



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI  
INDIRIZZO: EPATOLOGIA CLINICA  
CICLO XXI**

**TESI di DOTTORATO**

**LA CURA DEL PAZIENTE CON EPATITE C:  
dall'epidemiologia alla buona pratica clinica attraverso  
metodologie sperimentali e di laboratorio.**

**Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. ANTONIO TIENGO**

**Coordinatore d'Indirizzo: Ch.mo Prof. ANGELO GATTA**

**Supervisore: Ch.mo Prof. LILIANA CHEMELLO**

**Dottorando: Dott. LUISA CAVALLETTO**

**GENNAIO 2010**

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT .....	6
INTRODUZIONE .....	9
Premessa .....	9
Epidemiologia e storia naturale dell'epatite C .....	11
La struttura genomica e la diagnosi di infezione da HCV .....	13
Immunopatogenesi dell'infezione da HCV .....	19
La fibrosi epatica e gli indici di funzionalità epatica quali parametri per la stadiazione della malattia .....	21
Squamous cell carcinoma antigen (SCCA): caratteristiche strutturali e funzionali .....	24
Modificazioni indotte dalla terapia antivirale .....	26
Epatite C, disturbi psichiatrici ed affettivi .....	31
Neurotossicità in corso di terapia con interferone .....	33
Meccanismi patogenetici degli effetti neurotossici dell'IFN .....	40
Il triptofano e la "via serotonina" .....	43
I STUDIO SULLA CARATTERIZZAZIONE VIRALE DELL'INFEZIONE NEL VENETO .....	49
Materiali e Metodi.....	50
Risultati.....	55
II STUDIO SULLA STADIAZIONE NON-INVASIVA DELLA FIBROSI EPATICA E CONFRONTO DI MARCATORI SIERICI E TESSUTALI. ....	59
Materiali e Metodi.....	60
Risultati.....	66
III STUDIO SULL'ADERENZA ALLA TERAPIA ANTIVIRALE E SUI MECCANISMI PATOGENETICI DELLA DEPRESSIONE INDOTTA DA INTERFERONE.....	75
Materiali e metodi .....	76
Risultati.....	80
IV STUDIO SULL'IMPIEGO DELLA TERAPIA ANTIVIRALE PER L'EPATITE C NEL VENETO: MODALITA' D'USO, EFFICACIA E COSTI. ....	88
Materiali e Metodi.....	89
Risultati.....	91
DISCUSSIONE .....	97
CONCLUSIONI.....	106
I Studio.....	106
II Studio .....	106
III Studio .....	106
IV Studio.....	107
BIBLIOGRAFIA .....	108

## RIASSUNTO

L'aumento di morbilità e la mortalità per malattie del fegato e, in particolare per il carcinoma epatocellulare (HCC), in tutto il mondo ha comportato la necessaria implementazione di programmi di screening e di strategie sanitarie per la diagnosi precoce e la cura delle epatiti croniche virali.

Le ricerche svolte nell'ambito di questo dottorato incentrate sulla cura del paziente con epatite C, si sono articolate su aspetti epidemiologici, clinici e sperimentali diretti in particolar modo ad identificare i soggetti a rischio evolutivo e le caratteristiche virologiche più rilevanti che influenzano la cura standard dell'epatite C costituita da Peg-IFN e Ribavirina che oggi consente la guarigione di circa la metà dei pazienti.

Vengono pertanto presentati 4 studi che hanno riguardato:

1. la caratterizzazione virale dell'infezione nella regione Veneto
2. lo studio sulla stadiazione non-invasiva della fibrosi epatica e confronto di marcatori sierici e tissutali.
3. l'aderenza alla terapia antivirale e sui meccanismi patogenetici della depressione indotta da interferone
4. l'impiego della terapia antivirale nel Veneto: modalità d'uso efficacia e costi.

### Descrizione dei progetti:

1. Il primo progetto di ricerca ha riguardato circa 3.000 casi con epatite cronica C, che sono stati sottoposti a controlli periodici in base allo stadio della malattia (epatite cronica e/o cirrosi) e, dove indicato, sottoposti a trattamento antivirale con PEG-IFN alfa e ribavirina allo scopo di eradicare l'infezione. Sono stati eseguiti test virologici a) per determinare il genotipo di HCV con il metodo VERSANT HCV 2.0, INNO-LIPA e b) per il monitoraggio quantitativo di HCV-RNA con metodo COBAS TaqMan Real-Time PCR, range di linearità 43-69.000.000 IU / mL, prima della terapia e 6 mesi dopo l'interruzione del trattamento. L'analisi effettuata ha confrontato la distribuzione dei genotipi in circa duemila casi con infezione virale contratta prima dell'anno 1995 (data di applicazione routinaria dello screening di HCV mediante tecniche di biologia molecolare), rispetto a 978 casi con infezione contratta probabilmente nel periodo successivo. E' stata riscontrata una diversa prevalenza di genotipi nei casi con infezione prima e dopo il 1995: HCV-1b e HCV-2 globalmente interessavano il 72,8% prima del 1995, mentre rappresentano nel periodo successivo il 62,8% (-10%). Al contrario HCV-1a, HCV-3 e HCV-4 mostrano cumulativamente un aumento del 10% interessando prima del 1995 il 27,2% delle infezioni e il 37,2% nel periodo successivo ( $p < 0.01$ ). Questa osservazione ha confermato la presenza nel tempo di almeno 2 episodi di epidemia caratterizzati; il primo da una popolazione con importante rischio trasfusionale, sesso femminile, età media più avanzata, infezione con HCV-1b e HCV-2 e presenza di cirrosi nel 24% dei casi; il secondo, da soggetti maschi, più giovani, con una storia di abuso di droga, infezione con HCV 1a, HCV-3 e HCV-4 e presenza di cirrosi nel 10%. I livelli di viremia valutati con una ROC-curve hanno mostrato un cut-off di HCV RNA  $< 5.2 \log$  (IU / mL) come il principale fattore predittivo di risposta sostenuta nei pazienti sottoposti a terapia antivirale (SVR) con un Odds ratio di circa 6 volte rispetto ai livelli viremici più elevati.
2. Recentemente l'antigene del carcinoma a cellule squamose (SCCA) è stato rilevato nel siero in forma di immunocomplesso con IgM (SCCA-IC) in circa un terzo dei pazienti con epatite cronica e fino a due terzi dei casi

con carcinoma epatocellulare. La standardizzazione di metodiche ELISA e di immunoistochimica per la determinazione della SCCA nel siero e nel fegato rende oggi questo biomarcatore molto interessante per la potenziale rilevanza clinica. Questo secondo studio ha valutato la correlazione dei livelli sierici e l'espressione tissutale di SCCA specialmente in relazione al rischio evolutivo istologico da infezione cronica da HCV in 63 pazienti affetti da epatite cronica con attiva replicazione virale (33/30 M / F, età media  $48,2 \pm 12,2$  anni) sottoposti a test biochimici di funzionalità epatica, biopsia epatica con valutazione istologica secondo lo score di Ishak. Sulla base dei reperti istologici la popolazione in studio è stata raggruppata in casi senza (<F3) e con (> F3) fibrosi settale. I livelli sierici di SCCA-IC e l'espressione nel fegato di SCCA hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa ( $p=0.01$ ), inoltre, mediante l'analisi delle ROC-curves è stato identificato un livello di SCCA pari a 190 UA ml, come il migliore cut-off per la discriminazione dei casi senza e con evoluzione fibrotica della malattia epatica.

3. Questo terzo progetto di ricerca ha studiato la prevalenza e la gravità dei sintomi depressivi durante la terapia antivirale per l'epatite C cronica con Peg-IFN-alfa e Ribavirina (RBV), allo scopo di: a) individuare i casi più a rischio di sintomi neuro-psichiatrici confrontando le diverse scale utilizzate per la valutazione iniziale di ansia-depressione ed in particolare tra i test auto- o etero-somministrati, b) correlare gli effetti collaterali neuro-psichiatrici con i livelli sierici di triptofano e chinurenina e c) verificare l'efficacia della terapia antidepressiva con SSRI per controllare l'ansia e la depressione IFN-indotta. Sono stati prospetticamente reclutati 53 pazienti sottoposti ad un ciclo di terapia antivirale con PEG-IFN-alfa 2a o 2b + ribavirina per un periodo di 48 settimane se con genotipo HCV-1-4 e di 24 settimane se con HCV-2-3. Sono stati somministrati i seguenti tests: Mini International Neuropsychiatric Interview, scala di Hamilton per la depressione e ansia, Beck Depression Inventory e Hospital Anxiety and Depression Scale; è stata eseguita la misurazione del triptofano e chinurenina mediante HPLC e i dati ottenuti sono stati valutati con l'analisi statistica per misure ripetute ANOVA. Prima dell'inizio della terapia, 6 casi avevano già una diagnosi di depressione maggiore della malattia (MDD), come definito dal DMS-IV, mentre 14 casi svilupparono una depressione IFN-indotta (IFN-DD) nel corso di 4-24 settimane di terapia e quindi vennero sostenuti con la somministrazione di SSRI. E' stata registrata una prevalenza di depressione PEG-IFN-indotta (IFN-DD) del 30%. Dopo 4 settimane di terapia, un punteggio di BDI>9 punti ha consentito di discriminare i casi ad alto rischio di IFN-DD che hanno inoltre mostrato una significativa diminuzione del triptofano >2 ug/ml rispetto ai livelli pre-terapia, correlata all'aumento dei livelli di chinurenina e del rapporto KYN/TRP. Il trattamento con SSRI in questi casi ha consentito un miglioramento della QoL e dell'aderenza alla terapia antivirale e anche un incremento dei livelli di triptofano nel siero.
4. L'attuale standard di cura per il trattamento dell'infezione cronica da virus dell'epatite C (HCV) è la terapia di combinazione con Peg-interferone (IFN) alfa-2a o 2b più Ribavirina (RBV). Questo studio ha valutato le modalità del trattamento antivirale nella regione Veneto, in particolare farmaco-utilizzazione e costo-efficacia nella pratica clinica di ogni giorno del trattamento con i 2 Peg-IFN disponibili. Dodici centri epatologici collegati on-line hanno prospetticamente raccolto dati su 450 soggetti sottoposti a terapia antivirale per l'epatite cronica o cirrosi. L'analisi post-hoc dei casi trattati da gennaio 2003 a dicembre 2005 è stata eseguita confrontando 167 casi trattati con Peg-interferone alfa-2a (Pegasys,

Roche, a dose fissa di 180µg / settimana) e 288 che hanno ricevuto PEG-IFN alfa-2b (PEG-INTRON, Schering-Plough, con dose di 50-150 µg /settimana) e ribavirina (RBV). Complessivamente la SVR ottenuta con il Peg-IFN-α2a o α2b e RBV è risultata identica (61%), tuttavia i dati di farmaco-utilizzazione hanno mostrato che Peg-IFN-α2b è stato prescritto con un dosaggio sub-ottimale in ben il 58% dei casi con dosi di <1mcg/kg/settimana, mentre il 95% dei casi trattati con PEG-IFN-α2a ha ricevuto la dose piena di 180mcg/settimana. L'analisi di efficacia nei casi trattati con PEG-IFN-α2b<1 ha mostrato una risposta virologica sostenuta inferiore rispetto a quelli trattati con una dose >1mcg/kg/settimana (rispettivamente 50% vs. 66%, p=0,00) ed in particolare, nel caso di genotipo HCV-1-4 (32% vs. 53%, p=0,00). L'analisi di sensibilità ad una via ha indicato che il trattamento con Peg-IFN-α2b>1 o PEG-IFNα2a sono risultati costo-efficaci in caso di infezione da HCV-1-4, mentre Peg-IFN-α2b<1 si è dimostrato il trattamento di scelta in caso di infezione da HCV-2-3 consentendo un risparmio di circa 1.800-4.500€xSVR (81%).

## ABSTRACT

The increasing morbidity and mortality for liver diseases and particularly for hepatocellular carcinoma (HCC) widely started worldwide screening programs and healthcare strategies targeting on the early diagnosis and care of chronic viral hepatitis.

*This PhD thesis focused on care of patients with chronic hepatitis C by the study of the epidemiologic, clinical and experimental profile: a) to identify patients with the higher risk of liver damage and clinical evolution and b) to applied the most effective antiviral therapy schedule consisting of Peg-IFN and ribavirin, the only applicable chance for allowing viral eradication and avoiding progressive liver damage and related-complications.*

**Therefore the research consists in 4 studies that described:**

*the characterization of viral HCV infection in the Veneto region,*

*the identification of non-invasive serum and tissue markers of liver fibrosis useful for the staging of liver viral disease,*

*the adherence to antiviral therapy and pathogenic mechanisms of depression induced by interferon;*

*the use of the antiviral therapy in the Veneto region: analysis of costs and effectiveness.*

**Project descriptions:**

1. *Background:* Chronic HCV infection represents a major cause of end-stage liver disease and liver cancer worldwide. Antiviral therapy is the only effective chance to allows viral eradication and to avoid progression of liver damage. *Aim of the study:* This analysis dealt with about 3,000 cases with chronic hepatitis C who underwent a clinical follow-up, according to the stage of liver disease (chronic hepatitis or cirrhosis, respectively every 6 or 12 months) and that were recruited for antiviral treatment with Peg-IFN-alfa and ribavirin, when indicated, with the purpose of viral eradication and of related cost-analysis to derive the golden healthcare strategy. *Methods:* Virological tests were performed a) to determine the HCV-genotype, based on reverse hybridization, where in addition to the region 5'NC, was also considered the core region to useful subtyping of HCV-genotype 1 (*method: VERSANT HCV 2.0, INNO-LIPA*) and b) to monitor viral load or serum HCV-RNA by a quantitative assay (*method: COBAS TaqMan Real-Time PCR, linearity range 43-69000000 IU/mL*) before, during and after (6 months) of therapy. A statistical analysis was performed to compare the distribution of genotypes in 2 subset of cases with onset of infection before or after 1995 (the date of application routine screening for HCV by techniques of molecular biology) and to identified the best response predictor to antiviral therapy. *Results:* During a FU-period of 5 years, respectively 1949 and 978 cases with suggestive HCV infection exposure before or after 1995 were analyzed. The comparison showed a significantly difference in epidemiologic characteristics of the population and of the HCV-genotype profile distribution, confirming the concurrent presence of at least 2 HCV-outbreaks characterized: the first, by previous transfusion risk, older age and HCV infection with viral genotypes 1b and 2 and presence of cirrhosis in 24% of cases, the second, mainly by males, younger, with a history of drug abuse, HCV genotype 1a, 3 and 4 and presence of cirrhosis in 10%. Overtime the number of infection with HCV-1b and 2 decreased of 10% (72.8% vs. 62.8%), while the HCV-1a, 3 and 4 increased (27.2% vs. 37.2%) ( $p < 0.01$ ). ROC curves were used to assess the main predictive viral load related to a sustained virologic response to therapy (or absence

of viral replication 6 months after cessation of treatment) identifying a cut-off of HCV-RNA  $<5.2$  log (IU/mL) with an Odds Ratio equal to 6 fold respect to higher levels of viraemia ( $p < 0.001$ ). *Conclusions:* Two cohort of patients with chronic HCV infection were identified by the epidemiological profile, characterized by a different genotype distribution. The best virologic predictor of response to therapy was the lower viraemia at baseline.

2. *Background:* Recently the ov-serpin squamous cell carcinoma antigen (SCCA) was detected in serum associated with IgM (SCCA-IC) in about one third of patients with chronic hepatitis and in up two third of cases with hepatocellular carcinoma. The development of standardized ELISA and ICH methods for determination of SCCA in serum and liver makes these biomarkers very interesting for their potential clinical relevance. *Aim of the study* was to relate serum levels and tissue SCCA to histological evolution during chronic HCV infection. *Material and Methods:* Sixty-three consecutive out-patients (33/30 M/F; mean age  $48,2 \pm 12,2$  yrs) with chronic hepatitis, HCV-RNA positive, that underwent biochemical tests and liver biopsy, were tested for SCCA-IC (Hepa-IC, Xeptagen, Italy) and tissue-SCCA (Hepa-Ab, Xeptagen) at the same time. Ishak histologic score was used for necro-inflammatory grading and fibrosis staging. Steatosis degree was scored as: 1 (0-10%) or 2 ( $>10\%$ ) of hepatocytes (x40). The normal upper limit of SCCA-IC was 120 AU/ml, while tissue-SCCA was undetectable in controls. Statistical evaluation was performed by T-test, U-test and Chi-square test as appropriate. The accuracy of SCCA-IC to diagnose disease evolution was defined by ROC curve analysis. *Results:* Based on histological findings the study population was grouped in cases without ( $<F3$ ) and with ( $>F3$ ) septal fibrosis. Serum SCCA-IC levels and liver-tissue SCCA showed a significant correlation ( $p=0.01$ ). ROC curve analysis for comparison of SCCA-IC levels in cases without and with liver disease evolution discriminated the value of 190 AU/ml as the best cut-off for the prediction of evolution. *Conclusions:* Serum SCCA-IC appears significantly correlated to SCCA expression in the liver and being circulating levels significantly higher in patients with liver disease evolution. This serum marker may represent a simply and reliable predictor of early progression to HCV-related cirrhosis.
3. *Background:* Peg-interferon (IFN) and Ribavirin (RBV) is the antiviral standard of care for chronic hepatitis C (CHC). This drug-schedule can provoke in about 15-60% of cases, moderate-severe mood affections threatening adherence to therapy. Since IFN doesn't cross blood-brain barrier, the role of a second messenger mediating the neuro-psychiatric disorders is discussed and particularly cytokines IFN-induced, through lymphocytes T activation, could have an influence on the mood by modulation of serotonin and kynurenine systems. *Aim of the study* was to evaluate the prevalence and severity of depressive symptoms during Peg-IFN and RBV antiviral therapy for CHC and than a) to identify risk-cases for neuro-psychiatric symptoms and to compare the different scales used for predicting early anxiety-depressive axis alterations, particularly between the self & hetero administrations, b) to correlate neuro-psychiatric side effects to serum tryptophan and kynurenine levels, and c) to prevent anxiety and depression, ameliorating adherence and compliance to antiviral therapy using SSRI. *Methods:* Thus, fifty-three out-patients with CHC prospectively recruited in our hepatologic unit, received an antiviral schedule with Peg-IFN-alpha 2a or 2b plus Ribavirin according to genotype (HCV-1-4 for 48 weeks and HCV-2-3 for 24 weeks). The study was done by a trained medical staff and using standard methods as: the Mini International Neuropsychiatric Interview, Hamilton Depression

and Anxiety scale, Beck Depression Inventory and Hospital Anxiety and Depression Scale and respective cut-off to grade neuropsychiatric affections. Measurement of tryptophan and kynurenine were analysed by HPLC and the mean changes in biological measures and the intensity of depressive symptoms were estimated by ANOVA overtime: at baseline, 4 and 24 wks during therapy and 3 months after the end-of-therapy. *Results:* At baseline, 6 cases had a diagnosis of Major Depressive Disease (MDD) as defined by MSD-IV international criteria and fourteen cases developed an IFN-induced depressive disease (IFN-DD) after 4-24 wks of therapy. All these cases were supported with SSRI administration. None of risk-patient dropped-out from this study. All cases showed an evident level-drop in the tryptophan levels, while kynurenine showed a spike after 4-24 weeks of therapy, confirming the patho-physiological involvement of this pathway on TRP depletion by the increase of the KYN/TRP ratio. *Conclusions:* The prevalence of Peg-IFN-induced depression disease (IFN-DD) reached 30% of cases in the present study, showing in all cases a mild grade of mood affection by all psychiatric scales used. After 4-wk of therapy, a BDI score >9 points identified cases with high-risk of IFN-DD. Subjects with IFN-DD showed a significant correlation with the decrease in serum tryptophan more than 2 ug/mL respect to baseline levels and this feature was closely associated to increase of kynurenine levels and KYN/TRP ratio in all cases. Treatment with SSRI in risk-cases, strongly restored QoL and adherence to antiviral therapy and reverted serum tryptophan depletion.

