



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE

CICLO: XXVI

COORDINATORE Prof. G. LAFFI

*Determinanti virali e dell'ospite nella patogenesi dei
disordini linfoproliferativi HCV-correlati*

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

Dottorando

Dott. (Fognani Elisa)

(firma)

Tutore

Prof. (Zignego Anna Linda)

(firma)

Coordinatore

Prof. (Laffi Giacomo)

(firma)

Anni 2010/2013

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
IL VIRUS DELL'EPATITE C (HCV).....	1
LINFOTROPISMO E MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE.....	20
TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE CRONICA HCV.....	32
MICRORNA.....	40
SCOPO DELLA RICERCA.....	47
PAZIENTI E METODI.....	48
RISULTATI.....	54
DISCUSSIONE.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	65

INTRODUZIONE

IL VIRUS DELL'EPATITE C (HCV)

Epidemiologia e modalità di trasmissione

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) rappresenta un problema di salute pubblica di primaria importanza a livello mondiale. In Italia, l'HCV, da solo o in combinazione con altri fattori (alcol, HBV), è presente nel 72.1% delle cirrosi e nel 76% degli epatocarcinomi [1, 2].

L'infezione cronica da HCV si caratterizza per uno spettro alquanto eterogeneo di manifestazioni cliniche che possono andare da uno stato di portatore apparentemente sano, con viremia persistente, ma con minime lesioni istologiche nel fegato, a forme di epatite cronica più o meno attiva, sino alla cirrosi e all'epatocarcinoma.

L'epidemiologia dell'infezione da HCV si è significativamente modificata nell'ultimo decennio, come conseguenza dello sviluppo di metodologie diagnostiche per rilevare l'infezione e anche della progressiva adozione di misure di protezione e profilassi nei gruppi e nelle procedure a maggior rischio. Attraverso questi interventi, l'incidenza di nuovi casi di infezione si è progressivamente ridotta nei paesi occidentali, mentre la prevalenza dei portatori cronici nella popolazione generale resta in molte aree ancora elevata.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha recentemente reso noto che circa il 3% della popolazione mondiale sarebbe infettata dall'HCV con un numero di portatori cronici pari a 170-200 milioni, di cui 5 milioni in Europa, 1,5 milioni in Italia e 3,9 milioni negli USA [3] (Fig. 1). Dati epidemiologici recenti permettono di valutare in circa il 3% la prevalenza media di anticorpi anti-HCV nella popolazione italiana, benché tale tasso vari a seconda dell'età, del sesso e della regione di provenienza. Frequenze maggiori infatti si osservano nel

centro (8%) e al sud (12-16%) rispetto al nord (2-3%). Più del 50% dei soggetti anti-HCV positivi sono viremici, ossia HCV-RNA positivi, e sono pertanto portatori cronici dell'infezione.

Come già accennato, la prevalenza di infezione HCV in Italia correla fortemente con l'età, ovvero raggiunge punte particolarmente elevate (oltre il 30%) nella popolazione anziana di alcune regioni del sud Italia, mentre nei bambini e negli adolescenti la prevalenza dell'anti-HCV positività è molto bassa (0.4%).

Sulla base delle sequenze genomiche, l'HCV può essere classificato in 6 principali genotipi con una diversa distribuzione geografica:

- 1: Europa Occidentale (compresa Italia), Giappone, USA
- 2: Giappone e Cina
- 3: Nord Europa, India, Sud America
- 4: Africa Orientale
- 5: Sud Africa, Olanda
- 6: Sud-est asiatico

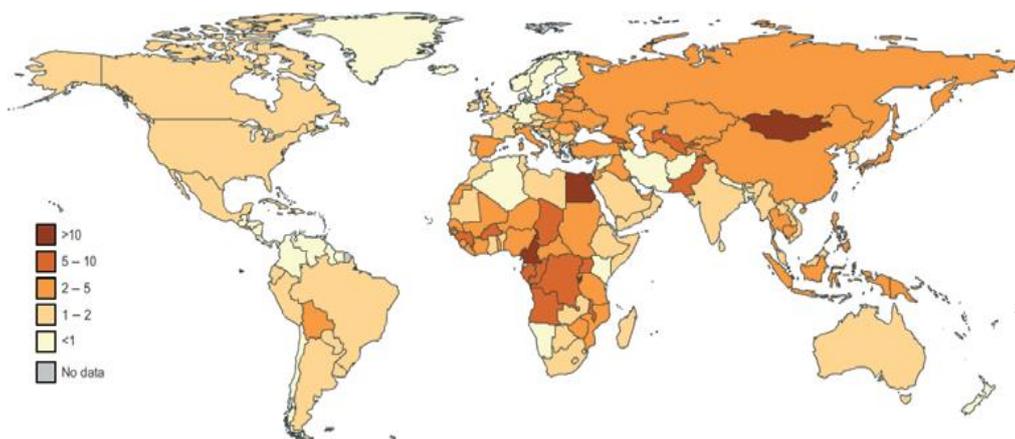


Figura 1: diffusione del virus dell'epatite C nel mondo

L'infezione HCV si trasmette in modo molto efficace attraverso la via parenterale. Nei paesi industrializzati la diffusione di questo virus

è stata favorita da due grandi focolai epidemici che si sono sviluppati nella seconda metà del XX secolo; il primo focolaio ha coinciso con l'uso estensivo di terapie parenterali e di trasfusioni di sangue, mentre il secondo è stato determinato dal crescente impiego di iniezione di sostanze stupefacenti da parte della popolazione tossicodipendente.

Nei paesi occidentali, l'epidemia di HCV da causa iatrogena, è da considerarsi in fase di conclusione grazie a due fattori chiave: il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie (abolizione dell'uso di siringhe di vetro) e soprattutto la disponibilità di test di laboratorio efficaci per la selezione di donatori di sangue a partire dai primi anni '90. La probabilità di ricevere un'unità di sangue potenzialmente infetta è così scesa fino allo 0.001%, pertanto, il rischio di contagio trasfusionale attualmente può essere stimato in 1 caso ogni 100.000 unità di sangue trasfuso, un valore ben diverso dal 2% osservato prima dell'introduzione dei test di laboratorio. L'efficacia della trasmissione per via ematica è dimostrata dall'elevata prevalenza di infezione osservata all'interno di alcuni gruppi della popolazione come gli emofilici (tra il 50 ed il 90%), i tossicodipendenti (tra il 70 ed il 92%) ed i trapiantati.

Uno studio condotto tra il 1994 ed il 1997 su donatori regolari di sangue ha permesso di evidenziare le seguenti modalità di trasmissione, in ordine decrescente: uso di droghe per via endovenosa con scambio di siringhe infette (22%), analisi mediche invasive (12%), abitudini sessuali promiscue (8%), esposizione professionale (4%) e tatuaggi (1,4%) [4]. Risulta chiaro che alcune pratiche come l'agopuntura ed i tatuaggi, se effettuate con materiale non sterile, rappresentino delle possibili vie di trasmissione. Tuttavia è molto importante sottolineare che, in una percentuale che va dal 10 al 40% dei casi di epatite C, risulta impossibile stabilire come sia avvenuto il contagio, si parla pertanto di "epatiti sporadiche".

La trasmissione da madre a neonato costituisce una modalità di infezione che può verificarsi durante la vita intrauterina, durante il parto o anche nel periodo perinatale [5]. Mediamente la percentuale di bambini nati da madri HCV positive che hanno contratto l'infezione è di circa il 3-5%. Questo valore aumenta notevolmente nel caso in cui la madre abbia una coinfezione HCV+HIV (15-30%). Contrariamente a quanto osservato per la trasmissione dell'HIV, nel caso dell'HCV, il ricorso al taglio cesareo non si è dimostrato utile nel ridurre il rischio di infezione neonatale. La presenza del virus nel latte materno non è stata dimostrata, e, al momento, non esistono controindicazioni per l'allattamento al seno.

Per quanto riguarda la trasmissione per via sessuale, la questione è ancora oggetto di discussione, poiché gli studi epidemiologici coinvolgono spesso pazienti HIV positivi, la cui condizione di immunosoppressione potrebbe favorire la trasmissione dell'HCV [6]. In linea generale, si considera che il rischio di trasmissione per via sessuale sia molto basso, praticamente nullo; inoltre la ricerca di HCV nelle secrezioni vaginali si è rivelata generalmente negativa [7], mentre è ormai certa la presenza del virus nello sperma [8], anche se ad una concentrazione fino a 100 volte più bassa rispetto al plasma [9].

Struttura del virus

L'HCV appartiene alla famiglia dei *Flaviviridae* ed è l'unico virus appartenente al genere degli Hepacivirus. La particella virale è composta da un involucro lipoproteico, l'envelope, che avvolge un capside, costituito dalla proteina core; all'interno del capside è racchiuso il genoma virale (Fig. 2).

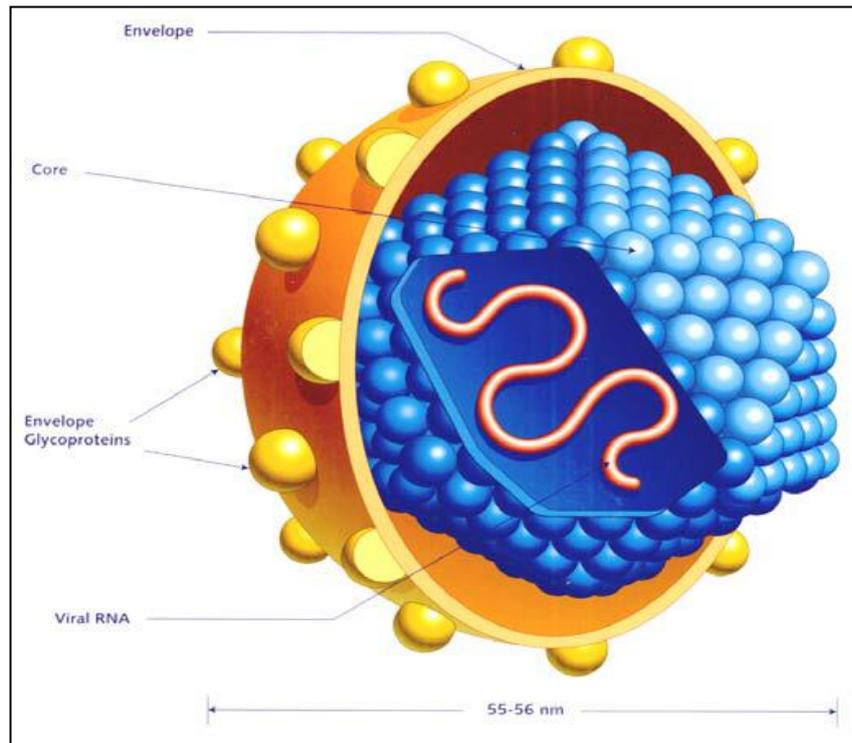


Figura 2: struttura del virus dell'epatite C

Il genoma è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento di polarità positiva (quindi di tipo messaggero), alle cui estremità sono presenti due regioni non codificanti a funzione regolatrice 5'-NTR e 3'-NTR (*Non-Translated Region*), che fiancheggiano un'ampia regione centrale codificante una poliproteina di 3010 aminoacidi. Tale poliproteina viene processata, a livello co- e post-traduzionale, da proteasi cellulari e virali, dando origine a proteine strutturali (il core C, e le glicoproteine dell'envelope virale, E1 e E2) e non strutturali (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B,

che intervengono nel clivaggio della poliproteina e nella replicazione virale) [10] (Fig. 3).

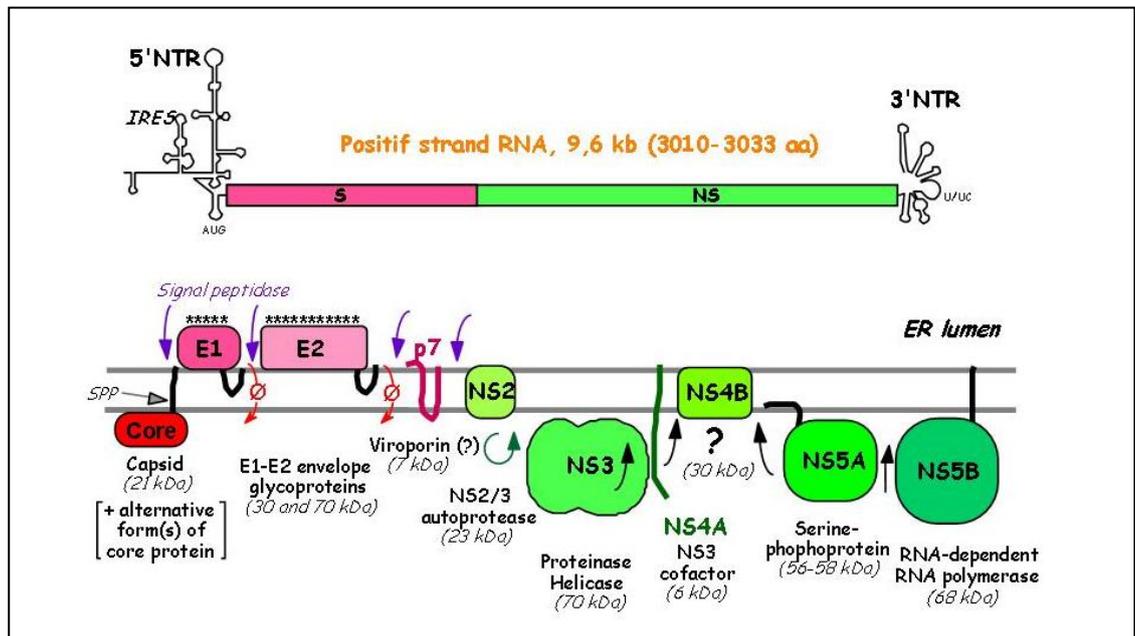


Figura 3: genoma dell'HCV e processazione (da Penin, 2003)

L'inizio della traduzione è permesso dalla presenza di sequenze IRES (Internal Ribosome Entry Site) nella regione 5'-UTR, molto conservata, che dirigono il legame del ribosoma all'RNA [11].

Alcuni modelli di espressione eterologa hanno permesso di studiare gli effetti biologici delle proteine virali e le loro interazioni con i componenti cellulari [12]; tuttavia, le numerose interazioni osservate e il loro effettivo ruolo fisiopatologico non sono ancora stati dimostrati *in vivo*.

Core

La proteina del core è processata da un'endoproteasi cellulare a livello del sito C/E1, in corrispondenza della sequenza specifica SPP (Signal Peptide Peptidase). Il suo peso molecolare è di 21 kDa e la sua localizzazione è principalmente citoplasmatica, ancorata alla membrana del reticolo endoplasmatico grazie alla sua estremità C-terminale [13]. Questa proteina ha la capacità di formare omodimeri

e di aggregarsi all'RNA virale per formare il nucleocapside icosaedrico del virus; inoltre essa interagisce con la regione 5' non codificante e con la glicoproteina E1 per l'assemblaggio del virione [14]. È stata anche osservata una forma più piccola della proteina del core, chiamata P16 (16 kDa), che sembra essere localizzata più specificamente nel nucleo [15].

È stato dimostrato che la proteina del core può modulare l'attività trascrizionale di alcuni geni che regolano la proliferazione cellulare, come RB [16], c-myc e c-fos [17], o l'apoptosi, come p53 e p21 [18]. Sembra inoltre che il core di HCV possa interagire con differenti proteine cellulari, come alcuni membri della famiglia del recettore del TNF (Tumor Necrosis Factor) [19] o della linfo tossina β [20], ed avere un effetto anti- o pro-apoptotico. Infatti, sono stati osservati degli effetti discordanti a seconda del modello sperimentale e della sequenza nucleotidica del core utilizzata [18, 21]. In aggiunta, altri studi hanno messo in evidenza il potere trasformante della proteina del core quando espressa in epatociti primari umani [22] o, *in vivo*, in topi transgenici che sviluppano, in alcuni casi, una steatosi epatica [23], seguita da un HCC [24].

La proteina del core si caratterizza infine per la sua capacità di interagire con i lipidi e di accumularsi nelle gocce lipidiche della cellula [25], fenomeno che potrebbe rappresentare un fattore importante nella comparsa di steatosi e nella patogenesi epatica [26, 27].

L'insieme di questi risultati suggerisce dunque che la proteina del core di HCV giochi un ruolo chiave nella patogenesi virale, tanto nell'infezione cronica che nella trasformazione cellulare, modificando i meccanismi di apoptosi e modulando la risposta immunitaria.

Proteina F

La proteina F è trascritta mediante frameshift -2/+1 nella sequenza del core e sembra costituisca circa il 54% della produzione

totale del core virale. L'importanza di questa proteina alternativa nel ciclo virale è ancora sconosciuta, anche se di recente è stata osservata in associazione con le membrane del reticolo endoplasmatico e questo suggerisce che possa far parte del complesso di replicazione [28]. Si pensa inoltre che sia responsabile di alcune delle numerose funzioni attribuite al core [29].

Nonostante l'esistenza della proteina F non sia stata del tutto provata, i principali argomenti a favore sono la presenza di anticorpi nei pazienti infetti [30] e linfociti T diretti specificamente contro di essa [31].

E1 e E2

E1 e E2 sono due glicoproteine transmembranarie, rispettivamente di 30 e 70 kDa, che costituiscono l'envelope virale; esse si trovano ancorate al reticolo endoplasmatico cellulare tramite il loro dominio C-terminale [32], associate tra di loro in maniera non covalente sotto forma di eterodimero dopo essere state modificate per glicosilazione [33]. La regione C-terminale di E1 contiene la sequenza segnale per il clivaggio di E2 da parte delle proteasi cellulari, mentre la sequenza segnale per E1 si trova nella regione C-terminale della proteina del core.

La proteina E1 è stata a lungo considerata come la responsabile della fusione tra l'envelope virale e la membrana cellulare, ma attualmente sembra che condivida le sue funzioni con E2, soprattutto nel caso dell'interazione con i recettori cellulari. Come per gli altri flaviviridae, l'acquisizione dell'envelope avviene al momento del budding, a livello della membrana del reticolo endoplasmatico, dove sono ancorate E1 e E2 [34].

La proteina E2 sembra essere coinvolta nella fissazione del virus sulla superficie cellulare, in particolare interagendo con il recettore CD81 [35].

P7

P7 è un piccolo peptide, molto idrofobo, localizzato a livello della membrana del reticolo endoplasmatico e dei mitocondri [36], con le due estremità N- e C-terminale orientate all'interno dell'organulo e un piccolo dominio idrofilo rivolto verso il citosol.

Quando espressa in un sistema procariotico, P7 forma degli esameri che funzionano come dei canali ionici, la cui attività è inibita *in vitro* da alcune sostanze che hanno attività anti-HCV *in vivo* [37]. Questa proteina potrebbe quindi appartenere alla famiglia delle viroporine, un gruppo di proteine presenti in molti virus, che partecipano a numerose funzioni virali, tra cui il miglioramento del passaggio ionico transmembranario; si pensa infatti che essa formi un canale ionico [38] che potrebbe essere inibito dall'amantadina.

NS2

Questa proteina transmembranaria di 23 kDa non è glicosilata ed è processata a partire dalla poliproteina virale da una metallo-proteasi zinco-dipendente [39]. Una volta sintetizzata, viene fosforilata e rapidamente degradata dal proteasoma [40]. NS2 non è necessaria alla replicazione del genoma virale e la sola funzione conosciuta è il clivaggio *in cis* tra NS2 e NS3; tale clivaggio richiede un meccanismo zinco-dipendente, e, nella regione N-terminale di NS3, coinvolta in questa attività proteolitica, è stato ritrovato un sito di legame allo zinco. Inoltre, analisi cristallografiche e biochimiche hanno suggerito un ruolo essenziale dello zinco per l'integrità della struttura proteica di NS3 e quindi per la sua attività di serinoproteasi [41].

