldina A, a forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA)/Ionomicina per stimolare la produzione di IFN- $\gamma$  e incubate per 5 ore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo un lavaggio sono state incubate con anticorpi monoclonali anti-CD4-FITC, fissate, permeabilizzate e infine marcate con anticorpi monoclonali anti-IFN- $\gamma$  coniugati con PE-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Dopo un lavaggio e risospensione in PBS 2% FBS le cellule sono state analizzate in citofluorimetria.

La produzione di IFN $\gamma$  è stata valutata sia come percentuale di cellule positive che come intensità media di fluorescenza (MFI) delle cellule positive.

## **Analisi statistiche**

I confronti di variabili continue tra i vari gruppi di pazienti sono state effettuati mediante test di Mann-Whitney o mediante t-test dove più appropriato; quelli di variabili categoriche mediante il test esatto di Fisher.

Le analisi di correlazione sono state effettuate valutando il coefficiente di correlazione di Pearson o di Spearman in base all'andamento normale o meno delle variabili analizzate.

Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato significativo.



# RISULTATI

## Caratteristiche cliniche e laboratoristiche

L'età e il sesso dei pazienti sono risultati comparabili tra i diversi sottogruppi di pazienti, eccetto che per il gruppo HCC in cui è stata rilevata una maggior frequenza di maschi. La durata presunta dell'infezione è risultata, come prevedibile, significativamente più lunga nei pazienti con malattia terminale rispetto a coloro affetti da epatite cronica.

La ALT e la gamma-GT sono risultate minori nei pazienti con malattia epatica terminale rispetto a quelli con epatite cronica, così come la viremia, mentre i genotipi virali hanno mostrato una distribuzione omogenea nei 3 gruppi di pazienti e sovrapponibile a quelle riportate in altre casistiche italiane, con netta prevalenza del genotipo 1 (oltre il 70%).

Come atteso, i livelli di bilirubina, INR e punteggio MELD sono risultati più elevati nei pazienti con HCC e cirrosi, mentre un significativo incremento di alfa-fetoproteina è stato documentato selettivamente nei pazienti con HCC (Tabella 1).

Dopo il trapianto di fegato, 9 degli 11 pazienti trapiantati (82%) hanno sviluppato una recidiva di infezione da HCV con elevata carica virale (media  $3.3 \times 10^6 \pm 2.8 \times 10^6$  UI/ml) nelle prime due settimane di follow up; 1 soggetto che era arrivato all'intervento con viremia quantitativa non dosabile si è mantenuto HCV-RNA negativo per l'intero periodo di follow up (36 settimane) ed 1 paziente è deceduto in seguito a complicanze infettive a due settimane dal trapianto. Tutti i soggetti che hanno mostrato una recidiva dell'infezione sono attualmente in trattamento antivirale combinato con interferone e ribavirina; due di questi hanno presentato una recidiva epatitica severa e progressiva documentata istologicamente.

Per quanto riguarda il regime immunosoppressivo utilizzato, 7 pazienti erano stati randomizzati nel braccio A dello studio (steroidi + basiliximab + everolimus) e 4 nel braccio B (steroidi + basiliximab + tacrolimus). In 2 soggetti del braccio A che avevano manifestato un episodio di scompenso clinico con picco di transaminasi (fra 3 e 13 volte il limite superiore della norma) tra la quarta e l'ottava settimana di follow up sono stati somministrati boli di steroide per risolvere la fase acuta ed è stato modificato il trattamento immunosoppressivo nel lungo termine, in un caso effettuando una terapia combinata con l'aggiunta di tacrolimus e in uno sostituendo everolimus con tacrolimus dopo un periodo di sovrapposizione. In 1 paziente del braccio B è stata invece effettuata la sostituzione del tacrolimus con everolimus a causa di intolleranza alla 30ma settimana senza ricadute laboratoristiche.

## Percentuale e fenotipo delle cellule T regolatorie

La percentuale di cellule T CD4+CD25+ sul totale dei PBMCs è risultata comparabile tra tutti i gruppi di pazienti tra loro e rispetto ai controlli sani, così come l'intensità media di fluorescenza (MFI) del FOXP3 nelle stesse cellule (Tabella 2).

I pazienti HCV-positivi nel loro complesso e in particolare gli HCC e ESLD, hanno mostrato una prevalenza significativamente più alta di cellule T circolanti esprimenti CD4+ ed alti livelli di CD25 (CD4+CD25<sup>hi</sup>), ossia cellule T regolatorie (T-reg), rispetto ai controlli sani (Tabella 2).

I pazienti HCV possiedono anche una maggiore percentuale di cellule T CD4+CD25<sup>hi</sup> che esprimono FOXP3 rispetto ai controlli sani, con i livelli maggiori riportati nei pazienti cirrotici. Negli stessi pazienti è stata rilevata inoltre una maggiore intensità media di fluorescenza (MFI) del FOXP3 espresso sulle cellule CD4+CD25<sup>hi</sup>; anche in questo caso i valori più elevati di MFI sono stati documentati nei pazienti con malattia epatica avanzata (Tabella 2).

Considerando i pazienti suddivisi in base ai livelli di transaminasi, i soggetti con transaminasi persistentemente nella norma hanno mostrato una percentuale di cellule CD4+CD25<sup>hi</sup>FOXP3+ maggiore rispetto sia ai controlli sani, sia coloro che mostravano una citonecrosi elevata.

L'MFI e la percentuale di positività del FOXP3 nei T-reg CD4+CD25<sup>hi</sup> sono risultate inversamente correlate ai livelli di ALT ( $R^2$  0.06;  $p=0.037$  e  $R^2$  0.06;  $p=0.036$  rispettivamente), mentre vi è una correlazione diretta ancora più netta tra gli stessi parametri e i livelli di bilirubina ( $R^2$  0.57,  $p<0.0001$  e  $R^2$  0.32,  $p<0.0001$  rispettivamente), la durata di malattia espressa in mesi ( $R^2$  0.11,  $p = 0.036$  and  $R^2$  0.35,  $p < 0.0001$ , rispettivamente) e con il punteggio MELD (Tabella 2, Figura 5).

Gli 11 pazienti che sono stati sottoposti a trapianto di fegato mostravano prima dell'intervento percentuali di T-reg ed espressione di Foxp3 superiori rispetto ai controlli sani ma sovrapponibili a quelli degli altri soggetti con malattia epatica avanzata (Tabella 3). Nelle prime settimane dopo il trapianto abbiamo assistito ad una drastica riduzione della popolazione T-reg, sia in confronto al base-line che rispetto ai controlli sani, sebbene i pochi linfociti regolatori rimasti continuassero ad esprimere Foxp3 ad elevata intensità. La percentuale di linfociti T CD4+CD25<sup>hi</sup> ha mostrato un rebound all'ottava settimana di follow-up per poi ritornare lentamente su valori sovrapponibili a quelli del pre-trapianto; l'espressione di Foxp3 ha seguito un andamento leggermente differente in quanto dopo il

picco all'ottava settimana è scesa a valori inferiori a quelli del t-zero sia come percentuale di cellule positive che come intensità di espressione (Tabella 3, Figura 6).

L'espressione di CD45RO e di CD62L non è risultata differire tra pazienti e controlli, essendo presente in circa l'85% delle cellule T CD4+CD25+ (dati non mostrati).

## Studi di funzione

La capacità delle cellule T regolatorie di sopprimere la proliferazione delle cellule target CD4+CD25- e la loro produzione di IFN $\gamma$  è stata studiata in 16 controlli sani e in 34 pazienti HCV (11 EC, 14 HCC, 9 ESLD), dei quali 15 HCV[n.n.] (media dell'ALT:  $0.7 \pm 0.2$  volte sopra il limite superiore della norma) e 11 HCV[alt] (media delle ALT:  $3.4 \pm 0.9$  volte sopra il limite superiore della norma).

Dopo 5 giorni di coltura, la percentuale di cellule target proliferanti in colture singole si è dimostrata simile tra i pazienti nel loro complesso e i controlli sani e l'aggiunta dei T-reg ha ridotto significativamente la proliferazione in modo comparabile tra le due coorti. La capacità proliferativa delle cellule bersaglio in colture singole e con i T-reg si è dimostrata sovrapponibile anche tra i controlli sani ed i pazienti in diverse fasi di malattia (EC, HCC, ESLD) e tra i sottogruppi di pazienti (Tabella 4A).

Considerando invece i pazienti suddivisi in base al livello delle transaminasi, la proliferazione delle cellule target nel gruppo HCV[n.n.] è risultata più bassa che nei controlli sani e in HCV[alt], sia quando coltivate da sole che con i T-reg, con una capacità inibitoria da parte dei T-reg significativamente più alta di quella esercitata dai controlli sani e dai pazienti con transaminasi alterate. Al contrario, le cellule bersaglio dei pazienti HCV[alt] hanno proliferato in modo più efficace che quelle estratte dai controlli sani, in entrambi i setting di colture ed i loro T-reg hanno mostrato un effetto inibitorio significativamente ridotto rispetto ai controlli (Tabella 4A, Figura 7A, Figura 8).