4. *Background:* The use of Peg-interferon (IFN) alpha-2a or 2b type plus Ribavirin (RBV) for chronic hepatitis C therapy in real life practice is significantly targeted to avoid the three fold mortality rates associated to untreated cases, by inducing viral eradication and liver damage regression, so as to define the patients “definitively cured” from liver disease. *Aim* of this analysis was to describe the modalities of antiviral treatment in the Veneto region, in particular the therapy-schedule mainly used and compare the cost-efficacy of treatment with the 2 available Peg-IFNs with strategies proposed as in the every day practice. *Methods:* Twelve on-line hepatologic units, centralized by a network prospectively collected data of 450 subjects that underwent antiviral therapy for chronic hepatitis or cirrhosis. A post-hoc retrospective analysis of cases treated from January 2003 to December 2005 was performed, grouping the study population in 167 cases treated with Peg-IFN alpha-2a (PEGASYS, Roche, fixed-dose of 180µg/weekly) and 288 that received Peg-IFN alpha-2b (PEG-INTRON, Schering-Plough, weight-adjusted-dose from 50 to 150 µg/weekly), both in combination therapy with Ribavirin (RBV). *Results:* Overall SVR, obtained with the Peg-IFN-α2a or α2b plus RBV regimens, was the same (61%), however Peg-IFN-α2b was used at a suboptimal dose in 58% of cases that received <1mcg/kg/week, while 95% of cases treated with Peg-IFN-α2a received the 180 mcg/week. Thus, cases treated with Peg-IFN-α2b<1, showed a lower SVR than those treated with a dose>1mcg/kg/week, respectively 50%vs.66% (p=0,006), particularly in HCV-genotype 1 and 4 (32% vs. 53%; p=0,00). *Conclusions:* By one-way sensitivity analysis, the Peg-IFN-α2b>1 or Peg-IFN-α2a schedules were favoured in HCV-genotype 1 and 4, while the Peg-IFN-α2b<1 in genotype 2 and 3 was the best choice saving about 1800-4500€ per SVR (81%).

## INTRODUZIONE

### **Premessa**

Le malattie epatiche rappresentano nel mondo un problema di rilevante interesse dal punto di vista epidemiologico, clinico e socio-sanitario. Circa il 70% dei casi appare dovuto ad infezioni virali e, secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, almeno 350 milioni di persone sono infette da virus dell'epatite B (HBV) e 250 milioni da virus dell'epatite C (HCV), con una mortalità complessiva di quasi 2 milioni di casi/anno. Sicuramente anche altri fattori eziologici possono essere presi in considerazione oltre ai virus epatitici e da questo punto di vista l'abuso alcolico, l'emosiderosi, l'obesità e gli stati dismetabolici assumono una parte importante nel determinare le epatopatie, soprattutto se sono presenti più fattori associati. In particolare, il danno epatico cronico di qualsiasi eziologia quando prolungato nel tempo (decenni) porta inevitabilmente ad una malattia evolutiva fino alla cirrosi epatica in un terzo dei casi e può complicarsi con lo sviluppo di tumore primitivo del fegato (epatocarcinoma) o di insufficienza epatica, determinando così la morte di molte migliaia di individui ogni anno o la necessità di trapianto epatico nei casi che trovano indicazione. Se da un punto di vista epidemiologico l'incidenza delle epatiti virali (da HBV e HCV) appare in netto decremento grazie a provvedimenti di politica sanitaria che hanno mirato a contenere la diffusione delle nuove infezioni (attento e mirato uso dei prodotti del sangue, applicazione dell'autotrasfusione, diffusione di metodi diagnostici specifici, programmi di vaccinazione), chi oggi è affetto da epatite cronica virale vive una realtà insidiosa per gli aspetti evolutivi e severi che spesso caratterizzano l'epatopatia, pur in completa assenza di sintomi ed è potenzialmente soggetto a rischio di cirrosi epatica e gravi complicanze, spesso temibili per la vita. Da un punto di vista clinico è noto che le malattie epatiche possono assumere un andamento progressivo e caratterizzato da persistente citolisi epatocitaria e deposizione di fibrosi nel lobulo, fino al sovertimento della struttura epatica e allo sviluppo di cirrosi e scompenso epatico. Si stima che il 30% dei casi progredisca allo stadio di cirrosi epatica nei primi 20-30 anni di malattia attiva. La cirrosi è una malattia cronica invalidante gravata da una importante mortalità specialmente quando interviene la fase di scompenso, tanto che il 55% dei soggetti muore ad 1 anno dal primo episodio di ascite, encefalopatia, sanguinamento gastroenterico o sindrome epatorenale. La cirrosi epatica rappresenta la prima causa di morte

nella fascia di età compresa tra i 35-44 anni e la terza in quella tra i 45-50 anni se si considera per confronto la mortalità associata ad altre patologie croniche, come il diabete, la broncopneumopatia, la cardiopatia, la nefropatia e la vasculopatia (*dati ISTAT*). Inoltre essa comporta un serio impegno di gestione clinica, richiedendo un sempre maggior dispendio di risorse e terapie, particolarmente dalla fase di scompenso e/o complicata dall'insorgenza di epatocarcinoma fino al trapianto di fegato (circa 800 casi/anno in Italia), nei casi in cui è possibile questo tipo d'intervento.

Il tasso standardizzato per età e sesso di mortalità per cirrosi epatica è di 14 casi su 100.000 abitanti ed è superiore a quello della maggior parte dei Paesi industrializzati (es. Stati Uniti, Giappone, Canada, Australia, Israele e Regno Unito) essendo preceduto solamente da Austria, Portogallo e Germania (*Armstrong GL, et al. 2000*). Questi valori di mortalità per cirrosi epatica in Italia rappresentano un dato pressoché stabile negli ultimi 25 anni, a differenza di quanto avviene per le altre cause di morte ed in genere per la mortalità globale, dimostrando chiaramente la emergente problematica delle malattie croniche di fegato almeno per la coorte di soggetti che risulta affetta da infezione cronica virale e da malattia evolutiva. Nel Nord-Italia, lo *studio Dionysus* (*Bellentani et al.*) ha analizzato il 70% (6917 casi) degli abitanti di due paesi (Montegalliano e Cormons) come campione statistico di popolazione aperta e ha dimostrato una grande diffusione delle malattie epatiche con segni suggestivi di alterazione della funzionalità epatica nel 17% della popolazione esplorata, dimostrando nella nostra regione una prevalenza paragonabile a quella dell'ipertensione arteriosa. In questa categoria di soggetti la prevalenza di HBsAg è stata dell'1,2% (di cui 4,5% con uno stadio di cirrosi Child A) ed il 3,2% è risultato portatore di epatite C o anti-HCV positivo, in quest'ultimi, l'incidenza di epatocarcinoma è stata di 2,5% casi/anno. Complessivamente la prevalenza di cirrosi epatica nella popolazione esaminata è stata dell'1,1% (significando un interessamento di 45.000 soggetti nel Veneto e di 560.000 casi in Italia) e questo dato appare sicuramente ed ampiamente sottostimato. Il 70-75% delle epatopatie croniche si associa ad infezione cronica da virus epatitici, ed in particolare da virus C, e rappresentano un rilevante problema di salute pubblica anche nella regione Veneto: a) per l'elevata prevalenza del virus nella popolazione generale, b) per la presenza di molti casi non ancora identificati (portatori di anti-HCV con ALT normali) e c) per l'impegno assistenziale che comporta la gestione dei casi rapidamente evolutivi o già in fase di cirrosi epatica.

## Epidemiologia e storia naturale dell'epatite C

Si stima che la prevalenza dell'infezione da virus dell'epatite C (HCV) nella popolazione mondiale sia circa del 3% (figura 1). Nei paesi industrializzati tale virus è responsabile del 70% dei casi di epatite cronica, del 40% di cirrosi epatica, del 60% di epatocarcinomi e del 30% dei trapianti di fegato (Hoofnagle JH, et al. 2002; Chemello L, et al. 1999).



Figura 1: Prevalenza nel mondo del virus dell'epatite C (HCV) (WHO 1999)

La prevalenza e l'incidenza dell'infezione da HCV presentano una notevole variabilità geografica e temporale e si possono, infatti, delineare almeno 3 profili di trasmissione sulla base anche di dati di prevalenza età-specifici. Nei paesi che presentano il *primo profilo di trasmissione*, come Stati Uniti ed Australia, la maggior parte delle infezioni si riscontra in soggetti di 30-49 anni, soprattutto giovani adulti che facevano uso di droga per via parenterale. Negli Stati Uniti, in particolare, si è evidenziato un elevato incremento dell'incidenza di infezione da HCV tra la fine degli anni '60 e l'inizio degli anni '80 (Wasley A, et al. 2000). Nei paesi con il *secondo profilo*, come Giappone e Italia, invece, la prevalenza dell'infezione da HCV è maggiore nei soggetti anziani (>50 anni) indicando, quindi, che il rischio di contagio si colloca in tempi più remoti rispetto agli Stati Uniti. Infine, i paesi con il *terzo profilo*, come l'Egitto, mostrano alti tassi di infezione in tutte le fasce d'età evidenziando un continuo rischio di acquisizione dell'infezione da HCV. A differenza dei paesi con il primo profilo negli altri due casi i principali fattori di trasmissione sono rappresentati dalla trasfusione di

sangue infetto e dall'impiego di terapie per via endovenosa con strumenti non monouso, e solo più recentemente dall'utilizzo di droga per via endovenosa che sembra aver contribuito alla trasmissione dell'infezione tra i giovani adulti. Il virus dell'epatite C è stato identificato come entità nosologica solo a partire dal 1989 (*Choo QL, et al. 1989; Kuo G, et al. 1989*) e ad oggi risulta molto difficile descriverne la storia naturale (*Seeff LB, et al. 2000 e 2002*) per una serie di motivi tra i quali: 1) l'inizio della malattia che rimane incerto in almeno la metà dei casi; 2) l'evoluzione della stessa durante la fase cronica che è molto spesso asintomatica e che rimane tale fino allo stadio avanzato; 3) il trattamento antivirale che ha modificato radicalmente il decorso della malattia. Indipendentemente dalla modalità di trasmissione dell'infezione, dopo una fase acuta, che nella maggior parte dei casi è asintomatica e si esaurisce entro sei mesi, nel 70%-80% dei casi si assiste ad una cronicizzazione dell'infezione. Questa seconda fase di malattia va dallo stato di portatore asintomatico a forme croniche di variabile attività ed evolutività fino allo stadio di cirrosi ed alla frequente degenerazione in epatocarcinoma. Il tasso di cronicizzazione della malattia varia dal 54% all'86% a seconda del tipo di osservazione effettuata, prospettica o retrospettiva, e della popolazione in studio risultando più basso negli studi prospettici che hanno valutato la progressione di malattia in donne giovani o in pazienti giovani con epatite acuta asintomatica. In generale si può dire che l'età al momento dell'infezione, il sesso e il tipo trasmissione sono fattori prognostici importanti per quanto riguarda l'evolutività della malattia. Infatti si è osservato un tasso di progressione maggiore nei soggetti di sesso maschile che si contagiano in tarda età e che presentano come cofattore di danno epatico l'abuso alcolico rispetto a quello riscontrato nei soggetti di sesso femminile di età inferiore ai 40 anni e che non presentano potus attivo (*Poynard T, et al. 1997*). L'evoluzione a cirrosi nei soggetti di sesso femminile avviene in un intervallo di tempo di circa 30 anni rispetto ad una media significativamente inferiore (13 anni) riscontrata tra i soggetti di sesso maschile. L'insorgenza della cirrosi, intesa come stato di sovvertimento sclero-nodulare del parenchima epatico, è il momento più importante nella storia naturale della malattia epatica e si ritiene che circa il 30% dei soggetti infetti sviluppi questa complicanza entro 20-30 anni dall'inizio della malattia (*Seeff LB, et al. 2001*), anche se alcuni pazienti possono rimanere asintomatici e senza evidenza significativa di malattia per molti anni, se non per tutta la vita (*figura 2*). Dal momento in cui si instaura la cirrosi inizia una fase irreversibile che, in 10-15 anni, porta nella maggior parte dei casi allo scompenso epatico e all'insorgenza di complicanze (varici esofagee, ascite, encefalopatia

epatica, epatocarcinoma) e, spesso, rende necessario il trapianto epatico (Ghany MG, et al. 2003).

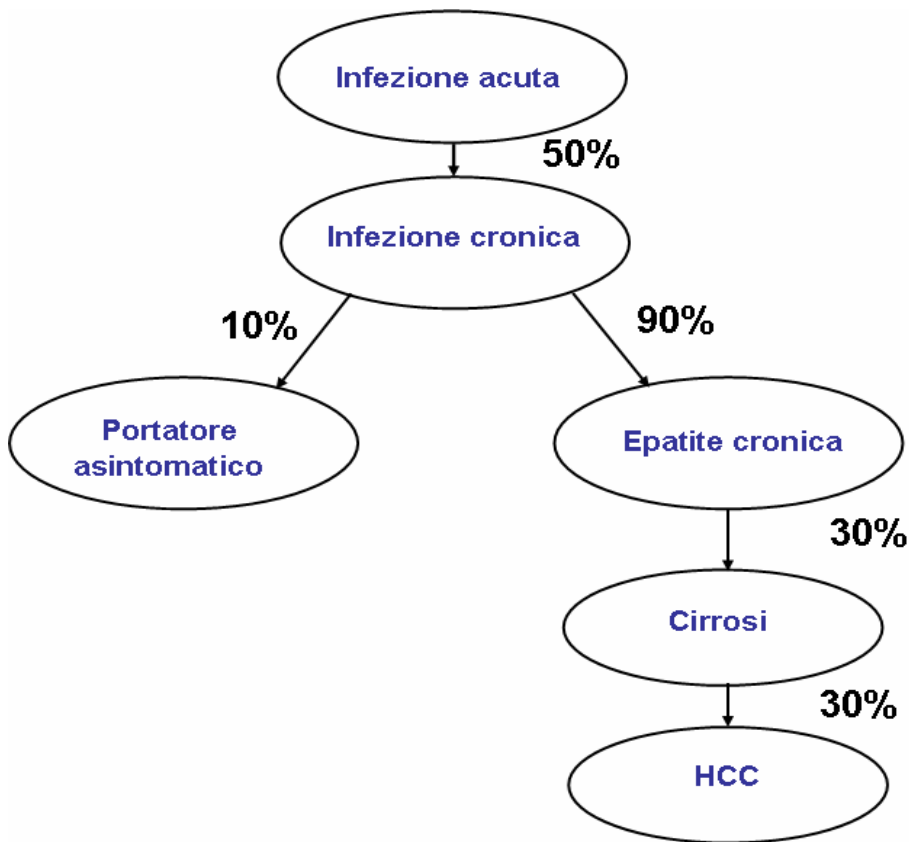


Figura 2: Storia naturale dell'infezione da HCV.

### La struttura genomica e la diagnosi di infezione da HCV

Dopo lo sviluppo di test diagnostici per i virus dell'epatite A e B (HAV ed HBV) si riscontrava lo stesso la trasmissione, soprattutto mediante trasfusioni di sangue ed emocomponenti, di un agente biologico responsabile di epatite. La malattia fu all'inizio denominata "epatite non-A e non-B". L'identificazione dell'agente responsabile fu molto difficile per le sue caratteristiche e, solamente grazie all'avvento di tecniche biomolecolari fu possibile identificarlo e caratterizzarlo nel 1988, definendolo virus dell'epatite C (HCV) (Choo QL, et al. 1989; Kuo G, et al. 1989). Questo virus è stato ed è tuttora al centro di molti studi per le seguenti peculiarità: a) HCV persiste per molto tempo nei tessuti infetti (fegato e non solo) con cronicizzazione dell'infezione e progressione della malattia fino alla cirrosi epatica con possibile evoluzione in insufficienza epatica ed epatocarcinoma; b) HCV è globalmente molto diffuso, secondo stime WHO si ha una prevalenza mondiale di più di 250 milioni di persone con l'infezione; c) sono ancora poche e

non completamente soddisfacenti le terapie a disposizione, e solo circa il 40% dei pazienti trattati sviluppa una risposta sostenuta nel tempo (SVR).

### Struttura e classificazione di HCV

Il genoma di HCV è costituito da una molecola di RNA a filamento singolo e di senso positivo ed ha molta similarità con i *Pestivirus* e *Flavivirus*. HCV viene classificato in un genere a se stante, *Hepacivirus* della famiglia *Flaviviridae*. Ha forma sferico, è provvisto di pericapside (envelope) ed ha diametro di circa 36-62 nm e densità di circa 1,08g/ml (Lauer GM, et al. 2001)(figura 3).

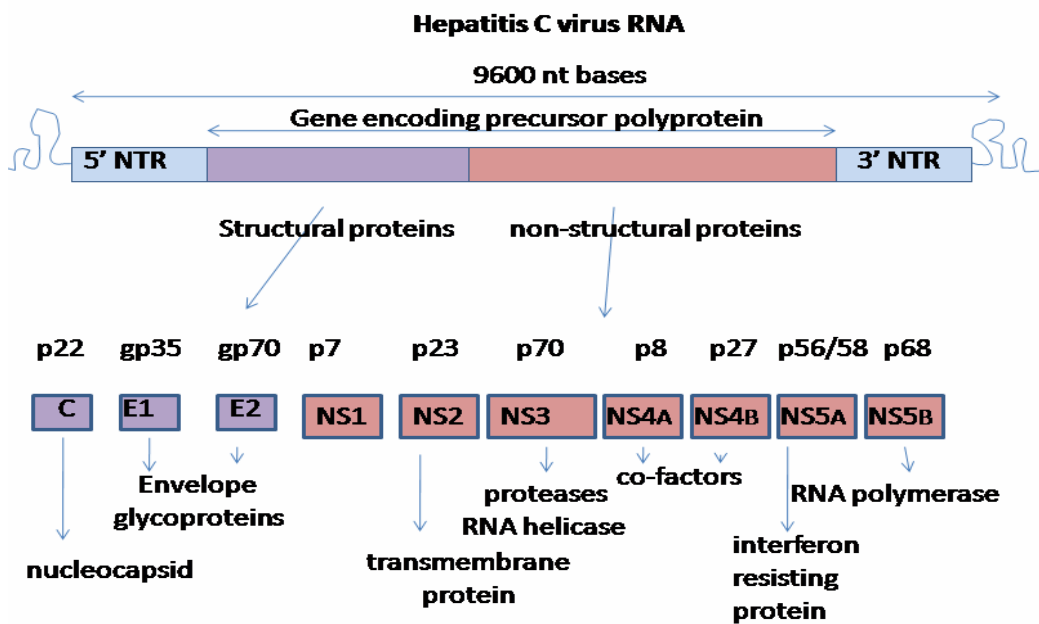


Figura 3: Il genoma di HCV e le specifiche proteine di clivaggio.

Il genoma di HCV è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento, di senso positivo di circa 9400 nucleotidi e viene tradotto in un unico polipeptide dal quale per successiva digestione si generano le diverse proteine virali. L'RNA genomico è caratterizzato da una parte codificante centrale e da due estremità non-codificanti (Honda M, et al. 1999; Kolykhalov AA, et al. 2000). La porzione codificante del genoma virale è suddivisa in 2 regioni, strutturale e non-strutturale, in base alle caratteristiche delle proteine che codificano: la regione strutturale all'estremità 5' contiene i geni C, E1 ed E2 e la regione non-strutturale all'estremità 3' è costituita dai geni NS, NS2, NS3, NS4 ed NS5. All'estremità 5', non codificante del genoma (5' UTR) si trovano delle sequenze "long terminal repeats" (LTR) di circa 330 nucleotidi. Questa è la regione del genoma virale maggiormente conservata per cui la maggior parte dei protocolli diagnostici prevede l'utilizzo di sonde e primer con omologia per questa regione. La regione 5'UTR è molto conservata in quanto regola la trascrizione genomica e dirige il

legame al ribosoma cellulare. A valle di 5' UTR si trova il gene C (core), il cui prodotto si lega all' RNA virale per formare il nucleocapside; inoltre sembra avere delle funzioni regolatrici sull' espressione degli altri geni virali.

- Il gene *E1* codifica la *proteina E1* che dopo glicosilazione dà origine alla glicoproteina gp33.