NS3/NS4A

La proteina NS3 è una proteina di 70 kDa con una doppia funzione: nel dominio N-terminale possiede un'attività proteolitica responsabile di 4 dei 5 clivaggi della regione non strutturale, alle

giunzioni localizzate a valle di NS3, e, nei due terzi C-terminali, possiede un'attività RNA elicasi e NTPasi (idrolisi dei nucleosidi trifosfati), che partecipano allo "srotolamento" dell'RNA durante la replicazione del genoma virale. L'attività di NS3 necessita la presenza di un co-fattore che corrisponde ad un peptide di 14 aa presente all'interno di NS4A; da un punto di vista strutturale, il peptide interno di NS4A è inserito nel dominio proteasico di NS3, assicurando così il ripiegamento stabile dell'estremità N-terminale di NS3.

Recentemente è stato messo in evidenza che la proteasi NS3/NS4A è in grado di bloccare la fosforilazione e quindi l'attività di IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3), inibendo così la via endogena dell'interferone [42]; in questo modo NS3/NS4A permetterebbe al virus di aggirare uno dei più importanti segnali della risposta innata antivirale della cellula.

NS4B

NS4B è una piccola proteina transmembranaria di 27 kDa, localizzata nella parete del reticolo endoplasmatico ed orientata verso il citoplasma [43]. La sua funzione non è chiara, ma si pensa che faccia parte del complesso replicativo [44].

NS5A

Questa proteina esiste in due forme distinte, di 56 e 58 kDa, a seconda del grado di fosforilazione [45] ed è localizzata in prossimità delle membrane del reticolo endoplasmatico, dove si trova associata alle altre proteine non strutturali nell'ambito del complesso di replicazione [46]. Probabilmente partecipa alla regolazione dell'attività della RNA polimerasi RNA-dipendente [47] e potrebbe interferire con la risposta antivirale indotta dall'interferone grazie all'interazione con la proteina PKR (double-stranded RNA-dependent Protein Kinase) [48]; risulta inoltre in grado di stimolare la cascata di signalling che porta all'attivazione di STAT3 [49].

NS5B

NS5B costituisce la RNA polimerasi RNA-dipendente del virus; tale enzima interagisce con l'estremità 3' dell'RNA virale e la polimerizzazione porta alla sintesi di una copia completa del genoma.

Ciclo virale

Il ciclo di replicazione dell'HCV è interamente citoplasmatico (Fig. 4). L'interazione tra la particella virale e la cellula coinvolge una o entrambe le glicoproteine dell'envelope virale e un numero non ben definito di recettori cellulari; per il momento sono stati identificati quattro recettori putativi: la tetraspannina CD81, lo "human scavenger receptor class B type 1", la lectina DC-SIGN e il recettore per le LDL (lipoproteine a bassa densità).

La molecola CD81 è stata la prima ad essere identificata [35] e partecipa a numerose funzioni cellulari, come l'adesione cellulare, l'attivazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule B, T e di altri tipi cellulari; nel caso dell'HCV interagirebbe con E2 e recentemente è stato dimostrato che, sebbene CD81 sia effettivamente implicato nell'interazione del virus con la cellula bersaglio, tale interazione non è sufficiente all'ingresso delle particelle virali nella cellula.

Per quanto riguarda lo "human scavenger receptor class B type 1 (SR-B1), esso è stato proposto come un altro recettore potenziale dell'HCV [50], sulla base della sua interazione con E2 alla superficie delle cellule HepG2, tra l'altro sprovviste di CD81; questa molecola, espressa sulla superficie degli epatociti, è in grado di fissare le lipoproteine ad alta densità e gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo dei lipidi.

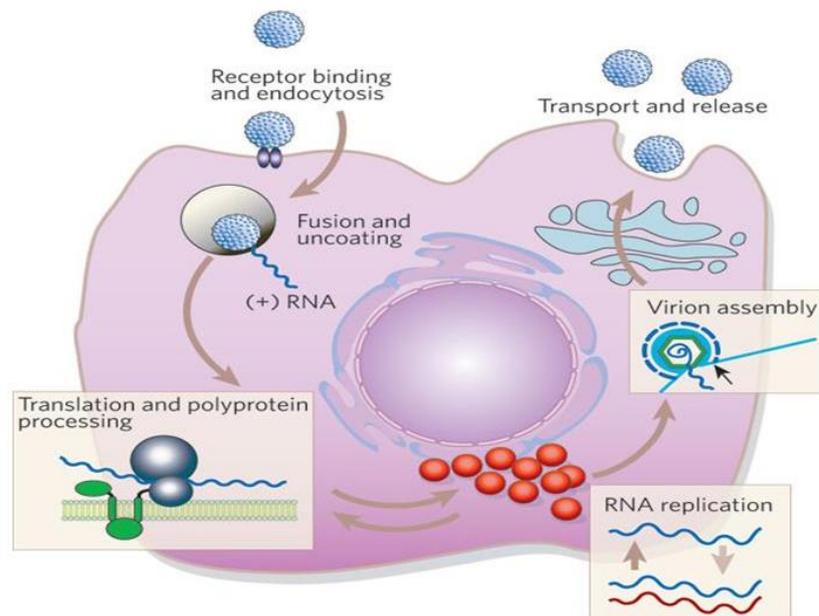


Figura 4: ciclo replicativo dell'HCV (da Lindebach et al, 2005)

Studi basati sulla produzione di pseudo-particelle di HCV a partire da baculovirus ricombinante suggeriscono che il recettore delle LDL potrebbe mediare l'ingresso del virus; questi risultati sono corroborati dal fatto che, nel siero dei pazienti infettati, i virioni di HCV sono associati alle VLDL o alle LDL [51].

Infine, la lectina DC-SIGN, espressa sulla superficie delle cellule dendritiche ed endoteliali sinusoidali del fegato, si lega ai glicani della glicoproteina E2 solubile [52] e delle particelle virali [53]. Sebbene le cellule endoteliali sinusoidali giochino un ruolo importante nell'indirizzare gli agenti patogeni nel fegato, non sembra che l'interazione di DC-SIGN con l'HCV rappresenti il solo meccanismo all'origine del tropismo del virus per gli epatociti i quali, pur essendo il principale bersaglio dell'HCV, non esprimono questa lectina.

Recentemente è stato dimostrato che l'ingresso dell'HCV nella cellula è pH-dipendente, come per gli altri Flaviviridae, e questa caratteristica lascia presupporre che il virus penetri nella cellula bersaglio grazie ad un'endocitosi mediata da un recettore e che la

fusione delle membrane virale e cellulare avvenga all'interno di questi endosomi, in seguito all'acidificazione del pH [54, 55].

In seguito all'ingresso del virus nella cellula, l'RNA viene liberato e, come qualunque altro RNA di polarità positiva, viene tradotto, producendo in primo luogo le proteine virali necessarie alla replicazione virale. Prima di tutto la molecola di RNA viene copiata dalla polimerasi virale per formare un intermedio di polarità negativa, che serve da matrice per la sintesi di molteplici filamenti di RNA positivo, i quali possono essere usati per la traduzione delle proteine virali, per la replicazione, oppure per l'assemblaggio all'interno delle particelle virali complete.

Come già accennato il primo stadio della replicazione è la traduzione dell'RNA virale per produrre una poliproteina di circa 3000 amminoacidi. Il processamento proteolitico del precursore unico da parte di quattro proteasi diverse, due virali e due cellulari, ha come risultato la generazione di dieci proteine mature che nell'ordine sono:

C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B.

Gli enzimi cellulari peptidasi della sequenza segnale ed SPP (signal peptide peptidase) sono insieme responsabili della maturazione delle proteine strutturali, da C a p7. La proteasi virale NS2/3 è responsabile, mediante un evento autocatalitico, della scissione fra NS2 ed NS3, mentre il complesso NS3-NS4A contiene la proteasi responsabile della generazione delle altre proteine non strutturali.

Il complesso di replicazione di HCV contiene, probabilmente, la maggior parte delle proteine virali non strutturali, da NS3 ad NS5B, insieme con un numero ancora imprecisato di proteine cellulari.

L'attività di RNA elicasi e di RNA polimerasi dipendente da RNA (RdRp), esplicate rispettivamente da NS3 e NS5B, sono le principali componenti enzimatiche dell'apparato molecolare preposto alla replicazione del genoma virale e pertanto rappresentano altri potenziali target per l'intervento terapeutico.

Fino a poco tempo fa lo studio di vari aspetti della replicazione era limitato dalla mancanza di un modello sperimentale capace di riprodurre *in vivo* l'intero ciclo replicativo del virus. Due studi pubblicati quasi contemporaneamente ad opera di Lindenbach et al. e Wakita et al. riportano la creazione di un modello sperimentale in cui, per la prima volta, l'infezione di cellule in coltura porta alla generazione di virioni infettivi, in cui cioè viene compiuto l'intero ciclo replicativo dell'HCV [56, 57]. Wakita e collaboratori, utilizzando repliconi full-length del ceppo JFH1 del genotipo virale 2a, hanno dimostrato che le particelle virali rilasciate nel terreno di coltura dalle cellule infettate erano capaci di infettare *in vitro* nuove colture cellulari della linea di epatoma Huh7 ed, *in vivo*, gli scimpanzé. L'infettività delle particelle virali era inoltre notevolmente diminuita all'incubazione con anticorpi anti-CD81 e con immunoglobuline isolate da pazienti con infezione cronica. Questa osservazione rappresenta una prova dell'importanza del ruolo del CD81 nel meccanismo di ingresso del virus nella cellula ospite.

Lindenbach e collaboratori invece hanno ottenuto simili risultati utilizzando un costrutto chimerico formato dall'RNA del ceppo J6 per la regione codificante dal core a NS2 e dal replicone subgenomico SGR-JFH per la porzione rimanente a formare il full-length. L'infezione di cellule Huh-7.5 portava alla secrezione di particelle virali isolabili dal terreno di coltura tramite filtrazione e capaci di infettare Huh 7.5 naive. Anche in questo lavoro viene provata l'importanza del CD81 nella fase di ingresso del virus nella cellula utilizzando le cellule HepG2 costitutivamente prive di CD81. Le HepG2 wild type infatti sono resistenti all'infezione, mentre Hep G2 esprimenti il CD81 portano a dei risultati simili a quelli ottenuti per le Huh 7.5 anche se con un'efficienza inferiore.

Lindenbach e collaboratori riportano anche un effetto dose-dipendente dell'interferone- α (IFN- α), attualmente l'antivirale più

usato nella terapia delle epatiti croniche da virus C, sulla replicazione virale nelle cellule infettate *in vitro*.

Tutte queste caratteristiche rendono questi modelli sperimentali degli strumenti molto interessanti per lo studio della replicazione virale e per lo sviluppo di nuove strategie antivirali.

L'inizio della traduzione della poliproteina dell'HCV avviene per ingresso del ribosoma a livello della regione IRES; a differenza dei picornavirus, la subunità 40S dei ribosomi e il fattore d'iniziazione della traduzione eIF3 si legano direttamente all'RNA, senza bisogno dell'intervento del co-fattore eIF4G.

La replicazione del genoma virale avviene all'interno di strutture membranarie che sono state osservate al microscopio elettronico nelle cellule contenenti un RNA sub-genomico autoreplicativo dell'HCV; tali strutture membranarie potrebbero quindi servire come supporto al complesso di replicazione del virus, formato dall'associazione tra l'RNA polimerasi RNA-dipendente e le proteine non strutturali [58, 59]. Tuttavia, il meccanismo molecolare della replicazione dell'RNA rimane ancora sconosciuto.

Al termine del ciclo replicativo il virione viene assemblato a livello del reticolo endoplasmatico, ma i dettagli dei meccanismi coinvolti nell'assemblaggio e soprattutto nella maturazione e la liberazione delle particelle virali non sono ancora stati definiti.

Caratteristiche del genoma virale

L'HCV-RNA è caratterizzato da una significativa variabilità genetica ed è stato stimato che sia soggetto a mutazioni la cui frequenza è pari a circa 10^3 sostituzioni per sito per anno. L'alto tasso di mutazione fa sì che nell'ospite si ritrovino delle forme virali (che differiscono tra loro per poche mutazioni), definite "quasi-specie". L'HCV-RNA, difatti, nella maggior parte dei casi, si presenta come una popolazione di molecole di RNA che differiscono nel siero, nel fegato e nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Alcuni "hot

spot" (regioni del genoma virale in cui la frequenza mutazionale è particolarmente elevata), sono stati identificati nelle sequenze che codificano la glicoproteina E2 dell'envelope; in corrispondenza della porzione 5' di questo dominio vi è una sequenza ipervariabile (HVR1), caratterizzata da un elevato livello di mutazioni non sinonime (ad esempio, mutazioni che portano a sostituzioni amminoacidiche). Alcune delle sequenze che codificano le proteine non strutturali (in particolare, l'NS5A), come pure quella che codifica il capsido, mostrano un livello di variabilità più basso, anche se ancora significativo. Al contrario, la regione 5' non tradotta è altamente conservata tra differenti isolati, sebbene possano esservi identificate mutazioni. Al momento, secondo la classificazione vigente, i tre principali genotipi dell'HCV sono distinti in: 1, 2 e 3, oltre ad altri genotipi che vanno da 4 a 7.

La capacità di mutare continuamente sembra essere una delle strategie adottate dal virus per sfuggire al controllo del sistema immunitario dell'ospite e permettere la persistenza dell'infezione a lungo termine; non solo, ma tale ipermutabilità favorirebbe anche la resistenza dell'HCV al trattamento con IFN- α , una citochina infiammatoria prodotta dalle cellule in risposta ad un'infezione virale e che attualmente costituisce la più efficace terapia contro l'infezione da HCV. Infatti, anche quando utilizzato in associazione con un altro farmaco antivirale quale la Ribavirina (RBV), l'IFN- α non permette una guarigione completa nella totalità dei pazienti trattati (30-40% dei pazienti mostra una recidiva al termine del trattamento).

Infezione e patogenesi virale

Da un punto di vista clinico, l'infezione da virus dell'epatite C è caratterizzata da una forte predominanza delle forme acute asintomatiche ed un'elevata frequenza di evoluzione verso la forma cronica. Attualmente si considera che il 20-50% delle epatiti acute da HCV, sintomatiche o no, si risolvano spontaneamente, mentre il 50-

80% dei pazienti infettati sviluppi un'infezione cronica; inoltre, il 20% delle infezioni croniche da HCV evolvono verso una cirrosi epatica, che può portare a sua volta ad un carcinoma epatocellulare (Fig. 5).

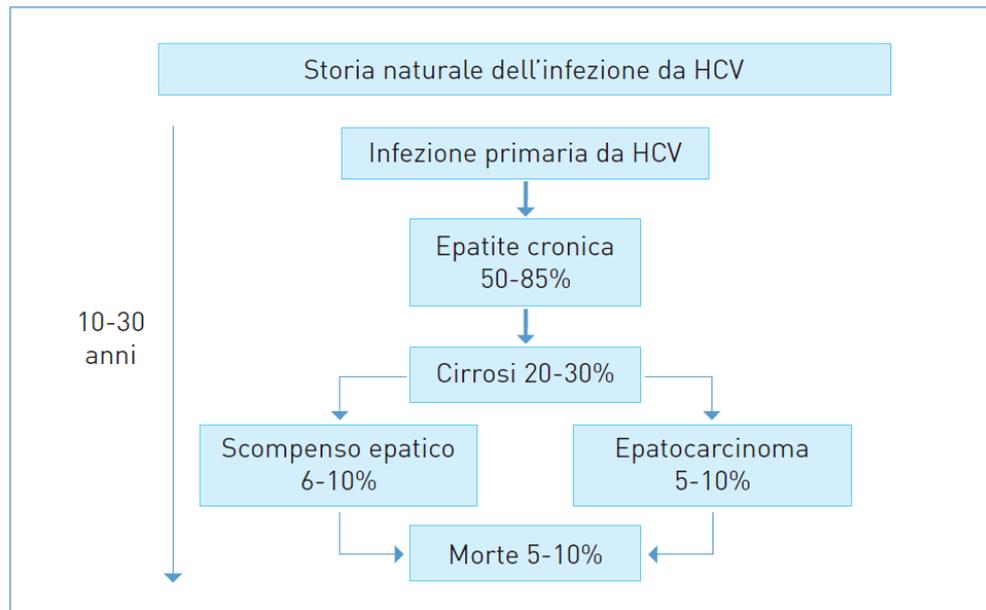


Figura 5: infezione e patogenesi virale

Epatite acuta

L'epatite acuta si manifesta nei primi 45 giorni dal contagio, ma nell'80-90% dei casi è asintomatica. Nel 10-20% dei casi sintomatici, i segnali clinici sono polimorfi e non permettono di distinguere tale epatite da altre varianti eziologiche; i sintomi comprendono artralgie, cefalee, febbre moderata, marcata astenia e, solo nel 10% dei casi, ittero. L'infezione da HCV resta quindi molto spesso non riconosciuta ed è diagnosticata soltanto allo stadio di epatite cronica. Durante l'epatite acuta, l'innalzamento delle transaminasi sieriche (ALT, Alanine Amino Transferase; AST, Aspartate Amino Transferase), marker della distruzione epatocitaria, è moderato (aumento di un fattore 10 oltre i valori normali).

La guarigione è rappresentata da un livello normale e duraturo delle transaminasi, e dall'impossibilità di rintracciare l'RNA virale nel

siero dopo almeno 6 mesi dall'infezione, nonostante la persistenza di anticorpi anti-HCV.

Epatite cronica

La caratteristica più rilevante dell'epatite C è l'evoluzione, nel 50-85% dei casi, verso un'infezione cronica. Anche allo stadio cronico i pazienti restano spesso asintomatici; tuttavia si osserva un aumento delle transaminasi, la presenza di anticorpi anti-HCV e del genoma virale nel siero. Al momento in cui è possibile determinare l'RNA virale, segno evidente di un'infezione cronica, è indispensabile procedere ad una biopsia epatica per meglio definire lo stadio evolutivo della malattia: a questo scopo si usa la classificazione METAVIR [60], basata su criteri istologici necro-infiammatori e sul grado di fibrosi.

La caratteristica principale dell'epatite cronica da virus C è l'accumulo di gocce lipidiche all'interno degli epatociti (steatosi), fenomeno più frequente che nelle altre epatiti croniche virali (50-70% dei casi); inoltre si osservano un'importante fibrosi e degli aggregati o dei noduli linfoidi presenti nella regione portale. Talvolta sono riscontrabili anche delle alterazioni dei canalicoli biliari interlobulari.

Mentre alcuni soggetti con un'epatite cronica da virus C hanno una malattia benigna senza un potenziale evolutivo importante, altri presentano un'evoluzione rapida verso la cirrosi; il rischio di una tale evoluzione è stato valutato intorno al 20%, 10-20 anni dopo il contagio in Europa e nell'America del Nord, mentre è più elevato in Giappone. Tra i principali fattori di rischio che partecipano allo sviluppo di una cirrosi da citare: la durata dell'infezione virale (superiore ai 20 anni), l'età al momento del contagio (oltre i 40 anni), la coesistenza di altre cause epatolesive come abuso di alcool, farmaci e dismetabolismo (i.e. obesità, accumulo di ferro, diabete di tipo 2 e resistenza all'insulina), le coinfezioni con altri virus epatitici o con HIV, le alterazioni del sistema immunitario [61, 62].