Rispetto ai controlli sani, le cellule bersaglio dei pazienti HCV hanno dimostrato una maggiore capacità di sintetizzare IFN- $\gamma$ , sia in colture singole che con i T-reg, con una percentuale particolarmente elevata nei pazienti con epatocarcinoma (Tabella 4B). L'aggiunta dei T-reg si è dimostrata efficace nel ridurre la produzione di IFN- $\gamma$  nei controlli sani, con un decremento del 28%, a differenza dei pazienti (considerati nel loro complesso o come singoli gruppi) in cui l'aggiunta dei T-reg non ha significativamente modificato la produzione della citochina. Solamente i pazienti con transaminasi persistentemente normali hanno mostrato un significativo decremento nella sintesi di IFN- $\gamma$  nelle colture con T-reg rispetto al basale, a differenza dei pazienti con citonecrosi elevata (Tabella 4B, Figura 7B, Figura 8).

Non sono emerse differenze statisticamente significative per quanto riguarda la MFI dell'IFN- $\gamma$  tra i pazienti e i controlli in nessun setting di coltura (dati non mostrati).

Nei pazienti HCV, i livelli di ALT si sono dimostrati correlare direttamente alla proliferazione delle cellule target e alla produzione di IFN- $\gamma$  negli esperimenti in coltura singola, e inversamente all'inibizione della proliferazione delle cellule target da parte dei T-reg (Figure 9A e 9B).

E' stata inoltre dimostrata una correlazione inversa tra la produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule target quando coltivate da sole e lo score MELD ( $R^2$  0.13,  $p=0.05$ ).

Non sono state invece rilevate correlazioni tra la percentuale di cellule CD4+CD25<sup>hi</sup>, la MFI del FOXP3 e gli effetti dei T-reg sulla proliferazione delle cellule bersaglio o sulla loro produzione di IFN- $\gamma$ .

Dopo trapianto di fegato abbiamo potuto valutare la funzione dei T-reg e delle loro cellule bersaglio in 4 pazienti a 24 settimane per 3 dei quali è disponibile anche il follow up a 36 settimane. Nonostante questi piccoli numeri, è emersa ad entrambi i time point una riduzione delle capacità proliferativa e secretiva di base da parte dei linfociti CD4+CD25- estratti dai pazienti rispetto ai controlli sani e soprattutto al t-zero, resa ancor più evidente da una marcatissima sensibilità all'azione delle T-reg (Tabella 5). Dei 4 pazienti giunti alla 24<sup>ma</sup> settimana di follow up, 3 erano in trattamento con tacrolimus ed 1 con terapia combinata tacrolimus + everolimus; dei 3 che hanno raggiunto la 36<sup>ma</sup> settimana di follow up, 1 era in trattamento con tacrolimus, 1 assumeva terapia combinata ed uno è passato da tacrolimus ad everolimus per intolleranza, senza che emergessero differenze significative a seconda del regime immuno-soppressivo utilizzato.

Esperimenti di controllo con T-reg coltivati da soli sono stati condotti alle medesime condizioni e non hanno mostrato nessuna sostanziale proliferazione o produzione di IFN- $\gamma$  da parte di questo subset cellulare (dati non mostrati).

## DISCUSSIONE

I meccanismi che portano alla cronicizzazione dell'infezione da HCV nella maggior parte dei pazienti sono noti solamente in parte ma una delle strategie sviluppate dal virus per sfuggire al controllo del sistema immunitario potrebbe coinvolgere lo sviluppo e la sopravvivenza dei linfociti a funzione regolatoria, in modo particolare i T-reg. Inoltre, i T-reg sono potenzialmente in grado di influenzare l'equilibrio fra re-infezione e tolleranza del graft dopo il trapianto di fegato per malattia epatica terminale da HCV.

L'approccio innovativo di questo lavoro è stato lo studio di numero e funzione dei T-reg analizzando i linfociti periferici di soggetti con infezione cronica da HCV in diversi stadi della malattia epatica seguendoli in follow up anche nei casi sottoposti a trapianto di fegato. Nei pazienti con epatite C valutati nel loro complesso abbiamo osservato un incremento sia della percentuale di T-reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> circolanti che della loro espressione di Foxp3, valutata come intensità media di fluorescenza rispetto ai controlli sani. Inoltre i nostri dati confermano quanto presente in letteratura riguardo l'incremento dell'attività regolatoria nei soggetti con transaminasi persistentemente normali rispetto ai soggetti con citonecrosi più elevata (129,130), osservazione che suggerisce come l'attività T regolatoria possa essere fondamentale per limitare il danno epatico immuno-mediato in corso di infezione da HCV.

Per quanto riguarda invece i diversi stadi di malattia, questo lavoro pone per la prima volta l'accento sull'incremento della percentuale dei linfociti T regolatori nei pazienti con infezione di lunga durata e malattia più avanzata, ovvero i soggetti con malattia epatica terminale e/o epatocarcinoma rispetto a coloro affetti da epatite cronica. Questo dato ricalca quanto pubblicato in una coorte cinese di pazienti con epatite cronica da HBV, nella quale una attività di malattia severa, definita come bilirubina totale oltre 10 volte il limite superiore della norma e tempo di protrombina inferiore al 40% si associava ad una maggiore percentuale di T-reg circolanti oltre che ad una più elevata intensità di fluorescenza del Foxp3 (131) ma, a differenza di quanto pubblicato per i pazienti con epatite B, dalla nostra casistica è emersa anche una correlazione diretta fra queste due variabili immunologiche e la progressione di malattia, valutata come punteggio MELD.

Questi dati potrebbero supportare l'ipotesi secondo cui un'infezione virale di lunga durata porterebbe ad un fenotipo sempre più tollerato dal sistema immunitario, evenienza che da un lato consentirebbe al virus di replicare perpetuando così l'infezione, ma dall'altro

ridurrebbe l'aggressione immuno-mediata agli epatociti infetti o semplicemente "spettatori". La ridotta carica virale riportata nei soggetti con malattia epatica avanzata rifletterebbe secondo questa ipotesi non tanto il tentativo di controllo della replicazione da parte del sistema immunitario quanto la riduzione del serbatoio replicativo costituito dagli epatociti nel fegato cirrotico.

E' noto che la popolazione T regolatoria è particolarmente ricca nei pazienti con epatocarcinoma, sia tra i linfociti circolanti (143) che nella sede della neoplasia (145). Fattori rilasciati da colture di epatociti neoplastici sono in grado di indurre e determinare l'espansione di linfociti CD4+CD25+, potenziandone anche l'attività soppressiva (146), sia direttamente che tramite l'inibizione di maturazione e differenziamento delle cellule presentanti l'antigene, in particolare le cellule dendritiche (172). Pertanto, la relativa predominanza dei T-reg nei pazienti con epatocarcinoma potrebbe contribuire alla soppressione dell'immuno-sorveglianza antitumorale favorendo così l'accrescimento e la diffusione della neoplasia.

L'osservazione che la numerosità e la funzione dei T-reg sono inversamente correlati al danno epatocitario supporta l'ipotesi che la loro azione possa limitare il danno epatico immuno-mediato, regolando non solo la risposta immune citotossica HCV-specifica verso gli epatociti infettati (39), ma anche limitando l'eliminazione delle cellule epatiche non infette dovuta agli alti livelli intraepatici di citochine infiammatorie (173-175). D'altronde, la correlazione diretta fra la percentuale di T-reg e l'espressione di Foxp3 con la durata dell'infezione e la progressione di malattia suggerisce un continuo adattamento da parte del sistema immunitario alle necessità virali ed un progressivo sviluppo di tolleranza nei confronti dello stesso agente infettivo.

Nonostante sia noto che i linfociti CD8+ specifici per HCV presentano un deficit di capacità secretiva (113) e citotossica (23,176,177) ex-vivo, nei nostri pazienti HCV, soprattutto in coloro con transaminasi persistentemente elevate, abbiamo osservato una maggiore frequenza di cellule secernenti interferone gamma tra i linfociti CD4+CD25- in colture singole. Inoltre, l'aggiunta dei T-reg non era in grado di ridurre questo eccesso di produzione di interferone gamma, soprattutto nei soggetti con citonecrosi più marcata. E' noto che il persistente danno epatocellulare è secondario all'aumentata espressione dei geni attivati dall'interferone (178), e che il topo transgenico per interferone gamma, caratterizzato da un eccesso di espressione di interferone-gamma nel fegato, è un modello

riconosciuto di epatopatia cronica (179). La riduzione del controllo da parte dei T-reg sulla produzione di interferone da parte delle cellule CD4+CD25- potrebbe spiegare la propagazione del danno infiammatorio ad epatociti circostanti e non infetti. I T-reg dei pazienti HCV positivi sono complessivamente efficaci nell'inibire la proliferazione delle cellule bersaglio ma non altrettanto nel controllare la produzione di interferone: gli unici soggetti con T-reg attivi al pari dei controlli sani nel ridurre la produzione citochinica infiammatoria sono quelli con transaminasi persistentemente nella norma, ad avvalorare ulteriormente il ruolo dell'interferone nel sostenere il danno epatico immuno-mediato. Ciononostante, la produzione di maggiori livelli di IFN- $\gamma$  non sembra utile nei pazienti con infezione cronica da HCV nell'eradicare il virus. Una delle ipotesi per spiegare questo apparente paradosso risiederebbe nelle vie di trasduzione del segnale dipendenti dall' IFN- $\gamma$  stesso che, come già noto per gli interferoni di classe I (180), potrebbero non essere operative in modo efficace nei pazienti con infezione cronica da HCV.