-Il gene *E2* insieme al gene *NS1* codifica per una proteina, anch'essa glicosilata, la *gp72* ( questa proteina ha molto somiglianza con gp120 di HIV). Gp 33 e gp 72 sono componenti dell'envelope virale. Di seguito ai geni strutturali, in direzione 3', ci sono i geni non strutturali che codificano diverse proteine: NS2 codifica la proteina p23, una metallo-proteasi in grado di scindere i prodotti genici di NS2 e NS3; NS3 codifica la proteina p72, una serin-proteasi responsabile della scissione della poliproteina, inoltre p 72 possiede attività elicastica necessaria alla replicazione virale; NS4 codifica una proteina costituita da 2 subunità: a (p10) e b (p27); infine NS5 codifica 2 proteine NS5a o p56, in grado di inibire la protein chinasi R, una chinasi indotta dall'interferone e la proteina p70 che è la RNA polimerasi RNA dipendente. All'estremità 3' c'è la regione non tradotta 3'UTR con probabile ruolo nella replicazione virale.

### ***Variabilità genomica***

HCV è caratterizzato da estrema variabilità genomica che ha portato alla distinzione di 6 diversi genotipi, caratterizzati da una omologia di sequenza del 65%, all'interno dei quali si identificano diversi sottotipi, con omologia superiore al 90%. Ciascun sottotipo è composto da singoli "isolati". E' però da notare che nell'individuo infettato il virus circola sotto forma di "quasispecie", ossia di una popolazione di virus filogeneticamente correlati con divergenza nucleotidica non superiore all'1,5% (*Martell M, et al. 1992; Bukh J, et al. 1995*). Questa grande variabilità genetica è dovuta alle caratteristiche della polimerasi virale ed alla pressione selettiva operata dalla risposta immunitaria (*Ogata N, et al. 1991*). La polimerasi di HCV non possiede attività di "proof-reading" con correzione degli errori di incorporazione nucleotidica (caratteristica della DNA polimerasi) con conseguente bassa fedeltà dell'apparato replicativo ed elevato tasso di mutazione. La grande variabilità genetica di HCV ha importanti implicazioni biologiche come: persistenza del virus grazie a meccanismi di "escape", generazione di ceppi resistenti alla terapia, insuccesso della strategia vaccinale. La variabilità all'interno del genoma di HCV non è uniformemente distribuita ma segue una predisposizione determinata dalla pressione selettiva da parte della risposta immunologia dell'ospite ed è inoltre strettamente associata alla specifica funzione della proteina codificata. Le sequenze maggiormente conservate sono



sequenza della regione NS5A associata a mancata risposta al trattamento con interferone nei pazienti con il genotipo 1b di HCV. Da una analisi comparativa diretta di tutta la sequenza nucleotidica di HCV di pazienti prima e durante trattamento con interferone è emerso che una regione di 40 aminoacidi della proteina NS5A denominata Interferon Sensitivity Determining Region (ISDR) presentava differenze caratteristiche. Nei pazienti non responsivi alla terapia antivirale questa sequenza è conservata, mentre in quelli che rispondono al trattamento sono presenti più di tre mutazioni. Dati "in vitro" hanno dimostrato che la proteina NS5A del genotipo 1b è in grado di inibire la RNA-activated protein kinase (PKR), che è una delle più potenti proteine antivirali indotte dall'interferone alfa. Se però nella sequenza aminoacidica di NS5A sono presenti mutazioni, queste ne alterano l'interazione con PKR e permettono che tale chinasi svolga la sua attività fosforilativa, che è responsabile dell'inibizione della sintesi proteica virale.

#### **La diagnosi di infezione da HCV**

La diagnosi si basa sulla rilevazione della reattività anticorpale nel siero e successivamente sulla determinazione quali-quantitativa di HCV-RNA nel siero.

I test anticorpali di prima generazione valutavano la presenza dell'antigene C-100 della regione NS4 adeso alla fase solida su micropiastra (metodo immunoenzimatico ELISA) o su striscetta di nitrocellulosa (Radio Immuno Blotting Assay, RIBA). I test di II generazione hanno permesso di identificare addizionali attività anticorpali verso le proteine ricombinanti 5-1-1, C33-c, C22-3. Nel caso di positività per due o più antigeni virali il test è considerato positivo, indeterminato se c'è reazione positiva per un singolo antigene e negativo in assenza di attività specifica di conferma (falsi positivi ELISA).

La determinazione dell'acido nucleico virale (HCV-RNA) nel siero avviene mediante reazione polimerasica a catena (PCR)(Garson JA, et al.1991). La rilevazione di HCV-RNA nel siero è il parametro più importante per la diagnosi di epatite cronica C nelle condizioni cliniche in cui l'assenza di un evidente interessamento epatico (transaminasi normali) e lo stato di immaturità o di depressione del sistema immune (neonati, alcolisti, politrasfusi, soggetti coinfecti con più virus o in terapia immunosoppressiva) possono portare ad una diagnosi errata.

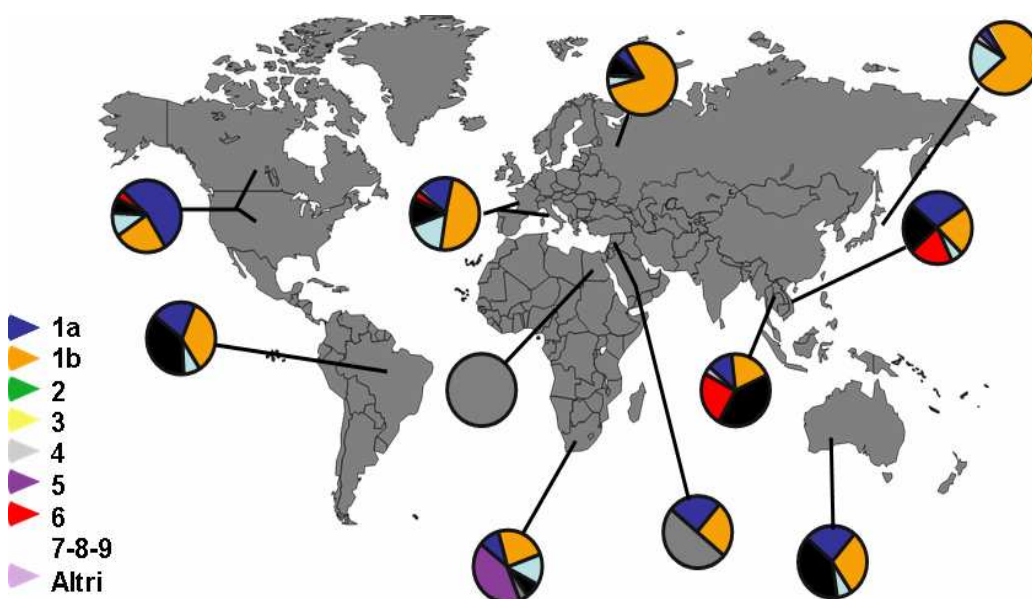
Il test HCV-RNA qualitativo è inoltre molto importante nelle prime fasi di infezione acuta da HCV quando non si sono ancora sviluppati gli anticorpi e ancora, dopo un ciclo di terapia antivirale per identificare i soggetti responsivi con eradicazione virale (HCV-RNA negativo) rispetto a quelli che pur avendo le transaminasi

normali non hanno eradicato il virus (HCV-RNA positivo) e potrebbero necessitare di ulteriore trattamento.

Esistono oggi dei tests in grado di dosare la viremia (HCV-RNA quantitativo), che risultano indispensabili per il monitoraggio della risposta alla terapia antivirale o “cinetica virale in terapia” e che permettono di effettuare una “stopping rule” nei casi resistenti al trattamento, limitando molto i costi ed effetti collaterali in assenza di reali probabilità di una eradicazione virale.

### I genotipi di HCV

1) L'attuale nomenclatura internazionale (*Simmonds P, et al. 1994; Robertson B, et al. 1998*) considera sei tipi di HCV, suddivisi in 11 sottotipi strutturalmente correlati, cioè con una omologia del 77-79 %, mentre variabili individuali entro un singolo sottotipo possono avere similarità di sequenza superiore all'88%. I genotipi 1, 2 e 3 sono ubiquitari mentre quelli di tipo 4 e 5 sono presenti in Africa e il genotipo 6 in Asia (*figura 5*).



*Figura 5: Distribuzione dei genotipi nel mondo*

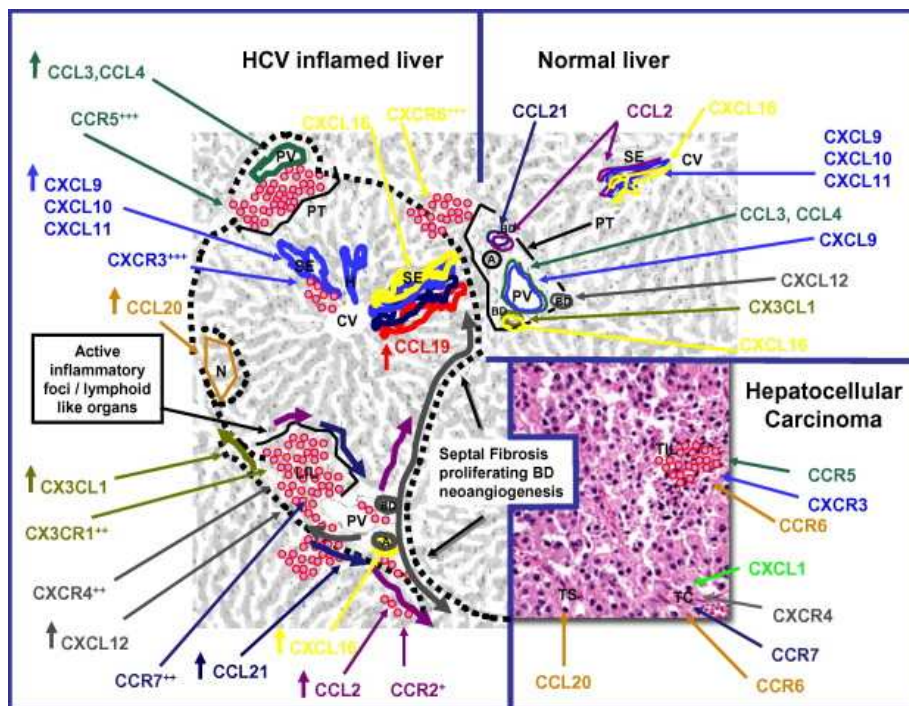
L'interpretazione clinica associata ad alcuni genotipi di HCV è prevalentemente basata sulla maggior prevalenza nelle forme croniche più evolutive di quei genotipi (HCV-1b e HCV-2) che si sono maggiormente diffusi con la prima coorte di soggetti infetti, prevalentemente donne contagiate attraverso la trasfusione di sangue, piuttosto che HCV-3, più rappresentato tra i tossicodipendenti (individui rappresentativi della seconda coorte di contagio). Il genotipo comunque resta il parametro virologico più predittivo della sensibilità alla terapia antivirale, correlando HCV-1 con la maggior resistenza all'interferone.

## **Immunopatogenesi dell'infezione da HCV**

In seguito all'infezione da HCV, l'azione di diversi mediatori dell'infiammazione contribuisce al reclutamento di cellule infiammatorie a livello del fegato per contrastare la replicazione virale. In questa prima fase la risposta immunitaria è in grado di controllare abbastanza efficacemente la replicazione virale, tant'è vero che nei pazienti immunocompromessi (pazienti HIV positivi o trapiantati) si ha una rapida progressione della malattia con danno epatico severo. D'altro canto l'azione delle cellule immunitarie ed infiammatorie reclutate può a loro volta contribuire al danno necrotico-infiammatorio con conseguente fibrosi epatica. La cirrosi è lo stadio finale di questa progressione. Il fegato, per resistere a questa infiammazione persistente subisce una serie di modifiche che consistono nella proliferazione dei dotti biliari e nella formazione di setti fibrosi. Quest'ultimi conferiscono al fegato cirrotico la caratteristica forma nodulare. All'esame microscopico del fegato cirrotico si notano la formazione di piccoli vasi sanguigni lungo i setti e la generazione di organi simili-linfoidei. La conseguenza di questo processo è la distruzione dell'architettura epatica con alterazione del flusso sanguigno epatico seguito da alterazioni metaboliche ed immunologiche del fegato. Come detto, durante l'infezione da HCV, l'infiammazione cronica, la rigenerazione tissutale e la fibrosi sono gli elementi che portano alla progressiva riduzione della funzionalità epatica. I mediatori dell'infiammazione e della risposta immunitaria sono i principali regolatori di questi processi quindi i maggiori responsabili dell'esito di un'infezione da HCV. Nei pazienti HCV-RNA positivi si osserva una elevata espressione, modulata dall'interferone dei geni MHC di tipo I e II. Anche la produzione di TNF-alfa e IL-6 risulta incrementata. Le diverse citochine ed il loro ruolo nel danno epatico da HCV può essere così schematizzato:

- CCL2-MCP-1 ha effetto profibrinogenetico
- CCL3-MIP-1a partecipa alla risposta immunitaria Th 1 ed alla compartimentalizzazione della risposta immunitaria;
- CCL20-MIP-3a promuove il danno necrotico-infiammatorio tramite cellule T CD4 positive, cellule dendritiche, macrofagi, e favorisce l'epatocarcinogenesi;
- CCL21-SLC partecipa alla organizzazione del tessuto linfoide portale, inoltre è profibrinogenetico;
- CXCL8-IL-8 è coinvolto nell'epatocarcinogenesi ed è un marcatore prognostico di invasione, neoangiogenesi e metastasi tumorale;

- CXCL9-MIG nella risposta immune tipo Th 1, la compartimentalizzazione della risposta immunitaria e promuove l'infiammazione intraepatica;
- CXCL-IP-10, la frazione IP-10 è un marcatore sierico di attività intraepatica della malattia ed è correlato con l'esito della terapia anti-HCV;
- CXCL12-SDF partecipa nell'organizzazione del tessuto linfoide portale, ha un ruolo nella rigenerazione e modulazione durante la fibrosi sulle cellule epiteliali del condotto biliare, nella epatocarcinogenesi e nella disseminazione tumorale;
- CXCL16-Bonzo è coinvolto nell'adesione linfocitica al fegato mediata dalle integrine;
- CX3CL1-Fractalkine favorisce il reclutamento ed adesione delle cellule infiammatorie.



La figura 6 rappresenta un possibile scenario delle localizzazioni delle citochine e dei loro recettori nel fegato normale, infiammato e nell'epatocarcinoma.

Le citochine e i recettori sono dello stesso colore, A-arteria, BD-cellule del dotto biliare, CV-vena centrale, H-epatocita, LIL-linfociti infiltrati nel fegato, N-area necrotica, PT-dotto portale, PV-vena portale, SE-endotelio dei sinusoidi, TC-cellule tumorali, TIL-linfociti infiltrati nel tumore, TS-tessuto attorno al tumore, +-fino al 30% dei recettori per LIL, ++-tra 30 e 60% di recettori per LIL, +++-oltre il60% di recettori per LIL.

Quando la risposta immunocompetente fallisce durante l'infezione, come purtroppo avviene frequentemente con HCV, si stabilisce un'infezione cronica. Questa provoca infiammazione, rigenerazione e fibrosi che può esitare in cirrosi ed epatocarcinoma. Diversi studi indicano le citochine ed i loro recettori come agenti responsabili del ricircolo dei leucociti nel fegato infiammato ed inoltre sono

anche catabolizzatori della rigenerazione, della fibrosi e della trasformazione maligna data dall'infiammazione persistente.

Attualmente non sono noti marcatori in grado di differenziare in fase precoce le forme di epatite acuta da HCV che guariscono da quelle che, invece, evolvono nella forma cronica. È, però, possibile identificare queste ultime monitorando l'andamento delle transaminasi (ALT) e dell'HCV-RNA nel siero. La diagnosi di infezione acuta da HCV è determinata dalla positività del test di replicazione virale (HCV-RNA) che precede il rialzo delle ALT nel soggetto infetto con malattia sintomatica (ittero, astenia, febbre, nausea). Il periodo di incubazione della malattia è, in media, di 7-8 settimane con un range di 2-30 settimane; l'aumento delle ALT è spesso modesto, generalmente inferiore a 800-1000 UI/L. Una volta che l'infezione acuta si sia esaurita tre sono, essenzialmente, i profili che si possono delineare:

- *Guarigione* dall'infezione e dalla malattia epatica con normalizzazione definitiva delle ALT e negativizzazione di HCV-RNA nel siero.
- *Stato di infezione cronica* con persistenza del virus ma con ALT normali.
- *Epatopatia con cronicizzazione* dell'infezione ed una epatite cronica caratterizzata da una attività bioumorale più o meno spiccata e da un atteggiamento più o meno evolutivo nel tempo.

Quest'ultimo è il profilo più frequentemente osservato, infatti, circa l'80% dei pazienti infettato da virus C presenta una forma cronica che inesorabilmente evolve anche se lentamente nel tempo.

### **La fibrosi epatica e gli indici di funzionalità epatica quali parametri per la stadiazione della malattia**

La fibrosi che si sviluppa a livello epatico è un meccanismo di compenso messo in atto dall'organismo di fronte all'esposizione cronica a sostanze epatotossiche o a virus epatotropi ed ha lo scopo di limitare l'estensione dell'infiammazione epatica conseguente al danno tissutale instaurando un processo pseudoriparativo attraverso la sintesi di numerosi componenti della matrice extracellulare tra cui alcune glicoproteine, quali il collagene, l'elastina, la fibronectina e la laminina. Queste proteine, insieme ai proteoglicani, danno origine a polimeri complessi insolubili che alterano la struttura del lobulo epatico portando, con il tempo, ad un sovvertimento del parenchima. Il collagene e le proteine della matrice sono per la maggior parte prodotte dalle cellule stellate che si trovano in forma quiescente nel fegato e che vengono attivate a cellule miofibroblastiche, capaci di produrre proteine della matrice in caso di danno

epatico. La produzione di proteine della matrice extracellulare in eccesso rispetto al loro turnover fisiologico determina l'interposizione di una membrana basale tra epatociti e sinusoidi che rende più difficoltoso lo scambio di sostanze nutritive. Tale fenomeno prende il nome di "capillarizzazione dei sinusoidi". Inoltre nel processo di fibrogenesi si assiste anche alla trasformazione della matrice cellulare in una forma più densa, di tipo fibrillare, che risulta più resistente all'azione di degradazione enzimatica. La fibrosi inizia a livello portale-periportale e si estende progressivamente all'interno del lobulo epatico fino alle vene centrolobulari con formazione di setti fibrosi. Lo stadio finale di questo processo è la cirrosi caratterizzata da una fibrosi estesa con setti che congiungono gli spazi portali e le vene centrolobulari e da noduli di rigenerazione del parenchima epatico (Marcellin P, et al. 2002). La stadiazione della fibrosi epatica viene effettuata mediante biopsia epatica eco-guidata; tra i metodi semi-quantitativi utilizzati per definirla quelli più conosciuti sono il Knodell score (HAI), l'Ishak score (HAI modificato), lo Scheuer score e il Metavir score. Lo score attualmente più utilizzato è quello di Ishak che stabilisce un punteggio da 0 a 18 per la quantizzazione dell'attività necroinfiammatoria che viene suddivisa in: necrosi periportale o piecemeal necrosis (score da 0-4), infiammazione globulare (score da 0-4), infiammazione portale (score da 0-4), necrosi confluyente (score da 0-6). Per la definizione della fibrosi viene invece utilizzato un punteggio da 0-6 (Ishak K, et al. 1995). Rispetto agli altri metodi semi-quantitativi lo score di Ishak permette una più precisa definizione degli stadi di fibrosi e quindi una migliore valutazione della progressione della malattia e dell'efficacia di una eventuale terapia antivirale. Attualmente la biopsia rappresenta il gold standard per la stadiazione della fibrosi epatica, tuttavia è una metodica invasiva e le complicanze si possono verificare nello 0,6-5% dei pazienti (Perrault J et al. 1978; Lindor KD et al. 1996, Gunneson TJ, et al. 2002). Inoltre è un esame costoso e richiede l'ospedalizzazione per almeno 6-18 ore (Wong JB et al 2000). Recenti studi hanno evidenziato l'importanza delle dimensioni del campione epatico per una corretta stadiazione della fibrosi (Collredo G. et al. 1996). Infine confrontando la biopsia epatica effettuata per via percutanea e per via laparoscopica si è visto che la cirrosi non viene correttamente diagnosticata nel 10-30% dei casi (Poniachik J et al 1996). Attualmente approcci non invasivi per la definizione istologica della malattia epatica si basano su sintomi e segni clinici, test di laboratorio routinari, marcatori sierologici di fibrosi e infiammazione, indici di funzione epatica, studi di imaging (McHutchinson JG, et al 2000). Tuttavia, nessuno di questi test o marcatori considerato singolarmente presenta, ancora,

accuratezza e attendibilità nel definire, in particolare, la fibrosi epatica (*Fontana RJ et al 2002*). Per tutti questi motivi sono stati condotti diversi studi al fine di individuare marcatori non invasivi di fibrosi che possano rappresentare una valida alternativa alla biopsia epatica nella stadiazione della fibrosi. Attualmente la classificazione dei pazienti si avvale di alcuni sistemi validati su casistiche limitate ed i più noti sono rappresentati dall'APRI (*Wai CT, et al. 2003*), dall'indice di fibrosi di Forns (*Forns X, et al. 2002*), dal Fibrotest (*Imbert-Bismut F, et al. 2001*) e dal FIB-4 (*Sterling RK, et al. 2006*) (figura 7).