La cirrosi dovuta all'infezione da HCV, è una delle cause principali di trapianto del fegato; nonostante la reinfezione quasi sistematica dell'organo trapiantato, la sopravvivenza a 5 anni dei trapiantati per cirrosi è dell'ordine del 70%.

Carcinoma epatocellulare

L'evoluzione classica della cirrosi è il carcinoma epatocellulare (HCC) [63, 64]; la necrosi epatocellulare e la rigenerazione conseguente a tale necrosi possono spiegare solo in parte la comparsa di un tumore epatico: è infatti ormai accertato che alcune proteine virali giocano un ruolo diretto in tale processo [65].

La mortalità dovuta all'HCC è in aumento nei paesi occidentali e il numero dei casi di HCC HCV-correlato dovrebbe aumentare nei prossimi 20 anni, tenuto conto del tempo di evoluzione dall'infezione cronica alla cirrosi e al carcinoma epatico [66].

LINFOTROPISMO E MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE

Un altro aspetto molto particolare dell'infezione da HCV è l'associazione a manifestazioni extraepatiche, legate allo spiccato linfotropismo del virus, che infetta le cellule mononucleate del sangue periferico. Diverse osservazioni, di seguito riportate, supportano questa ipotesi:

1. a seguito della stimolazione con agenti mitogeni, quali PHA (fitoemoagglutinina) e PMA (forbolo miristato acetato), colture a breve termine di PBMC mostrano un significativo incremento della quantità di RNA virale [67];
2. l'ibridazione *in situ* ha rivelato la presenza di RNA virale in una limitata percentuale (circa l'1%) delle PBMC circolanti e dei linfonodi [68, 69];
3. PBMC isolate da soggetti sani possono essere infettate dall'HCV [70, 71];
4. cloni di cellule B e T ottenute da soggetti portatori di HCV e immortalizzate con il virus di Epstein-Barr mostrano una persistenza a lungo termine dei genomi dell'HCV [70];
5. esistono forti evidenze per la persistenza dell'HCV-RNA nelle PBMC ottenute da soggetti positivi per l'HCV ed iniettati in topi SCID. Gli artefatti dovuti alla contaminazione con particelle sieriche sono stati esclusi da questo approccio che ha chiaramente mostrato un'effettiva infezione di queste cellule da parte dell'HCV [72].

Un secondo aspetto riguarda la presenza dell'elica a polarità negativa dell'HCV-RNA nelle PBMC. È stato suggerito che il genotipo 1 dell'HCV, rispetto ad altri frequenti genotipi, abbia uno spiccato linfotropismo [73]. Utilizzando un metodo di RT-PCR altamente specifico, Shimizu e collaboratori sono stati in grado di dimostrare la presenza di HCV-RNA di polarità negativa in campioni di PBMC isolate da scimpanzé infettati. Lo stesso gruppo di ricerca ha inoltre osservato che la capacità del virus di infettare le PBMC e/o le cellule

epatiche degli scimpanzé, come pure le linee cellulari di linfociti umani *in vitro*, variava a seconda dei differenti ceppi dell'HCV, suggerendo l'esistenza di ceppi linfotropici del virus [74].

L'elica a polarità negativa dell'HCV-RNA, indicante un'attiva replicazione virale in corso, è stato trovato in tutte le sottopopolazioni cellulari in alcuni studi [67], mentre in altri in specifiche sottopopolazioni cellulari (linfociti B e monociti) [73, 75]. L'ipotesi secondo cui l'HCV infetta le PBMC è stata di recente ulteriormente confermata da studi indicanti che l'infezione da HCV delle cellule linfatiche può favorire la selezione di determinate varianti virali. Studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* e basati sull'analisi della sequenza HVR1, hanno mostrato differenti profili di quasi-specie tra il siero, il fegato e le PBMC [76-79]. Tali osservazioni supportano l'ipotesi di una "compartimentalizzazione" di alcuni genomi dell'HCV. Le differenze nella distribuzione delle quasi-specie riscontrate in questi tessuti possono avere origine da fattori cellulari presenti nel fegato e nelle PBMC, tendenti a favorire la crescita di alcune varianti virali a scapito di altre [77].

In conclusione, è stato suggerito che l'infezione di cellule non epatiche possa costituire una riserva che potrebbe favorire la selezione di varianti dell'HCV e la persistenza virale. In particolare, l'infezione da parte dell'HCV delle PBMC e delle cellule del midollo osseo potrebbe promuovere specifiche alterazioni cellulari, interpretabili come potenziali strategie patogenetiche adottate dall'agente virale per indurre i disordini linfoproliferativi (DLP) che ricorrono frequentemente durante l'infezione cronica da HCV [70, 80].

I principali DLP a cellule B con cui è stata associata l'infezione cronica da HCV sono la crioglobulinemia mista (CM), il linfoma non-Hodgkin (LNH) a cellule B e le gammopatie monoclonali [81-84]. L'associazione epidemiologica tra infezione da virus C e manifestazioni extraepatiche è stata confermata in alcune, ma non in

tutte le aree del mondo, supportando il ruolo del virus e/o di fattori correlati all'ospite [70]. I meccanismi implicati nei disordini linfoproliferativi, sia quelli virus-dipendenti che quelli virus-indipendenti, sono complessi e non ancora completamente chiariti.

Crioglobulinemia mista (CM)

La CM, il DLP più strettamente associato con l'infezione da HCV, è una malattia da immunocomplessi circolanti, la cui produzione è secondaria ad un processo linfoproliferativo B-cellulare. La definizione di crioglobulinemia è basata su un dato di laboratorio: la presenza nel siero di una o più immunoglobuline (Ig) caratterizzate dal fatto di precipitare a temperature inferiori a 37°C e di ridiversi in seguito a riscaldamento del siero.

Gli immunocomplessi crioprecipitabili, rappresentati dalle crioglobuline miste IgG e IgM, costituiscono il marcatore sierologico della CM. Per la precisione, le immunoglobuline di tipo G sono gli autoantigeni, mentre quelle di tipo M, dotate di attività di fattore reumatoide, costituiscono gli autoanticorpi. La presenza di IgM policlonali o monoclonali determina il tipo di CM: nel caso di IgM policlonali, il DLP è classificato come tipo III, mentre in presenza di IgM monoclonali, come tipo II [85, 86].

La CM è una sindrome clinicamente distinta, caratterizzata da porpora, astenia, artralgie, glomerulonefrite membranoproliferativa, neuropatie periferiche e centrali, ulcere cutanee e vasculiti diffuse [87, 88]. Poiché tale sindrome coesiste frequentemente con aspetti del midollo osseo tipici del LNH ed evolve, nel 5-8% circa dei casi, in una franca malignità a cellule B [89], la CM è da ritenersi un disordine "borderline" (benigno/maligno).

Nei pazienti affetti da CM associata con l'infezione da HCV, inoltre, è stata riscontrata un'espansione clonale delle cellule B produttrici IgM [90].

Per quanto riguarda il coinvolgimento degli organi ed il decorso clinico, la CM di tipo II e quella di tipo III sono simili, anche se la prima, a differenza dell'altra, può evolvere in linfoma. I meccanismi patogenetici implicati nella linfoproliferazione benigna alla base della CM e nella sua evoluzione in linfoma sono ancora poco conosciuti, tuttavia, è stato suggerito che il riarrangiamento del gene antiapoptotico della leucemia 2/linfoma a cellule B (*bcl-2*), la traslocazione reciproca (14;18) [t(14;18)], possa svolgere un ruolo determinante nella patogenesi della CM associata con l'infezione da HCV [80, 91]. Nella t(14;18), il locus genico di *bcl-2*, normalmente localizzato sul cromosoma 18 (18q21), viene giustapposto al locus delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgH), presente sul cromosoma 14 (14q32). Tale aberrazione cromosomica coinvolge i segmenti di unione (J_h) delle IgH (fig. 6). Nel punto di giunzione dei due geni, i segmenti N, ossia le inserzioni di lunghezza variabile dovute alla casuale aggiunta di nucleotidi non presenti nelle originarie sequenze ricombinanti, determinano un profilo nucleotidico specifico per ogni clone traslocato [92, 93].

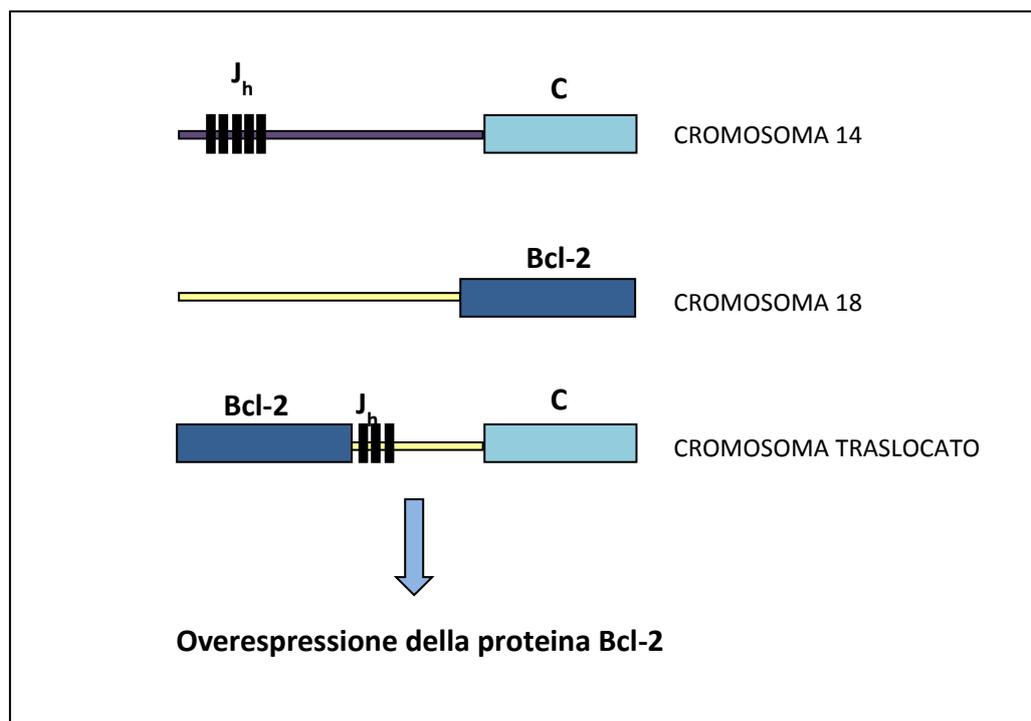


Figura 6: schema della traslocazione (14;18)

Il riarrangiamento del gene *bcl-2* ne attiva l'espressione e, come conseguenza, le cellule B portatrici della t(14;18) esprimono elevati livelli della proteina Bcl-2. Questa molecola fa parte di una grande famiglia di proteine, i cui membri sono in grado di interagire l'uno con l'altro in modo complesso; alcuni di essi, ad esempio, agiscono promuovendo la morte cellulare programmata o apoptosi mentre altri la inibiscono [94]. Nel caso specifico, la proteina Bcl-2 protegge le cellule dall'apoptosi mentre il suo omologo, Bax, ne determina la morte [95]; per questo il rapporto Bcl-2/Bax costituisce un fattore determinante per quanto riguarda la suscettibilità delle cellule all'apoptosi [94].

Grazie all'impiego dell'immunoistochimica, è stato possibile evidenziare l'over-espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 negli aggregati di linfociti epatici, non solo nella maggioranza dei casi di CM associata con l'infezione da HCV, ma anche in circa il 45% dei pazienti con infezione cronica da HCV in assenza di CM [96]. La t(14;18) è interpretabile come un errore commesso durante i processi di riarrangiamento V(D)J dei geni delle immunoglobuline e rappresenta l'aberrazione genetica più frequente nei linfomi umani [94, 97]. Si ritiene che tale riarrangiamento cromosomico possa essere favorito da una forte stimolazione antigenica protrattesi a lungo nel tempo [98-100]. Tale aberrazione, che si verifica durante le fasi precoci dello sviluppo delle cellule B, sembra essere una delle tappe della progressione di una cellula fisiologica verso la trasformazione in senso neoplastico [101]. La traslocazione (14;18), rilevabile anche nell'iperplasia follicolare benigna [98], è stata riscontrata nella maggior parte dei linfomi follicolari a cellule B, compresi alcuni di quelli diffusi. Inoltre, dati recenti mostrano come, tra i LNH idiopatici positivi per l'HCV, il linfoma centro follicolare rappresenti una delle varietà più comuni [102].

L'importanza patogenetica della t(14;18) nei disordini linfoproliferativi è stata evidenziata anche da studi condotti su modelli animali rappresentati da topi transgenici per la t(14;18) che sviluppavano una linfoproliferazione follicolare policlonale indolente a sua volta progredente verso una malignità monoclonale di alto grado. È interessante notare come, nei topi transgenici, la penetranza dei tumori B linfoidi fosse bassa e a lunga latenza, suggerendo che il prolungamento della durata della vita delle cellule B possa aumentare il rischio di trasformazione verso il linfoma [103, 104]. La traslocazione (14;18) non è, di fatto, sufficiente ad indurre una neoplasia e può essere trovata in persone apparentemente sane, con prevalenza crescente con l'età [98, 105]. In alcuni individui, quindi, la t(14;18) potrebbe costituire una fase precoce di un complesso processo multifasico esitante nel linfoma maligno.

Alla luce di quanto è stato detto a proposito della traslocazione (14;18) e del suo potenziale ruolo patogenetico nell'insorgenza della CM associata con l'infezione cronica da HCV, risulta evidente come l'inibizione dell'espansione anomala dei linfociti B durante le fasi precoci del meccanismo patogenetico della sindrome della CM possa essere particolarmente utile nella prevenzione dello sviluppo di tale DLP. In letteratura vi sono pochi dati relativi agli effetti del trattamento antivirale sull'espansione clonale dei linfociti B in corso di infezione da HCV e tali dati, generalmente, si riferiscono a pazienti con evidenti DLP, in particolare con CM con o senza LNH [106-108]. Non è ben chiaro, inoltre, se tali effetti siano mediati esclusivamente dalle proprietà antiproliferative possedute dall'interferone.

Alla luce di tali dati è stato valutato l'effetto della terapia antivirale con interferone e ribavirina nel siero e nei linfociti B di pazienti con e senza CM e altri disordini linfoproliferativi. Nelle cellule B è stata analizzata la coesistenza in di HCV-RNA e t(14;18). Durante il trattamento, nella maggior parte dei casi, si ritrovava la contemporanea presenza o assenza della t(14;18) e dell'HCV-RNA.

Alla fine del trattamento la t(14;18) era scomparsa nel 50% dei pazienti con risposta virologica parziale o completa, mentre era persistentemente rintracciabile nei pazienti che non rispondevano al trattamento, così come nei controlli.

Recentemente, l'importanza di fattori specifici del virus nella patogenesi dei DLP è stata ridimensionata; in particolare, Bianchettin e collaboratori [109] hanno confutato il dato precedentemente proposto che associava alla CM specifici cambiamenti o inserzione di motivi ricorrenti nella sequenza amminoacidica della regione ipervariabile 1 di HCV (HVR1). Bianchettin e collaboratori hanno inoltre dimostrato come inserzioni amminoacidiche in posizione 384 o 385 dell'HVR1 abbiano una distribuzione simile nel gruppo dei pazienti con crioglobulinemia sintomatica e asintomatica. In considerazione di tali risultati, nel lavoro è stata analizzata la possibile esistenza e significatività di motivi specifici nella sequenza di HVR1 che potessero discriminare tra pazienti con e senza CM. Nessuna differenza statisticamente rilevante è stata trovata, dimostrando che il sequenziamento di HVR1 non possa essere considerato un tool per l'identificazione del fenotipo crioglobulinemico, in contrasto ai dati presentati da Hoffmann et al. [110]. Inoltre, Bianchettin e collaboratori hanno condotto analisi dell'intera sequenza di E2 per vedere se fosse possibile stabilire un legame tra modificazioni a livello dell'envelope di HCV, includendo dunque regioni di importanza cruciali, quali il sito di legame con CD81, e la possibilità di sviluppare una CM, ma anche tale analisi ha avuto esito negativo. Dunque, un'analisi estensiva della proteina E2, con particolare attenzione a HVR1, che è noto essere un target per il processo di immuno selezione che contribuisce alla distribuzione delle quasi-specie, non è stata in grado di rivelare sequenze specifiche che sono considerate associate allo sviluppo della CM. In conclusione, in tale lavoro viene posta l'attenzione su fattori dell'ospite ancora non individuati quali possibili responsabili dello sviluppo di disordini

linfoproliferativi B-cellulari in conseguenza all'infezione da HCV, piuttosto che su fattori virus-specifici. Oltre alla stimolazione antigenica cronica, citochine e fattori di crescita possono dunque svolgere un ruolo chiave nel sostenere l'over-attivazione B cellulare.

Diagnosi di sindrome crioglobulinemica

La diagnosi di SCM è stata effettuata seguendo i criteri proposti da un recente lavoro di De Vita e collaboratori [111] condotto su un'ampia popolazione di soggetti HCV positivi: 272 interessati da una vasculite sistemica, riconducibile ad una franca sindrome crioglobulinemica, 228 soggetti che non mostravano sintomi di vasculite, ma con positività per le crioglobuline sieriche e 425 soggetti di controllo senza sintomi e/o segni di crioglobuline circolanti.

La definizione di SCM, in un paziente positivo alle crioglobuline sieriche, è il risultato di una accurata valutazione di più parametri e la diagnosi viene effettuata in caso di positività di almeno due delle seguenti condizioni:

- positività ad un questionario proposto al paziente (risposta affermativa a due domande su tre) (Tab. 1);
- positività al questionario, secondo i criteri precedentemente indicati e positività di almeno due dei tre parametri ematici valutati con test di laboratorio ed includenti: ridotto livello della componente C4 del complemento, positività al Fattore Reumatoide (FR) e presenza di una componente M, caratteristica delle crioglobuline di tipo I e II al test di immunoelettroforesi delle Ig (Tab. 1).
- positività ai test di laboratorio (due su tre dei parametri valutati, come già descritto) e ad almeno tre delle quattro categorie di sintomi clinici riportati nella tabella 1.

<p>1) QUESTIONARIO: positivo con due risposte affermative alle tre seguenti domande:</p> <p>✓ Ha mai avuto uno o più episodi di piccole macchie rosse sulla pelle, soprattutto a livello degli arti inferiori?</p> <p>✓ Ha mai avuto piccole macchie rosse che esitavano poi in un color brunastro dopo la loro scomparsa?</p> <p>✓ Le è stata mai diagnosticata un'epatite virale?</p> <p>2) PARAMETRI BIOUMORALI: positività ad almeno due su tre dei seguenti test di laboratorio:</p> <p>✓ Livelli sierici ridotti di C4</p> <p>✓ Fattore Reumatoide positivo</p> <p>✓ Presenza della componente M nel siero</p>	<p>3) SINTOMI CLINICI: <u>positività ad almeno tre</u> delle seguenti categorie (presente o pregressa)</p> <p>✓ <u>Sintomi costituzionali:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Astenia 2. Febbre (37-37.9°C per più di 10 giorni senza cause apparenti) 3. Febbre (>38°C senza cause apparenti) 4. Fibromialgia <p>✓ <u>Coinvolgimento articolare:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Artralgia 2. Artrite <p>✓ <u>Coinvolgimento vascolare:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Porpora 2. Ulcere cutanee 3. Vaculite necrotizzante 4. Sindrome da Iperviscosità 5. Fenomeno di Rainaud <p>✓ <u>Coinvolgimento neurologico:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Neuropatia periferica 2. Coinvolgimento del nervo craniale 3. Coinvolgimento vascolare del SNC
--	--

Tabella 1: Schema dei parametri utilizzati per la definizione di Sindrome Crioglobulinemica

Linfoma Non-Hodgkin (LNH)

L'HCV è considerato un classico esempio di agente infettivo capace di causare l'insorgenza di un linfoma Non-Hodgkin attraverso la persistente stimolazione del sistema immunitario. Tuttavia, lo specifico meccanismo patogenetico operato dall'HCV tramite l'infezione delle cellule B non è stato tuttora chiarito, anche se sono state formulate molteplici ipotesi.