Dopo il trapianto di fegato abbiamo assistito ad una drammatica riduzione della percentuale di T-reg circolanti, verosimilmente attribuibile all'utilizzo del basiliximab, cosa già ipotizzata in soggetti trapiantati di rene (171). Tale diminuzione percentuale si è protratta per quattro settimane, per poi assestarsi su livelli sovrapponibili a quelli del pre-trapianto, fatta eccezione per l'espressione del FOXP3 che è rimasta deficitaria. Ciononostante, la funzione regolatoria dei T-reg è apparsa totalmente ripristinata, se non incrementata, a 24 e 36 settimane dal trapianto sia in termini di inibizione della proliferazione che della produzione di interferone da parte delle cellule bersaglio. D'altro canto, la reinfezione immediata del graft con alta viremia che hanno sperimentato tutti i soggetti giunti viremici al trapianto fa ipotizzare che l'utilizzo del basiliximab, inibendo oltre ai T-reg anche la risposta T cellulare effettrice, da un lato riduca efficacemente il rischio di rigetto acuto (evento che solamente due dei pazienti hanno sperimentato, in forma lieve e senza la perdita del graft) ma dall'altro possa favorire una rapida espansione della carica virale con massiva colonizzazione dell'organo trapiantato. La reinfezione da HCV si verifica in questi pazienti molto precocemente in concomitanza con il nadir della cinetica delle cellule regolatorie, e quindi in presenza di una risposta immune verso il virus che, sebbene deficitaria a causa della terapia immunosoppressiva, è nel complesso meno sottoposta a meccanismi di controllo. Questa potrebbe essere una delle spiegazioni dei 2 casi di epatite precoce da HCV, severa e progressiva verificatasi nella nostra coorte.



Concludendo, da questo lavoro emergono dati a supporto di un ruolo complesso delle cellule T regolatorie in corso di epatopatia cronica HCV-relata, favorenti da un lato la persistenza dell'infezione (con possibile evoluzione a malattia epatica terminale ed epatocarcinoma) e verosimilmente la sua ricomparsa dopo trapianto, ma dall'altro proteggendo l'ospite da una risposta infiammatoria eccessiva e sostanzialmente poco efficace nell'eradicazione virale.

Una migliore conoscenza della funzione dei T-reg e della loro integrazione con altre popolazioni regolatorie, nonché una più approfondita comprensione dei meccanismi che determinano l'interazione virus-ospite potranno aprire la strada ad interventi di immunomodulazione nella gestione della patologia epatica da HCV.

TABELLA 1: caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei soggetti arruolati.

	HCV (n = 80)	EC (n = 52)	HCC (n = 16)	ESLD (n = 12)
Età (anni)*	60 (23-92)	61 (23-92)	59 (46-70)	60 (43-72)
Sesso (M/F)	46/34	23/29	15/1 <sup>1</sup>	7/5
Infezione (mesi)	200 ± 147	159 ± 104	305 ± 192	384 ± 165 <sup>1</sup>
AST (x u.n.l.)	2.0 ± 1.2	1.9 ± 1.2	2.3 ± 1.4	2.0 ± 0.8
ALT (x u.n.l.)	2.0 ± 1.5	2.3 ± 1.6	2.0 ± 1.6	1.0 ± 0.5 <sup>2,3</sup>
Gamma-GT (U/l)	56.9 ± 54.1	53.7 ± 45.7	89.2 ± 76.3	26.4 ± 19.9 <sup>1,4</sup>
Viremia (x 10 <sup>3</sup> UI)*	360 (7-7692)	613 (24-7692)	272 (67-1388)	270 (7-2017) <sup>1</sup>
Genotipo (%)				
1	73	70	76	82
2	16	20	8	9
3	8	10	8	0
4	2	0	8	9
Bilirubina (mg/dl)*	1.1 (0.3-55.1)	0.6 (0.3-6.1)	1.7 (0.6-55.1) <sup>2</sup>	6.4 (1.2-37.0) <sup>2,4</sup>
INR	1.38 ± 0.55	1.10 ± 0.12	1.47 ± 0.39 <sup>1</sup>	2.20 ± 0.76 <sup>2,4</sup>
Proteine totali (g/dl)	7.4 ± 0.9	7.7 ± 0.6	7.3 ± 1.2	6.9 ± 0.9
Gamma-globuline (g/dl)	1.7 ± 0.7	1.5 ± 0.5	2.2 ± 0.9	2.0 ± 1.0
Alfafeto (ng/ml)*	10 (1-60)	7 (2-41)	23 (4-59) <sup>1</sup>	2 (1-9) <sup>4</sup>
Punteggio MELD	13 ± 8	8 ± 2	15 ± 7 <sup>2</sup>	23 ± 7 <sup>2,4</sup>

I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

\* mediana con range fra parentesi

<sup>1</sup> p < 0.01 vs EC

<sup>2</sup> p < 0.001 vs EC

<sup>3</sup> p < 0.05 vs HCC

<sup>4</sup> p < 0.01 vs HCC

TABELLA 2: Analisi fenotipica dei linfociti su sangue periferico.

	CD4+CD25+ % PBMC	Foxp3+CD4+CD25 <sup>hi</sup> ‰ PBMC	CD4+CD25 <sup>hi</sup> Foxp3 MFI
CS (n = 40)	14.0 ± 6.1	0.9 ± 0.8	2730 ± 671
HCV (n = 80)	14.9 ± 6.4	2.5 ± 3.0 <sup>1■○</sup>	3286 ± 1459 <sup>3■○</sup>
EC (n = 52)	14.8 ± 6.2	1.4 ± 1.5 <sup>2</sup>	3017 ± 1368
HCC (n = 16)	17.2 ± 7.6	3.2 ± 2.9 <sup>3,4</sup>	3602 ± 1802
ESLD (n = 12)	12.0 ± 4.7	6.0 ± 5.1 <sup>3,4</sup>	4063 ± 1118 <sup>1,4</sup>
HCV [n.n] (n = 28)	13.9 ± 5.4	3.1 ± 4.4 <sup>3</sup>	3744 ± 1852 <sup>3</sup>
HCV [alt] (n = 29)	14.4 ± 6.7	1.4 ± 1.4 <sup>5</sup>	2876 ± 1190 <sup>5</sup>

I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

<sup>1</sup> p < 0.005 vs CS

<sup>2</sup> p = 0.04 vs CS

<sup>3</sup> p < 0.01 vs CS

<sup>4</sup> p < 0.05 vs EC

<sup>5</sup> p < 0.05 vs HCV[n.n]

■ correlazione inversa con i livelli di transaminasi: p < 0.05.

○ correlazione diretta con bilirubina, durata dell'infezione e punteggio MELD: p < 0.01.

TABELLA 3: T-reg e Foxp3 nel follow-up dopo trapianto di fegato

	CD4+CD25 <sup>hi</sup> % PBMC	Foxp3+CD4+CD25 <sup>hi</sup> ‰ PBMC	CD4+CD25 <sup>hi</sup> Foxp3 MFI
CS	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.8	2730 ± 671
t-0 (pre-OLT)	1.8 ± 1.0 <sup>2</sup>	3.8 ± 1.6 <sup>1</sup>	4343 ± 1534 <sup>1</sup>
t-2 settimane	0.3 ± 0.3 <sup>2,3</sup>	1.6 ± 1.9 <sup>2,3</sup>	3493 ± 1610
t-4 settimane	0.7 ± 1.1	1.1 ± 0.9 <sup>1,3</sup>	3963 ± 3385
t-8 settimane	3.3 ± 2.6 <sup>1,4,6</sup>	5.7 ± 4.0 <sup>1,5,6</sup>	3411 ± 1507
t-12 settimane	2.0 ± 0.4 <sup>1,4,6</sup>	1.4 ± 0.8 <sup>1,3</sup>	2360 ± 443 <sup>3</sup>
t-16 settimane	1.7 ± 1.2 <sup>2,5</sup>	2.0 ± 0.9 <sup>2,3</sup>	2515 ± 939 <sup>3</sup>
t-24 settimane	2.1 ± 1.9 <sup>1,4</sup>	1.0 ± 0.9 <sup>1,3</sup>	2009 ± 835 <sup>3</sup>
t-36 settimane	3.2 ± 0.1 <sup>1,4,6</sup>	3.0 ± 0.1 <sup>2,6</sup>	2870 ± 576

I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

<sup>1</sup> p < 0.01 vs CS

<sup>2</sup> p < 0.05 vs CS

<sup>3</sup> p < 0.05 vs t-0

<sup>4</sup> p < 0.001 vs t-2 settimane

<sup>5</sup> p < 0.05 vs t-2 settimane

<sup>6</sup> p < 0.05 vs t-4 settimane

TABELLA 4A: Studi di funzione: proliferazione delle cellule bersaglio.

	% proliferazione CD4+CD25- da sole	% proliferazione CD4+CD25- + T-reg	<i>p</i>	% inibizione proliferazione delle cellule bersaglio da parte dei T-reg
CS (n = 16)	61.0 ± 18.2	37.1 ± 16.9	<0.0001	54.0 ± 19.3
HCV (n = 34)	55.9 ± 25.9	35.6 ± 25.6	0.003	43.6 ± 30.1
EC (n = 11)	57.5 ± 22.5	35.9 ± 26.7	0.04	44.7 ± 30.9
HCC (n = 14)	51.0 ± 29.2	34.9 ± 28.0	n.s.	42.9 ± 34.0
ESLD (n = 9)	62.7 ± 26.8	36.5 ± 26.7	n.s.	46.6 ± 28.0
HCV [n.n] (n = 14)	40.9 ± 28.0 <sup>1</sup>	11.4 ± 6.7 <sup>3</sup>	0.003	71.8 ± 17.2 <sup>1</sup>
HCV [alt] (n = 10)	74.7 ± 10.0 <sup>1,2</sup>	58.3 ± 16.5 <sup>4,2</sup>	0.02	20.8 ± 17.9 <sup>4,2</sup>

TABELLA 4B: Studi di funzione: produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule bersaglio.