Indice	Parametri	Outcome	Cut-off	AUROC	Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>Fibrotest</b> (42)	$\alpha$ 2-macroglobulina, aptoglobina, apolipoproteina A1, GGT, bilirubina	Metavir F2-F4	< 0,1 > 0,6	0,87	100 70	22 95	50 91	100 76
<b>Forns fibrosis index</b> (41)	Età, piastrine, GGT, colesterolo	Scheuer 2-4	< 4,2 > 6,9	0,81	94 30	51 95	40 66	96 80
<b>Apri index</b> (40)	AST/piastrine	Ishak 3-6	< 0,5	0,88	91	47	61	86
<b>Fib-4 index</b> (43)	Età, piastrine, AST, ALT	Ishak 4-6	< 1,45	0,76	70	74	42	90

AUROC: area sotto la curva ROC; Se: sensibilità; Sp: specificità; VPP: valore predittivo positivo; VPN: valore predittivo negativo

Figura 7: Marcatori sierologici non invasivi per la stadiazione della fibrosi epatica.

L'APRI è dato dal rapporto tra AST normalizzate e piastrine, l'indice di Forns si calcola in base all'età del paziente, alle piastrine, alla GGT e al colesterolo, il Fibrotest, invece, è dato dalla combinazione di bilirubina, GGT, aptoglobina, apolipoproteina A1 e alfa-2-macroglobulina. Infine, il FIB-4 risulta dalla combinazione di piastrine, età del paziente, AST e ALT. Questi sistemi di valutazione non sono in grado di classificare correttamente molti pazienti, in particolare il Fibrotest utilizza parametri, come l'alfa-2-macroglobulina, l'aptoglobina o l'apolipoproteina A1, che non vengono dosati comunemente nella pratica clinica, e la loro accuratezza diagnostica non supera l'80-85% (*Afdhal NH, et al. 2004*). Uno studio recentemente condotto, ha suggerito che sia possibile utilizzare più indici non invasivi di fibrosi epatica per aumentare l'accuratezza diagnostica rispetto all'uso di un singolo test. La necessità di eseguire la biopsia epatica verrebbe così ridotta del 50-70% (*Sebastiani G, et al. 2006*), anche se nel 20-30% dei casi con epatite cronica C rimane una pratica diagnostica non sostituibile.

## **Squamous cell carcinoma antigen (SCCA): caratteristiche strutturali e funzionali**

SCCA è una proteina avente un peso molecolare di circa 45kDa (*Ikeda I, et al. 1987*) che appartiene alla superfamiglia delle serpine (inibitori delle proteasi seriniche). Il clonaggio del cDNA di SCCA, comprendente 1170 nucleotidi per una sequenza di 390 amminoacidi, ha permesso infatti di evidenziare, che la sequenza aminoacidica di SCCA è omologa a quella di altre serpine e in particolar modo a quella delle serpine appartenenti alla sottofamiglia delle ov-serpine, così chiamate per la loro omologia con l'ovoalbumina (*Suminami Y, et al. 1991*). L'antigene SCC, inizialmente isolato nel carcinoma della cervice uterina (*Kato H, et al. 1977*), consiste in più di 10 frazioni proteiche con diversi punti isoelettrici, compresi fra 5.9 e 6.6. Queste frazioni sono state distinte in due gruppi principali: la frazione acida con PM 44.5 kDa e un punto isoelettrico compreso fra 5.9-6.2, e la frazione neutra con PM 44.9 kDa e un punto isoelettrico compreso fra 6.3 e 6.6 (*Kato H, et al. 1977*). Tali componenti sono distribuite diversamente nei vari tessuti, in particolare, quella acida è presente nel tessuto peritumorale e viene rilasciata in circolo dalle cellule squamose maligne, mentre quella neutra si trova sia nelle cellule squamose maligne che negli epiteli normali (*Kato H, et al. 1992*). I due geni codificanti le due isoforme di SCCA sono localizzati sul cromosoma 18, nella regione q21.3 di 600 kb (*Hamada K, et al. 2001*) insieme ad almeno altri quattro geni codificanti varianti serpiniche. Questi due geni, quasi identici, sono distribuiti in tandem sul cromosoma (appaiamento testa-coda): il gene più vicino al centromero codifica l'antigene SCC di tipo 1 (SCCA1), quello più vicino alla regione telomerica per l'SCCA di tipo 2 (SCCA2). Probabilmente essi derivano da eventi di duplicazione di un gene ancestrale comune (*Schneider SS, et al. 1995*). L'analisi della sequenza aminoacidica presumibile dalla sequenza nucleotidica dei due geni (SCCA1 e SCCA2), e l'analisi dei punti isoelettrici delle due isoforme ha permesso di concludere che il gene SCCA1 codifica l'SCCA neutro, mentre il gene SCCA2 codifica la frazione acida dell'antigene SCC. L'elevata omologia nella sequenza nucleotidica dei due geni (98%) si traduce in una altrettanto elevata omologia di sequenza aminoacidica delle due proteine stimata intorno al 92%. È stato dimostrato che esistono almeno due varianti della frazione acida di SCCA, la prima che si forma in seguito alla fosforilazione dell'isoforma neutra e la seconda che è, invece, codificata dal gene SCCA2 (*Abe H, et al. 1994*). Come le altre serpine, SCCA1 ed SCCA2 presentano una struttura secondaria che alterna foglietti  $\beta$  ed  $\alpha$  eliche. Il centro di reazione (RSL) è caratterizzato da una sequenza aminoacidica

conservata, che però è diversa nelle due proteine e corrisponde a residui serina-serina per SCCA1, e a residui serina-leucina per SCCA2. Questa sostituzione rende conto della diversa specificità d'azione delle due proteine, che agiscono su target molecolari diversi. L'SCCA1 infatti è un potente inibitore sia di proteasi seriniche, come la chimotripsina, sia di cisteina proteasi papaina-like, come le catepsine L, S, K. Il bersaglio di SCCA2, è rappresentato dalle proteasi seriniche chimotripsina-like, come la catepsina G e la chimotripsina dei mastociti (*Schick C, et al. 1997 e 1998*). Nell'epitelio squamoso normale SCCA è stato identificato, mediante immunocistochimica, a livello degli strati spinoso e granuloso (*Suehiro Y, et al. 1986*), ma non in quello basale o parabasale. Al contrario l'mRNA per SCCA è localizzato principalmente negli strati basale e parabasale dell'epitelio squamoso (*Takeshima N, et al. 1992*). Il coinvolgimento di SCCA nella regolazione dei processi proteolitici ha sicuramente delle importanti implicazioni a livello dei processi neoplastici, dal momento che l'equilibrio tra le proteasi ed i loro inibitori, può influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione, e la morte cellulare stessa. Questo aspetto è correlabile con l'aumento di espressione di SCCA in tessuti tumorali, rispetto agli epitelii normali ed esistono alcune evidenze di un legame tra livello di espressione di proteina e il grado di sviluppo tumorale (*Silverman GA, et al. 1998*). Molto interessante appare il ruolo di SCCA nell'inibire la morte programmata (apoptosi) delle cellule tumorali di origine epiteliale (*Suminami Y, et al. 2000*), processo che risulta diminuito o addirittura soppresso durante la trasformazione tumorigenica con la conseguenza che le cellule tumorali non vengono eliminate, ma continuano a proliferare in maniera incontrollata. Il ruolo di SCCA è stato dimostrato mediante esperimenti di trasfezione transiente di linee cellulari, non esprimenti SCCA, con il cDNA di dell'isoforma SCCA1 tramite un vettore retrovirale. Si è osservato che le cellule trasfettate ed esprimenti SCCA1, stimulate con reagenti inducenti l'apoptosi (es. TNF-alpha, FAS), sopravvivono più a lungo rispetto alle cellule di controllo (*Numa F, et al. 1996*). Le cellule trasfettate con il cDNA di SCCA1 si sono dimostrate resistenti anche all'apoptosi mediata "in vitro" dalle cellule Natural Killer (NK) attivate dall'interleuchina 2 (*Suminami Y, et al. 2001*). Questi dati suggeriscono, quindi, che l'espressione di SCCA1 renderebbe le cellule cancerose resistenti a diversi meccanismi di killing attraverso l'inibizione dell'apoptosi. Il meccanismo di protezione delle cellule tumorali dall'apoptosi implicherebbe l'inibizione dell'attività della caspasi-3 che è una proteasi coinvolta nella cascata dei segnali intracellulari che attivano il processo apoptotico. E' stato, infatti, dimostrato che cellule epiteliali (293T) esprimenti SCCA1 esprimono la caspasi-3 in quantità

minore rispetto ai controlli. È stato inoltre evidenziato che anche cellule trasfettate con il cDNA dell'isoforma SCCA2 possiedono una ridotta attività delle caspasi-3 e 9 e che sono in grado di resistere all'apoptosi indotta da radiazioni (Murakami A, et al. 2001). Analogamente a quanto osservato nelle cellule di origine epiteliale la valutazione dell'attività apoptotica nell'epatocarcinoma ha portato a concludere che anche in questa neoplasia il meccanismo apoptotico sia alterato e significativamente diminuito (Kountouras J, et al. 2003) e questo potrebbe dipendere proprio da SCCA1 che, essendo iper-espresso nei tumori epatici, modulerebbe in senso negativo la morte cellulare programmata, contribuendo così alla sopravvivenza delle cellule tumorali. Studi recentemente effettuati hanno evidenziato che nell'epatocarcinoma sono iper-esprese le varianti serpiniche SCCA1, SCCA2 e SCCA-PD (Beneduce L, et al. 2005). Recentemente è stata dimostrata la presenza di SCCA nel siero, prevalentemente associata ad immunoglobuline di tipo IgM con livelli circolanti che sono proporzionali all'espressione dell'antigene nel fegato. In particolare, l'antigene l'SCCA presente nel tessuto epatico è stato rilevato, mediante immunistochemica, nel 18% dei pazienti con epatite cronica, nel 26% di quelli con cirrosi e nel 70% dei pazienti con epatocarcinoma (Pontisso P, et al. 2004). Osservando l'immunocomplesso SCCA-IgM nel siero si è visto che questo è presente a livelli maggiori nei casi di epatopatia più severa. Inoltre lo studio del comportamento di SCCA-IgM nel tempo ha evidenziato come i livelli di questo immunocomplesso siano sostanzialmente stabili nelle forme non evolutive, mentre aumentino significativamente nelle forme evolutive. Questo risultato è stato confermato nei pazienti affetti da epatopatia cronica la cui malattia si è evoluta nel tempo con un aumento significativo della componente fibrotica istologicamente documentato (Pontisso P, et al. 2006). Quindi il monitoraggio dell'immunocomplesso SCCA-IgM e la sua espressione in termini di variazione nel tempo potrebbe essere utile ai fini prognostici per la valutazione non solo dell'epatopatia cronica ma anche per identificare la sottopopolazione con malattia già evoluta a rischio di epatocarcinoma.

### **Modificazioni indotte dalla terapia antivirale**

La storia naturale dell'epatite cronica da virus C si dimostra spesso evolutiva con alti tassi di morbilità e mortalità dovuti al notevole aumento dei casi di cirrosi epatica ed epatocarcinoma. Il trattamento antivirale appare, ad oggi, l'unico modo per prevenire queste forme in quanto è in grado di determinare un rallentamento nella progressione della fibrosi nei soggetti trattati e, soprattutto, in

quelli che raggiungono l'eradicazione virale (*Bernardinello E, et al. 2006*). L'obiettivo principale della terapia antivirale è quello di ottenere una completa eradicazione dell'infezione virale indispensabile per prevenire la progressione istologica della malattia, cioè la cirrosi epatica e le complicanze, nel singolo paziente ma anche per limitare la diffusione dell'infezione nella popolazione generale. I soggetti con stadio avanzato di fibrosi presentano maggiore resistenza alla terapia per cui il trattamento antivirale risulta meno efficace rispetto ai soggetti con epatite cronica non ancora evolutiva ed è gravato da una maggiore comparsa di effetti collaterali, soprattutto di tipo neuropsichiatrico (depressione, irritabilità) ed ematologico (neutropenia e piastrinopenia ingravescenti), che controindicherebbero il trattamento con IFN (*Heathcote EJ, et al. 2003*). Tuttavia è indiscutibile il beneficio ottenuto in questa categoria di pazienti se si riesce ad ottenere una risposta completa e duratura con la terapia antivirale sia in termini di significativa riduzione della morbilità che della mortalità (*Camma C, et al. 2001; Benvegnù L, et al. 1998*). La percentuale di pazienti con epatopatia evoluta che raggiunge l'eradicazione virale indotta dalla terapia (risposta completa e sostenuta nel tempo che viene definita dall'assenza di viremia e dalla stabile normalizzazione delle ALT nel tempo) si attesta al 20-40% dei casi trattati e risulta significativamente più bassa rispetto ai casi ancora senza cirrosi (60-80%). Il presupposto fondamentale affinché la terapia antivirale sia efficace, sia in corso di epatite cronica che di cirrosi epatica, è la corretta selezione del paziente, l'individualizzazione dello schema terapeutico, il monitoraggio accurato e l'adeguata compliance del paziente, considerando che la mancata risposta dopo 3-4 mesi deve indurre la sospensione della terapia. Nell'ultimo decennio la terapia dell'epatite C ha subito una evoluzione estremamente significativa passando dalla monoterapia con alfa-interferone ricombinante (IFN), utilizzata nei primi anni '90, alla terapia di combinazione con alfa-interferone e ribavirina e solo più recentemente all'interferone alfa peghilato a lunga emivita PEG-IFN $\alpha$ 2a (2003) e PEG-IFN $\alpha$ 2b (2001) in monoterapia o in associazione alla ribavirina. L'interferone alfa ricombinante ( $\alpha$ 2a e  $\alpha$ 2b, rispettivamente di 40 Kd e 12 Kd) è oggi coniugato con una grossa molecola di polietilenglycole (PEG) che ne aumenta il potenziale terapeutico in quanto lo rende meno suscettibile alla degradazione enzimatica e ne allunga l'emivita plasmatica consentendo, quindi, una unica somministrazione settimanale. Quando è utilizzato in associazione con Ribavirina è in grado di determinare una risposta virologica sostenuta nel tempo con definitiva eliminazione dell'infezione da HCV in circa il 50% dei pazienti con infezione da HCV-1 ed in circa l'80-90%

di quelli con infezione da HCV-2 e HCV-3 (Alberti A, et al. 2001). Per questi motivi la terapia antivirale di associazione con l'alfa-interferone peghilato e Ribavirina rappresenta, oggi, la scelta migliore per indurre l'eradicazione virale e condizionare l'evoluitività dell'epatopatia, soprattutto nei casi di cirrosi epatica.

### **La terapia antivirale con interferone (IFN- $\alpha$ ) e Ribavirina**

Lo scopo principale della terapia dell'epatite cronica con IFN è quello di prevenire lo sviluppo della cirrosi e dell'epatocarcinoma, riducendo l'infiammazione e il danno alle cellule epatiche, ottenendo un miglioramento nel quadro istopatologico e un calo progressivo dei valori delle transaminasi. L'interferone è in grado di ridurre la carica virale nei soggetti con epatite cronica, in una percentuale di casi fino a completa eradicazione del virus. La risposta virologica sostenuta, definita come una conta inferiore o uguale a 100 copie di HCV-RNA/ml riscontrabili nel siero dei pazienti a 6 mesi dalla sospensione del trattamento, è riportata nella maggior parte degli studi con una frequenza pari al 15-20% dei casi trattati con un ciclo di 48 settimane di monoterapia con 3-5 MU di IFN- $\alpha$ , sottocute, tre volte a settimana (TIW) (Hoofnagle J, et al. 1997). Alcuni autori riferiscono una maggiore risposta con dosaggi maggiori e per periodi più lunghi (6MU/TIW per 12 mesi) (Chemello L, et al. 1995). Recentemente l'associazione alla terapia con IFN della Ribavirina, un analogo nucleotidico dotato di un ampio spettro di attività antivirali (inibizione della sintesi di ribonucleoproteine e della trascrizione virale, riduzione della capacità infettante delle particelle virali), ha permesso di ottenere migliori risultati terapeutici (Davis et al.,1998). La terapia di associazione permette di ottenere delle risposte virologiche sostenute in una percentuale maggiore rispetto all'IFN- $\alpha$  da solo (15-20%), con un regime terapeutico di 3-5 MU/TIW di IFN- $\alpha$  s.c. + Ribavirina 1000-1200 mg/die per 24 settimane (30-35%), ed ancora maggiori se il trattamento viene protratto per 48 settimane (38-43%) (McHutchinson JC, et al. 1998; Poynard T, et al. 1998). L'avvento dei nuovi preparati peghilati ha ulteriormente aumentato il potenziale terapeutico dell'interferone nei confronti dell'epatite cronica. Diversi studi hanno dimostrato una maggiore efficacia in termini di risposta virologica, biochimica ed istopatologica, sia dal confronto tra monoterapia di IFN- $\alpha$ -2a o IFN- $\alpha$ -2b coi corrispondenti farmaci peghilati, sia dal confronto degli schemi terapeutici in associazione con Ribavirina. PEG-IFN- $\alpha$ -2a in monoterapia, alla dose standard di 180  $\mu$ g, è associato a scomparsa del virus a distanza di 6 mesi dalla interruzione della terapia, in percentuali che variano dal 36% al 40% rispetto al 15%-20% di IFN- $\alpha$ -2a in monoterapia (Zeuzem S, et al 2000). La terapia combinata PEG-IFN- $\alpha$ -2a più Ribavirina invece sembra offrire

una percentuale di negativizzazioni sostenute della viremia del 56% rispetto al 47% di IFN- $\alpha$  più Ribavirina (*Fried MW, et al. 2002*). PEG-IFN- $\alpha$ -2b in monoterapia alle dosi standard di 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per 48 settimane, ha portato ad una risposta virologica sostenuta stimata del 23-25%, rispetto al 12% di IFN- $\alpha$  da solo (*Glue P, et al. 2000*). L'associazione di Ribavirina portava alla negativizzazione della viremia, in maniera persistente, il 54% dei casi, rispetto al 47% nei casi trattati con IFN- $\alpha$  e Ribavirina. Diversi studi hanno evidenziato anche fattori non farmacologici associati ad una più frequente risposta virologica e conseguentemente ad un migliore decorso dei parametri biochimici ed istopatologici. Tra questi è importante il genotipo del virus, con una tendenza ad una peggiore risposta all'IFN nei casi con genotipo 1. Direttamente correlate ad una prognosi peggiore sono anche l'alta carica virale, i bassi livelli di ALT pretrattamento, un grado di cirrosi più avanzato e un'età superiore ai 40 anni (*Zeuzem S, et al. 2000*).