L'evidenza più semplice del ruolo oncogenico svolto da HCV nella patogenesi del LNH proviene da studi condotti su ampie popolazioni di soggetti sottoposti a trattamento antivirale; infatti è stato osservato che in seguito a terapia anti-HCV standard con interferone peghilato e ribavirina, è possibile osservare, nei pazienti HCV positivi, la remissione parziale o completa del linfoma, mentre lo stesso non avviene nei pazienti con linfoma HCV-negativi [112].

Anche dal punto di vista epidemiologico emergono dati estremamente interessanti. Infatti è stato osservato che l'associazione tra infezione HCV e LNH è maggiore nelle aree geografiche con più alta prevalenza dell'infezione virale [113]. In una recente meta-analisi di 15 studi selezionati, il rischio relativo totale di sviluppare LNH in caso di infezione HCV è stato calcolato almeno 2 volte maggiore rispetto alle popolazioni di controllo [114]. Inoltre il rischio relativo di LNH è risultato più elevato nelle zone ad alta prevalenza di infezione HCV, in confronto alle aree a più bassa prevalenza. Questo dato conferma le precedenti osservazioni provenienti da paesi a bassa diffusione dell'HCV, dove non era stato possibile mettere in evidenza un'associazione significativa tra HCV e LNH. La spiegazione di questo dato è probabilmente dovuta alla scarsa numerosità, in questi studi, della popolazione HCV positiva [115].

Dal punto di vista patogenetico, la determinazione del genoma virale solo in una parte di cellule B neoplastiche, contrapposta ad un più frequente riscontro sia del genoma che delle proteine virali nelle cellule stromali che circondano le cellule neoplastiche, suggerisce che specifici cloni B cellulari proliferino come conseguenza di una stimolazione antigenica cronica sostenuta dall'HCV. A sostegno di questa ipotesi si trovano numerosi lavori scientifici che mostrano come i geni della regione variabile delle immunoglobuline espressi dalle cellule B di LNH presentino mutazioni somatiche indicanti un processo di selezione antigenica [116]. Inoltre è stato osservato che la sequenza aminoacidica dei recettori espressi sulla membrana delle cellule B in caso di linfoproliferazione HCV-correlata è estremamente simile a quella degli anticorpi anti-HCV [117].

La trasformazione neoplastica può anche essere il risultato di un meccanismo antiapoptotico diretto operato dall'HCV all'interno dei linfociti B; infatti non solo sono state determinate sequenze di HCVRNA in campioni biopsici di linfonodi provenienti da pazienti con LNH [118], ma è stata dimostrata anche la presenza di proteine virale all'interno delle cellule neoplastiche [119].

Una delle teorie più accreditate sui meccanismi patogenetici alla base della linfoproliferazione associata all'infezione HCV riguarda il legame dell'HCV ai recettori di membrana dei linfociti B; si ipotizza che questo evento abbassi la loro soglia di attivazione in risposta alla stimolazione antigenica, induca mutazioni a livello del DNA e, soprattutto, provochi un aumento della frequenza di traslocazioni cromosomiche associate a LNH [120, 121]. Responsabile della proliferazione policlonale B cellulare alla base della linfomagenesi HCV-correlata sembra essere la proteina virale E2. Infatti l'identificazione di uno specifico binding tra la proteina virale E2 e il recettore di membrana CD81, espresso sulla superficie di tutti i linfociti B, ha consistentemente supportato l'ipotesi che la prolungata

stimolazione di linfociti B in risposta agli antigeni virali favorisca lo sviluppo di malattie linfoproliferative [122].

Diversi lavori condotti anche dal nostro gruppo di ricerca, hanno mostrato una significativa associazione tra l'infezione HCV e il riarrangiamento di Bcl-2, o traslocazione t(14;18) [123, 124]. In questi studi è stata dimostrata la presenza sia di un'espansione clonale B cellulare albergante la traslocazione t(14;18), sia dell'overespressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 [123, 125]. A conclusione di tali osservazioni, risultano di notevole interesse i dati riguardanti gli effetti del trattamento con terapia interferonica anti-HCV sui pazienti HCV con LNH. Infatti, in questi soggetti, in seguito alla clearance virale è stato possibile osservare la scomparsa della traslocazione t(14;18) e la remissione del LNH, indicando un ruolo chiave svolto dall'HCV nei meccanismi patogenetici alla base del linfoma non-Hodgkin [126-128].

TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE CRONICA HCV

Standard of Care

Il trattamento dell'epatite C ha subito una rapida evoluzione nell'ultimo decennio. Ancora nella seconda metà degli anni novanta la sola terapia disponibile era la monoterapia con IFN- α , con un'efficacia limitata ed un rapporto costo/beneficio non vantaggioso. La terapia utilizzata attualmente (Standard of Care: SOC), associa l'IFN- α peghilato e la RBV per periodi oscillanti fra 6 e 12 mesi a seconda del genotipo e della carica virale.

L'IFN ha delle proprietà antivirali non specifiche ed immunomodulanti; in particolare il suo effetto antivirale, mediato dall'attivazione della trascrizione a livello nucleare di numerosi geni bersaglio, interviene sia a livello della replicazione intracellulare dell'HCV che sulla prevenzione della reinfezione o infezione degli epatociti sani. A causa della breve emivita, l'IFN persiste nel siero solo per poche ore; per questo motivo, da qualche anno viene utilizzato un IFN cosiddetto peghilato, in quanto è associato a delle molecole idrosolubili di PoliEtilenGlicole (PEG), che gli conferiscono una maggiore biodisponibilità, solubilità e stabilità, migliorandone notevolmente la farmacocinetica, diminuendone allo stesso tempo l'immunogenicità e consentendo una copertura continua in termini di attività antivirale. La RBV invece è un analogo nucleosidico che determina un aumento, definito "catastrofico", della frequenza di errore della polimerasi virale, ma che risulta agire soprattutto come "helper" dell'IFN per le sue proprietà immunomodulanti.

Nel complesso l'efficacia di questa terapia si aggira intorno a percentuali inferiori al 50% ma varia notevolmente a seconda del genotipo virale (i genotipi 1 e 4 rispondono in modo peggiore rispetto ai genotipi 2 e 3, mentre si sa molto poco sulla risposta dei genotipi 5 e 6), della carica virale, del grado di fibrosi epatica al momento dell'inizio del trattamento, dell'età e del sesso del paziente; inoltre,

l'alto tasso di mutazione virale può determinare la comparsa di mutanti resistenti e spiegare in parte la resistenza del virus al trattamento.

L'introduzione del PEG-IFN, sempre in associazione con la RBV, ha portato ad un aumento dell'efficacia al 40% per il genotipo 1 e fino al 75% per i genotipi 2 e 3 considerati cumulativamente [129-131].

Sul piano economico, il fattore limitante dell'utilizzo su larga scala di queste terapie è rappresentato dagli elevati costi. Al fine di razionalizzare l'impiego di questi farmaci, sarà quindi necessario definire linee guida volte ad identificare i pazienti da trattare attraverso un'analisi costo-beneficio basata sulle caratteristiche individuali pre-trattamento, quali il genotipo dell'IL28B, un predittore di esito della terapia di recente scoperta, lo stadio di fibrosi, i livelli di HCV-RNA e la risposta ai precedenti trattamenti, e in corso di terapia, l'andamento della viremia.

Sulla base della risposta alla terapia con IFN si distinguono tre categorie di pazienti:

1. *pazienti con risposta virologica sostenuta ('sustained virologic responder', SVR):* vengono così definiti i pazienti che mostrano una negativizzazione della viremia e che rimangono HCV-RNA negativi nel siero per almeno 6 mesi dall'interruzione del trattamento;
2. *pazienti con totale risposta alla terapia, ma con ricaduta dopo la sospensione:* questi pazienti, definiti *relapser*, rispondono inizialmente alla terapia, ma, dopo settimane o mesi dalla cessazione del trattamento, l'HCV-RNA è nuovamente presente nel siero;
3. *pazienti che non rispondono alla terapia:* in questi pazienti, definiti "*non responders*", l'HCV-RNA sierico rimane determinabile durante la terapia.

Dal momento dell'introduzione dell'IFN per la terapia dell'infezione cronica da HCV, si è cercato di identificare possibili fattori predittivi di risposta. Ad oggi è noto che i principali fattori predittivi di risposta sono caratteristici rispettivamente del virus e dell'ospite, che influenzano significativamente la clearance virale.

Tra i fattori predittivi di risposta correlati al virus, troviamo prima di tutto il genotipo virale, in base al quale sono previsti trattamenti terapeutici di durata diversa: i cosiddetti genotipi "difficili", 1a, 1b e 4, prevedono un trattamento di 48 settimane, mentre, i genotipi definiti "facili", 2a/2c e 3, prevedono protocolli terapeutici di 24 settimane.

Altri fattori predittivi di risposta correlati al virus sono: la carica virale *pre-treatment* e la cinetica virale. Nello specifico, è stato osservato da Brunetto e collaboratori [132] che una diminuzione della carica virale di almeno 2 log nelle prime 12 settimane di trattamento, sia direttamente proporzionale ad una risposta virologica a lungo termine.

Anche per quanto riguarda l'ospite sono ben noti alcuni predittori di risposta al trattamento quali età, sesso, grado di malattia epatica, BMI ed etnia oltre a fattori genetici recentemente evidenziati che verranno descritti in modo approfondito nei paragrafi successivi.

I farmaci di nuova generazione: gli inibitori dell'NS3

È ormai avviata la commercializzazione di nuovi farmaci anti-HCV, da associare alla terapia con IFN peghilato e RBV. Queste molecole, al momento somministrate nell'ambito di strutture ospedaliere, sono state introdotte con i nomi di Boceprevir e Telaprevir.

Tali farmaci presentano uno stesso meccanismo di azione: sono inibitori della proteasi NS3 dell'HCV; legandosi in modo covalente ma reversibile, al sito attivo della proteasi NS3, bloccano la replicazione virale nelle cellule dell'ospite e agiscono quindi in modo diverso sia

dell'IFN che della RBV. Diverse sono le modalità di somministrazione: il Boceprevir viene introdotto dopo 4 settimane di induzione con Peg-IFN e RBV, per 44 settimane, mentre Telaprevir viene somministrato in associazione alla SOC sin dall'inizio, per una durata complessiva di 12 settimane.

Diversi sono anche i dosaggi di questi nuovi farmaci: il Boceprevir si presenta in capsule rigide da 200mg da assumere in numero di 4 per 3 volte al giorno ogni 8 ore.

Il dosaggio del Telaprevir è di 750mg (2 cp da 375mg) da assumere 3 volte al giorno, anche in questo caso ogni 8 ore.

Per entrambi i medicinali la somministrazione deve obbligatoriamente avvenire insieme all'assunzione di cibo allo scopo di aumentarne la biodisponibilità.

Boceprevir e Telaprevir rappresentano quindi una nuova generazione di farmaci che apre maggiori prospettive di successo terapeutico come dimostrano i risultati del loro impiego, registrati fino ad adesso dagli studi campione. La loro associazione alla terapia standard nei pazienti con genotipo 1, mai trattati con antivirali, ha consentito di ottenere percentuali di risposta sostenuta del 67-75%, a fronte del 40-44% dell'attuale SOC [133]. Per quanto riguarda invece pazienti *non-responder* o *relapser* ad un precedente trattamento con la SOC, l'associazione di Boceprevir, consente di ottenere una risposta virologica sostenuta del 40-50% nei *non responder* e del 60-70% nei *relapser* rispetto ad una risposta virologica sostenuta del 7-18% di un nuovo trattamento con solo PEG-IFN+RBV [134]. Analoghi risultati sono stati ottenuti con Telaprevir in pazienti *naive* [135] e in pazienti precedentemente trattati [136].

Queste nuove terapie non sono però esenti da bias sia da un punto di vista di effetti collaterali diretti a carico del paziente (soprattutto rash per Telaprevir e anemizzazione per Boceprevir) sia da un punto di vista strettamente virologico, in quanto inducono l'insorgenza di varianti virali resistenti.

I timori maggiori riguardano il possibile sviluppo di mutazioni della proteasi di HCV che potrebbero rendere il virus resistente al Boceprevir e al Telaprevir, definiti, per il loro meccanismo di azione, antivirali diretti (*Direct Acting Antiviral* DAA). Gli studi clinici disponibili al momento, hanno effettivamente dimostrato la presenza di mutazioni puntiformi delle proteasi virali nei pazienti che non riescono a mantenere una risposta nel tempo. É chiaro inoltre che, dal momento che il Boceprevir e il Telaprevir condividono lo stesso meccanismo di azione, una resistenza sviluppata durante la somministrazione di uno dei due escluderà un futuro trattamento con l'altro.

Una prospettiva realistica per il 2020 è quindi quella di poter avere a disposizione terapie antivirali ugualmente efficaci su tutti i genotipi e capaci di indurre una completa eradicazione virale in tutte le tipologie di pazienti con epatite cronica HCV senza l'impiego di interferone peghilato, in modo da trattare soggetti con cirrosi scompensata e, in generale, pazienti per cui l'interferone è controindicato.

Trattamento dell'SCM in pazienti HCV-positivi

Da quando è stato scoperto l'HCV, è stato dimostrato che la grande maggior parte dei casi di CM, che precedentemente era definita essenziale o idiopatica, potevano essere attribuiti al virus [137]. Le crioglobuline circolanti si rintracciano frequentemente in pazienti HCV positivi, ma solo una minoranza di pazienti con infezione cronica da HCV (solitamente donne con età superiore ai 50 anni), sviluppa una Sindrome Crioglobulinemica franca (SCM) [138]. Anche se considerata "malattia rara", la SCM non è in realtà poco diffusa nei paesi dell'Europa meridionale dove la prevalenza dell'infezione da HCV è alta, soprattutto nella popolazione più anziana.

Il trattamento dell'SCM risulta spesso di non facile approccio, data la varietà di pattern clinici con cui essa si manifesta. Per questa

ragione la terapia dell'SCM che ha come obiettivi la prevenzione del danno d'organo irreversibile, la riduzione del dolore e quindi il miglioramento della qualità di vita del paziente, è al momento, ancora largamente empirica e affidata alle singole esperienze del clinico. Ogni approccio terapeutico razionale dovrebbe avere 3 principali obiettivi: l'eradicazione dell'HCV, la limitazione o soppressione della linfoproliferazione e il contenimento dei sintomi della vasculite per la riduzione del danno causato dagli immuno-complessi circolanti [139].

Data l'associazione molto stretta tra SCM e infezione cronica HCV, molti studi hanno valutato l'efficacia della terapia antivirale da un punto di vista di risposta clinica della SCM [122].

Peraltro, anche prima dell'identificazione dell'HCV, l'IFN- α , al momento alla base del trattamento eziologico dell'epatite cronica HCV, veniva usato con successo per trattare la CM [140, 141], a causa dei suoi effetti antiproliferativi e immunomodulatori.

Il trattamento dell'SCM ha essenzialmente seguito l'evoluzione della terapia dell'infezione cronica HCV anche se, ripercorrerne l'iter potrebbe non risultare facile a causa dell'eterogeneità dei regimi di trattamento, dei diversi criteri di selezione dei pazienti, delle valutazioni di risposta e dei piccoli numeri di soggetti valutati negli studi pubblicati sull'argomento [122]. I primi studi riportanti gli effetti dell'IFN somministrato in monoterapia, descrivevano la remissione dei sintomi nella maggior parte dei pazienti trattati, beneficio in realtà spesso transitorio, con un'alta frequenza di relapser alla fine della terapia [142-150]. In ogni caso però, la presenza della SCM non influenzava l'esito della risposta all'IFN da un punto di vista strettamente virologico [151, 152].

Come noto, l'introduzione della RBV ha aumentato il tasso di eradicazione virale e migliorato la cura della sintomatologia rispetto alla monoterapia [153-158], anche se, solo i pazienti che rispondevano completamente da un punto di vista virologico,

ottenevano parallelamente una completa risposta clinica [153, 154, 156-158].

Nel corso degli ultimi 10 anni, lo sviluppo di IFN peghilati (Peg-IFN) α -2a e α -2b, con prolungata biodisponibilità e miglior efficacia antivirale rispetto IFN standard, ha aperto nuove opportunità per il trattamento dell'epatite cronica HCV e della SCM ad essa correlata [129-131]. Come già spiegato, Peg-IFN e RBV sono al momento considerati come lo *Standard Of Care* (SOC) per il trattamento dell'HCV con un 40-50% di SVR per i genotipi 1 e 4 e circa l'80% di SVR per i genotipi 2 e 3 [159]. Studi molto recenti condotti su pazienti con SCM HCV correlata e sottoposti al trattamento con la SOC, riportano che, solo in casi sporadici, si aveva persistenza delle crioglobuline sieriche o dei sintomi, dopo aver raggiunto una completa eradicazione virale [160, 161].

Sono inoltre descritti in letteratura dei casi di peggioramento [162] di alcuni disordini pre-esistenti e spesso subclinici, in particolare, in seguito al trattamento di pazienti SCM con neuropatie periferiche o con ulcere cutanee attive. Tali effetti, dovuti alle proprietà immunomodulanti dell'IFN, non risultano sfortunatamente di facile previsione e, l'unica strategia da adottare, è quella di somministrare con particolare attenzione la terapia antivirale a queste categorie di pazienti [138].

Attualmente sono veramente limitati i dati relativi al trattamento della CM HCV-correlata con i farmaci antivirali diretti di nuova generazione, Boceprevir e Telaprevir. L'esperienza personale del team clinico del centro Masve dell'Università di Firenze, condotta su un numero limitato di pazienti HCV con SCM, nell'ambito di un Named Patient Protocol (NPP) destinato all'uso compassionevole di Boceprevir, ha riportato un minore tasso di risposta dei pazienti crioglobulinemici rispetto ai pazienti con la sola infezione cronica HCV. Tuttavia, la stessa differenza di risposta alla terapia eradicante tra pazienti HCV con e senza CM è stata osservata anche all'interno di un

ampio studio prospettico, condotto dallo stesso centro, che prevedeva la somministrazione di duplice terapia antivirale (Peg-IFN e RBV) secondo lo Standard of Care.

In sintesi, nella pratica clinica il trattamento dell'SCM dovrebbe essere il più possibile adattato al singolo paziente, sulla base della gravità delle manifestazioni cliniche [138, 163, 164].