	% produzione di IFN- $\gamma$ CD4+CD25- da sole	% produzione di IFN- $\gamma$ CD4+CD25- +T-reg	<i>p</i>	% inibizione produzione di IFN- $\gamma$ delle cellule bersaglio da parte dei T-reg
CS (n = 13)	20.3 ± 7.4	13.8 ± 4.4	0.004	28.2 ± 9.0
HCV (n = 34)	30.2 ± 11.3 <sup>4</sup>	26.3 ± 11.6 <sup>3</sup>	n.s.	18.3 ± 21.6 <sup>1</sup>
EC (n = 11)	28.5 ± 10.3 <sup>1</sup>	19.9 ± 12.8	n.s.	31.3 ± 30.7
HCC (n = 14)	35.4 ± 12.1 <sup>4</sup>	28.3 ± 12.8 <sup>4</sup>	n.s.	21.9 ± 19.7
ESLD (n = 9)	24.0 ± 8.8 <sup>5</sup>	24.2 ± 3.8 <sup>3</sup>	n.s.	4.9 ± 7.2 <sup>3,5</sup>
HCV [n.n] (n = 14)	24.9 ± 12.7	15.6 ± 8.5	0.04	34.7 ± 26.8
HCV [alt] (n = 10)	34.6 ± 8.9 <sup>3,6</sup>	29.8 ± 8.9 <sup>3,2</sup>	n.s.	18.8 ± 17.4

I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

<sup>1</sup> p<0.05 vs HC

<sup>2</sup> p<0.001 vs HCV[n.n]

<sup>3</sup> p<0.001 vs HC

<sup>4</sup> p<0.01 vs HC

<sup>5</sup> p<0.05 vs HCC

<sup>6</sup> p<0.05 vs HCV[n.n]

TABELLA 5A: Proliferazione delle cellule bersaglio dopo trapianto di fegato.

	% proliferazione CD4+CD25- da sole	% proliferazione CD4+CD25- + T-reg	% inibizione proliferazione delle cellule bersaglio da parte dei T-regs
CS (n = 16)	61.0 ± 18.2	37.1 ± 16.9	54.0 ± 19.3
t-zero (n = 11)	57.5 ± 29.2	39.1 ± 29.7	48.2 ± 35.0
24 settimane (n = 4)	20.1 ± 22.6 <sup>1,3</sup>	1.2 ± 0.9 <sup>2</sup>	88.8 ± 6.5 <sup>2</sup>
36 settimane (n = 3)	13.6 ± 12.6 <sup>1,4</sup>	1.2 ± 1.2 <sup>2</sup>	85.6 ± 7.9 <sup>1</sup>

TABELLA 5B: Produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule bersaglio dopo trapianto di fegato.

	% produzione di IFN- $\gamma$ CD4+CD25- da sole	% produzione di IFN- $\gamma$ CD4+CD25- +T-reg	% inibizione produzione di IFN- $\gamma$ delle cellule bersaglio da parte dei T-regs
CS (n = 13)	20.3 ± 7.4	13.8 ± 4.4	28.2 ± 9.0
t-zero (n = 11)	29.7 ± 12.3	28.8 ± 11.3 <sup>2</sup>	25.9 ± 34.5
24 settimane (n = 4)	11.8 ± 11.6	5.4 ± 4.5 <sup>1,3</sup>	46.0 ± 11.7
36 settimane (n = 3)	16.0 ± 3.5 <sup>4</sup>	6.9 ± 1.3 <sup>4</sup>	52.8 ± 18.4

I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

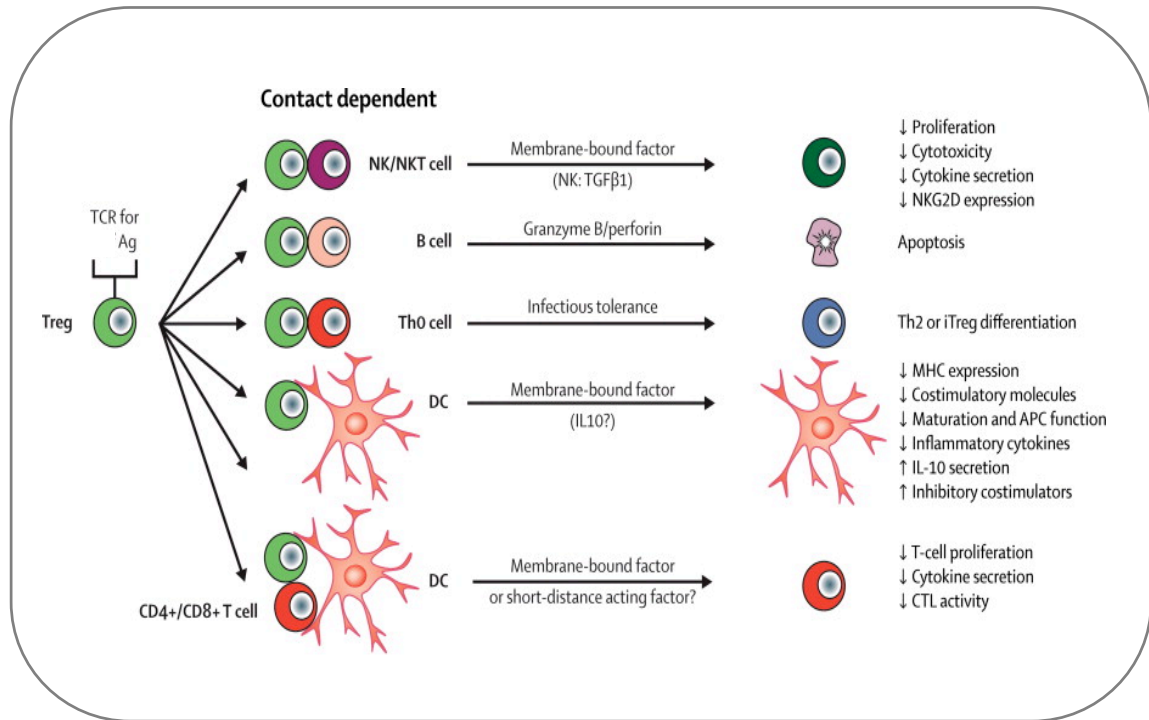
<sup>1</sup> p<0.05 vs CS

<sup>2</sup> p<0.01 vs CS

<sup>3</sup> p<0.05 vs t-zero

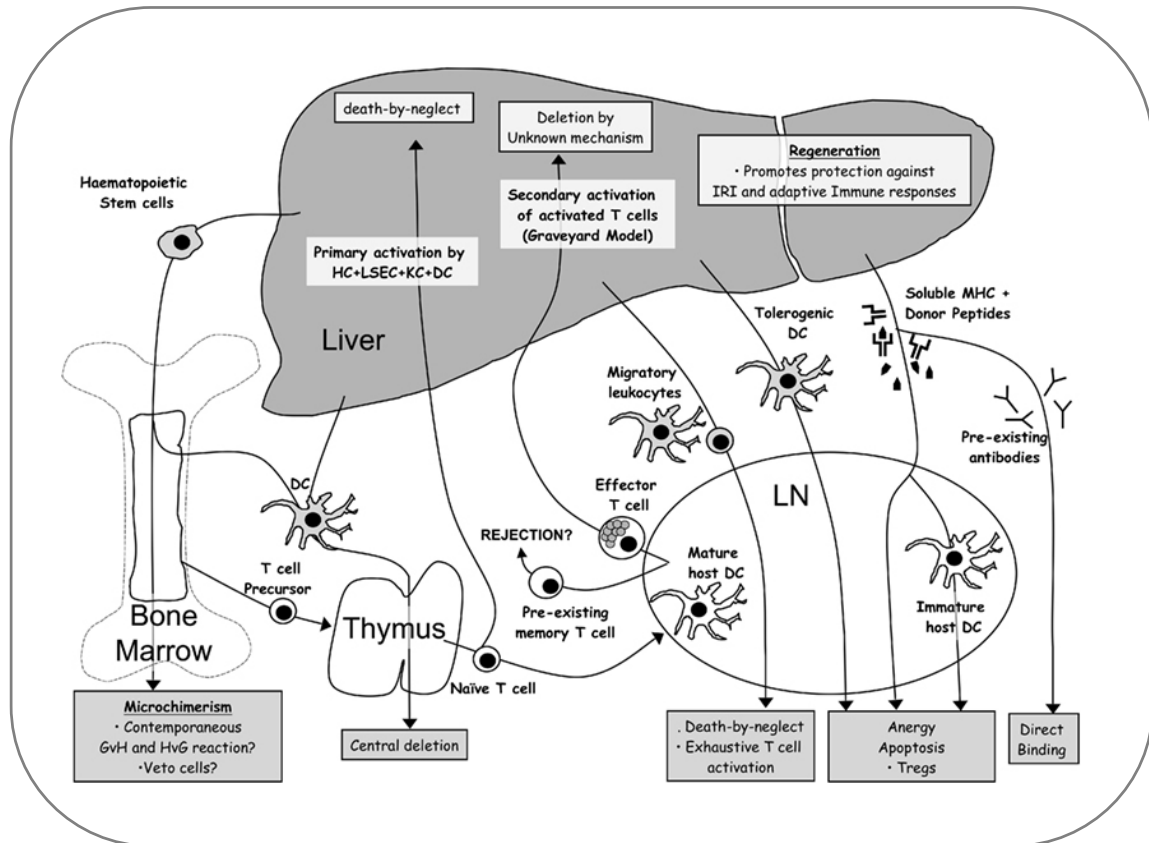
<sup>4</sup> p<0.01 vs t-zero

FIGURA 1: Meccanismi d'azione dei T-reg.