### **Proprietà farmacodinamiche**

L'interferone esplica la sua attività legandosi a specifici recettori sulla superficie cellulare che danno inizio ad una complessa cascata di interazioni tra proteine iniziando una rapida attivazione genomica. La loro principale attività in vivo consiste nell'induzione del cosiddetto stato antivirale nelle cellule in risposta alla presenza di RNA a doppia elica. Si producono i seguenti enzimi:

- la 2'-5' oligoadenilato sintetasi in grado di attivare una RNasi che a sua volta degrada la RNA a singola e doppia catena,
- le fosforilasi PKR che bloccano la sintesi proteica della cellula infettata,
- le proteine Mx GTPasi ad attività antivirale.

Inoltre gli IFN di tipo I aumentano il potenziale litico delle cellule NK e modulano l'espressione delle molecole di MHC con aumentata espressione presentazione della classe I e ridotta espressione della classe II. Tutte queste attività inibiscono globalmente la sintesi proteica e di RNA, riducendo quindi la proliferazione delle cellule infette, portandole a morte (*Wang YS, et al. 1999*). La peghilazione è un processo chimico che consiste nel legame di una molecola inerte di glicolepolietilenico ad una proteina, in questo caso all'interferone. La peghilazione permette all'interferone di avere alcune caratteristiche vantaggiose: assorbimento più lento, emivita più lunga, clearance più lenta, riduzione dell'immunogenicità. L'uso della peghilazione ha prodotto la sintesi di due farmaci: Peg-IFN alfa-2a e alfa-2b. La ribavirina è un analogo nucleosidico con attività antivirale contro i virus a DNA e RNA. La terapia di combinazione Peg-IFN alfa-2a o alfa-2b con la ribavirina garantisce una migliore risposta contro HCV.

### **Proprietà farmacocinetiche**

La massima concentrazione di Peg-IFN alfa-2a avviene tra le 72 e le 96 ore dopo somministrazione sottocutanea e rimane sostenuta per 168 ore. La clearance sistemica media in adulti sani è 94 ml/h ed ha un'emivita di 80 ore. La massima concentrazione di Peg-IFN alfa-2b avviene dopo 15 e 48 ore dopo la somministrazione e rimane sostenuta per 48-72 ore. La tabella sottostante paragona i parametri farmacodinamici e farmacocinetici del Peg-IFN alfa-2a e alfa-2b.

Parametri	Peg-IFN alfa-2a	Peg-IFN alfa-2b
Peso molecolare	40 Kdaltons	12 Kdaltons
Metodo di produzione	DNA ricombinante	DNA ricombinate
Cmax	Dose dipendente	Dose dipendente
Tmax	72-96 ore	15-44 ore
T 1/2	80 ore	40 ore
Clearance	94 mL/h	22 mL/hxkg
Insufficienza renale	Riduce la clearance	Riduce la clearance

### **Effetti collaterali della terapia con interferone**

La terapia con interferone è gravata da diversi effetti collaterali, alcuni immediati, altri ritardati, alcuni ben tollerati, altri gravi a tal punto da portare a riduzione delle dosi o anche a sospensione del trattamento. Tra gli effetti collaterali più comuni:

1. reazione febbrile simil-influenzale associata a brividi, cefalea, mialgie che si riscontra poche ore dopo la somministrazione del farmaco. Questa reazione può durare inizialmente fino a 24-36 ore, ma progressivamente si attenua risultando quasi assente e ben tollerata dai pazienti nell'arco delle prime 4 settimane (*Glue P, et al. 2000*) ed è controllata con trattamento antinfiammatorio sintomatico;
2. astenia presente nel 90% dei pazienti e che compare già dopo le prime somministrazioni di interferone e in genere aumenta di intensità nel corso del trattamento (*Dieperink E, et al. 2000*);
3. effetti gastrointestinali come anoressia (nel 30-50% dei casi) che può essere associata a nausea, vomito, diarrea e calo ponderale;
4. a carico della cute sono state descritte alopecia, esantemi cutanei al tronco e alle estremità, eritema, orticaria, esacerbazione di una psoriasi preesistente, nonché reazioni nel sito di iniezione (dolore, eritema, prurito);
5. effetti neuropsichiatrici: depressione, ansia, labilità emotiva, irritabilità, insonnia in percentuale variabile da studio a studio (da 10 a 40%).

Gli interferoni peghilati possono inoltre causare o aggravare disordini gravi o potenzialmente fatali come di tipo neuropsichiatrico autoimmune, ischemico e infettivo. Tra gli effetti neuropsichiatrici sono stati descritti il suicidio, ideazioni suicidarie o omicidiarie, aggressività. Tali effetti collaterali sono stati riscontrati non solo in pazienti con storia di malattie psichiatriche ma anche in pazienti con anamnesi negativa per depressione. Entrambi i tipi di interferone peghilato possono provocare depressione midollare con severa citopenia soprattutto a carico dei neutrofili e delle piastrine. Sono state descritte inoltre comparsa o aggravamento di disfunzioni tiroidee. Gli eventi cardiovascolari includono ipotensione, aritmie sopraventricolari, angina pectoris, infarto miocardio. A carico del sistema gastrointestinale: coliti ulcerative ed emorragiche, pancreatiti anche fatali. I disordini autoimmunitario includono tiroiditi, trombocitopenia, artriti reumatoidi, nefriti interstiziali, lupus eritematoso sistemico, psoriasi. Ricordiamo a carico del sistema respiratorio: dispnea, polmoniti, infiltrati polmonari e tra i disordini oftalmologici le emorragie retiniche, spot cotonosi, trombosi dell'arteria e della vena. Vengono anche riportati casi di insufficienza epatica. La ribavirina inoltre aumenta il rischio di anemia emolitica (10-30% dei casi) che può presentarsi precocemente anche dopo 1 o 2 settimane dopo l'inizio della terapia, mentre raramente compaiono reazioni acute da ipersensibilità: orticaria, angioedema, broncocostrizione, anafilassi. Nella maggior parte dei pazienti il trattamento con Peg-IFN alfa-2b presenta una tollerabilità praticamente identica a quella di IFN- $\alpha$ -2b con la necessità di sospendere la terapia solo nel 13-14% dei casi, tuttavia porta più frequentemente a modifiche delle dosi a causa di eventi avversi di tipo ematologico (neutropenia). Da uno studio emerge che nel corso di trattamento con Peg-IFN alfa-2a la frequenza degli effetti collaterali è lievemente superiore rispetto ad IFN $\alpha$  tranne che per la depressione e l'insonnia (*Fried MW, et al. 2002*). Si è resa necessaria la sospensione della terapia nel 10% dei casi trattati con Peg-IFN alfa-2a; le alterazioni ematologiche sono la causa che porta più spesso alla necessità di riduzione delle dosi.

### **Epatite C, disturbi psichiatrici ed affettivi**

Molti studi hanno evidenziato come vi siano dei deficit cognitivi, sintomi psichiatrici e diminuzione della qualità di vita (*Foster GR, et al. 1998*) nei pazienti affetti da epatite cronica HCV. In effetti viene riportato in letteratura che i pazienti affetti da epatopatia cronica HCV-correlata soffrono di astenia, dolori muscolo-scheletrici, dolenzia ai quadranti addominali superiori, depressione, ma l'eziologia di questi sintomi rimane sconosciuta. I sintomi infatti non sembrano essere

associati con il grado di epatite, la presenza di epatiti autoimmuni (*Goh J, et al. 1999*) o la cirrosi (*Foster GR, et al. 1998*) o i livelli di citochine circolanti (*Gershon A, et al. 2000*). Comunque altri Autori ritengono che la presenza di tali sintomi nel contesto dell'infezione da HCV non implica necessariamente un nesso di casualità ma che ci siano altri fattori associati che potrebbero alterare indipendentemente la percezione dei pazienti sul proprio benessere, come l'ansia per la diagnosi, la prognosi e la terapia, abusi di sostanze in anamnesi o in atto (*Forton DM, et al. 2003*). Il questionario per la qualità di vita è stato usato in maniera estensiva nei pazienti con epatite cronica HCV. C'è un generale accordo che la qualità della vita è significativamente ridotta nei pazienti affetti da epatite cronica HCV (*Davis G, et al. 1994*) rispetto a persone sane e rispetto ai pazienti affetti da epatite cronica HBV e che migliora dopo terapia che porta all'eradicazione virale. L'impatto della diagnosi e la conseguente ansia è collegata alla diminuzione della qualità di vita come è stato dimostrato in un piccolo studio in cui i pazienti che non erano a conoscenza della loro positività per HCV riportarono qualità di vita migliori rispetto ai pazienti che erano a conoscenza del loro stato di infettività ma comunque inferiori rispetto alle persone sane (*Rodger AJ, et al. 1999*). L'astenia è un sintomo comune riportato dai pazienti affetti da epatite cronica HCV. Numerosi studi hanno riportato una prevalenza di tale disturbo dal 20 al 80% dei pazienti (*Forton DM, et al. 2003*) che migliora comunque dopo il trattamento. Bisogna comunque ricordare che l'astenia è un sintomo multidimensionale che è influenzato da interrelazioni sociali, comportamentali, fattori psicologici e di personalità. D'altro canto, *Wessely S.(2002)* afferma che non ci sono evidenze che l'infezione da HCV di per sé sia associata all'astenia e alla depressione dato che: 1) la maggioranza se non tutti gli studi in questo campo sono metodologicamente difettosi e non tengono in conto i fattori confondenti; 2) non c'è relazione tra astenia e marker di infiammazione epatica; 3) in studi retrospettivi selezionati non c'è più astenia nei pazienti affetti da epatite cronica HCV paragonati a donatori sani e non c'è un eccesso di infezione da epatite da HCV in pazienti che presentano sindrome da affaticamento cronico. Anche la depressione è un reperto frequente nei pazienti affetti da epatite cronica HCV. La relazione tra epatite C e depressione è complesso. Innanzi tutto molti dei pazienti affetti da HCV hanno abusato di droghe per via endovenosa quindi sono già predisposti alla depressione e alla labilità emotiva, secondariamente è noto come la notizia di una malattia cronica e potenzialmente invalidante porti alla depressione. Altri studi hanno dimostrato come vi sia un impatto del virus C sulle funzioni cognitive: in pazienti con epatite

cronica C minima vi sarebbe una diminuzione dell'attenzione, della concentrazione e della velocità psicomotoria. Questa alterazione sembra diminuire dopo terapia antivirale condotta con successo (Forton DM, et al. 2002, Hisalbeck RC, et al. 2002). Anche Weisserborn K. (2004) osservò un calo dell'attenzione e delle funzioni esecutive e un calo del rapporto N-acetil-aspartato/creatina nella corteccia cerebrale alla spettroscopia elettronica con un rallentamento dell'EEG nei pazienti affetti da epatite cronica HCV con funzione apatica ben conservata, alterazioni più marcate venivano rilevate nei pazienti che lamentano un'astenia più marcata. È stato ipotizzato che l'epatite C possa dare un'encefalite simile a quella osservata nell'infezione da HIV. Questa teoria si basa sul riscontro alla risonanza magnetica spettroscopica di Forton di alterazione dei metaboliti cerebrali simile a quella osservata nei pazienti con HIV. Altri autori (Kramer L, et al. 2002) dimostrarono un significativo aumento della latenza della P300 in pazienti con epatite cronica HCV. In un recente studio di Cozzi et al. (2006) è stato riscontrato come in un gruppo di 39 pazienti con epatite cronica HCV avessero una riduzione dei livelli di triptofano sierico del 28% rispetto a volontari sani paragonabili per sesso ed età, e rispetto ad un gruppo di pazienti con epatite cronica HBV con stadio di malattia epatica sovrapponibile. I pazienti con epatite cronica HC inoltre avevano un grado di ansia e di depressione (misurati con STAI 1 e 2 e con Ham-D) superiore agli altri due gruppi. Il livello di triptofano comunque non era correlato con i livelli di HCV-RNA, e il basso dosaggio di triptofano nel siero dei pazienti con HCV sia responsabile dei sintomi di depressione e di ansia.

### **Neurotossicità in corso di terapia con interferone**

Fra i disturbi indesiderati più importanti che l'interferone può provocare vi sono quelli neuropsichici, sia per la loro influenza sulla limitazione della dose, sia in termini di frequenza ed in termini di gravità delle manifestazioni. Numerosi sono gli studi che documentano la frequente associazione tra disturbi psichiatrici e terapia con interferone (Fekkes D. et al. 2003, Crone C. et al. 2003, Gohier B. et al. 2003). I dati suggeriscono l'esistenza di almeno due distinte sindromi indotte dall'IFN, una "neurovegetativa" e una "affettivo-cognitiva" che sembrano avere anche 2 distinti meccanismi patogenetici (Capuron L, et al. 2004).

#### *Sindrome neuro-vegetativa*

La sindrome neurovegetativa è caratterizzata da anoressia, astenia, alterazioni del sonno, dolore, rallentamento psicomotorio. Compare solitamente entro 2 settimane dall'inizio della terapia con IFN nella maggior parte dei pazienti, e sembra poco responsiva alla terapia con paroxetina (Capuron L, et al. 2002).

Sembra che tale sindrome sia associata ad alterazioni della via dopaminergica a livello dei gangli basali.

#### *Sindrome affettivo-cognitiva*

La sindrome affettivo-cognitiva è caratterizzata da sintomi di depressione, ansia, e alterazioni cognitive (perdita di concentrazione, disturbi della memoria, episodi di confusione). Compare più tardivamente, è responsiva alla terapia antidepressiva e sembra essere associata all'attivazione delle vie neuroendocrine e all'alterato metabolismo della serotonina. I quadri clinici di tale sindrome sono:

- *la sindrome depressiva*
- *l'ansia, l'irritabilità e i sintomi maniacali*
- *lo stato confusionale acuto*
- *le alterazioni cognitive*

#### *Sindrome depressiva.*

Questa sindrome si sviluppa lentamente, più frequentemente in un periodo compreso tra le 4 e le 12 settimane. Comprende un largo spettro di condizioni cliniche che vanno dai sintomi depressivi passeggeri fino ad una sindrome più severa che soddisfa i criteri del DSM-IV per la depressione maggiore. La distinzione tra i livelli di depressione si basa non solo sull'intensità e sulla durata dei sintomi depressivi, ma anche sull'eventuale presenza di sintomi fisici, emotivi e cognitivi, e sul decorso longitudinale della patologia (*Valentine AD, et al. 1998*). Nei casi più gravi è stata riscontrata la presenza di ideazione suicidaria, a volte portata a termine (*Jannsen HL, et al. 1994*).

#### *Ansia, irritabilità e sintomi maniacali.*

Questi sono i sintomi meno approfonditi in letteratura. *Kraus et al. (2003)* hanno rilevato un aumento dell'ansia e dell'ostilità in un gruppo di pazienti trattati con IFN. L'irritabilità è stata descritta da *McHutchinson et al. (1998)* nel 32% dei pazienti trattati con IFN-alfa e Ribavirina. Essa può manifestarsi come sintomo a sé stante, come reazione all'astenia o come facente parte della sindrome depressiva. In alcuni casi recede in seguito all'assunzione di antidepressivi (*Musselman DL, et al, 2001*). Sono stati riportati anche episodi maniacali indotti da IFN, sebbene meno comuni rispetto agli episodi depressivi (*Kanno A, et al. 1999; Striter D, et al. 1997*).

#### *Stato confusionale acuto*

Si sviluppa rapidamente dopo la somministrazione di dosi elevate di IFN per via endovenosa o intraventricolare. Consiste in genere in disorientamento, letargia,

sonnolenza, ritardo psicomotorio e sintomi psicotici, tra i quali le allucinazioni (Meyers CA, et al. 1991).

#### *Disturbi cognitivi indotti dall'IFN.*

È difficile rilevare i disturbi cognitivi indipendentemente da quelli affettivi e di personalità in quanto tali aspetti sono tra loro correlati. Infatti le performance cognitive sono influenzate dai disturbi dell'umore e d'altra parte una depressione reattiva può insorgere in seguito al disagio psicologico che deriva dalla diminuzione delle prestazioni cognitive. Tra le funzioni cognitive più spesso alterate vengono indicati disturbi di attenzione, di memoria, di fluency verbale e di esecuzione di compiti semplici. (Pountianen E, et al. 1994). Il tempo necessario per la totale reversibilità è dell'ordine di alcuni giorni secondo Valentine et al. (1998), mentre altri Autori (Bocci V, et al. 1981) concordano su tempi di circa due settimane. Altri Autori (Meyers CA, et al, 1991) osservano invece una persistenza della sintomatologia fino a tre anni dopo la sospensione. Tali discrepanze si devono probabilmente alla generale difficoltà nel codificare un protocollo di valutazione delle disfunzioni e alle possibili interferenze di altri quadri patologici.

#### *Alterazioni elettrofisiologiche indotte dall'IFN*

Dalla letteratura inoltre emerge un ruolo dell'IFN nell'alterazione dell'attività elettroencefalografica con riduzione dell'attività alfa e aumento dell'attività beta (Kamei S, et al. 2002, Amodio P, et al. 2005). I dati suggeriscono che l'IFN-alfa aumenti la sincronizzazione EEG in modo dose dipendente, con una generale diminuzione dell'attività alfa e un aumento dell'attività beta. Jeugling et al.(2000) hanno osservato mediante tecniche di neuroimaging di tipo funzionale un ipometabolismo delle aree frontali in pazienti trattati con basse dosi di IFN-alfa suggerendo l'ipotesi che si tratti di una sindrome frontale. Tutti i sintomi citati sono completamente reversibili, salvo i casi in cui si siano sviluppate vere e proprie lesioni organiche.

#### *La sindrome depressiva indotta da IFN*

I dati epidemiologici relativi ai disturbi psichiatrici variano molto a seconda delle statistiche: per quanto riguarda la terapia con IFN dell'epatite cronica, Trask et al. (2000) riporta un'incidenza compresa tra lo 0% e il 70%, affermando che la maggior parte dei ricercatori presentano valori compresi tra il 10% e il 40%. Pariante et al. (1999) su 50 pazienti trattati con 6-10 MU per tre volte alla settimana per tre mesi e sottoposti a un'intervista strutturata secondo il DSM-IV, riportano un'incidenza di sintomi psichiatrici del 22%. Il 32% di 50 pazienti trattati con 3 MU 3v/settimana per 6i mesi manifesta alla BDI e al subset "emozionale"

della SF-36 un significativo peggioramento del profilo psichiatrico a partire dal sesto mese di terapia (*Hunt CM, et al. 1997*). Il calcolo dell'incidenza degli effetti neuropsichiatrici in questi pazienti ha dato risultati discordanti, ma i valori più frequenti sono tra il 20% e il 35%.

*Otsubo et al. (1997)* riportano che nel 37% degli 83 pazienti sottoposti a terapia per epatite C si era presentato almeno un episodio di depressione maggiore nell'arco dei 6 mesi della terapia e una significativa diminuzione dell'umore secondo i criteri del DSM-III-R e della Ham-D. Tra gli Autori che hanno studiato l'uso dell'IFN in campo oncologico, *Caraceni et al. (1998)* non riportano sostanziali alterazioni neuropsichiatriche o cognitive in un campione di 70 pazienti affetti da melanoma e trattati con 3 MU di IFN-alfa per 36 settimane. *Capuron et al. (1999)*, in 3/10 pazienti affetti da melanoma metastatico ad alto rischio trattati con 100 MU la settimana per un mese, descrive diversi segni di depressione secondo la MADRS (*Montgomery Åsberg Depression Rating Scale*), peraltro correlati alla valutazione psichiatrica basale.