In conclusione:

- L'eliminazione dell'HCV-RNA è associata ad un miglioramento o addirittura alla scomparsa delle manifestazioni cliniche e di laboratorio dell'SCM HCV-relata nella maggior parte dei pazienti con SVR.
- La terapia eziologica finalizzata all'eradicazione virale dovrebbe essere considerata come opzione terapeutica di prima scelta in pazienti con SCM lieve-moderata in assenza di particolari controindicazioni.
- La possibile insorgenza o il peggioramento di alcune manifestazioni vasculitiche, come la neuropatia periferica e le ulcere cutanee, dovrebbero essere attentamente valutate prima di iniziare il trattamento eziologico.

microRNA

I microRNA (comunemente detti anche miRNA) costituiscono una classe di RNA non codificante, caratterizzato da una lunghezza di circa 20-25 nucleotidi, capace di regolare l'espressione genica attraverso il classico meccanismo di "base pairing" tra la sequenza nucleotidica dello stesso miRNA e la sequenza nucleotidica del gene target, classicamente collocata in posizione 3' UTR del mRNA [165].

La biogenesi dei microRNA è particolarmente articolata e schematizzata nella figura 7. Per prima cosa essi vengono trascritti come parti di precursori più lunghi, detti pri-miRNA; questi trascritti primari sono capaci di organizzarsi in una particolare struttura a forcina. I pri-miRNA vengono quindi processati nel nucleo per opera dell'enzima Drosha, una RNasi di tipo III di classe 2, e trasportati nel citoplasma dall'esportina 5; qui vengono finalmente processati dalla ribonucleasi Dicer [166]. I microRNA maturi vengono incorporati dal complesso proteico RISC (RNA-induced silencing complex), associato a sua volta alla proteina Argonata. All'interno del complesso RISC, la sequenza di RNA a singolo filamento viene linearizzata grazie all'attività elicastica di Dicer e guidata verso la localizzazione del gene target, provocando la stabilizzazione del mRNA e l'inibizione della sua trascrizione [167].

A partire dalla scoperta dei microRNA intorno alla metà degli anni '90, nonostante i notevoli progressi conseguiti nel corso degli ultimi anni nella comprensione della loro biologia, rimangono tuttora da chiarire diversi aspetti legati alle loro funzioni all'interno delle cellule e degli organismi, e le conoscenze riguardanti i loro meccanismi d'azione e la loro regolazione sono in continua evoluzione. Una questione attualmente oggetto di numerosi studi è, ad esempio, lo studio di espressione dei geni target relativamente all'alterazione di espressione di uno specifico microRNA. Infatti è possibile identificare

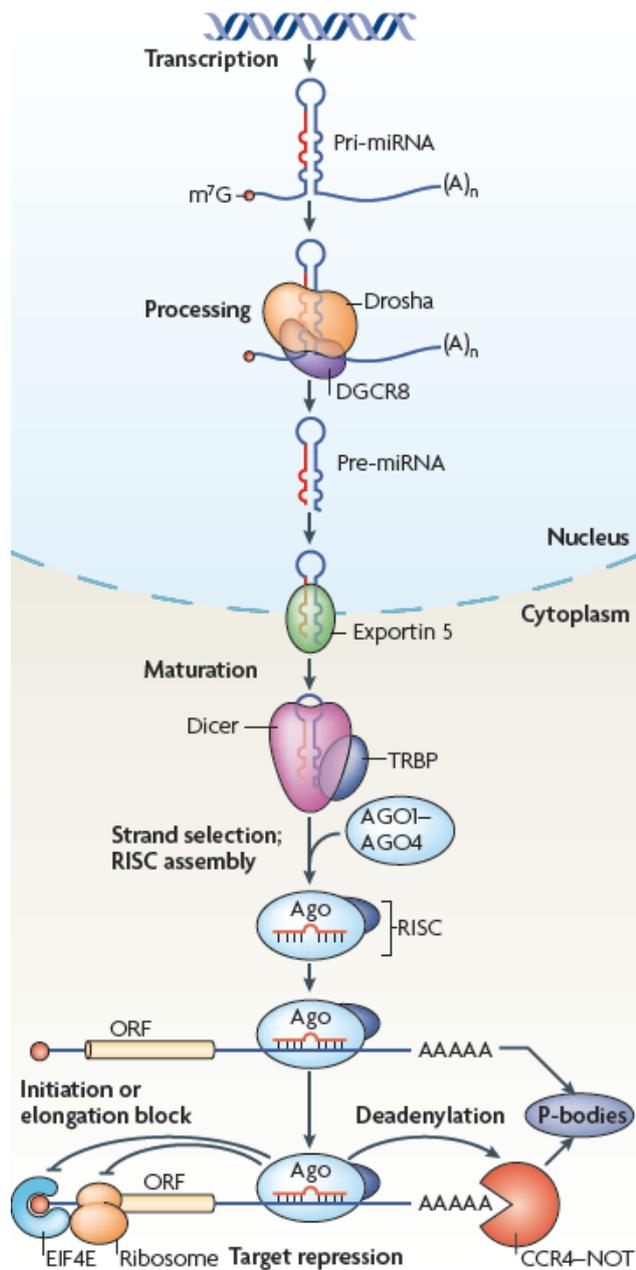


Figura 7: biogenesi e meccanismo d'azione dei microRNA (da Inoui et al., 2010)

per ogni miRNA un consistente numero di possibili geni bersaglio, anche con funzioni molto diverse tra loro, e nella maggior parte dei casi non risulta ancora possibile stabilire se l'effetto dell'azione regolatrice operata dal microRNA sia la stessa per ognuno, o se intervengano altri fattori cellulari modulanti. Risulta quindi evidente come siano necessari ancora molti studi, focalizzati principalmente sulla comprensione del ruolo svolto dai microRNA nella regolazione di

complessi meccanismi cellulari alla base di numerosi pathways biologici.

microRNA e disordini linfoproliferativi

Così come i microRNA sono implicati nei normali processi cellulari fisiologici, risulta inevitabile che la loro disregolazione sia associata anche ad un'ampia varietà di patologie. Infatti i microRNA, per la loro fondamentale proprietà di regolare l'espressione genica, svolgono un ruolo chiave in una varietà di meccanismi, sia fisiologici che patologici, in particolare nella regolazione del sistema immunitario e nello sviluppo di patologie neoplastiche.

Nel campo delle malattie autoimmuni, la maggior parte dei dati disponibili in letteratura riguarda l'artrite reumatoide (AR). Diversi studi hanno descritto un'alterazione dell'espressione di alcuni microRNA nelle sinovie dei pazienti con AR, in particolare è stata evidenziata un'up-regolazione di miR-146a, miR-155 e miR-16 a livello dei tessuti sinoviali e delle cellule del sangue periferico [168, 169]. L'osservazione dell'up-regolazione di miR-155, miR-146, miR-16 e miR-132 nelle PBMC e nei fibroblasti isolati dalle sinovie di pazienti con AR ha ulteriormente confermato il coinvolgimento di tali miRNA nella patogenesi di tale malattia [170].

I meccanismi attraverso i quali l'aumentata espressione di tali microRNA contribuisce alla patogenesi dell'artrite reumatoide non sono ancora stati chiariti, anche se l'ipotesi maggiormente accreditata è che siano responsabili del mantenimento cronico dei processi infiammatori.

Alcuni studi scientifici riguardano anche un'altra patologia autoimmune estremamente interessante, il Lupus Eritematoso Sistemico (LES). Anche in questo caso, l'alterazione dell'espressione di diversi microRNA è stata associata a questa malattia, in particolare sono stati osservati peculiari profili di espressione di miRNA nelle

PBMC isolate da pazienti con LES rispetto alla popolazione di controllo [171].

Come anche nella maggioranza delle malattie autoimmuni/linfoproliferative, un'alterazione del pattern di espressione dei microRNA è stata dimostrata anche nella maggior parte dei tumori umani. I microRNA sono capaci di alterare i pathways molecolari responsabili dello sviluppo delle neoplasie sia intervenendo nella biologia delle cellule staminali tumorali, sia regolando i meccanismi di angiogenesi, transizione epitelio-mesenchima, metastasi e resistenza ai farmaci, sia modificando l'espressione di vari soppressori tumorali e oncogeni target.

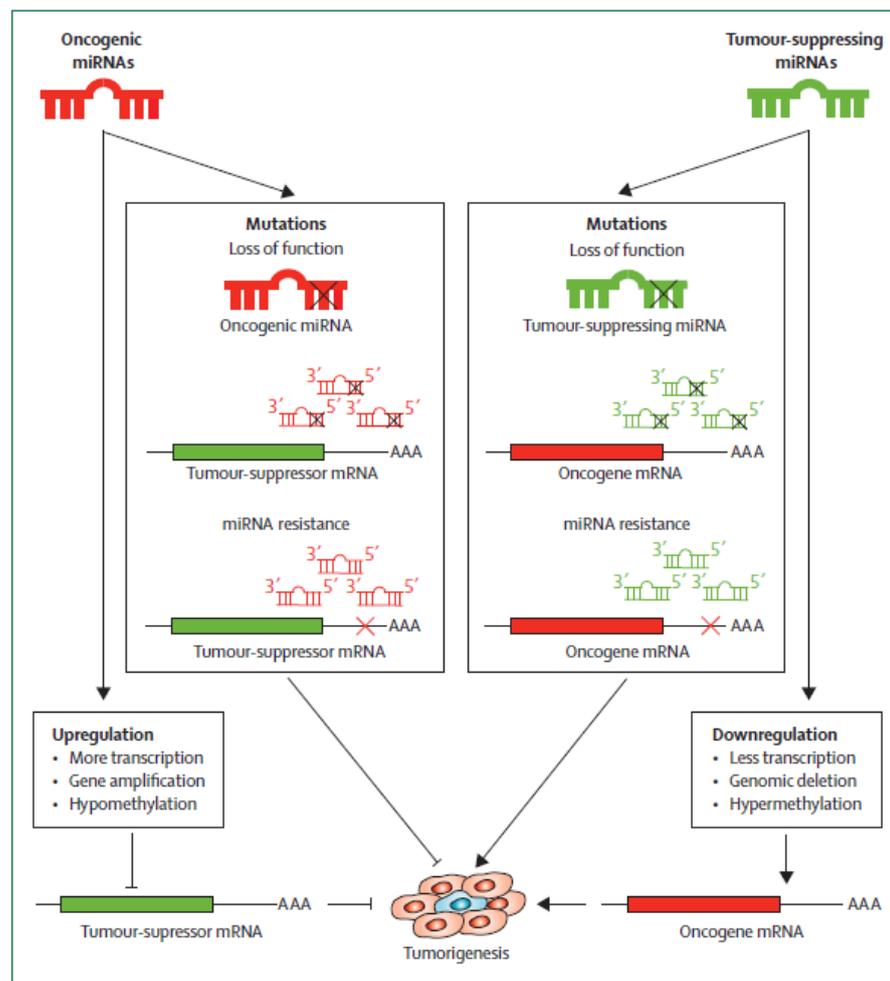


Figura 8: Regolazione della tumorigenisi da parte dei microRNA (da Kong et al., 2012)

Poiché la regolazione epigenetica operata dai microRNA dipende anche dall'espressione dei relativi geni target, l'effetto di uno specifico miRNA può variare a seconda del tipo cellulare o delle condizioni biologiche.

L'elenco dei microRNA risultati coinvolti nei meccanismi di iniziazione e progressione tumorale sta continuamente crescendo ed alcune di queste molecole sono state definite onco-miRNA [172]. MiR-21 può essere considerato uno dei principali onco-miRNA. Questo microRNA risulta infatti over-espresso nella maggior parte dei tumori, sia solidi che linfatici; inoltre, l'aumentata espressione di miR-21 determina la crescita, il mantenimento e la sopravvivenza delle cellule tumorali *in vivo* [173, 174]. Diversi geni soppressori tumorali sono stati identificati come target di mir-21, la cui over-espressione può quindi determinare un aumento della proliferazione e un'inibizione dell'apoptosi [175, 176].

Grazie ai particolari profili di espressione di determinati microRNA è possibile distinguere non solo un tessuto sano da uno neoplastico, ma anche discriminare diversi sottotipi di particolari tumori o individuare specifiche anomalie genetiche [177, 178]. Ancora più interessante sono le recenti osservazioni di diversi gruppi scientifici che hanno dimostrato come lo studio del profilo di espressione di alcuni microRNA sia capace di predire l'outcome di malattia o la risposta alla terapia. I primi lavori a riguardo sono stati pubblicati sulla leucemia linfatica cronica (LLC) [179] e sul tumore al polmone ([180]; in entrambi i casi, specifici miRNA sono risultati essere un fattore prognostico di progressione di malattia. In seguito simili osservazioni sono state ottenute anche per molti altri tipi di tumore [181-183].

Pertanto risulta evidente che peculiari profili di espressione di microRNA possano costituire un valido ed accurato sistema sia di classificazione tumorale e che di valutazione diagnostica e terapeutica.

Poiché determinati microRNA controllano non solo punti cruciali dello sviluppo e funzionamento del sistema immunitario, ma anche diversi passaggi del processo di maturazione delle cellule emopoietiche, l'alterazione della loro espressione è considerata una delle cause principali di diverse malignità ematologiche, e risulta associata anche alla prognosi e alla manifestazione dei diversi fenotipi.

A partire dalla prima osservazione che poneva l'attenzione sull'importanza del ruolo svolto dai microRNA nella patogenesi dei tumori linfatici, moltissimi lavori scientifici hanno confermato il loro coinvolgimento in tali neoplasie.

In particolare miR-155, miR-146a, miR-21 and miR26b sono risultati associati alla patogenesi di diversi tipi di linfoma, e specificamente a quelli più frequenti in corso di infezione HCV (linfomi della zona marginale -MZL- e linfomi diffusi a grandi cellule B - DLBCL-) [184-186]. Inoltre è stato dimostrato che una disregolazione di miR-21 e miR-26b risulta associata, rispettivamente, anche allo sviluppo di epatocarcinoma e ad un peggior outcome di terapia [187, 188].

I microRNA rappresentano una classe di ottimi marcatori biologici anche per un'altra importante caratteristica che li contraddistingue: essi infatti, a differenza dell'mRNA, mostrano un'elevata resistenza alla degradazione e i loro livelli nei tessuti o nelle cellule analizzate rimangono sufficientemente stabili nel tempo.

Inoltre, la possibilità di valutare la loro espressione nei liquidi corporei, come sangue intero o siero, tramite procedure non invasive, aumenta enormemente il loro potenziale come biomarcatori [189].

In conclusione, sebbene siano necessari ulteriori studi che estendano la comprensione dei meccanismi patogenetici responsabili di tali malattie, è chiaro che i microRNA rivestano un ruolo fondamentale come marcatori biologici, sia diagnostici che prognostici, in una grande varietà di malattie.

Ad oggi, la disponibilità di dati riguardanti i disordini extraepatici HCV correlati è veramente limitata e soprattutto non esistono informazioni riguardanti la crioglobulinemia mista HCV-correlata.

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questa tesi di dottorato è quello di valutare i livelli di espressione di un panel di microRNA, precedentemente risultati coinvolti in vari disordini linfoproliferativi e/o autoimmuni, in un'ampia e ben caratterizzata popolazione di soggetti con infezione cronica HCV, con o senza tali disordini. Tale analisi è tesa all'identificazione dell'alterazione di specifici microRNA, al fine di individuare possibili nuovi biomarcatori e sviluppare nuove misure sia diagnostiche che prognostiche.

PAZIENTI E METODI

Pazienti

Nello studio sono stati inseriti 167 pazienti con infezione cronica HCV, reclutati consecutivamente presso l'ambulatorio del Centro Masve nel periodo compreso tra Gennaio 2009 e Dicembre 2010.

Tali pazienti sono stati suddivisi secondo la presenza/assenza di disordini linfoproliferativi HCV-correlati nei seguenti gruppi: 75 pazienti con CM, definita secondo i criteri classificativi attuali (CM-HCV), 11 pazienti con LNH, principalmente marginal zone (LNH-HCV), 81 pazienti senza alcun segno o sintomo di disordine linfoproliferativo o autoimmune. Le principali caratteristiche demografiche e cliniche di tali pazienti sono riportate nella Tabella 2.

Nello studio sono stati inseriti anche 35 donatori sani (DS) come controllo negativo, e 35 pazienti con malattia epatica non HCV-correlata (pazienti con epatite cronica HBV, reclutati consecutivamente nello stesso periodo al fine di effettuare trattamento anti-HBV).

Le principali manifestazioni cliniche dei pazienti con CM sono riportate nella Tabella 3. La maggior parte dei pazienti presentava astenia (92%), artralgia (82.7%) e porpora (77.3%). Tra le altre manifestazioni osservabili si trovavano sintomi neuropatici (69.3%), e, in misura minore, coinvolgimento renale (14.7%) e ulcere cutanee (10.7%).

Per quanto riguarda invece i pazienti HCV con LNH, la maggior parte di essi (8/11) presentava una sindrome crioglobulinemica con relativa sintomatologia ad essa associata, in particolare costituita da porpora (75%), artralgia (65%), neuropatia periferica (53%), coinvolgimento renale (11%), sicca sindrome (20%), con frequenze simili a quelle osservate nel gruppo di pazienti con la sola CM.

	DS (n=35)	HCV (n=81)	CM-HCV (n=75)	LNH- HCV (n=11)	p value
Età media (anni)	38±11.6	55.1±12.1	60.6±14.5	60.5±6.5	<i>p</i> < 0.01*
Sesso (M/F)	19/16	60/21	19/56	2/9	<i>p</i> < 0.05**
Istologia					<i>p</i> < 0.05***
Epatite Cronica		66	47	9	
Cirrosi		15	28	2	
NMZL				2	
SMZL				8	
DLBCL				1	
ALT[^] (ULN)	0.74±1.6	1.68±1.1	1.07±0.6	1.54±0.5	ns
Viremia (IU/mL x 10 ⁶)	-	3.0±3.9	3.5±7.4	3.1±2.2	ns
Genotipo HCV					ns
1		53	38	6	
2		14	33	3	
3		12	3	1	
4		2	1	1	
Criocrito medio (%)	0	0	11.7±17.1	4.8±5.4	<i>p</i> < 0.01°
C3[#] medio (mg/dL)	121±23	108±23	91±24	89±17	ns
C4[†] medio (mg/dL)	111±25	105±27	8±7	6±6	<i>p</i> < 0.01°
RF[†] medio (IU/mL)	14±7	16±8	273±126	322±159	<i>p</i> < 0.01°

Tabella 2. Principali caratteristiche demografiche, cliniche e sierologiche di 35 donatori sani (DS) e 167 pazienti con infezione cronica HCV, distinti in: pazienti senza alcun segno o sintomo di disordine linfoproliferativo/autoimmune (HCV); pazienti con crioglobulinemia mista (CM-HCV); pazienti con linfoma non Hodgkin's HCV-correlato (LNH-HCV).

I risultati sono riportati come media ± deviazione standard standard deviation.

ns, non significativo; [^]ALT, alanina aminotransferasi; ULN, upper limit of normal.

[#] Complemento C3, valori di riferimento: 83 - 177 mg/dL; [†] Complemento C4, valori di riferimento: 20 - 150 mg/dL; [†]Fattore Reumatoide, valori di riferimento: < 25 IU/mL

*DS vs HCV; DS vs CM-HCV; DS vs LNH-HCV; HCV vs CM-HCV

** DS vs CM-HCV; DS vs LNH-HCV; HCV vs CM-HCV; HCV vs LNH-HCV

***HCV vs CM-HCV

°DS o HCV vs CM-HCV o LNH-HCV

Manifestazioni di CM	Pazienti (n=75)	(%)
Porpora	58	77.3
Artralgia	62	82.7
Stanchezza	69	92
Sintomi neuropatici	52	69.3
Coinvolgimento renale	11	14.7
Ulcere cutanee	8	10.7
Sindrome Sicca	25	33.3

Tabella 3. Principali manifestazioni cliniche della CM nei 75 pazienti HCV con CM (CM-HCV).