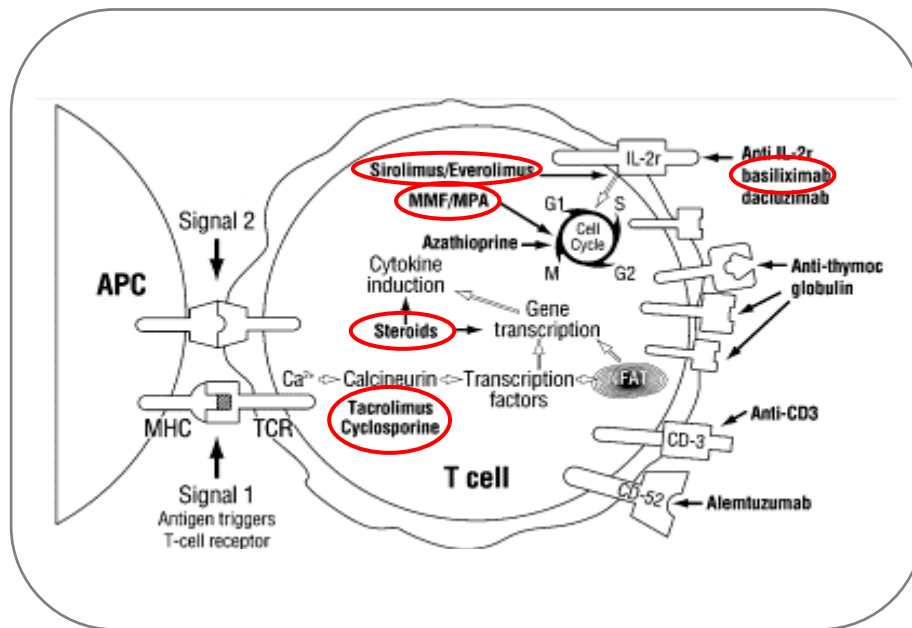
Modificato da: Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007;7:804-13 (ref n. 120).

FIGURA 2: Meccanismi alla base della tolleranza d'organo nel trapianto di fegato.



Tratto da: Benseler V, McCaughan G, Schlitt H, et al. The liver: a special case in transplantation tolerance. *Semin Liver Dis* 2007;27:194-213 (ref n. 149)

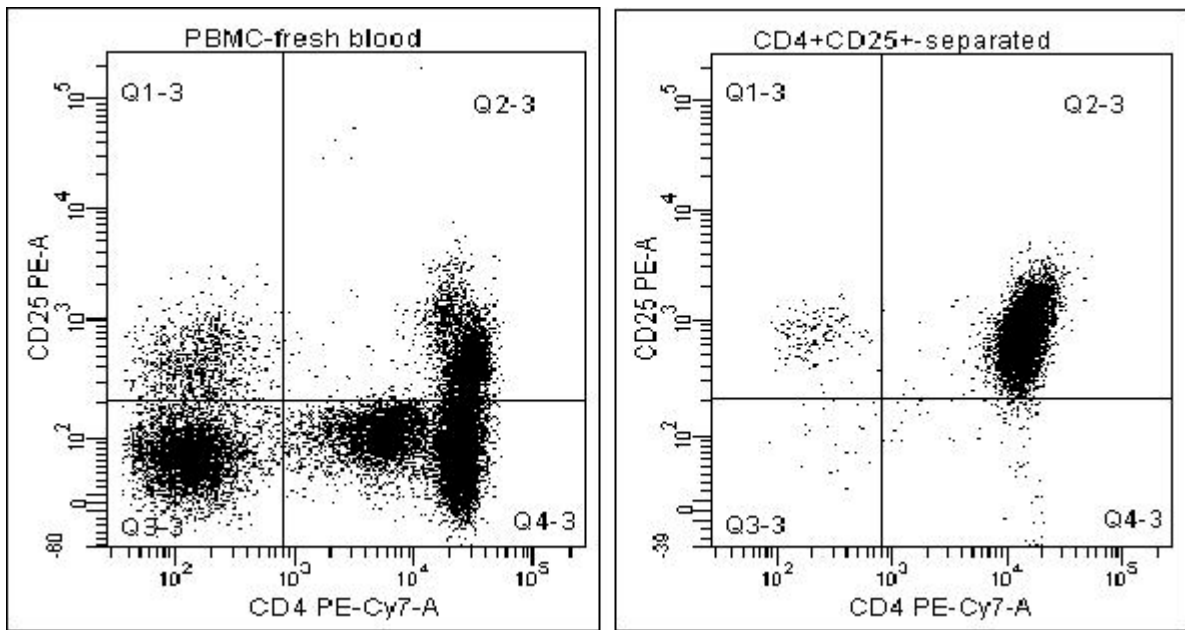
FIGURA 3 : Target cellulari dei farmaci immuno-soppressori.



Modificato da: Larsen CP, Knechtle SJ, Adams A, et al. A new look at blockade of T-cell costimulation: a therapeutic strategy for long-term maintenance immunosuppression. *Am J Transpl* 2006;6:876-83 (ref n. 164).

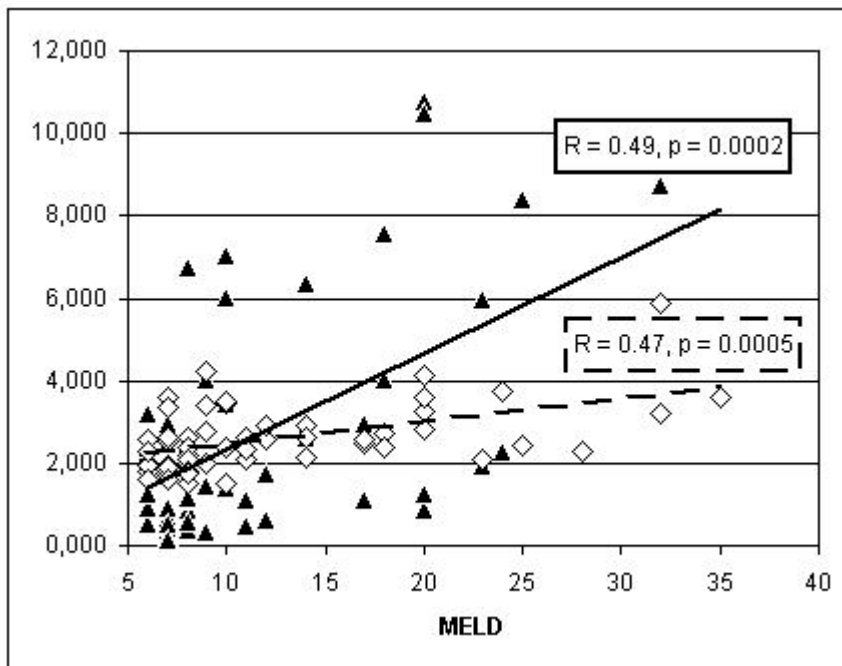


FIGURA 4: Esempio di estrazione di T-reg da cellule mononucleate del sangue periferico.



I T-reg CD4+CD25+ sono stati separati dai PBMC tramite una selezione negativa per CD4 seguita da una selezione positiva per CD25 utilizzando biglie immuno-magnetiche. La purezza della popolazione CD4+CD25+ in questo soggetto rappresentativo raggiunge il 96.8%.

FIGURA 5: Correlazione fra MELD e parametri immunologici



- ▲ ——— % CD4+CD25<sup>hi</sup>Foxp3 su PBMC
- ◇ - - - MFI del Foxp3 espresso dai T-reg (/1000)

FIGURA 6: Andamento dei parametri immunologici dopo il trapianto di fegato (11 pazienti).