L'incidenza dei disturbi psichiatrici presenta dunque risultati non sempre concordanti. Questo è dovuto soprattutto a fattori di ordine metodologico: diversa numerosità campionaria, differenti definizioni di depressione, utilizzo di diverse scale di valutazione. Spesso il numero esiguo dei pazienti considerati e la diversità dei parametri di valutazione non consentono un confronto diretto tra i diversi studi. Tra i questionari usati la BDI (*Beck Depression Inventory*) è uno dei più frequenti, ma alcuni Autori (*Trask PC, et al, 2000; Cavanaugh S, et al. 1984*) pensano che possa sovrastimare i punteggi di depressione, a causa della prevalenza degli item somatici. Altri Autori la ritengono un test valido e riproducibile oltre che facilmente somministrabile. Uno studio di *Hauser et al. (2002)* ha dimostrato l'efficacia della somministrazione della BDI ogni due settimane, invece *Valentine et al. (1998)* propongono una rivalutazione ogni tre mesi, intervallo ritenuto troppo lungo da *Trask et al. (2000)* in considerazione del fatto che è proprio nei primi tre mesi che si verificano con maggior frequenza gli effetti neuropsichici. Tutti gli Autori concordano in una valutazione prima dell'inizio della terapia, sia per valutare al basale il paziente, sia per escludere dalla terapia i soggetti che presentino livelli di depressione e/o ansia più elevati rispetto alla popolazione generale (*Hunt CM, et al. 1997*).

#### *Sindrome depressiva e sottotipi di IFN*

Sebbene sia chiaro che l'esposizione all'interferone si associato con incremento dell'incidenza della depressione ci sono poche valutazioni che mettano in relazione la frequenza e il grado di depressione con i tipi di IFN. Malaguarnera e

collaboratori riscontrarono che il trattamento con IFN-r alfa-2b era associato con depressione di grado più severo e con maggior prevalenza di ideazioni suicidarie (*Malaguarnera M, et al. 2001*) rispetto al trattamento con IFN-r alfa-n1. Sembra inoltre che in modelli animali, la somministrazione centrale di IFN-alfa a topi si associata ad incremento del tempo di immobilità (interpretato come risposta depressiva) (*Makino M, et al. 2000*). Anche la peghilazione sembra influenzare l'insorgenza della depressione: per esempio, tra 1121 pazienti randomizzati al trattamento con Peg-IFN alfa-2a e ribavirina, Peg-IFN alfa-2a e placebo, o IFN-alfa-2b e ribavirina per 48 settimane, l'incidenza di depressione fu rispettivamente del 22%, 20% e 30% con un differenza significativa tra il gruppo a cui fu somministrato la combinazione di Peg-IFN alfa-2a e ribavirina e il gruppo trattato con l'associazione IFN alfa-2b e ribavirina (*Fried MW, et al. 2002*). Al contrario tra i 1530 pazienti randomizzati a Peg-IFN alfa-2b più ribavirina e IFN alfa-2b e ribavirina per 48 settimane, l'incidenza della depressione fu simile nei due gruppi, andando dal 29 al 34% e perciò sembra che la peghilazione di IFN alfa-2b non riduca il grado di depressione indotta da IFN (*Manns M, et al. 2001*). Comunque in entrambi questi due studi la presenza di depressione si basava su un solo sintomo e non rappresentava la diagnosi di depressione maggiore. Come la maggior parte degli effetti collaterali da farmaci, anche la depressione indotta da IFN sembra essere correlata con la dose (*Lindsay KL, et al. 1996*) e la durata di trattamento (*Hauser P, et al. 2002*). Lo sviluppo della depressione non avviene immediatamente ma si insatura con una media di 8-12 settimane dopo l'inizio della terapia (*Mulsseman DL, et al. 2001, Hauser P, et al. 2002*). Anche le modalità di somministrazione sembrano avere un ruolo sulle modalità di insorgenza della depressione: la somministrazione endovenosa provoca depressione più frequentemente e più rapidamente della somministrazione sottocutanea (*Capuron L, et al. 2001*). Nell'epatite cronica HCV-correlata la terapia combinata di Peg-IFN e ribavirina ottiene maggiori risultati in termini di risposta sostenuta a lungo termine rispetto alla monoterapia con IFN, ma anche la ribavirina sembra giocare un ruolo nello sviluppo della depressione. Infatti uno studio che ha valutato 56 pazienti con epatite cronica HCV-correalata trattati con sola ribavirina o con placebo ha rilevato depressione nel 20,7% del gruppo con ribavirina rispetto al 3,3% del gruppo con placebo (*Bodenheimer HC, et al. 1997*). Inoltre anche nello studio di *Kraus MR. (2003)* vi è una più alta frequenza di depressione e di irritabilità nel gruppo trattato con terapia di combinazione rispetto alla monoterapia con IFN.

### *Fattori di rischio di sviluppo della sindrome depressiva*

Una questione tuttora dibattuta riguarda i fattori di rischio predisponenti l'insorgenza degli effetti collaterali di carattere psichiatrico. *Capuron et al. (1999)* dimostrarono una correlazione significativa della scala *Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS)* tra lo stato depressivo dei pazienti pretrattamento e al primo mese. *Mohr et al. (1999)* descrivono un significativo ma transitorio calo dell'umore in pazienti già depressi dopo le prime due settimane di trattamento. D'altra parte numerosi Autori, tra cui *Rosenstain et al. (1999)* e *Fattovich et al. (1996)* sostengono invece che i precedenti psichiatrici hanno un'importanza solo relativa quale fattore predisponente di effetti psichiatrici durante la terapia antivirale. In particolare, *Trask et al. (2000)* ha indagato un vasto campione di pazienti che avevano tentato il suicidio o sviluppato idee suicidarie: di questi nessuno aveva precedenti psichiatrici. L'alta incidenza di depressione durante il trattamento con IFN ha spinto talvolta a trattare in via profilattica numerosi pazienti con antidepressivi, prevenendo in tal modo il manifestarsi della sindrome (*Musselmann DL, et al. 2001*) anche se almeno il 50% dei pazienti in trattamento con IFN non incontra i criteri diagnostici della depressione maggiore, e in questi un trattamento antidepressivo provoca talora un sovraccarico inutile di farmaci. Per questo motivo è importante individuare precisi fattori di rischio per lo sviluppo della depressione secondaria ad IFN, così da identificare quei pazienti che hanno più bisogno di essere strettamente sorvegliati o di essere sottoposti a un pretrattamento antidepressivo. I fattori di rischio possono essere suddivisi in due categorie, quelli dovuti al trattamento di per sé e quelli legati alla storia del paziente. Tra i fattori di rischio legati alla storia del paziente, probabilmente il dato più significativo da tenere in considerazione è la presenza di un disturbo psichiatrico immediatamente prima dell'inizio del trattamento. Disturbi depressivi o d'ansia, anche se subclinici, qualora presenti all'inizio della terapia, predicono lo sviluppo di comorbidità psichiatrica (*Hauser P, et al. 2002*). I punteggi ottenuti prima dell'inizio della terapia nelle diverse scale di valutazione per la depressione sembrano infatti predire l'andamento della reazione depressiva (*Pariante M, et al. 1999*). In uno studio del 2003, *Dieperink et al.* ha suggerito che la BDI (*Beck Depression Inventory*) sia un'eccellente scala per il monitoraggio dei sintomi con lo scopo di identificare i pazienti che potrebbero aver bisogno di sostegno psichiatrico. Un punteggio superiore a 6 giustifica il suggerimento di una terapia antidepressiva profilattica, un punteggio superiore a 10 ne giustifica la raccomandazione. Numerosi studi non hanno trovato relazione tra una storia passata di malattie psichiatriche e il rischio attuale

di sviluppare disturbi neuropsichiatrici (*Hauser P, et al. 2002; Schaefer M, et al. 2003*). Tuttavia una storia pregressa di due o più diagnosi psichiatriche suggerisce quantomeno una vulnerabilità del paziente nei confronti di eventi stressanti, e potrebbe predire la necessità di trattamenti farmacologici durante la terapia con IFN. Nonostante un'anamnesi familiare positiva per disturbi affettivi sia considerata un fattore di rischio nella popolazione generale, alcuni studi non l'hanno considerata tale in pazienti sottoposti a terapia antivirale per HCV (*Pariente M, et al. 1999*). Altri studi invece (*Dieperink E, et al. 2003*) hanno calcolato un rischio 7 volte superiore di incorrere negli effetti collaterali dell'IFN. L'età non si è dimostrata un significativo fattore di rischio (*Kraus MR, et al. 2003*). Lo stesso dicasi per una storia passata di abuso di alcool o di sostanze qualora i pazienti continuino la loro astinenza durante il trattamento (*Hauser P, et al. 2002; Kraus MR, et al. 2003*). Al contrario, la mancanza di un adeguato sostegno sociale si è dimostrata un fattore di rischio importante (*McDonald EM, et al. 1987*).

Altri effetti collaterali indotti da IFN che possono spiegare la sindrome depressiva:

- 1) *Distiroidismo*: le disfunzioni tiroidee si manifestano nel 12% dei pazienti trattati con IFN. Tali effetti collaterali si manifestano più frequentemente nel sesso femminile e nella razza asiatica. È noto che i disturbi tiroidei e soprattutto l'ipotiroidismo, sono associati a depressione (*Jackson IM, et al. 1998*).
- 2) *Anemia*: nella terapia per l'epatite C sia l'interferone che la ribavirina causano indipendentemente anemia, che è associata con molti disturbi lamentati dai pazienti trattati con IFN quali astenia, cefalea, dispnea, riduzione della qualità di vita.

#### *Depressione indotta da IFN e risposta virologica*

Ci sono alcuni studi che mettono in relazione la depressione indotta da IFN in pazienti trattati per epatite cronica C e risposta virologica. *Loftis et al. (2004)* dimostrarono un'associazione tra la depressione in corso di terapia e la risposta a IFN. Sia la risposta al termine della terapia (R), intesa come negatività per HCV-RNA, che la risposta sostenuta (SVR), intesa come negatività a 6 mesi dal termine, erano significativamente più alte nei pazienti che svilupparono depressione durante il trattamento (R 61,5% vs 26.9%,  $p=0.03$ ; SVR 38.5% vs 11.5%  $p=0.04$ ). Inoltre i pazienti che erano risultati risponder o guariti alla terapia avevano un peso corporeo inferiore. Nessuna relazione ci fu invece tra risposta all'IFN e anamnesi positiva per depressione o abuso di sostanze. Tali autori pertanto suggeriscono che questa relazione possa essere legata alla dose di

IFN, cioè che la concentrazione nel sangue possa essere più elevata nei pazienti che sviluppano depressione e quindi lo sviluppo di depressione possa essere un indicatore di dose ottimale. Al contrario, *Raison et al. (2005)* dimostrarono che pazienti trattati con Peg-IFN alfa-2b e ribavirina che aumentavano i punteggi al *Zung self rating depression scale* avevano meno probabilità di essere HCV-RNA negativi alla 24ma settimana di terapia. Gli autori suggeriscono che i pazienti depressi possano non essere del tutto complianti alla terapia.

### **Meccanismi patogenetici degli effetti neurotossici dell'IFN**

Alcuni dati recenti suggeriscono l'esistenza di molteplici processi fisiologici implicati nell'eziopatogenesi della depressione (*Raison CL, et al. 2005*).

#### *Azioni sul Sistema Nervoso Centrale (SNC)*

I meccanismi attraverso i quali l'IFN può indurre un così ampio spettro di azioni a livello del SNC sono ancora oggi poco chiari e per molti aspetti solo speculativi. Oltre ad una possibile azione indiretta dell'IFN a livello del SNC attraverso afferenze viscerali neuronali o attraverso l'induzione di molecole liposolubili in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica (BEE) (come l'ossido nitrico e le prostaglandine) (*Wong ML, et al. 1996*), sono ipotizzate anche azioni dirette dello stesso. Probabilmente l'IFN riesce a entrare nel SNC o attraverso specifici trasportatori di membrana o passando dove manca la barriera emato-encefalica, come nell'area postrema, nell'eminenza mediana e a livello dell'infundibolo. In uno studio condotto su scimmie (*Habif DB, et al. 1975*), hanno dimostrato un incremento dei livelli di IFN dosabili nel CSF dopo somministrazione periferica. In condizioni di normalità si riscontrano minime tracce di IFN nel liquor, ma in caso di alterazioni flogistiche, data la necessità di favorire i processi immunitari, la concentrazione aumenta e ciò è messo in relazione all'aumentata permeabilità della BEE in tali circostanze, in particolare a livello del midollo spinale cervicale e lombosacrale (*Daniel PM, et al. 1985*). L'ipotesi del passaggio dell'IFN attraverso aree di minor resistenza è sostenuta anche dal ritrovamento di recettori per l'IFN a livello dell'ipotalamo (*Janicki PK, et al. 1992*). L'azione sul SNC dell'IFN somministrato per via sistemica è dimostrato indirettamente dalla sintesi di proteine tipicamente indotte dall'IFN stesso: l'innalzamento dei livelli di 2'-5' oligoadenilato sintetasi nel liquor, l'induzione di molecole MHC di classe I nelle cellule gliali, l'ibridazione di RNA che codifica per la proteina C56 (*Smith RA, et al. 1985*).

#### *Azioni sul sistema endocrino*

1. *Asse ipotalamo-ipofisi-surrene*

Negli animali di laboratorio in seguito alla somministrazione di IFN si assiste all'aumento, in particolare a livello dell'amigdala e dell'ipotalamo, della produzione e del rilascio di *CRF* (*Corticotropin Releasing Factor*) (Raber J, et al. 1997). A conferma di questo meccanismo, in uno studio del 2000 di Yamano et al. è stato dimostrato che la depressione indotta nei ratti dalla somministrazione di IFN può essere prevenuta con la somministrazione di un antagonista del CRF. Ma ci sono anche altri meccanismi attraverso i quali l'IFN può agire sull'attivazione dell'asse HPA. Non solo infatti l'IFN è antigeneticamente e strutturalmente correlato all'ACTH, potendo così indurre acutamente un aumento dei livelli plasmatici del cortisolo (Blalock JE, et al. 1980), ma anche l'aumento della concentrazione di alcune citochine indotte dall'IFN correla con i livelli dell'ACTH e del cortisolo. E' interessante notare come l'aumento dell'ACTH e del cortisolo dopo la prima somministrazione di IFN sia correlato allo sviluppo successivo solo dei sintomi cognitivi e comportamentali, non a quelli neurovegetativi, suggerendo l'esistenza di due distinti percorsi patogenetici per queste due sindromi (Capuron L, et al. 2003).

## 2. Funzionalità tiroidea

La somministrazione di IFN può interferire anche con la funzione tiroidea, potendo causare sia ipertiroidismo che ipotiroidismo. Sembra che l'IFN agisca sulla tiroide sia in via diretta a causa della somiglianza strutturale dell'IFN con il TSH, che in via indiretta, in quest'ultimo caso tramite l'attivazione di altre citochine che possono regolare la funzione tiroidea o indurre processi autoimmuni. (Loftis & Hauser, 2004).

### Sistema delle citochine

L'IFN, essendo un potente modulatore della risposta infiammatoria, può attivare una cascata di segnali intracellulare in grado di indurre o inibire l'espressione di molte citochine - IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Owen MJ, et al. 1991). La loro azione può contribuire all'insorgenza dei sintomi neuropsichiatrici, in modo diretto per quelle prodotte nel SNC, in modo indiretto per quelle prodotte perifericamente. Sembra per esempio che l'IFN induca i monociti a secernere IL-1 in assenza di altri stimoli (Gerrard TL, et al. 1987) e che alteri la risposta biologica all'interleuchina stessa inducendo la produzione dell'antagonista del suo recettore (Arend WP, et al. 1993).

### Sistema dei neurotrasmettitori

#### 1. Sistema noradrenergico

Durante la terapia si assiste ad un'alterazione della funzione del sistema delle amine. Per esempio, in volontari sani i livelli di adrenalina e noradrenalina

umentano dopo somministrazione di IFN (*Corsmitt EP, et al. 1995*), mentre sui linfociti si assiste a una down regulation dei recettori  $\beta$ -adrenergici e della loro sensibilità (*Siever LJ, et al. 1985*). Questa situazione di persistente elevazione delle amine tra i pazienti trattati con IFN è un probabile meccanismo di induzione della depressione. Infatti secondo *Hammer & Diamond (1996)* i livelli plasmatici di noradrenalina correlano negativamente con i livelli della Ham-D.

## 2 Sistema dopaminergico

Le alterazioni dei circuiti regolati dalla dopamina sembra stare alla base di sintomi quali il ritardo psicomotorio, i disturbi del sonno e i sintomi neurovegetativi. *Shuto et al. (1997)* hanno esposto alcuni animali da laboratorio a somministrazione cronica di IFN, riscontrando in questi una forte depressione dell'attività motoria, associata all'inibizione dell'attività dei neuroni dopaminergici e a un diminuzione del metabolismo dell'intero encefalo. Un'altra evidenza in tal senso è il riscontro di disturbi motori simili a quelli del Parkinson in pazienti in terapia con IFN, disturbi migliorati dalla terapia con Levodopa (*Sunami M, et al. 2000*). Le alterazioni della via dopaminergica possono essere implicate anche nella patogenesi dell'astenia e dei disturbi del sonno provocati dall'IFN- $\alpha$ . Per esempio, *Rye & Jankovic (2002)* hanno rilevato la partecipazione della dopamina nel mantenimento del ritmo sonno-veglia. Osservazioni sperimentali hanno messo in rilievo come l'IFN agisca col sistema dopaminergico in vario modo: come agonista centrale (*Ho et al., 1992*) attraverso il legame al recettore  $\mu$  degli oppioidi, permettendo così il rilascio presinaptico della dopamina (*Janicki PK, et al. 1992*), e attraverso la mediazione del sistema delle citochine. Infatti i loro recettori sono espressi in abbondanza a livello dei gangli della base e dei circuiti talamo-corticali, potendo così influenzare l'attività neuronale di queste aree (*Capuron & Miller, 2004*). Queste alterazioni, sebbene distinte da quelle cognitivo-comportamentali, riconoscono probabilmente vie comuni a quelle che si attivano anche nei pazienti affetti da depressione maggiore e da altri sintomi neuro-psichiatrici. *Capuron et al. (2002)* sono giunti alla conclusione che i sintomi neurovegetativi rappresentino una sindrome a se stante grazie all'osservazione che l'astenia, la perdita di appetito e il ritardo psicomotorio si manifestano precocemente durante il trattamento mentre altri sintomi specifici della depressione si manifestano più tardi. Inoltre, mentre i sintomi specifici della depressione regrediscono in seguito a terapia antidepressiva, i sintomi neurovegetativi rispondono solo in minima parte (*Trask PC, et al. 2000*), confermando l'osservazione clinica che spesso si manifestino anche in assenza di depressione. I sintomi depressivi, ansiosi o cognitivi, ma non quelli

neurovegetativi, si associano alla deplezione del triptofano, così come avviene per il CRF. Probabilmente le vie della serotonina e del CRF interagiscono in questa direzione, in un modo che sembra assomigliare molto a quello che si ritrova in pazienti sani con depressione maggiore (Capuron & Miller, 2004; Raion CL, et al. 2005). Quindi lo sviluppo della sindrome neurovegetativa probabilmente vede coinvolte le vie della dopamina e i circuiti dei gangli della base.