Il gruppo di pazienti MC-HCV includeva un sottogruppo di 35 pazienti che aveva ottenuto una risposta virologica sostenuta ed una risposta clinica completa ad almeno 6 mesi dalla fine della terapia antivirale.

La presenza dell'infezione HCV è stata valutata mediante ricerca sia degli anticorpi circolanti anti-HCV (EIA-2 e RIBA-2, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ), sia dell'HCVRNA (AMPLICOR HCV Test, v2.0. Roche Diagnostics, Alameda, CA).

Il genotipo HCV è stato determinato attraverso test diagnostico commerciale certificato (VERSANT HCV Genotype 2.0, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL).

L'entità del danno epatico è stata definita attraverso criteri standard basati sulla biopsia epatica e la stadiazione istopatologica è stata basata sull'algoritmo METAVIR [60].

La presenza e la caratterizzazione di crioglobuline sieriche circolanti, i livelli delle frazioni del complemento (C3 e C4), di fattore

reumatoide (FR) e di autoanticorpi sono stati valutati secondo modalità precedentemente descritte [81, 84]. La diagnosi di crioglobulinemia mista è stata effettuata secondo criteri già descritti [121]. In particolare, i pazienti con CM presentavano crioglobuline rintracciabili nel siero per un periodo maggiore di 6 mesi e almeno due delle seguenti caratteristiche: porpora palpabile, positività all'IgM-RF latex test e bassi livelli della frazione C4 del complemento. In accordo con gli attuali criteri di inclusione alla terapia anti-HCV, i pazienti MC sottoposti a trattamento eradicante mostravano una sindrome crioglobulinemica con sintomatologia da lieve a moderata, mentre erano esclusi i pazienti con sindrome severa [190].

La caratterizzazione dei LNH HCV-correlati è stata eseguita secondo la Revised European American Lymphoma Classification (REAL) [191]. In particolare, in 8 pazienti era stata eseguita una diagnosi di linfoma marginale splenico (SMZL), in 2 una diagnosi di linfoma marginale nodale (NMZL), mentre in un paziente la diagnosi era stata di linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL).

Metodi

Isolamento delle PBMC

Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state isolate da sangue fresco intero anticoagulato mediante precipitazione su gradiente di densità utilizzando Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway), secondo le istruzioni del produttore. Dopo due lavaggi con Phosphate buffered saline (PBS) 1x, le PBMC sono state contate utilizzando una camera di Bürker e conservate in aliquote da circa 5×10^6 cellule a -80°C .

Il tempo medio di conservazione è stato di 27.35 ± 67.12 mesi.

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto da aliquote di circa 5×10^6 PBMC, isolate dai soggetti analizzati, utilizzando Trizol (Invitrogen, USA),

seguendo le istruzioni del produttore. Ad ogni campione di PBMC è stato aggiunto un oligonucleotide di RNA sintetico corrispondente a miR-39 di *C. elegans* (1.1×10^8 copie/ 10^6 cellule) che è utilizzato come controllo esterno per valutare l'efficacia di estrazione.

Retrotrascrizione e PCR Real-Time quantitativa

Per valutare l'espressione dei microRNA è stata effettuata una retrotrascrizione (RT) primer-specifica, utilizzando il TaqMan MicroRNA RT kit (Applied Biosystems, CA, USA) e 160ng di RNA totale.

Tramite PCR Real-Time sono stati quindi valutati i livelli di espressione di miR-Let-7d, miR-16, miR-21, miR-26b, miR-146a, miR-155 e *C. elegans* miR-39, utilizzando specifici TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, CA, USA). Questo panel di microRNA è stato selezionato sulla base dei dati disponibili in letteratura. Infatti, come indicato in Tabella 4, numerosi lavori in letteratura hanno evidenziato un'associazione tra i miRNA oggetto del nostro studio e disordini linfoproliferativi, in particolare quelli più frequenti in caso di infezione da HCV, quali i linfomi marginal zone e diffusi a grandi cellule B.

Inoltre, mir-21, mir-16 e mir-155 sono stati definiti anche onco-miRNA per il loro ruolo nella patogenesi di vari tipi di tumore, sia solidi che linfatici. MiR-146a sembra essere associato anche a malattie autoimmuni come artrite reumatoide e lupus.

Infine abbiamo incluso nel nostro studio mir26b in quanto questo microRNA è risultato specificamente associato a splenic marginal zone linfoma (SMZL) HCV positivo.

L'espressione relativa dei diversi miRNA è stata valutata mediante il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [192], utilizzando miR-Let-7d come riferimento endogeno per normalizzare i livelli di espressione degli altri microRNA.

miRNA	Cromosoma	mRNA target	Associazione con malattie linfoproliferative e/o autoimmuni
Hsa-miR-21	17q23.1	GPR64, TIAM1, TGFBI, STAT3, CPEB3, BCL7A	High expression in DLBCL serum (Fang 2012); High expression in SMZL tissue (Peveling-O 2012)
Hsa-miR-155	21q21.3	LRP1B, GCFC1, G2E3, BACH1, FOXO3	High expression in DLBCL (Zhong 2012); High expression in SMZL tissue (Peveling-O 2012)
Hsa-miR-146a	5q34	IRAK1, STAT1, BRCA1, ERBB4, DCAF12	High expression in SMZL tissue (Peveling-O 2012); Altered expression in RA and LES (Chen 2012)
Hsa-miR-26b	2q35	LEF1, COX2, STK39, NEK6, HGF, TET1	Low expression in HCV+ SMZL tissue (Peveling-O 2012)
Hsa-miR-16	13q14	CCNE1, CPEB2, RAB9B, VEGFA, NOTCH2	High expression in DLBCL serum (Fang 2012)

Tabella 4. Principali riferimenti bibliografici riguardanti i microRNA analizzati nello studio.

Analisi Statistica

I dati sono espressi come media±deviazione standard (DS). Le variabili quantitative sono state valutate mediante analisi della varianza (ANOVA non-parametrica). Le variabili qualitative sono state valutate tramite χ^2 test o test esatto di Fisher quando necessario. Tutti i test sono stati condotti con livelli di significatività pari a 0.05 a due code. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando Stata v.9.0 (StataCorpLP, College Station, TX, USA).

RISULTATI

Le principali caratteristiche cliniche e sierologiche dei pazienti inclusi nello studio sono riportate in Tabella 2. Tra i diversi gruppi non sono emerse differenze significative riguardanti il genotipo virale HCV o i valori di viremia. Al contrario, come atteso, la presenza del sesso femminile è risultata significativamente più alta nel gruppo dei pazienti HCV con CM ($p < 0.05$), come anche la presenza di una maggiore età media ($p < 0.01$) e di cirrosi epatica ($p < 0.05$).

Per una corretta quantificazione dell'espressione dei miRNA nelle PBMC analizzate, abbiamo valutato la variabilità, nella popolazione oggetto del nostro studio, di miR-let-7d e di miR-16, entrambi utilizzati come controllo endogeno da diversi studi pubblicati in letteratura.

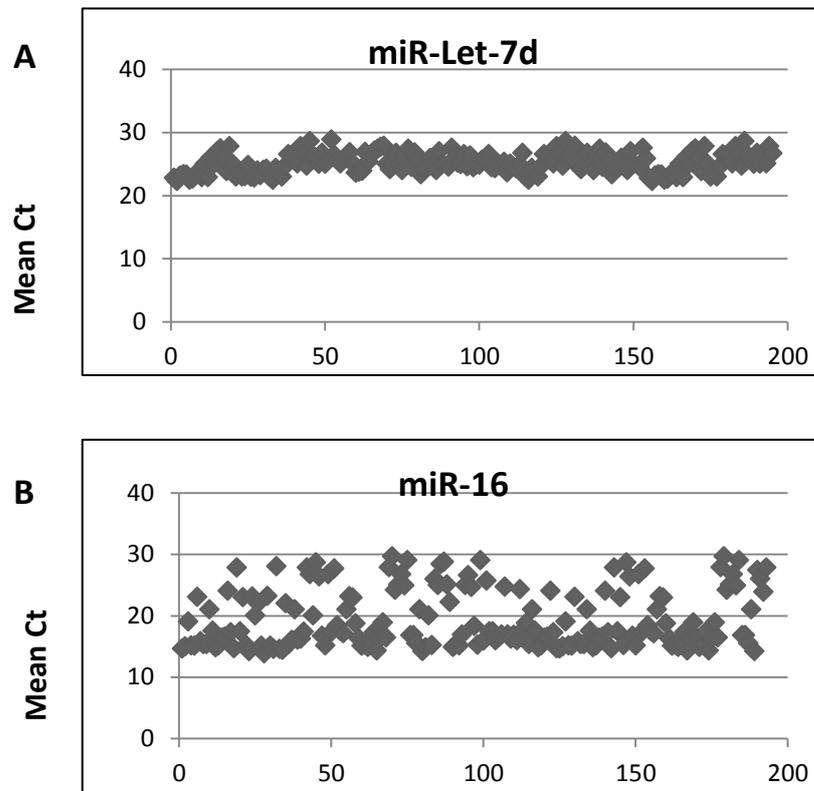


Figura 9. Livelli di espressione di miR-Let-7d (panel A) e miR-16 (panel B) nei pazienti HCV e controlli.

I livelli di espressione di miR-Let-7d sono risultati stabili in tutti i pazienti analizzati nello studio (mean Ct: 25.1560, Figura 9, panel A) mentre i livelli di miR-16 mostravano maggiori livelli di variabilità ed apparivano meno costanti (mean Ct: 19.3364, Figura 9, panel B). Abbiamo quindi scelto il let-7d come controllo endogeno per valutare i livelli di espressione degli altri miRNA presi in esami.

L'espressione di miR-146a è risultata simile in tutti i gruppi testati, sebbene nei pazienti HCV con MC fosse stato possibile osservare un range di distribuzione più ampio (Figura 10, panel A).

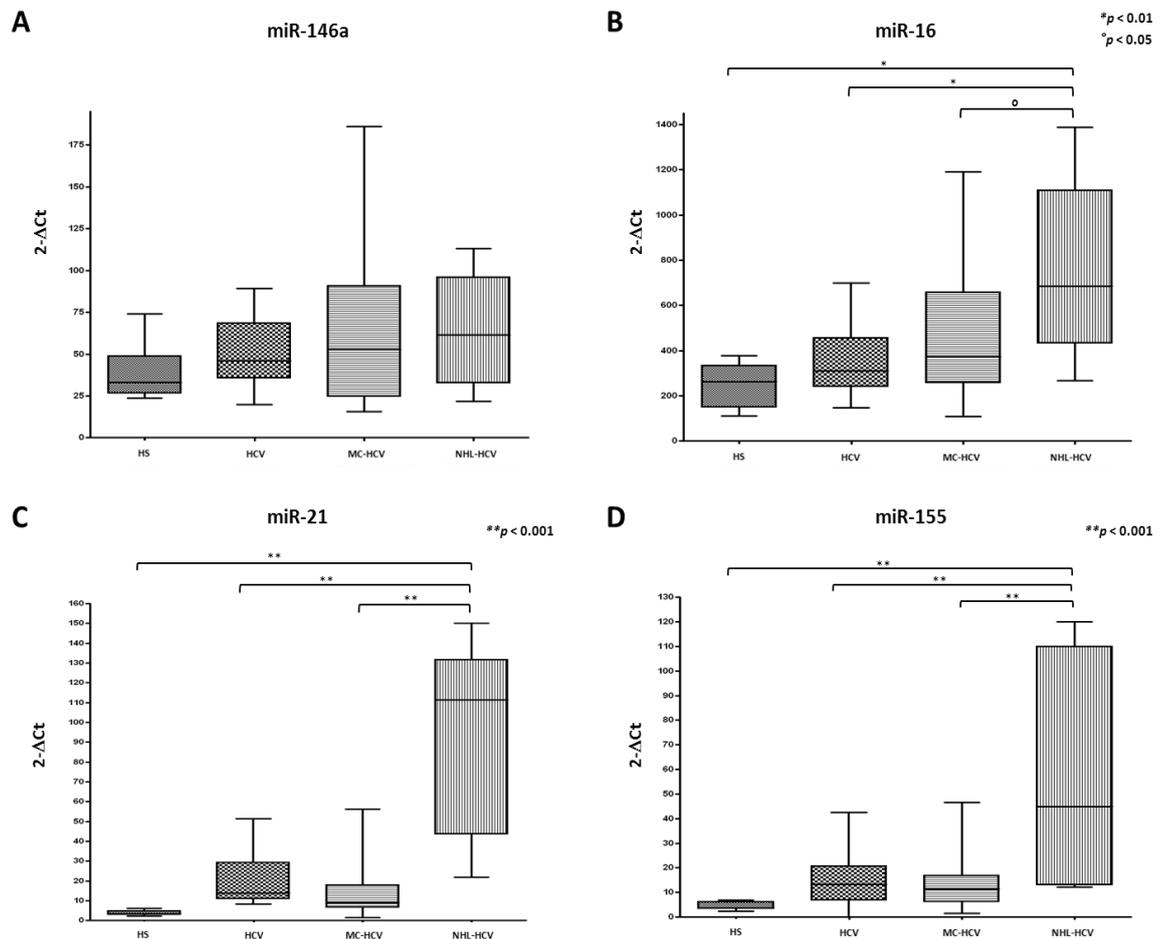


Figura 10. Livelli di espressione di miR-146a (panel A), miR-16 (panel B), miR-21 (panel C) e miR-155 (panel D) nei soggetti sani e nei pazienti HCV, CM-HCV e LNH-HCV.

Per quanto riguarda invece gli onco-miR miR-16, miR-21 e miR-155, è stato possibile osservare un profilo di espressione simile. Infatti, livelli significativamente più alti di tali miRNA sono stati misurati nelle PBMC isolate dai pazienti HCV con LNH, rispetto agli altri gruppi analizzati (Tabella 5).

Più nel dettaglio, miR-16 è risultato rispettivamente 3.16 e 2.15 volte più espresso nelle PBMC di LNH rispetto alla popolazione di controllo (DS) e al gruppo dei pazienti HCV ($p < 0.01$) e 1.54 volte più espresso rispetto ai pazienti CM-HCV ($p < 0.05$) (Figura 10, panel B).

Per quanto riguarda miR-21, l'espressione di tale miRNA nelle PBMC di LNH è risultata rispettivamente 24.51, 4.34 e 6.98 volte più alta quando paragonata ai DS, HCV e CM-HCV ($p < 0.001$) (Figura 10, panel C).

miRNA	Fold increase	p-value
Hsa-miR-16	LNH vs DS=3.1	$p < 0.01$
	LNH vs HCV=2.2	$p < 0.01$
	LNH vs CM=2.4	$p < 0.05$
Hsa-miR-21	LNH vs DS=24	$p < 0.001$
	LNH vs HCV=4.3	$p < 0.001$
	LNH vs CM=6.9	$p < 0.001$
Hsa-miR-155	LNH vs DS=12.9	$p < 0.001$
	LNH vs HCV=3.7	$p < 0.001$
	LNH vs CM=3.8	$p < 0.001$

Tabella 5. Aumento di espressione degli onco-miRNA nelle PBMC di LNH rispetto a DS, HCV e MC-HCV.

Analogamente, miR-155 è apparso up-regolato rispettivamente 13.12, 3.68 e 3.79 volte nelle PBMC dei pazienti HCV con LNH rispetto a quelle isolate dai donatori e dai pazienti HCV con o senza CM ($p < 0.001$) (Figura 10, panel D).

Al contrario, non è stato possibile evidenziare alcuna differenza significativa nell'espressione di miR-16, miR-21 e miR-155 tra DS e i pazienti HCV con o senza CM.

Interessanti sono stati i risultati ottenuti dall'analisi del miR-26b. In questo caso infatti un'importante down-regolazione è emersa sia nel gruppo di pazienti con CM che con LNH rispetto ai DS, ai pazienti HBV utilizzati come controllo patologico e ai pazienti HCV senza disordini linfoproliferativi/autoimmuni. Questi ultimi tre gruppi infatti mostravano livelli di espressione simili (74 ± 51.14 e 83.61 ± 23.36 vs 162.48 ± 11.28 , 160.13 ± 18.56 e 151.98 ± 75.44 , rispettivamente; $p < 0.01$) (Fig. 11).

L'interesse di tale dato ci ha suggerito di approfondire la ricerca valutando comparativamente l'espressione di miR-26b nelle cellule mononucleate circolanti prelevate sia prima che dopo terapia eradicante da un sottogruppo di 35 pazienti con sindrome crioglobulinemica che avevano conseguito sia una risposta virologica sostenuta che una risposta clinica completa ad almeno sei mesi dalla fine della terapia antivirale.

In questi pazienti i livelli di espressione del miR-26b risultavano analoghi a quelli osservati nei soggetti senza CM o linfoma e sani di controllo (Fig. 11).

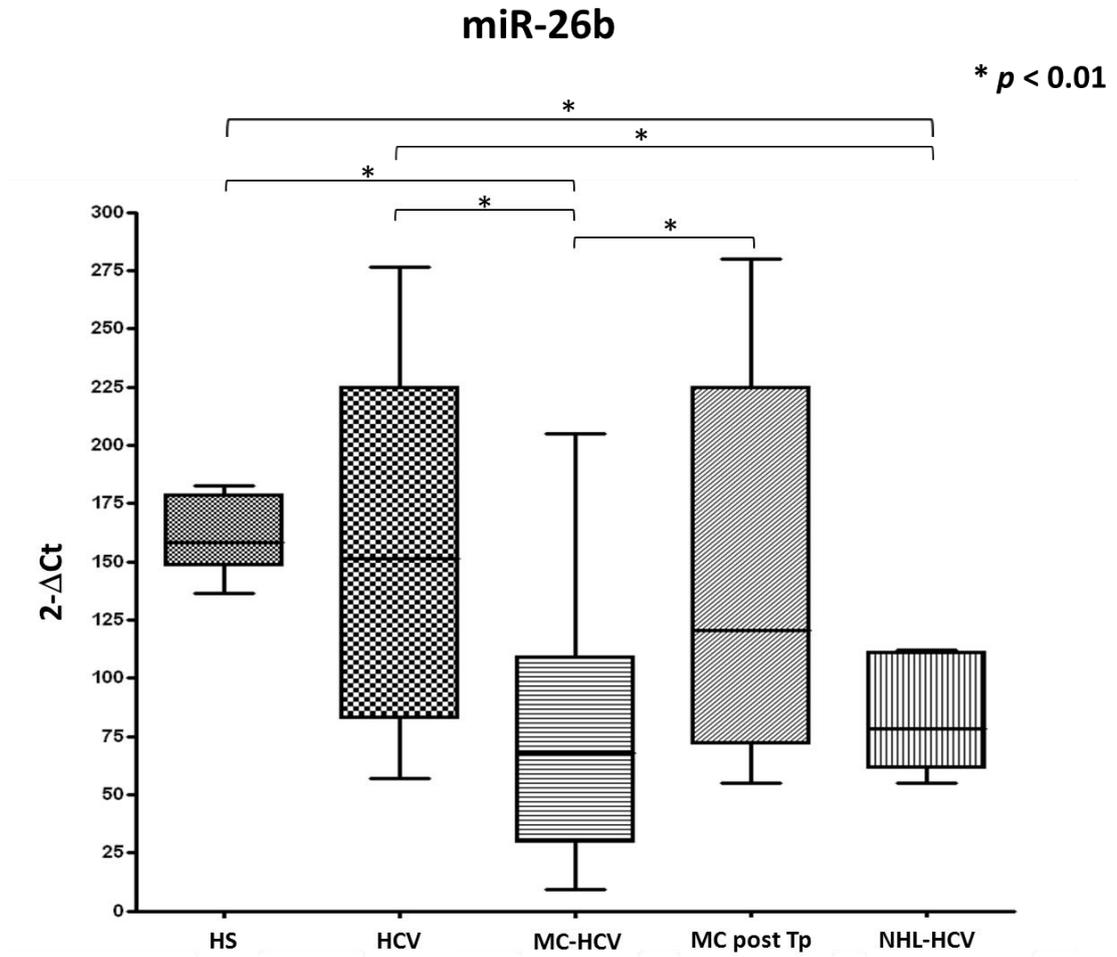


Figura 11. Livelli espressione di miR-26b nei gruppi analizzati e nel sottogruppo di pazienti CM-HCV dopo completa clearance virale e risposta clinica indotta da terapia eziologica (MC post Tp).