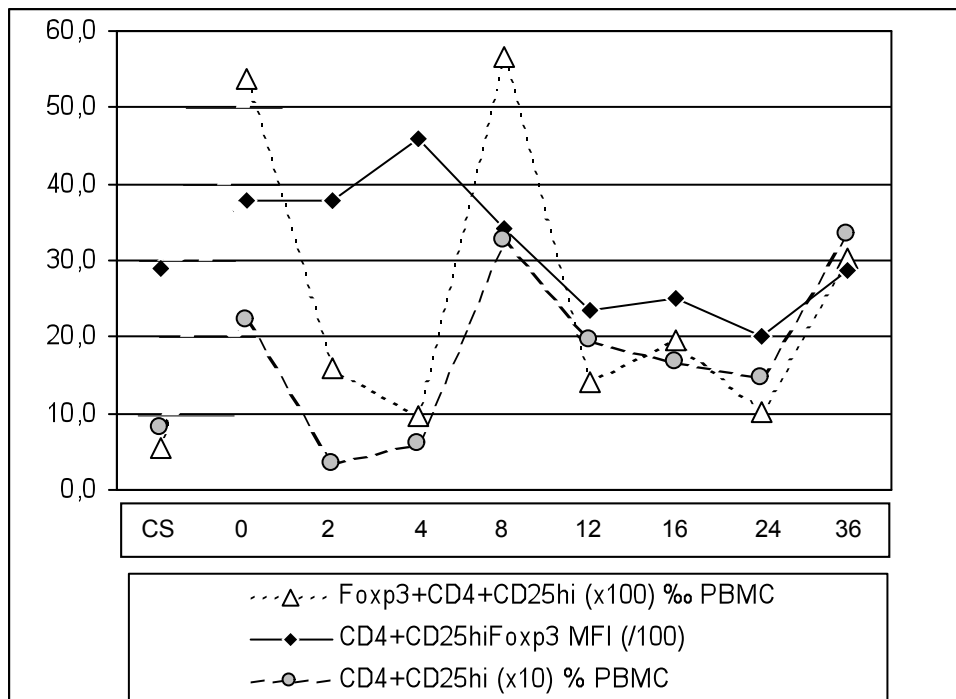
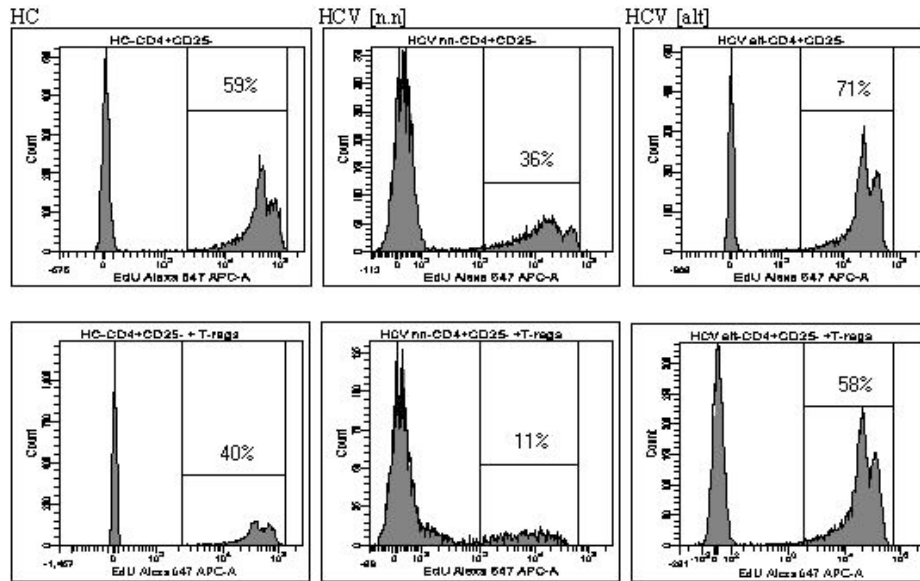
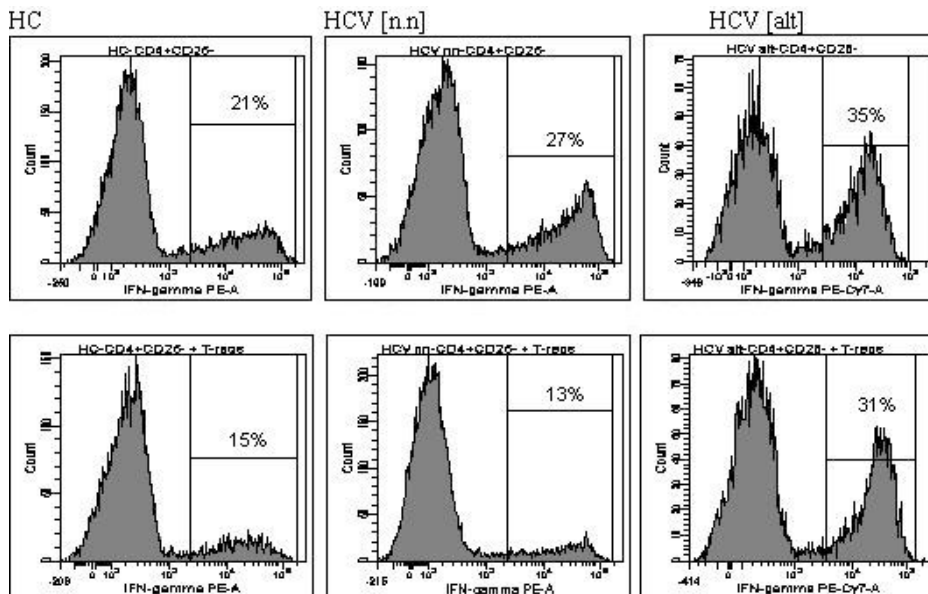


FIGURA 7A: Analisi della proliferazione delle cellule bersaglio in colture singole e insieme ai T-reg in un controllo sano, un HCV [n.n] e un HCV [alt].



La proliferazione è stata valutata dopo 5 giorni di coltura utilizzando Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay: le cellule sono state incubate per le ultime 16 ore con EdU, un nucleotide analogo alla timidina che viene incorporato nel DNA durante la sua sintesi. Dopo fissazione e permeabilizzazione, l'incorporazione di EdU è stata rilevata con una reazione click e la percentuale di cellule in fase S è stata valutata in citofluorimetria.

FIGURA 7B: Analisi della produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule bersaglio in colture singole e insieme ai T-reg in un controllo sano, un HCV [n.n] e un HCV [alt].



Al quinto giorno di coltura le cellule sono state esposte, in presenza di brefeldina A, a PMA/ionomicina e incubate per 5 ore a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>; dopo fissazione e permeabilizzazione le cellule sono state marcate con anticorpo monoclonale anti-IFN $\gamma$  coniugato con PE o PE-Cy7 e analizzate in citofluorimetria. La produzione di IFN- $\gamma$  è stata valutata come percentuale ed intensità media di fluorescenza (MFI).

FIGURA 8: Proliferazione delle cellule bersaglio e produzione di IFN- $\gamma$  in colture singole e con i T-regs (ratio 4/1) in pazienti con transaminasi normali [n.n] ed alterate [alt].

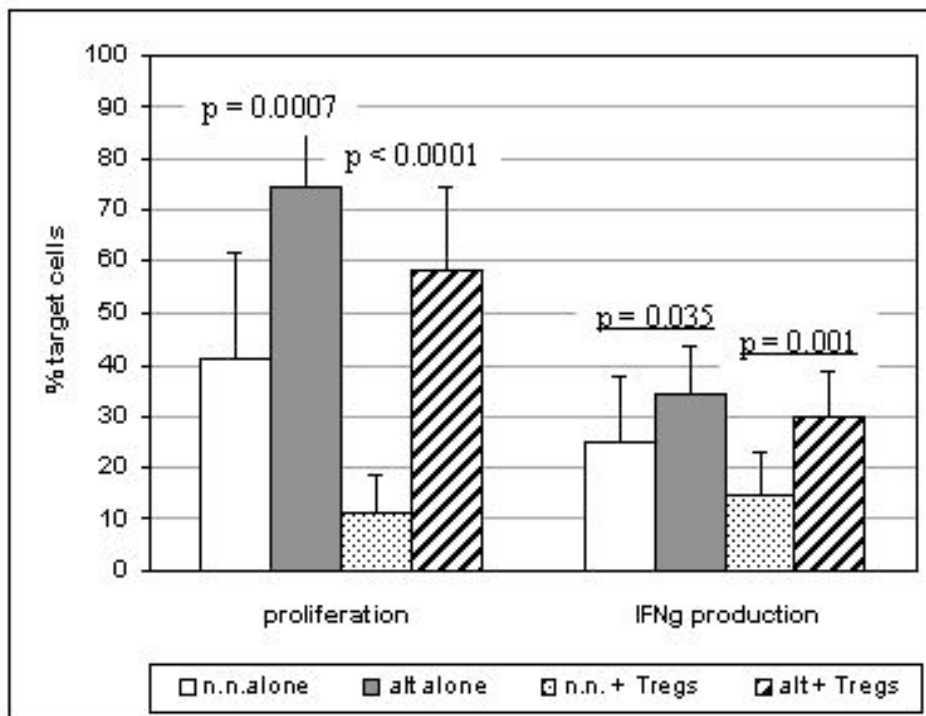
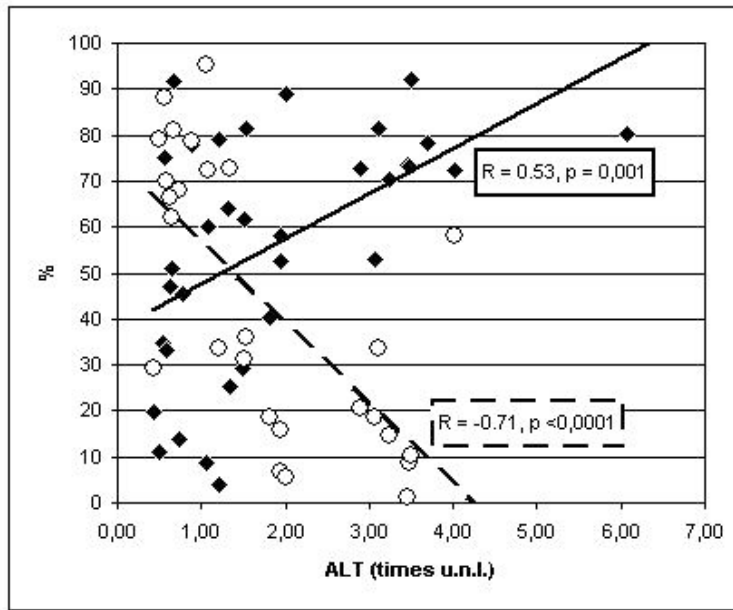
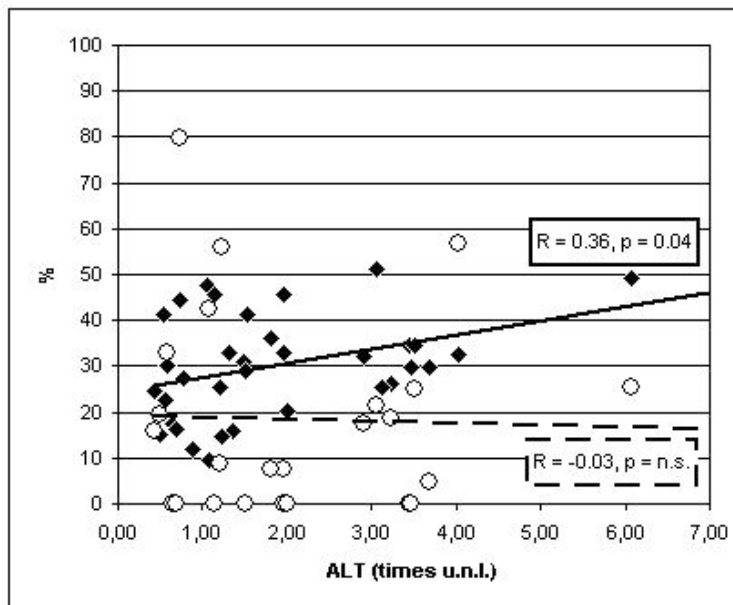