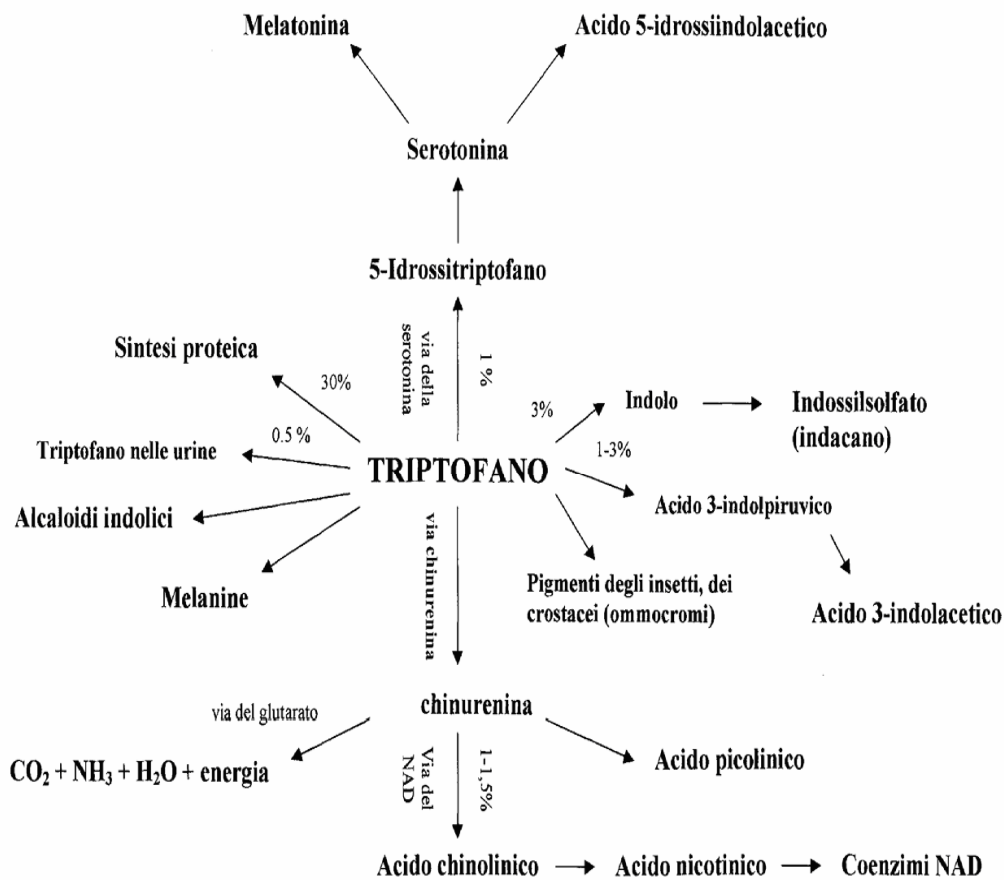
### 3. Sistema serotoninergico

È noto il ruolo della serotonina nelle alterazioni dell'umore. L'alterazione di questo sistema da parte dell'IFN sembra essere il meccanismo principale nell'induzione della depressione secondaria. L'IFN probabilmente interferisce con questo sistema provocando una deplezione di triptofano a causa dell'induzione, sia diretta sia indiretta tramite la mediazione di altre citochine proinfiammatorie, di un enzima, l'indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) (Capuron L, et al. 2003). L'attività di questo enzima provoca uno shunt nell'utilizzo del triptofano, non più verso la biosintesi della serotonina, la cui concentrazione così si riduce, ma verso quella della kinurenina, che può attraversare la BEE. Le cellule gliali in risposta producono acido chinolonico, che comporta un danno neuronale a livello ippocampale con induzione di ansia, depressione, declino cognitivo e iperattività dell'asse HPA (Maes M, et al. 2002). L'IFN sembra inoltre alterare l'm-RNA del trasportatore della serotonina (Morikawa O, et al. 1998), il quale, essendo coinvolto nella patogenesi della depressione (Owen MJ, et al. 1994), è uno dei target della terapia antidepressiva (Schloss P, et al. 1998).

#### **Il triptofano e la "via serotonina"**

Il triptofano (Trp) è il derivato indolico più largamente diffuso in natura. È un aminoacido essenziale per la normale crescita e per il mantenimento dell'equilibrio azotato negli animali e nell'uomo. La richiesta di Trp nei mammiferi è la più bassa tra tutti gli aminoacidi essenziali. Negli uomini adulti, il suo fabbisogno minimo giornaliero è stato stimato in 250 mg, e nelle donne 160 mg (Harper AE, et al. 1977). Il Trp è uno dei 20-22 aminoacidi richiesti per la sintesi delle proteine tissutali; ha però anche un ruolo importante nel mantenere le normali funzioni fisiologiche. Il Trp è, infine, il precursore di molti composti neuroattivi tra cui la serotonina (5-idrossitriptamina; 5-HT), la triptamina e l'ormone melatonina, secreta dalla ghiandola pineale. Vista la funzione di Trp quale precursore di neurotrasmettitori, non sorprende che molti degli effetti che alterano seriamente il metabolismo di Trp, siano espressi dai comportamenti che riflettono alterazioni delle funzioni del sistema nervoso centrale. Il Trp viene

degradato nel nostro organismo secondo diverse vie metaboliche, come riportato nella figura 8.



Schema 1 - Vie metaboliche del triptofano

Figura 8

#### Metabolismo del triptofano a livello cerebrale

Il triptofano è il precursore della serotonina attraverso la via metabolica riportata nella figura 9. Il Trp è fornito dalla dieta e trasportato all'interno delle cellule dal trasportatore degli aminoacidi neutri, quindi la sua biodisponibilità è legata al tipo di dieta: diete ricche di carboidrati favoriscono la sintesi di Trp.

Il Trp è idrossilato in posizione 5 dalla triptofan-5-idrossilasi per formare il 5-idrossitriptofano (5-HTP); quest'ultimo viene decarbossilato da un enzima (aromatico L-aminoacido decarbossilasi) con formazione di 5-HT.

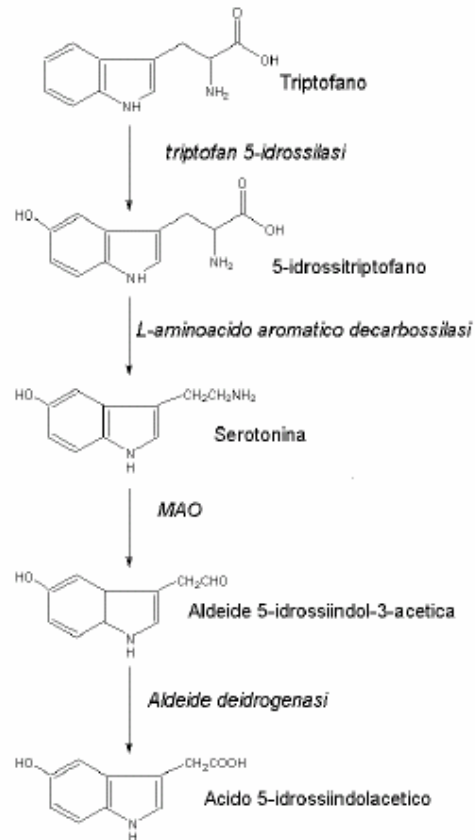


Figura 9: Metabolismo del triptofano in serotonina

### Il sistema serotoninergico

La conversione di Trp a 5-HT avviene in diversi tessuti, tra cui le cellule enterocromaffini dell'intestino, le piastrine del sangue e il sistema nervoso centrale (SNC). Nel SNC la 5-HT è considerata un neurotrasmettitore modulatore con effetti generali di tipo inibitorio. Essa gioca un ruolo importante nella regolazione di diversi processi psicobiologici. Lesioni del sistema serotoninergico portano (negli animali da laboratorio) a comportamenti aggressivi disinibiti e perdita di inibizione nei confronti di comportamenti vietati e puniti. Studi su pazienti suicidi hanno mostrato che essi avevano un sistema serotoninergico labile, con minori livelli di serotonina nella corteccia prefrontale e nel liquido cerebrospinale. Inoltre alcuni studi sembrano suggerire che alcuni polimorfismi della triptofano idrossilasi, l'enzima limitante la sintesi della serotonina, possano essere correlati con una maggiore predisposizione al suicidio. La 5-HT ha anche effetti inibitori sul comportamento sessuale, sulla sensibilità al dolore e sull'appetito; ha influenze modulatorie sulla temperatura corporea, migliora il livello dell'umore e facilita il sonno; è importante nel controllo del vomito (Sved AF, et al. 1983). Inoltre, i sistemi serotoninergici svolgono un

ruolo importante nel controllo della secrezione di ormoni steroidei e della prolattina in sistemi neuroendocrini (*Fernstrom JD, et al. 1981*).

Almeno tre fattori sono importanti nel determinare l'apporto di Trp al cervello per la biosintesi di 5-HT:

- 1) la concentrazione plasmatica di Trp;
- 2) la concentrazione plasmatica di altri aminoacidi neutri, che concorrono con il Trp per il trasporto al cervello;
- 3) la liberazione di Trp dal legame con la sieralbumina. Il Trp è, infatti, l'unico aminoacido che nel sangue circola legato per l'85-90% all'albumina; solo la frazione libera può attraversare la barriera ematoencefalica e raggiungere il cervello.

Ciascuno di questi fattori, può essere influenzato dallo stato nutrizionale e ormonale, ad esempio, la concentrazione di Trp nel plasma è in funzione, non solo della assunzione dietetica, ma anche della capacità di rilascio di Trp dal sangue ai tessuti del corpo. Il legame di Trp alla sieralbumina infine, fenomeno descritto per primo da *McMenamy e Oncley (1958)*, può influenzare, in alcune circostanze, il trasporto di questo aminoacido mediante carrier, attraverso la barriera ematoencefalica. Come abbiamo già detto, normalmente la porzione nel plasma di Trp associato alla albumina è circa 85-90%; l'equilibrio può essere modificato da condizioni che alterano la concentrazione nel plasma di acidi grassi (*not esterified fatty acid, NEFA*), ad esempio durante il digiuno e in condizioni di stress (*McMenamy RH, et al. 1965*). Questo avviene perché i NEFA competono con il Trp per il legame all'albumina: quando la concentrazione di NEFA aumenta, il Trp viene liberato dal legame all'albumina, aumentando così la concentrazione di triptofano libero. I livelli di Trp nel plasma sono influenzati, oltre che dalla dieta, da alcuni ormoni come l'insulina, che provocano un aumento degli stessi (*Fernstrom e Wurtman, 1971*), e come i glucocorticoidi che ne provocano, invece, una diminuzione (*Green e Curzon, 1968*). I tentativi di evidenziare nell'uomo un ritmo circadiano nelle concentrazioni di Trp nel sangue, hanno dato risultati ancora controversi. Ad ogni modo, variazioni di Trp plasmatico, indurrebbero delle variazioni parallele di 5-HT nel cervello, probabilmente attraverso modificazioni dei livelli di Trp cerebrale. A questo proposito è stato notato che trattamenti capaci di incrementare il contenuto di Trp cerebrale, aumentano anche la sintesi di 5-HT cerebrale; viceversa, farmaci che aumentano la sintesi di 5-HT, accrescano anche il contenuto di Trp nel cervello (*Tagliamonte A, et al. 1971*). Si è visto inoltre che la concentrazione di Trp cerebrale e la velocità di sintesi di 5-HT, dipendono non dal contenuto totale di

Trp plasmatico, ma dalla concentrazione della parte libera nel plasma. Infatti, la somministrazione di farmaci che spiazzano il Trp dal suo legame con le albumine del siero, come ad esempio i salicilati (*Mc Arthur e Dawkins, 1969*), il probenecid (*Gessa e Tagliamonte, 1974*) e il clofibrato, aumentano la concentrazione di Trp nel cervello e di conseguenza la sintesi di serotonina (*Tagliamonte A, et al. 1973*). È stato anche dimostrato che l'equilibrio tra Trp libero e legato è influenzato dagli acidi grassi liberi (NEFA) del plasma, i quali diminuiscono il legame di Trp con le albumine seriche; in questo modo, trattamenti che aumentano i NEFA plasmatici, amplificano la concentrazione di Trp libero e quindi di Trp cerebrale (e di 5-HT). La serotonina cerebrale deriva soltanto dal Trp presente nella medesima sede, poiché l'amina in questione non riesce ad attraversare la barriera ematoencefalica. Il turnover di 5-HT è molto rapido: studi sperimentali condotti mediante l'impiego di inibitori delle monoaminoossidasi (MAO) hanno permesso di valutare il tempo di dimezzamento variabile tra 10 e 30 minuti primi (*Costa e Neff, 1970*).

#### *Serotonina e disturbo depressivo maggiore*

Sul piano clinico, la ricerca ha in anni recenti sempre più valorizzato il ruolo di questo neurotrasmettitore nei disturbi depressivi. Dall'altra parte, il fatto che non esista ancora un modello definitivo e unificatore della disfunzione chimica presente alla base della depressione, ha fatto sì che l'industria farmaceutica abbia prodotto sempre più nuove molecole con attività serotoninergica differente. Tuttavia, data la grande efficacia dimostrata nel trattamento della depressione dagli inibitori specifici del reuptake della serotonina (SSRI), ad esempio la fluoxetina, questa amina biogena è diventata il neurotrasmettitore più comunemente associato alla depressione. L'identificazione di sottotipi multipli del recettore della serotonina ha anche aumentato l'interesse all'interno della comunità scientifica nei confronti dello sviluppo di trattamenti ancora più specifici. Tuttavia, oltre al fatto che gli SSRI e gli altri antidepressivi serotoninergici sono efficaci nel trattamento della depressione, altri dati indicano che la serotonina è coinvolta nella fisiopatologia della depressione. La deplezione di serotonina può aggravare notevolmente la depressione, tanto che alcuni pazienti suicidi presentavano basse concentrazioni di metaboliti della serotonina nel liquor (*Arango V, et al. 1992*). Alcuni dei dati che hanno reso possibile una correlazione molecolare tra Disturbo Depressivo Maggiore e sistema serotoninergico, sono venuti dallo studio del trasportatore della serotonina. Per tali studi si è utilizzata soprattutto l'imipramina che è una molecola di sintesi e si lega al trasportatore o sito di uptake della serotonina. In tal modo è stata osservata una netta

diminuzione di tali siti di uptake nei pazienti depressi, sia nel tessuto cerebrale di soggetti suicidi, che nelle piastrine circolanti (*Mellerup ET, et al. 1983; Arango V, et al. 1992*). Inoltre si è visto che tale diminuzione può tornare a livelli normali dopo trattamento con farmaci antidepressivi che agiscono appunto sul re-uptake della serotonina (*Langer e Schoemaker, 1988; Owens e Nemeroff, 1994*). I dati sperimentali, quindi, sottolineano come il sistema serotoninergico sia primariamente coinvolto nelle disregolazioni neurochimiche del sistema nervoso centrale nei disturbi depressivi.

#### *Il triptofano in corso di terapia con IFN*

*Bonaccorso et al. (2002)* riscontrarono in 18 pazienti trattati con IFN-alfa per epatite HCV, e *Capuron et al. (2002)* in 26 pazienti trattati con IFN-alfa per melanoma, un calo nei livelli sierici di triptofano e un aumento nei livelli di kinurenina. Nello studio di *Bonaccorso* i livelli di kinurenina e di serotonina correlavano in maniera rispettivamente positiva e negativa con l'aumento dei sintomi depressivi (rilevati mediante MADRS) ma non con i sintomi ansiosi (rilevati mediante HAM-A). Al contrario nello studio di *Capuron* la riduzione del triptofano, ma non i livelli di kinurenina, correlava positivamente con lo sviluppo e con il grado dei sintomi depressivi (rilevati con HAM-D). Inoltre gli individui che avevano sviluppato depressione maggiore avevano un decremento di triptofano più prolungato rispetto ai pazienti non depressi. *Russo et al. (2005)* in 18 pazienti trattati con IFN-alfa per epatite HCV non riscontrarono alcun aumento dei sintomi depressivi (misurati con HAM-D) né di quelli ansiosi (misurati con HAM-A e con Symptoms Checklist-90). Fu rilevata comunque un aumento dell'irritabilità. Non fu riscontrato neppure un decremento nei livelli di triptofano a 2 mesi dall'inizio della terapia rispetto al momento basale. Tuttavia nei 10 pazienti in cui è stato riscontrata irritabilità vi era una diminuzione del triptofano. Questi autori ritengono che una diminuzione piuttosto che i livelli assoluti di triptofano sono responsabili dei sintomi psichiatrici. Quindi i dati in letteratura sono discordanti, poco numerosi, e usano metodi di rilevazione diversi.

## **I STUDIO SULLA CARATTERIZZAZIONE VIRALE DELL'INFEZIONE NEL VENETO**

Nell'ambito del Programma Regionale di Miglioramento della Sorveglianza e Controllo delle Epatopatie Croniche Complicanti l'infezione da Virus dell'Epatite C (HCV): "Cirrosi Epatica ed Epatocarcinoma", istituito per conoscere l'entità di questo problema socio-sanitario nelle strutture ospedaliere con competenze epatologiche collegate da una rete informatica, è stato condotto uno studio di coorte che ha reclutato prospetticamente i soggetti con epatopatia cronica virale residenti nelle province di Padova e Venezia. Questo progetto di ricerca ha riguardato circa 3000 casi con epatite cronica C che sono stati sottoposti a routinari periodici controlli, in base allo stadio della malattia (epatite cronica e/o cirrosi) e, se indicato, a trattamento antivirale con PEG-IFN alfa e RIBAVIRINA, a scopo eradicante l'infezione.

L'obiettivo dello studio è stato quello di acquisire conoscenze sulla morbilità e mortalità per epatopatia nel Veneto, derivare progetti per l'analisi critica dei procedimenti diagnostici, delle terapie antivirali e dei costi sostenuti per razionalizzare e migliorare l'impegno socio-sanitario in questo settore della medicina.

## Materiali e Metodi

Sono stati eseguiti tests virologici a) per la determinazione del genotipo di HCV, basato su ibridazione inversa, in cui oltre alla regione 5'NC, viene considerata anche la regione core, utile anche per la sottotipizzazione dei genotipi HCV-1 (metodica:VERSANT HCV 2.0, INNO-LIPA) e b) per il monitoraggio quantitativo di HCV-RNA (metodica: Real-Time PCR COBAS TaqMan, range linearità 43-69.000.000 UI/mL) in epoca pre-terapia e 6 mesi dopo la sospensione del trattamento per la definizione di risposta virologica sostenuta (SVR), cioè di guarigione o eradicazione virale persistente.

### *La tipizzazione del genoma*

È un'indagine molto importante perché consente la valutazione dell'associazione tra genotipo e decorso clinico dell'epatopatia ed è oggi essenziale per la corretta prescrizione della terapia antivirale i genotipi di HCV richiedono differenti protocolli terapeutici.