DISCUSSIONE

In questo studio, per la prima volta, è stata analizzata l'alterazione dei profili di espressione di alcuni microRNA, nelle PBMC isolate da pazienti con infezione cronica HCV e disordini linfoproliferativi e/o autoimmuni, quali la Crioglobulinemia Mista e il Linfoma non-Hodgkin. A tal scopo è stato selezionato uno specifico panel di microRNA, precedentemente risultati coinvolti nella patogenesi di DLP analoghi a quelli HCV correlati (artrite reumatoide, sindrome di Sjogren, linfomi marginal zone, linfomi diffusi a grandi cellule B), nell'ottica di individuare specifici microRNA con potenziale valore di marker diagnostico/prognostico.

Un passaggio importante nella quantificazione relativa dei livelli di espressione dei microRNA è rappresentato dalla scelta di un adeguato miRNA endogeno che risulti espresso in maniera costante in tutta la popolazione analizzata, patologica e non, in modo tale da poter essere utilizzato come affidabile controllo endogeno.

Tale questione costituisce attualmente tema di dibattito, sia perché sono stati identificati diversi miRNA utilizzabili come controllo endogeno a seconda del tessuto/tipo cellulare analizzato, sia perché dati contrastanti pubblicati in letteratura indicano risultati diversi, anche per quanto riguarda lo stesso materiale analizzato.

Diversi studi sono stati condotti utilizzando come controllo endogeno miR-16 [193]. Tuttavia, nella nostra analisi, l'espressione di miR-16 è risultata molto variabile (Figura 9, panel B) e significativamente diversa nelle PBMC dei pazienti con LNH rispetto agli altri (Figura 10, panel B). Al contrario i livelli di espressione di miR-Let-7d sono risultati estremamente costanti e omogenei nelle PBMC di tutta la popolazione analizzata (Figura 9, panel A), ed è stato quindi scelto come controllo endogeno per la corretta quantificazione relativa degli altri miRNA analizzati.

A conferma della nostra osservazione, anche altri lavori in letteratura indicano miR-Let-7d come affidabile controllo endogeno [194].

Per quanto riguarda l'analisi degli altri microRNA, l'espressione di miR-146a non è risultata alterata nelle PBMC dei pazienti con CM o LNH rispetto ai controlli, nonostante altri recenti dati della letteratura indichino una disregolazione di miR-146a in diversi tipi di malattie autoimmuni, principalmente artrite reumatoide [169] e LES [195].

Un profilo di espressione simile è stato invece osservato nell'espressione dei tre microRNA frequentemente associati a malattie neoplastiche, i cosiddetti oncomiRNA miR-16, miR-21 e miR-155.

Questi microRNA infatti sono risultati up-regolati e abbondantemente espressi nelle PBMC dei pazienti HCV con LNH, mentre negli altri gruppi analizzati i livelli di espressione sono risultati simili.

Questo dato suggerisce la potenziale utilità di un'accurata analisi di espressione degli oncomiRNA nei pazienti HCV in cui si abbia il sospetto di un'evoluzione maligna della malattia linfoproliferativa.

Più nel dettaglio, è stato precedentemente descritto come l'espressione di miR-21 sia consistentemente aumentata in vari tipi di tumore, soprattutto solidi [196]. I target finora identificati di miR-21 sono molti e riguardano soprattutto geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e nel controllo di crescita e proliferazione cellulare, tuttavia, secondo varie analisi computazionali, molti altri geni target sono ancora in attesa di essere identificati [196].

L'up-regolazione dell'espressione di miR-21 che è stata riportata in questo lavoro è in accordo con altri dati recenti riguardanti linfomi della zona marginale splenica [186].

Mir-155 costituisce un altro microRNA estremamente interessante, coinvolto nella patogenesi di diverse malattie autoimmuni [197] e in diversi tipi di linfoma [198, 199].

Studi pubblicati in letteratura descrivono miR-155 come un importante regolatore della activation-induced cytidine deaminase (AID), proteina che agisce come potente mutageno e risultata

implicata nella linfomagenesi indotta da HCV [200, 201]. Per questo motivo è stata condotta l'analisi dell'espressione di miR-155 nei DLP HCV-correlati e nei pazienti HCV con LNH è stata osservata una significativa up-regolazione. I risultati ottenuti mostrano che tale up-regolazione è osservabile non solo nel tessuto linfomatoso, ma anche nelle cellule mononucleate isolate da sangue periferico, valorizzandone quindi il significato traslazionale.

Infine sono risultati particolarmente interessanti i dati ottenuti dall'analisi del miR-26b. Infatti in questo caso abbiamo potuto notare una significativa down-regolazione di questo microRNA sia nei pazienti con CM sia in quelli con LNH, rispetto ai gruppi di controllo. Un recente studio, focalizzato sull'analisi di campioni di linfoma marginale splenico HCV positivo, ha mostrato una specifica associazione tra questa specifica malattia linfoproliferativa HCV-correlata e la down-regolazione di miR-26b osservata nei relativi campioni biotici, suggerendo fortemente un coinvolgimento di tale microRNA nella linfomagenesi HCV-correlata [185].

I risultati riportati in questa tesi confermano quindi le precedenti osservazioni nei casi di linfoma associati ad infezione HCV, e soprattutto ampliano le conoscenze sull'argomento in quanto indicano il ruolo chiave svolto dall'espressione di miR-26b non solo in altri tipi di linfoma correlati all'infezione HCV, quali il linfoma della zona marginale nodale e il linfoma diffuso a grandi cellule B, ma anche nella patogenesi della Crioglobulinemia Mista, il più frequente disordine extraepatico HCV-correlato.

Inoltre questo studio sottolinea l'interesse per la determinazione dell'espressione di particolari microRNA nei campioni di PBMC, ottenibili tramite semplici e non invasivi prelievi di sangue; questa considerazione aumenta enormemente il significato traslazionale di questa correlazione. L'analisi più approfondita delle diverse sottopopolazioni cellulari rappresenta sicuramente la naturale prosecuzione di questo studio, in quanto permetterà di valutare

l'esatto contributo dei differenti tipi cellulari nell'alterazione dell'espressione dei microRNA.

Per confermare l'importanza dei risultati ottenuti dall'analisi del miR-26b abbiamo introdotto un ulteriore gruppo di controllo, rappresentato da campioni di PBMC isolate dagli stessi pazienti con CM sia prima che dopo trattamento eradicante, nei quali si era ottenuta una risposta virologica sostenuta ed una risposta clinica completa, in accordo a criteri precedentemente descritti dal nostro gruppo di ricerca [202, 203].

A conferma dei risultati ottenuti, dopo una completa risposta sia virologica che clinica indotta dalla terapia anti-HCV nei pazienti con CM, la down-regolazione di miR-26b non era più rilevabile e i livelli di espressione di tale microRNA si ristabilivano a valori analoghi a quelli osservati nei gruppi di controllo. Al contrario, i pazienti con CM che non avevano risposto alla terapia eradicante e che quindi mantenevano livelli di viremia superiori ai limiti e sintomatologia caratteristica della CM ad almeno sei mesi dalla fine della terapia antivirale, mostravano livelli di espressione di miR-26b analoghi a quelli osservati prima della terapia o in altri pazienti con CM non trattati.

La down-regolazione di miR-26b osservata specificamente nei pazienti HCV con disordini linfoproliferativi, al contrario di quanto rilevato nei pazienti HCV senza tali disordini, suggerisce che tale alterazione di espressione sia correlata non tanto all'infezione HCV, ma soprattutto all'evoluzione di questa verso la malattia linfoproliferativa. Di conseguenza risulta evidente come la valutazione dell'espressione di miR-26b nelle PBMC possa costituire un pratico ed utile strumento al fine di monitorare il possibile sviluppo di CM e/o linfoma in corso di infezione HCV. Tuttavia, saranno sicuramente necessarie analisi condotte su popolazioni più numerose per confermare tali affermazioni.

Attualmente, un argomento di estremo interesse ma non ancora adeguatamente risolto riguarda la comprensione dei meccanismi cellulari che si verificano in seguito all'alterazione della regolazione di miR-26b.

A questo proposito è possibile ipotizzare un ruolo svolto da NEK6, uno dei geni target di miR-26b, che codifica per una chinasi coinvolta nei meccanismi di progressione della mitosi. L'overespressione di NEK6 potrebbe quindi contribuire all'inibizione dei normali processi di invecchiamento cellulare e promuovere la progressione tumorale, ed è stata ampiamente documentata in diversi tipi di tumore [204].

Oltre a NEK6, altri geni target di miR-26b potrebbero essere implicati nella promozione e nel mantenimento della linfomagenesi; tra questi appare particolarmente interessante LEF-1 (lymphoid enhancer factor 1). LEF-1 è stato infatti recentemente indicato come specifico target di miR-26b e la sua overespressione è stata associata alla down regolazione di miR-26b in diverse linee cellulari [205].

LEF-1 è un fattore di trascrizione nucleare che forma un complesso insieme alla β -catenina e al T-cell factor, e induce la trascrizione della ciclina D1 e di c-myc. LEF-1 è normalmente e transientemente espresso nelle cellule pro-B, mentre non risulta espresso nei normali linfociti B maturi. Diversi studi hanno mostrato elevati livelli di espressione di LEF-1 in vari tipi di tumore, in particolare in caso di leucemia linfatica cronica (LLC) [206]. Un dato ancora più recente descrive inoltre un'alterazione dell'espressione di LEF-1 in un'ampia coorte di casi di DLBCL [207].

Il possibile coinvolgimento di LEF-1 nella patogenesi dei disordini linfoproliferativi HCV-correlati rappresenta sicuramente un'importante questione da approfondire, nel tentativo di chiarire l'esatto meccanismo patogenetico svolto da miR-26b.

In conclusione le ricerche condotte in questa tesi indicano chiaramente l'importanza dei microRNA e delle loro disregolazioni nella patogenesi delle malattie linfoproliferative associate all'infezione HCV. Inoltre risulta evidente l'importanza dei microRNA come potenziali marcatori di evoluzione e progressione di malattia, da un condizione pre-neoplastica ad una franca malignità. Ulteriori studi saranno in grado di confermare i dati finora ottenuti e di far luce sui meccanismi cellulari regolati dall'espressione di specifici microRNA e dei loro geni target.

BIBLIOGRAFIA

1. De Bac C. et al., *Pathogenic factors in cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma: a multicenter Italian study*. *Hepatology*, 1994. 20: p. 1225-30.
2. Stroffolini T. et al., *Characteristics of hepatocellular carcinoma in Italy*. *J Hepatol*, 1998. 29: p. 944-52.
3. Lavanchy D., *Evolving epidemiology of hepatitis C virus*. *Clin Microbiol Infect*, 2011. 17(2): p. 107-15.
4. Alter M.J., *Epidemiology of hepatitis C*. *Hepatology*, 1997. 26(3 Suppl 1): p. 62S-65S.
5. La Torre A. et al., *Vertical transmission of HCV*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1998. 77(9): p. 889-92.
6. Eyster M.E. et al., *Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV)*. *Ann Intern Med*, 1991. 115(10): p. 764-8.
7. Hsu H.H. et al., *Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction*. *Hepatology*, 1991. 14(5): p. 763-7.
8. Leruez-Ville M. et al., *Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men*. *Lancet*, 2000. 356(9223): p. 42-3.
9. Cassuto N.G. et al., *A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men*. *Hum Reprod*, 2002. 17(12): p. 3153-6.
10. Major M.E. and S.M. Feinstone, *The molecular virology of hepatitis C*. *Hepatology*, 1997. 25(6): p. 1527-38.
11. Spahn C.M. et al., *Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit*. *Science*, 2001. 291(5510): p. 1959-62.
12. Tellinghuisen T.L. and C.M. Rice, *Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors*. *Curr Opin Microbiol*, 2002. 5(4): p. 419-27.
13. Chang S.C. et al., *Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 205(2): p. 1284-90.
14. Lo S.Y., M.J. Selby, and J.H. Ou, *Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein*. *J Virol*, 1996. 70(8): p. 5177-82.
15. Lo S.Y. et al., *Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products*. *Virology*, 1995. 213(2): p. 455-61.
16. Shih C.M. et al., *Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells*. *J Virol*, 1993. 67(10): p. 5823-32.

17. Yuen M.F. et al., *Expression of c-Myc, c-Fos, and c-jun in hepatocellular carcinoma*. *Cancer*, 2001. 91(1): p. 106-12.
18. Lai M.M. and C.F. Ware, *Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 242: p. 117-34.
19. Zhu N. et al., *Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis*. *J Virol*, 1998. 72(5): p. 3691-7.
20. Matsumoto M. et al., *Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor*. *J Virol*, 1997. 71(2): p. 1301-9.
21. McLauchlan J., *Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes*. *J Viral Hepat*, 2000. 7(1): p. 2-14.
22. Ray R.B., K. Meyer, and R. Ray, *Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes*. *Virology*, 2000. 271(1): p. 197-204.
23. Moriya K. et al., *Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice*. *J Gen Virol*, 1997. 78 (Pt 7): p. 1527-31.
24. Moriya K. et al., *The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice*. *Nat Med*, 1998. 4(9): p. 1065-7.
25. Barba G. et al., *Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(4): p. 1200-5.
26. Luyckx F.H., P.J. Lefebvre, and A.J. Scheen, *Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss*. *Diabetes Metab*, 2000. 26(2): p. 98-106.
27. Moradpour D. et al., *Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein*. *Virology*, 1996. 222(1): p. 51-63.
28. Xu Z. et al., *Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum*. *J Virol*, 2003. 77(2): p. 1578-83.
29. Gosert R. and D. Moradpour, *Reading between the lines: evidence for a new hepatitis C virus protein*. *Hepatology*, 2002. 36(3): p. 757-60.
30. Walewski J.L. et al., *Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame*. *Rna*, 2001. 7(5): p. 710-21.
31. Bain C. et al., *Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection*. *J Virol*, 2004. 78(19): p. 10460-9.
32. Dubuisson J. et al., *Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses*. *J Virol*, 1994. 68(10): p. 6147-60.
33. Ralston R. et al., *Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses*. *J Virol*, 1993. 67(11): p. 6753-61.

34. Op De Beeck A., L. Cocquerel, and J. Dubuisson, *Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Gen Virol, 2001. 82(Pt 11): p. 2589-95.
35. Pileri P. et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. 282(5390): p. 938-41.
36. Griffin S. et al., *Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes*. J Virol, 2005. 79(24): p. 15525-36.
37. Pavlovic D. et al., *The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(10): p. 6104-8.
38. Griffin S.D. et al., *The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine*. FEBS Lett, 2003. 535(1-3): p. 34-8.
39. Hijikata M. et al., *Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus*. J Virol, 1993. 67(8): p. 4665-75.
40. Franck N. et al., *Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome*. J Virol, 2005. 79(5): p. 2700-8.
41. De Francesco R. et al., *A zinc binding site in viral serine proteinases*. Biochemistry, 1996. 35(41): p. 13282-7.
42. Foy E. et al., *Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease*. Science, 2003. 300(5622): p. 1145-8.
43. Hugle T. et al., *The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein*. Virology, 2001. 284(1): p. 70-81.
44. Gosert R. et al., *Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons*. J Virol, 2003. 77(9): p. 5487-92.
45. Reed K.E., J. Xu, and C.M. Rice, *Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase*. J Virol, 1997. 71(10): p. 7187-97.
46. Polyak S.J. et al., *Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication*. Hepatology, 1999. 29(4): p. 1262-71.
47. Shirota Y. et al., *Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity*. J Biol Chem, 2002. 277(13): p. 11149-55.
48. Gale M.J.Jr. et al., *Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein*. Virology, 1997. 230(2): p. 217-27.
49. Gong G. et al., *Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(17): p. 9599-604.

50. Scarselli E. et al., *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*. *Embo J*, 2002. 21(19): p. 5017-25.
51. Agnello V. et al., *Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(22): p. 12766-71.
52. Lozach P.Y. et al., *DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2*. *J Biol Chem*, 2003. 278(22): p. 20358-66.
53. Lozach P.Y. et al., *C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles*. *J Biol Chem*, 2004. 279(31): p. 32035-45.
54. Codran A. et al., *Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis*. *J Gen Virol*, 2006. 87(Pt 9): p. 2583-93.
55. Hsu M. et al., *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(12): p. 7271-6.
56. Lindenbach B.D. et al., *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. *Science*, 2005. 309(5734): p. 623-6.
57. Wakita T. et al., *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. *Nat Med*, 2005. 11(7): p. 791-6.
58. Egger D. et al., *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex*. *J Virol*, 2002. 76(12): p. 5974-84.
59. Ishido S., T. Fujita, and H. Hotta, *Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 244(1): p. 35-40.
60. Bedossa P. and T. Poynard, *An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group*. *Hepatology*, 1996. 24(2): p. 289-93.
61. Corrao G. et al., *Exploring the combined action of lifetime alcohol intake and chronic hepatotropic virus infections on the risk of symptomatic liver cirrhosis. Collaborative Groups for the Study of Liver Diseases in Italy*. *Eur J Epidemiol*, 1998. 14(5): p. 447-56.
62. Schiff E.R., *Hepatitis C and alcohol*. *Hepatology*, 1997. 26(3 Suppl 1): p. 39S-42S.
63. Bruno S. et al., *Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study*. *Hepatology*, 1997. 25(3): p. 754-8.
64. Simonetti R.G. et al., *Hepatitis C virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. A case-control study*. *Ann Intern Med*, 1992. 116(2): p. 97-102.