FIGURA 9A: Correlazione fra livelli di transaminasi e proliferazione delle cellule bersaglio.



- ◆ ——— % di proliferazione delle cellule bersaglio da sole.
- ⊗ - - - % di inibizione della proliferazione delle cellule bersaglio indotta dai T-reg.

FIGURA 9B: Correlazione fra i livelli di transaminasi e la produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule bersaglio.



- ◆ ——— % di produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule bersaglio da sole.
- ⊗ - - - % di inibizione della produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule bersaglio indotta dai T-reg.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335-74.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:2436-41.
3. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006;144:705-14
4. Kim WR. The burden of hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;36:S30-S34.
5. Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, et al. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos study. *Hepatology* 1994;20:1442-9.
6. Maio G, D'Argenio P, Stroffolini T, et al. Hepatitis C virus infection and alanine transaminase levels in the general population: a survey in a Southern Italian town. *J Hepatol* 2000;33:116-20.
7. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008;48:148-62.
8. Couzigou P, Richard L, Dumas F, et al. Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. *Gut* 1993;34:S59-60.
9. Sagnelli E, Gaeta GB, Felaco FM, et al. Hepatitis C virus infection in households of anti-HCV chronic carriers in Italy: a multicentre case-control study. *Infection* 1997;25:346-49.
10. Aykin N, Cevik F, Demirturk N, et al. Anti-HCV positivity in sexual partners and offspring of patient with chronic hepatitis C. *Scand J Infect Dis* 2008;40:533-37.
11. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S99-S105.
12. Terrault NA. Sex and hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2005;100:825-26.
13. Ross RS, Viazov S, Gross T, et al. Transmission of hepatitis C virus from a patient to an anaesthesiology assistant to five patients. *N Engl J Med* 2000;343:1851-4.
14. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997;337:237-40.
15. Deuffic-Burban S, Poynard T, Sulkowski MS, et al. Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States. *J Viral Hepat* 2007;14:107-15.
16. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
17. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1527-38.
18. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15:41-63.

19. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, et al. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132:296-305.
20. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998;282:103-7.
21. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, et al. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest* 1995;96:2311-21.
22. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999;10:439-49.
23. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J exp Med* 2000;191:1499-512.
24. Takaki A, Wiese M, Maertens G, et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000;6:578-82.
25. Major ME, Mihalik K, Fernandez J, et al. Long term follow up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* 1999;73:3317-25.
26. Martinot-Peignoux M, Khiri H, Leclere L, et al. Clinical performances of two real-time PCR assays and bDNA/TMA to early monitor treatment outcome in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2009;46:216-21.
27. Alter HJ, Seef LB. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17-35.
28. Thimme R, Oldach D, Chang KM, et al. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-406.
29. Lauer GM, Lucas M, Timm J, et al. Full-breadth analysis of CD8+ T-cell responses in acute hepatitis C virus infection and early therapy. *J Virol* 2005;79:12979-88.
30. Ulsenheimer A, Lucas M, Seth NP, et al. Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: ex vivo analysis of helper T-cell responses. *J Viral Hepat* 2006;13:708-14
31. Diepolder HM. New insights into the immunopathogenesis of chronic hepatitis C. *Antiviral Res* 2009;82:103-9.
32. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet* 2008;372:321-32.
33. Lawson A; Trent hepatitis C Study Group. Hepatitis C virus-infected patients with a persistently normal alanine aminotransferase: do they exist and is this really a group with mild disease? *J Viral Hepat* 2010;17:51-8.
34. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009;29 S1:74-81.

35. Fattovich G. Progression of hepatitis B and C to hepatocellular carcinoma in Western countries. *Hepatology* 1998;45 S13:1206-13.
36. Worns MA, Weinmann A, Schuchmann M, et al. Systemic therapies in hepatocellular carcinoma. *Dig Dis*. 2009;27:175-88.
37. Zhang T, Ding X, Wei D, et al. Sorafenib improves the survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials. *Anticancer Drugs* 2009 [Epub ahead of print]
38. Ferri S, Muratori L, Lenzi M, et al. HCV and autoimmunity. *Curr Pharm Des* 2008;14:1678-85.
39. Agnello V, Chung Rt, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type I cryoglobulinemia. *N Eng J Med* 1992;327:1490-5.
40. Horcajada JP, Garcia-Bengoechea M, Cilla G, et al. Mixed cryoglobulinemia in patients with chronic hepatitis C infection: prevalence, significance and relationship with different viral genotypes. *Ann Med* 1999;31:352-8.
41. Heckmann JG, Kayser C, Heuss D, et al. Neurological manifestations of chronic hepatitis C. *J Neurol* 1999;246:486-91.
42. Gisbert JP, Garcia-Buey L, Pajares JM, et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in B-cell non-Hodgkin lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2003;125:1723-32.
43. Muratori P, Muratori L, Stroffolini T, et al. Prevalence of non-organ specific autoantibodies in HCV-infected subjects in the general population. *Clin Exp Immunol* 2003;131:118-21.
44. Ferri S, Muratori L, Quarneti C, et al. Clinical features and effect of antiviral therapy in anti-liver/kidney microsomal antibody type 1 (anti-LKM1) positive chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009;50:1093-101.
45. Rodriguez-Torres M, Sulkowski MS, Chung RT, et al. Factors associated with rapid and early virologic response to peginterferon alfa-2a/ribavirin treatment in HCV genotype 1 patients representative of the general chronic hepatitis C population. *J Viral Hepat* 2010;17:139-47.
46. Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, et al. Predictors of response of US veterans to treatment for the hepatitis C virus. *Hepatology* 2007;46:37-47.
47. Mangia A, Santoro R, Minerva N, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Eng J Med* 2005;352:2609-17.
48. Weigand K, Stremmel W, Encke J. Treatment of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:1897-905.
49. Weisberg IS, Jacobson IM. Telaprevir: hope on the horizon, getting closer. *Clin Liver Dis* 2009;13:441-52.



50. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007;132:1979-98.
51. Kuo A, Terrault NA. Management of hepatitis C in liver transplant recipients. *Am J Transplant*. 2006 ;6:449-58.
52. Burton JR Jr, Rosen HR. Acute rejection in HCV-infected liver transplant recipients: The great conundrum. *Liver Transpl* 2006;12:S38-47.
53. Berenguer M, Aguilera V, Prieto M, et al. Significant improvement in the outcome of HCV-infected transplant recipients by avoiding rapid steroid tapering and potent induction immunosuppression. *J Hepatol* 2006;44:717-22.
54. Vivarelli M, Cucchetti A, Piscaglia F, et al. Analysis of risk factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: key role of immunosuppression. *Liver Transpl* 2005;11:497-503
55. Petrovic LM. Early recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:S32-7.
56. O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, et al. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1119-25.
57. Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 2003;361:1502-10.
58. Berenguer M, Royuela A, Zamora J. Immunosuppression with calcineurin inhibitors with respect to the outcome of HCV recurrence after liver transplantation: results of a meta-analysis. *Liver Transpl* 2007;13:21-9.
59. Neuhaus P, Klupp J, Langrahr JM. MTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl* 2001;6:473-84.
60. Viganò J, Gruttadauria S, Mandalà L, et al. The role of basiliximab induction therapy in adult-to-adult living-related transplantation and deceased donor liver transplantation: a comparative retrospective analysis of a single-center series. *Transpl Proc* 2008;40:1953-5.
61. Lupo L, Panzera P, Tandoi F, et al. Basiliximab versus steroids in double therapy immunosuppression in liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. *Transplantation* 2008;86:925-31.
62. Schmeding M, Sauer IM, Kiessling A, et al. Influence of basiliximab induction therapy on long term outcome after liver transplantation, a prospectively randomised trial. *Ann Transplant* 2007;12:15-21.
63. Grassi A, Quarneti C, Ravaioli M, et al. Detection of HCV antigens in liver graft: relevance to the management of recurrent post-liver transplant hepatitis C. *Liver Transpl* 2006;12:1673-81.