65. Levrero M., *Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C*. *Oncogene*, 2006. 25(27): p. 3834-47.
66. Seeff L.B., *Introduction: the burden of hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2004. 127: p. S1-S4.
67. Zignego A.L. et al., *Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus [see comments]*. *J Hepatol*, 1992. 15(3): p. 382-6.
68. Moldvay J. et al., *Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization*. *Blood*, 1994. 83(1): p. 269-73.
69. Agnello V., R.T. Chung, and L.M. Kaplan, *A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia* *N Engl J Med*, 1992. 327(21): p. 1490-5.
70. Zignego A.L. and C. Brechot, *Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies*. *J Hepatol*, 1999. 31(2): p. 369-76.
71. Cribier B. et al., *In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus*. *J Gen Virol*, 1995. 76(Pt 10): p. 2485-91.
72. Bronowicki J.P. et al., *Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice* *Hepatology*, 1998. 28(1): p. 211-8.
73. Lerat H. et al., *In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype*. *Blood*, 1998. 91(10): p. 3841-9.
74. Shimizu Y.K. et al., *Sequence analysis of the hepatitis C virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees*. *J Virol*, 1997. 71(8): p. 5769-73.
75. Morsica G. et al., *Replication of hepatitis C virus in B lymphocytes (CD19+)* [letter]. *Blood*, 1999. 94(3): p. 1138-9.
76. Fujii K. et al., *Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus between human serum and peripheral blood mononuclear cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 225(3): p. 771-6.
77. Maggi F. et al., *Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma*. *J Gen Virol*, 1997. 78(Pt 7): p. 1521-5.
78. Roque-Afonso A.M. et al., *Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets*. *J Virol*, 1999. 73(11): p. 9213-21.
79. Ducoulombier D. et al., *Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes*. *Hepatology*, 2004. 39(3): p. 817-25.
80. Zignego A.L. et al., *T(14;18) translocation in chronic hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 2000. 31(2): p. 474-9.
81. Zignego A.L. et al., *Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia*. *Ann Intern Med*, 1996. 124(1 Pt 1): p. 31-4.

82. Ferri C. et al., *Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma*. Br J Haematol, 1994. 88(2): p. 392-4.
83. Zuckerman E. et al., *Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Ann Intern Med, 1997. 127(6): p. 423-8.
84. Andreone P. et al., *Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C virus infection*. Ann Intern Med, 1998. 129(4): p. 294-8.
85. Brouet J.C. et al., *Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases*. Am J Med, 1974. 57(5): p. 775-88.
86. Winfield J.B., *Cryoglobulinemia*. Hum Pathol, 1983. 14(4): p. 350-4.
87. Abel G., Q.X. Zhang, and V. Agnello, *Hepatitis C virus infection in type II mixed cryoglobulinemia*. Arthritis Rheum, 1993. 36(10): p. 1341-9.
88. Monti G. et al., *Cryoglobulinaemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease. GISC. Italian Group for the Study of Cryoglobulinaemias*. Qjm, 1995. 88(2): p. 115-26.
89. Monteverde A. et al., *Lymphoproliferation in type II mixed cryoglobulinemia*. Clin Exp Rheumatol, 1995. 13(Suppl 13): p. S141-7.
90. Franzin F. et al., *Clonal B-cell expansions in peripheral blood of HCV-infected patients*. Br J Haematol, 1995. 90(3): p. 548-52.
91. Zignego A.L. et al., *Frequency of bcl-2 rearrangement in patients with mixed cryoglobulinemia and HCV-positive liver diseases*. Clin Exp Rheumatol, 1997. 15(6): p. 711-2.
92. Tsujimoto Y. et al., *The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining*. Science, 1985. 229(4720): p. 1390-3.
93. Bakhshi A. et al., *Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18*. Cell, 1985. 41(3): p. 899-906.
94. Korsmeyer S.J., *BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death*. Cancer Res, 1999. 59(7 Suppl): p. 1693s-1700s.
95. Otter I. et al., *The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli*. J Biol Chem, 1998. 273(11): p. 6110-20.
96. Monteverde A., M. Ballare, and S. Pileri, *Hepatic lymphoid aggregates in chronic hepatitis C and mixed cryoglobulinemia*. Springer Semin Immunopathol, 1997. 19(1): p. 99-110.
97. Cory S. et al., *Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation*. Cancer Res, 1999. 59(7 Suppl): p. 1685s-1692s.
98. Limpens J. et al., *Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia*. Oncogene, 1991. 6(12): p. 2271-6.

99. Meijerink J.P., J.M. Raemaekers, and E.J. Mensink, *New type of t(14;18) in a non-Hodgkin's lymphoma provides insight in molecular events in early B-cell differentiation*. *Br J Haematol*, 1995. 91(3): p. 630-9.
100. Poetsch M. et al., *Detection of the t(14;18) chromosomal translocation by interphase cytogenetics with yeast-artificial-chromosome probes in follicular lymphoma and nonneoplastic lymphoproliferation*. *J Clin Oncol*, 1996. 14(3): p. 963-9.
101. Kneba M. et al., *Frequency and structure of t(14;18) major breakpoint regions in non-Hodgkin's lymphomas typed according to the Kiel classification: analysis by direct DNA sequencing*. *Cancer Res*, 1991. 51(12): p. 3243-50.
102. Luppi M. et al., *Clinico-pathological characterization of hepatitis C virus-related B-cell non-Hodgkin's lymphomas without symptomatic cryoglobulinemia [see comments]*. *Ann Oncol*, 1998. 9(5): p. 495-8.
103. McDonnell T.J. and S.J. Korsmeyer, *Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)*. *Nature*, 1991. 349(6306): p. 254-6.
104. Korsmeyer S.J., *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death*. *Blood*, 1992. 80(4): p. 879-86.
105. Biagi J.J. and J.F. Seymour, *Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation*. *Blood*, 2002. 99(12): p. 4265-75.
106. Zignego A.L. et al., *Prevalence of bcl-2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or without B-cell lymphomas*. *Ann Intern Med*, 2002. 137: p. 571-580.
107. Zuckerman E. et al., *The effect of antiviral therapy on t(14;18) translocation and immunoglobulin gene rearrangement in patients with chronic hepatitis C virus infection*. *Blood*, 2001. 97(6): p. 1555-9.
108. Mazzaro C. et al., *Regression of monoclonal B-cell expansion in patients affected by mixed cryoglobulinemia responsive to alpha-interferon therapy*. *Cancer*, 1996. 77(12): p. 2604-13.
109. Bianchettin G. et al., *Analysis of hepatitis C virus hypervariable region 1 sequence from cryoglobulinemic patients and associated controls*. *J Virol*, 2007. 81(9): p. 4564-71.
110. Hofmann W.P. et al., *Association of HCV-related mixed cryoglobulinemia with specific mutational pattern of the HCV E2 protein and CD81 expression on peripheral B lymphocytes*. *Blood*, 2004. 104(4): p. 1228-9.
111. De Vita S. et al., *Preliminary classification criteria for the cryoglobulinaemic vasculitis*. *Ann Rheum Dis*, 2011. 70(7): p. 1183-90.
112. Vallisa D. et al., *Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV-related, low-grade, B-cell, non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter Italian experience*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(3): p. 468-73.
113. Fisher S.G. and R.I. Fisher, *The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma*. *Oncogene*, 2004. 23(38): p. 6524-34.

114. Dal Maso L. and S. Franceschi, *Hepatitis C virus and risk of lymphoma and other lymphoid neoplasms: a meta-analysis of epidemiologic studies*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. 15(11): p. 2078-85.
115. Negri E. et al., *B-cell non-Hodgkin's lymphoma and hepatitis C virus infection: a systematic review*. *Int J Cancer*, 2004. 111(1): p. 1-8.
116. De Re V. et al., *Pre-malignant and malignant lymphoproliferations in an HCV-infected type II mixed cryoglobulinemic patient are sequential phases of an antigen-driven pathological process*. *Int J Cancer*, 2000. 87(2): p. 211-6.
117. De Re V. et al., *Sequence analysis of the immunoglobulin antigen receptor of hepatitis C virus-associated non-Hodgkin lymphomas suggests that the malignant cells are derived from the rheumatoid factor-producing cells that occur mainly in type II cryoglobulinemia*. *Blood*, 2000. 96(10): p. 3578-84.
118. Luppi M. et al., *Hepatitis C virus infection in subsets of neoplastic lymphoproliferations not associated with cryoglobulinemia*. *Leukemia*, 1996. 10(2): p. 351-5.
119. Mele A. et al., *Hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphomas: an Italian multicenter case-control study*. *Blood*, 2003. 102(3): p. 996-9.
120. Pileri P. et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. *Science*, 1998. 282(5390): p. 938-41.
121. Zignego A.L. et al., *T(14;18) translocation in chronic hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 2000. 31(2): p. 474-9.
122. Zignego A.L. et al., *Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: A general overview and guidelines for a clinical approach*. *Dig Liver Dis*, 2007. 39(1): p. 2-17.
123. Zignego A.L. et al., *Prevalence of bcl-2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or without B-cell lymphomas*. *Ann Intern Med*, 2002. 137(7): p. 571-80.
124. Kitay-Cohen Y. et al., *Bcl-2 rearrangement in patients with chronic hepatitis C associated with essential mixed cryoglobulinemia type II*. *Blood*, 2000. 96(8): p. 2910-2.
125. Zuckerman E. et al., *bcl-2 and immunoglobulin gene rearrangement in patients with hepatitis C virus infection*. *Br J Haematol*, 2001. 112(2): p. 364-9.
126. Zuckerman E. et al., *The effect of antiviral therapy on t(14;18) translocation and immunoglobulin gene rearrangement in patients with chronic hepatitis C virus infection*. *Blood*, 2001. 97(6): p. 1555-9.
127. Hermine O. et al., *Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection*. *N Engl J Med*, 2002. 347(2): p. 89-94.
128. Giannelli F. et al., *Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation*. *Blood*, 2003. 102(4): p. 1196-201.

129. Hadziyannis S.J. et al., *Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose*. *Ann Intern Med*, 2004. 140(5): p. 346-55.
130. Fried M.W. et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection*. *N Engl J Med*, 2002. 347(13): p. 975-82.
131. Manns M.P. et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial*. *Lancet*, 2001. 358(9286): p. 958-65.
132. Brunetto M.R., P. Colombatto, and F. Bonino, *Bio-mathematical models of viral dynamics to tailor antiviral therapy in chronic viral hepatitis*. *World J Gastroenterol*, 2009. 15(5): p. 531-7.
133. Poordad F. et al., *Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection*. *N Engl J Med*, 2011. 364(13): p. 1195-206.
134. Bacon B.R. et al., *Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection*. *N Engl J Med*, 2011. 364(13): p. 1207-17.
135. Jacobson I.M. et al., *Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection*. *N Engl J Med*, 2011. 364(25): p. 2405-16.
136. Zeuzem S. et al., *Telaprevir for retreatment of HCV infection*. *N Engl J Med*, 2011. 364(25): p. 2417-28.
137. Ferri C. et al., *Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia [see comment]*. *Clin Exp Rheumatol*, 1991. 9(6): p. 621-4.
138. Ferri C., *Mixed cryoglobulinemia*. *Orphanet J Rare Dis*, 2008. 3: p. 25.
139. Sansonno D. et al., *Current and emerging therapeutic approaches in HCV-related mixed cryoglobulinemia*. *Curr Med Chem*, 2008. 15(2): p. 117-26.
140. Bonomo L. et al., *Treatment of idiopathic mixed cryoglobulinemia with alpha interferon*. *Am J Med*, 1987. 83(4): p. 726-30.
141. Casato M. et al., *Long-term results of therapy with interferon-alpha for type II essential mixed cryoglobulinemia*. *Blood*, 1991. 78(12): p. 3142-7.
142. Ferri C. et al., *Interferon-alpha in mixed cryoglobulinemia patients: a randomized, crossover-controlled trial*. *Blood*, 1993. 81(5): p. 1132-6.
143. Marcellin P. et al., *Cryoglobulinemia with vasculitis associated with hepatitis C virus infection*. *Gastroenterology*, 1993. 104(1): p. 272-7.
144. Misiani R. et al., *Interferon alfa-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus [see comments]*. *N Engl J Med*, 1994. 330(11): p. 751-6.
145. Dammacco F. et al., *Natural interferon-alpha versus its combination with 6-methyl- prednisolone in the therapy of type II mixed cryoglobulinemia: a long- term, randomized, controlled study*. *Blood*, 1994. 84(10): p. 3336-43.
146. Migliaresi S. and G. Tirri, *Interferon in the treatment of mixed cryoglobulinemia*. *Clin Exp Rheumatol*, 1995. 13 Suppl 13: p. S175-80.

147. Cohen P. et al., *Treatment of mixed cryoglobulinemia with recombinant interferon alpha and adjuvant therapies. A prospective study on 20 patients.* Ann Med Interne (Paris), 1996. 147(2): p. 81-6.
148. Mazzaro C. et al., *Interferon therapy in HCV-positive mixed cryoglobulinaemia: viral and host factors contributing to efficacy of the therapy [see comments].* Ital J Gastroenterol Hepatol, 1997. 29(4): p. 343-50.
149. Casato M. et al., *Predictors of long-term response to high-dose interferon therapy in type II cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus infection.* Blood, 1997. 90(10): p. 3865-73.
150. Adinolfi L.E. et al., *Effects of long-term course of alpha-interferon in patients with chronic hepatitis C associated to mixed cryoglobulinaemia.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1997. 9(11): p. 1067-72.
151. Cresta P. et al., *Response to interferon alpha treatment and disappearance of cryoglobulinaemia in patients infected by hepatitis C virus.* Gut, 1999. 45(1): p. 122-8.
152. Polzien F. et al., *Interferon-alpha treatment of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia.* J Hepatol, 1997. 27(1): p. 63-71.
153. Donada C. et al., *Interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C and mixed cryoglobulinemia.* Blood, 1998. 92(8): p. 2983-4.
154. Calleja J.L. et al., *Sustained response to interferon-alpha or to interferon-alpha plus ribavirin in hepatitis C virus-associated symptomatic mixed cryoglobulinaemia.* Aliment Pharmacol Ther, 1999. 13(9): p. 1179-86.
155. Zuckerman E. et al., *Treatment of refractory, symptomatic, hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia with ribavirin and interferon-alpha.* J Rheumatol, 2000. 27(9): p. 2172-8.
156. Cacoub P. et al., *Interferon-alpha and ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus-related systemic vasculitis.* Arthritis Rheum, 2002. 46(12): p. 3317-26.
157. Mazzaro C. et al., *Interferon plus ribavirin in patients with hepatitis C virus positive mixed cryoglobulinemia resistant to interferon.* J Rheumatol, 2003. 30(8): p. 1775-81.
158. Bruchfeld A. et al., *Interferon and ribavirin treatment in patients with hepatitis C-associated renal disease and renal insufficiency.* Nephrol Dial Transplant, 2003. 18(8): p. 1573-80.
159. Ghany M.G. et al., *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update.* Hepatology, 2009. 49(4): p. 1335-74.
160. Levine J.W. et al., *Persistent cryoglobulinemic vasculitis following successful treatment of hepatitis C virus.* J Rheumatol, 2005. 32(6): p. 1164-7.
161. Landau D.A. et al., *Relapse of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis in patients with sustained viral response.* Arthritis Rheum, 2008. 58(2): p. 604-11.

162. Rossi P. et al., *Hepatitis C virus-related cryoglobulinemic glomerulonephritis: long-term remission after antiviral therapy*. *Kidney Int*, 2003. 63(6): p. 2236-41.
163. Ferri C. and M.T. Mascia, *Cryoglobulinemic vasculitis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2006. 18(1): p. 54-63.
164. Saadoun D. et al., *Treatment of hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2008. 20(1): p. 23-8.
165. Bartel D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. *Cell*, 2009. 136(2): p. 215-33.
166. Carthew R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. *Cell*, 2009. 136(4): p. 642-55.
167. Brodersen P. and O. Voinnet, *Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(2): p. 141-8.
168. Nakasa T. et al., *Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue*. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(5): p. 1284-92.
169. Pauley K.M. et al., *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. *Arthritis Res Ther*, 2008. 10(4): p. R101.
170. Stanczyk J. et al., *Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(4): p. 1001-9.
171. Hughes T. and A.H. Sawalha, *The role of epigenetic variation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2011. 13(5): p. 245.
172. Esquela-Kerscher A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(4): p. 259-69.
173. Si M.L. et al., *miR-21-mediated tumor growth*. *Oncogene*, 2007. 26(19): p. 2799-803.
174. Medina P.P., M. Nolde, and F.J. Slack, *OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma*. *Nature*, 2010. 467(7311): p. 86-90.
175. Gabriely G. et al., *MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators*. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(17): p. 5369-80.
176. Darido C. et al., *Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2011. 20(5): p. 635-48.
177. Blenkiron C. et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. *Genome Biol*, 2007. 8(10): p. R214.
178. Sempere L.F. et al., *Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer*. *Cancer Res*, 2007. 67(24): p. 11612-20.

179. Calin G.A. et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. 353(17): p. 1793-801.
180. Yanaihara N. et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. 9(3): p. 189-98.
181. Li X. et al., *Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature*. Gut, 2010. 59(5): p. 579-85.
182. Caramuta S. et al., *MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma*. J Invest Dermatol, 2010. 130(8): p. 2062-70.
183. Schetter A.J. et al., *MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma*. Jama, 2008. 299(4): p. 425-36.
184. Bouteloup M. et al., *MicroRNA expression profile in splenic marginal zone lymphoma*. Br J Haematol, 2012. 156(2): p. 279-81.
185. Peveling-Oberhag J. et al., *Dysregulation of global microRNA expression in splenic marginal zone lymphoma and influence of chronic hepatitis C virus infection*. Leukemia, 2012. 26(7): p. 1654-62.
186. Di Lisio L. et al., *The role of miRNAs in the pathogenesis and diagnosis of B-cell lymphomas*. Blood, 2012. 120(9): p. 1782-90.
187. Gramantieri L. et al., *MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma*. J Cell Mol Med, 2008. 12(6A): p. 2189-204.
188. Ji J. et al., *MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer*. N Engl J Med, 2009. 361(15): p. 1437-47.
189. Weber J.A. et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem, 2010. 56(11): p. 1733-41.
190. Pietrogrande M. et al., *Recommendations for the management of mixed cryoglobulinemia syndrome in hepatitis C virus-infected patients*. Autoimmun Rev, 2011. 10(8): p. 444-54.
191. Harris N.L. et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood, 1994. 84(5): p. 1361-92.
192. Livak K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
193. Lawrie C.H., *MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy?* J Cell Mol Med, 2008. 12(5A): p. 1432-44.
194. Qi R. et al., *Identification of endogenous normalizers for serum microRNAs by microarray profiling: U6 small nuclear RNA is not a reliable normalizer*. Hepatology, 2012. 55(5): p. 1640-2; author reply 1642-3.

195. Tang Y. et al., MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(4): p. 1065-75.
196. Li S. et al., MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. *Mol Cell Biochem*, 2012. 360(1-2): p. 147-58.
197. Leng R.X. et al., Role of microRNA-155 in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011. 22(3): p. 141-7.
198. Kluiver J. et al., BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*, 2005. 207(2): p. 243-9.
199. van den Berg A. et al., High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. 37(1): p. 20-8.
200. Ito M. et al., Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral blood B cells of chronic hepatitis C patients. *Clin Immunol*, 2010. 135(3): p. 459-65.
201. Machida K. et al., Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(12): p. 4262-7.
202. Petrarca A. et al., Safety and efficacy of rituximab in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia and severe liver disease. *Blood*, 2010. 116(3): p. 335-42.
203. Piluso A. et al., Value of IL28B genotyping in patients with HCV-related mixed cryoglobulinemia: results of a large, prospective study. *J Viral Hepat*, 2013. 20(4): p. e107-14.
204. Takeno A. et al., Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br J Cancer*, 2008. 99(8): p. 1307-15.
205. Zhang Z. et al., MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. *J Biol Chem*, 2010. 285(45): p. 34718-28.
206. Gutierrez A. Jr. et al., LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood*, 2010. 116(16): p. 2975-83.
207. Cubedo E. et al., Identification of LMO2 transcriptome and interactome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2012. 119(23): p. 5478-91.