64. Ferrari C. T and B cells in hepatitis C virus control: what they do and when they fail. *Gastroenterology* 2007;132:801-5.
65. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10149-54.
66. Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007;25:71-99.
67. Bowen DG, Walker CN. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005;436:946-52.
68. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18: 723-37.
69. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971;21:903-14.
70. Gershon RK, Choen P, Hencin R, et al. Suppressor T cells. *J Immunol* 1972;108:586-90.
71. Gershon RK. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 1975;26:170-85.
72. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, et al. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T-cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1985;161:72-87.
73. Powrie F, Mason D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med* 1990;172:1701-8.
74. Fowell D, Mason D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med* 1993;177:627-36.
75. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptors alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
76. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42.
77. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193:1303-10.
78. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Semin Immunol* 2004;16:89-98.
79. Shevac EM, DiPaolo RA, Andersson J, et al. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006;212:60-73.

80. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting Edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001;167:1137-40.
81. Zhao DM, Thornton AM, Di Paolo RJ, et al. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006;107:3925-32.
82. Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, et al. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev* 2006;214:229-38.
83. La Cava A, Van Kaer L, Fu Dong S, et al. T-regs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* 2006;27:322-27.
84. Mahnke K, Enk AH. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T-cells? *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;293:133-50.
85. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.
86. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010;11:7-13.
87. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32.
88. Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumor immunity by CD25+ T cells. *Immunology* 2002;107:5-9.
89. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007;7:875-88.
90. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004;4:841-55.
91. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005;6:353-60.
92. Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* 2006;212:72-86.
93. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62.
94. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006;25:195-201.
95. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, et al. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2603-22.
96. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.

97. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, et al. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 2001;166:7282-89.
98. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005;6:1219-27.
99. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-10.
100. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-23.
101. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, et al. Expression of the integrin alpha E beta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13031-36.
102. Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;21:503-13.
103. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-61.
104. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:430-35.
105. Wang J, Ioan-Facsinay A, Van Der Voort EI, et al. Transient expression of FOXP3 in human activated non regulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007;37:129-38.
106. Gavin MA, Torgerson TR, Houston ER, et al. Single-cell analysis of normal and Foxp3-mutant human T cells: Foxp3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6659-64.
107. Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* 2007;37:21-3.
108. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30: 538-43.
109. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.
110. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen non specific. *J Immunol* 2000;164:183-90.
111. Takahashi T, Kuniyatsu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-80.

112. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006;176:4484-91.
113. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7860-67.
114. De La Rosa M, Rutz S, Dorninger H, et al. Interleukin-2 is essential for CD4(+)/CD25(+) regulatory cell function. *Eur J Immunol* 2004;34:2480-88.
115. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:1206-12.
116. Paust S, Lu L, McCarty N, et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;158:2025-34.
117. Stassen M, Fondel S, Bopp T, et al. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1303-11.
118. Dolganiuc A, Szabo G. T cells with regulatory activity in hepatitis C virus infection: what we know and what we don't. *J Leukoc Biol* 2008;84:614-22.
119. Billerbeck E, Bottler T, Thimme R. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:4858-64.
120. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007;7:804-13.
121. Alatrakchi N, Koziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. *J Viral Hepat* 2009;16:223-29.
122. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, et al. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1437-48.
123. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7852-59.
124. Li S, Jones KL, Woollard DJ, et al. Defining target antigens for CD25+FOXP3+INF $\gamma$ -regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:197-204.
125. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)/CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-71.
126. Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, et al. Identification and in-vitro expansion of functional antigen-specific CD25+FoxP3+ regulatory T-cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008;82:5043-53.

127. Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, et al. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2008;197:46-57.
128. Perrella A, Vitiello L, Atripaldi I, et al. Elevated CD4+/CD25+ T cell frequency and function during acute hepatitis C presage chronic evolution. *Gut* 2006;55:1370-71.
129. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006;144:188-96.
130. Itose I, Kanto T, Kakita N, et al. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *J Viral Hepat* 2009;16:844-52.
131. Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with Hepatitis B. *J Immunol* 2006;177:739-47.
132. Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, et al. Role of regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. *Bull Cancer* 2008;95:1029-38.
133. Morse MA, Clay TM, Mosca P, et al. Immunoregulatory T cells in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2002;2:827-34.
134. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor  $\alpha$ ) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999;59:3128-33.
135. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA. Concomitant tumor immunity to a poor immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004;200:771-82.
136. Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R et al. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Res* 2002;62:5267-272.
137. Wolf AM, Wolf D, Steurer M et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:606-12.
138. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. Possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003;98:1089-99.
139. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61:4766-72.
140. Woo EY, Yeh H, Chu CS et al. Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002;168:4272-76.

141. Cureil TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942-49.
142. Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M et al. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol* 1990;145:2359-64.
143. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:2457-64.
144. Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005;41:722-30.
145. Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T et al. Increase of CD4+CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006;45:254-62.
146. Cao M, Cabrera R, Xu Y, et al. Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4+CD25+ Regulatory T cells. *Lab Invest* 2007;87:582-90.
147. Zhou J, Ding T, Pan W et al. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2009;125:1640-8.
148. Fu J, Xu D, Liu Z, et al. Increased Regulatory T cells correlated with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterol* 2007;132:2328-39.
149. Benseler V, McCaughan G, Schlitt H, et al. The liver: a special case in transplantation tolerance. *Semin Liver Dis* 2007;27:194-213.
150. Bishop GA, McCaughan GW. Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: implications for immunosuppressive therapy. *Liver Transpl* 2001;7:161-72.
151. Davies HS, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulations of liver graft recipients. *Transplantation* 1989;47:524-7.
152. Geissler EK, Korzun WJ, Graeb C. Secreted donor-MHC class I antigen prolong liver allograft survival and inhibits recipient anti-donor cytotoxic T lymphocyte responses. *Transplantation* 1997;64:782-6.
153. Zavazava N, Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 1996;2:1005-10.
154. Sumimoto R, Kamada N. Specific suppression of allograft rejection by soluble class I antigen and complexes with monoclonal antibody. *Transplantation* 1990;50:678-82
155. Schlitt HJ, Kanehiro H, Raddatz G, et al. Persistence of donor lymphocytes in liver allograft recipients. *Transplantation* 1993;56:1001-7.
156. Starzl TE, Lakkis FG. The unfinished legacy of liver transplantation: emphasis on immunology. *Hepatology* 2006;43:S151-63.
157. Good RA. Mixed chimerism and immunologic tolerance. *N Engl J Med* 1993;328:801-2.

158. Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, et al. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 2006;7:1092-100.
159. Bowen DG, Zen M, Holz L, et al. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004;114:701-12.
160. Jiang X, Morita M, Sugioka A, et al. The importance of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mouse hepatic allograft tolerance. *Liver Transpl* 2006;12:1112-8.
161. Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, et al. Low circulating regulatory T cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Transplant Proc* 2006;12:277-84.
162. Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transpl* 2007;7:309-19.
163. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
164. Larsen CP, Knechtle SJ, Adams A, et al. A new look at blockade of T-cell costimulation: a therapeutic strategy for long-term maintenance immunosuppression. *Am J Transpl* 2006;6:876-83.
165. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, et al. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 2005;80:110-7.
166. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006;82:550-7.
167. Meloni F, Morosini M, Solari N, et al. Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cell expansion in lung transplant recipients is not affected by calcineurin inhibitors. *Int Immunopharmacol* 2006;6:2002-10.
168. Wekerle T. T-regulatory cells-what relationship with immunosuppressive agents? *Transpl Proc* 2008;40:S13-6.
169. Heitger A, Blaha P, Bigenzahn S, et al. The influence of immunosuppressive drugs on cell-induced graft tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2004;9:307-13.
170. Kreijveld E, Koenen HJ, Klasen IS, et al. Following anti-CD25 treatment, a functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007;7:249-55.
171. Vondran FWR, Timrott K, Tross J, et al. Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. *Transpl Internat* 2009; epub ahead of print.
172. Li L, Li SP, Min J, et al. Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells. *Immunol Lett* 2007;114:38-45.



173. Dumoulin FL, Bach A, Leifeld L, El-Bakri M, Fischer HP, Sauerbruch T, et al. Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1997;175:681-85.
174. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:829-41.
175. Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996;24:759-65.
176. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, et al. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001;75:5550-8.
177. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-58.
178. Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, et al. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J Virol* 2001;75:1332-8.
179. Okamoto T, Yamamura K, Hino O. The mouse interferon-gamma transgene chronic hepatitis model. *Int J Mol Med* 1999;3:517-20.
180. Garaigorta U, Chisari FV. Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 2009;6:513-22.

Ringrazio

il Prof. Massimo Campieri e il Prof. Francesco B. Bianchi per l'opportunità di svolgere il

Dottorato di Ricerca presso il Dipartimento di Medicina Clinica dell'Università di Bologna

il Prof. Marco Lenzi e il Dott. Luigi Muratori per la supervisione clinica e scientifica

il Prof. Diego Vergani e la Dott.ssa Maria Serena Longhi per la generosa e proficua ospitalità

all'Institute of Liver Studies, King's College Hospital, London

le Dott.sse Rita Menichella e Claudine Lalanne per l'indispensabile contributo in laboratorio

i Dott. Georgios Pappas, Alessandro Granito, Paolo Muratori, Chiara Quarneti, Chiara De

Molo, Erica Fiorini, Claudia Parisi, Cristina Morelli, Sonia Berardi, Maria Rosa Tamè,

Alice Gianstefani per l'aiuto nel reclutamento dei pazienti

Mirna, Angela e Milena dell'Istituto di Patologia Clinica dell'Ospedale S. Orsola-Malpighi

per il prezioso supporto tecnico