**METODICA DI GENOTIPIZZAZIONE VIRALE: REVERSE HYBRIDIZATION ASSAY (LIPA) LINE PROBE ASSAY**

**INNO-LiPA (Line Probe Assay)**

Chromogen (NBT/BCIP) → Purple precipitate

Alkaline Phosphatase

Streptavidin

Biotin

5'

3'

Amplified target

DNA-probe

Nitrocellulose strip

1a 1b 1a-1b 2a 2b 3a 4 4f 5a 5a 6a

Conj. control  
Ampl. control

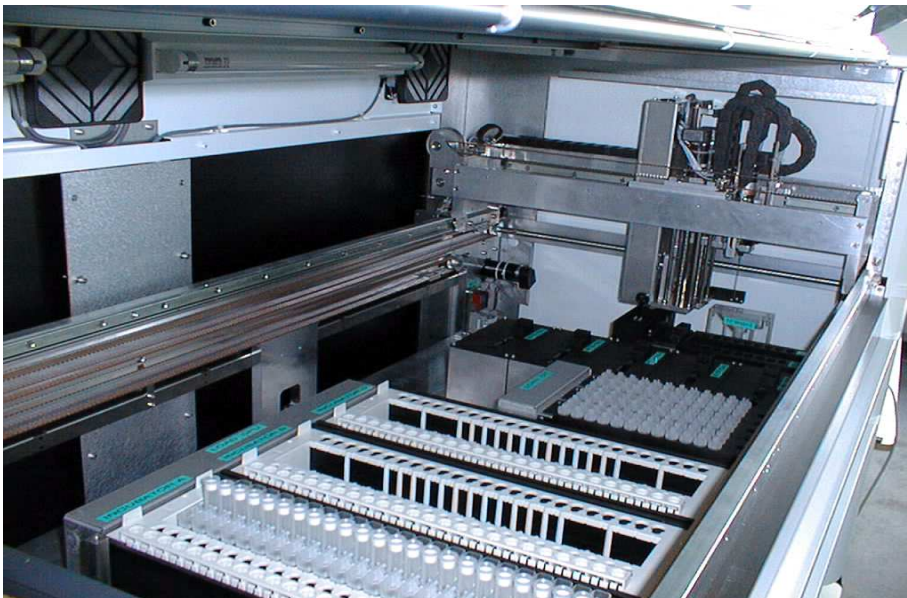
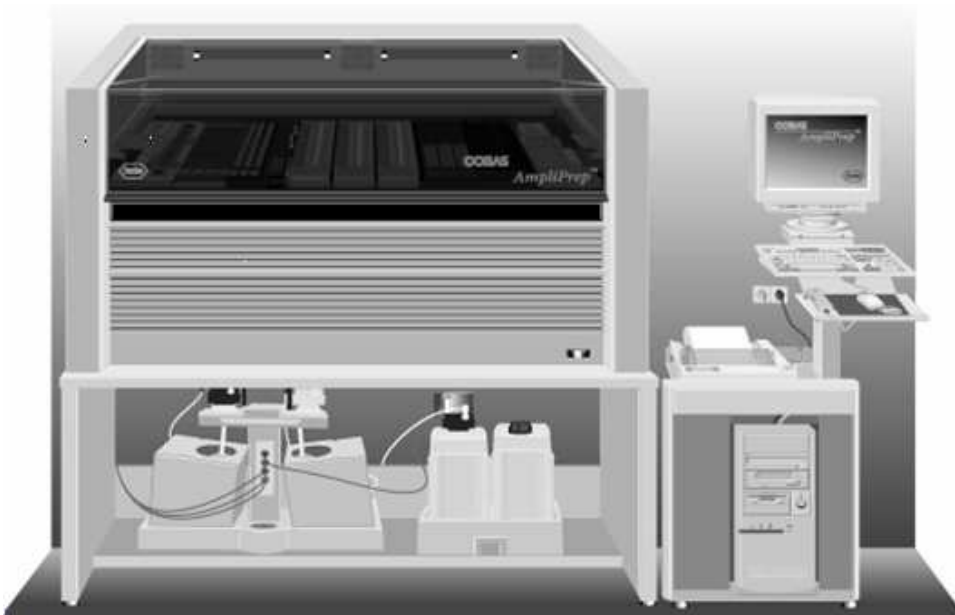
1  
1a  
1b  
1ab  
2  
2a/c  
2b  
3  
4  
5a  
6a

### *Determinazione dell' RNA virale*

Con le diverse tecniche di amplificazione genica, entrate ormai nella routine diagnostica, è possibile dimostrare la presenza dell'acido nucleico virale anche in campioni con bassissime cariche virali. La ripetizione di diversi cicli di denaturazione-ibridazione-sintesi, come classicamente avviene nelle reazioni di PCR, dà origine ad una amplificazione esponenziale delle sequenze di acido nucleico presenti nel campione. Questa tecnica permette di ottenere un'analisi

sia quantitativa che qualitativa del genoma virale. La reazione di amplificazione del HCV RNA richiede che prima si ottenga un DNA (cDNA) complementare all'RNA virale mediante una prima fase retrotrascrizione e l'utilizzo di 2 primers (oligonucleotidi sintetici). Per la ricerca di HCV-RNA vengono più frequentemente amplificate sequenze della regione altamente conservata 5'UTR.

La viremia è stata valutata con **il metodo per la quantizzazione dell'acido nucleico virale (COBAS, AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV, Roche)**. Questo sistema, effettuato su plasma, ha utilizzato una metodica "Real Time PCR" con estrazione automatica degli acidi nucleici virali, dove si effettua sia l'automazione della preparazione dei campioni (estrazione acido nucleico virale con COBAS AmpliPrep) che l'amplificazione e la rivelazione (COBAS TaqMan). Il test prevede tre fasi principali: 1) preparazione dei campioni per separare l'acido nucleico virale; 2) trascrizione inversa dell'RNA per generare il cDNA; 3) amplificazione e rivelazione simultanea dell'amplificato. La preparazione dei campioni sullo strumento AmpliPrep si basa sulla cattura degli acidi nucleici mediante una matrice di silice. La procedura prevede il trattamento di 850uL di plasma. Le particelle virali vengono lisate tramite incubazione ad elevata temperatura con una soluzione tampone proteasica e di lisi/legame caotropico che rilascia acidi nucleici e protegge l'RNA di HCV liberato dalle ribonucleasi. La proteasi ed un numero noto di molecole di RNA di QS (controllo interno) vengono introdotti in ciascun campione assieme al reagente di lisi ed alle particelle di vetro magnetizzate. Dopo incubazione l'RNA di HCV e QS vengono legati alla superficie delle particelle di vetro magnetizzate, mentre le sostanze non legate vengono rimosse con i lavaggi delle particelle magnetizzate. Successivamente gli acidi nucleici vengono eluiti a temperatura elevata con una soluzione acquosa. Il campione così ottenuto, contenente le particelle magnetiche come pure gli acidi nucleici eluiti di HCV e di QS viene aggiunto automaticamente alla miscela di amplificazione e trasferito nell'analizzatore COBAS TaqMan. L'RNA di HCV e l'RNA dello standard di quantificazione (QS) vengono poi sottoposti a trascrizione inversa, amplificazione e contemporaneamente a rivelazione.



### **COBAS AmpliPrep**

La reazione di trascrizione inversa e di amplificazione mediante PCR viene eseguita utilizzando nella miscela di reazione l'enzima ricombinante termostabile Taq-polimerasi. In condizioni appropriate di temperatura ed in presenza di ioni manganese, l'enzima svolge attività sia di trascrittasi inversa che di polimerasi del DNA. I campioni trattati vengono addizionati alla miscela di amplificazione in apposite provette, dove ha luogo sia la trascrizione inversa, sia l'amplificazione e la rivelazione senza necessità di manipolazione dei campioni. La miscela di reazione viene riscaldata per permettere ai primer di appaiarsi specificamente all'RNA bersaglio di HCV ad all'RNA di QS. In presenza di manganese e di un eccesso di desossinucleotidi trifosforati (dNTP), la polimerasi sintetizza un

filamento di DNA complementare (cDNA). Dopo la retrotrascrizione, nel termociclatore TaqMan avvengono i classici cicli di amplificazione degli acidi nucleici. Grazie all'uso dell'enzima Uracil-N-Glicosilasi e del trifosfato di desossiuiridina (dUTP), la reazione è molto selettiva in quanto Uracil-N-Glicosilasi catalizza la distruzione di filamenti di DNA contenenti dUTP provenienti da eventuali "ampliconi" contaminanti. La desossiuiridina (dUTP) non è presente nel DNA naturale, però è sempre presente negli ampliconi, visto che i dNTP della master mix comprendono dUTP al posto di dTTP. Il metodo COBAS TaqMan si basa sulla tecnologia "Real-Time PCR" con utilizzo di sonde marcate con fluorocromi, questo permette, mediante monitoraggio dell'intensità della fluorescenza emessa durante i cicli di amplificazione (in seguito a rottura della sonda), la quantificazione del prodotto di amplificazione. In sostanza vengono utilizzate due sonde specifiche per HCV e QS marcate con diversi fluorocromi e quencher. Durante l'amplificazione i fluorocromi sono liberati con emissione del segnale, l'intensità e la caratteristica del segnale, rilevate dal laser dello strumento, permettono di caratterizzare (HCV e/o QS) e quantificare i prodotti di amplificazione. Il test COBAS TaqMan è intrinsecamente quantitativo su una gamma dinamica molto ampia, dal momento che il monitoraggio dell'amplicone viene effettuato durante la fase esponenziale dell'amplificazione. Più il titolo di HCV-RNA di un campione è elevato, più è rapido il superamento del livello di fluorescenza soglia (ciclo soglia). Dal momento che la quantità di RNA del QS è costante per tutti i campioni, la fluorescenza del reporter della sonda di QS dovrà avere lo stesso ciclo soglia per tutti i campioni. La presenza di QS, oltre a costituire un controllo intracampione per verificare tutte le fasi del processo (estrazione, retrotrascrizione ed amplificazione) è fondamentale per valutare la presenza nel campione di eventuali inibitori inoltre, grazie a QS è possibile quantificare HCV-RNA rapportando il ciclo soglia del bersaglio HCV con il ciclo soglia di QS. Il test da noi utilizzato permette la quantificazione di HCV-RNA con intervallo lineare dell'analisi da 43UI/mL a 69.000.000 UI/mL. In ogni caso la sensibilità del metodo, con percentuale di rilevazione Probit del 95% è stata valutata di 12,6 UI/mL ( intervallo di fiducia del 95%: 9-24 UI/

## Taqman PCR Chemistry

Denaturation → Annealing

↓

• **Polymerization**

R = Reporter  
Q = Quencher

Real Time PCR

## Taqman PCR Absolute Quantitation

multiplex

Real Time PCR

## METODICA DI DOSAGGIO QUANTITATIVO DI HCV-RNA: REAL-TIME PCR (COBAS TaqMan) range linearità 43-69.000.000 UI/mL

Test	1 IU =
Cobas Amplicor HCV-Monitor (Roche)	2.7 copie
SuperQuant (NGI)	3.4 copie
LCx HCV-RNA quant. (Abbott)	3.8 copie
Versant HCV-RNA (Bayer)	5.2 copie
TaqMan (Roche)	5.2 copie



90% di tutti i pazienti

### RANGE DI LINEARITÀ DEI TEST QUANTITATIVI

## Risultati

E' stata condotta un'analisi statistica che ha confrontato la distribuzione del genotipo virale in 1949 casi con verosimile contagio in epoca antecedente il 1995 (data di applicazione routinaria dello screening per HCV con tecniche di biologia molecolare), rispetto a 978 casi infettati probabilmente nel periodo successivo

**CARATTERISTICHE EPIDEMIOLOGICHE DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO IN RELAZIONE AL GENOTIPO VIRALE**

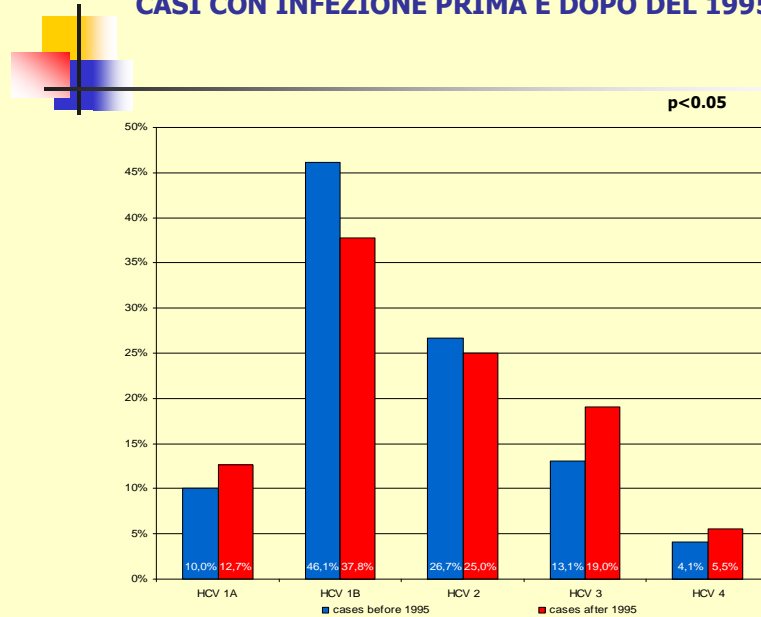



	HCV 1A	HCV 1B	HCV 2	HCV 3	HCV 4	All cases
<b>% infected before 1995</b>	10,0%	46,1%	26,7%	13,1%	4,1%	<b>1949</b>
male gender (%)	68,4%	61,5%	48,2%	79,0%	74,3%	61,5%
mean age $\pm$ SD	43,3 $\pm$ 9,2	55 $\pm$ 13,4	60,4 $\pm$ 12,8	41,8 $\pm$ 6,4	43 $\pm$ 7,8	55,7 $\pm$ 14,4
acute hepatitis (%)	13,7%	11,4%	8,7%	16,1%	20,5%	11,9%
post transfusional (%)	16,8%	33,2%	39,1%	5,6%	5,1%	<b>28,4%</b>
drug addicts (%)	32,6%	11,4%	0,8%	59,7%	48,7%	18,5%
professional exposures (%)	1,0%	2,7%	2,0%	0,8%	0,0%	2,0%
<b>% infected after 1995</b>	12,7%	37,8%	25,0%	19,0%	5,5%	<b>978</b>
male gender (%)	62,5%	53,0%	48,2%	74,7%	75,0%	58,3%
mean age $\pm$ SD	40,3 $\pm$ 12	50,8 $\pm$ 14,4	58 $\pm$ 13,9	37,3 $\pm$ 8,5	43,6 $\pm$ 8,4	53 $\pm$ 16,6
acute hepatitis (%)	10,7%	3,0%	2,7%	4,8%	12,5%	4,8%
post transfusional (%)	0,0%	2,4%	5,4%	1,2%	4,2%	<b>2,7%</b>
drug addicts (%)	17,8%	7,2%	0,9%	19,3%	16,7%	9,8%
professional exposures (%)	0,0%	1,8%	1,8%	1,2%	0,0%	1,4%

**p<0,05**

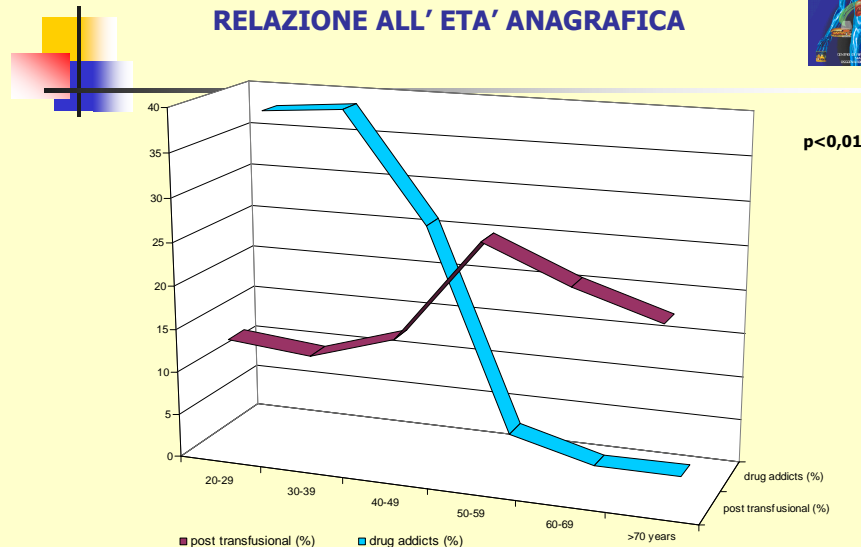
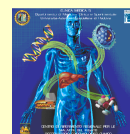
L'analisi ha dimostrato una diversa prevalenza dei genotipi infettanti nei casi con infezione prima e dopo il 1995, cumulativamente HCV-1B e HCV-2 (72,8% vs. 62,8%) e HCV-1A, HCV-3 ed HCV-4 (27,2% vs. 37,2%) ( $p<0.01$ ).

## DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI VIRALI NEI CASI CON INFEZIONE PRIMA E DOPO DEL 1995




Questo rilievo ha confermato la presenza nel tempo di almeno 2 epidemie caratterizzate: *la prima*, più numerosa, da una popolazione con pregresso rischio trasfusionale, età media più avanzata, infezione da genotipi virali HCV-1B e HCV-2 e presenza di cirrosi nel 24% dei casi e *la seconda*, rappresentata prevalentemente da soggetti maschi, più giovani, con storia di tossicodipendenza, genotipo HCV-1A, HCV-3 e HCV-4 e presenza di cirrosi nel 10%.

## TIPO DI CONTAGIO PARENTERALE IN RELAZIONE ALL' ETÀ ANAGRAFICA



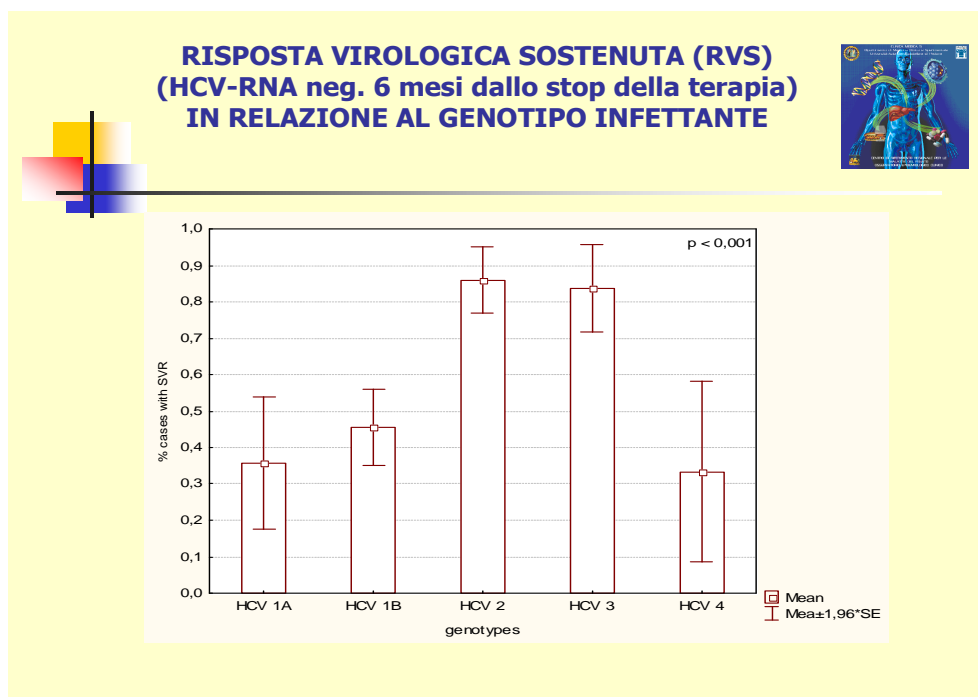
Le caratteristiche basali dei pazienti sottoposti a terapia e ritenute influenti sulla risposta al trattamento antivirale, sono elencate nella seguente tabella, suddivise in base al genotipo infettante.

**CARATTERISTICHE BASALI DEI PAZIENTI TRATTATI CON PEG-IFN E RIBAVIRINA**

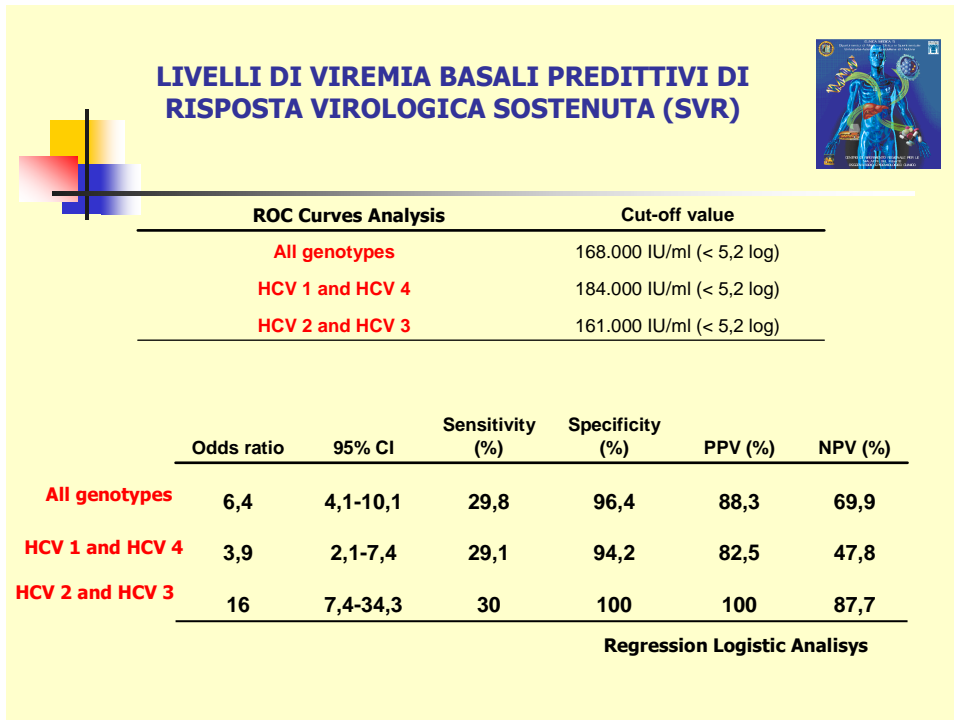


GENOTIPO VIRALE	HCV 1A	HCV 1B	HCV 2	HCV 3	HCV 4	tutti
CASI (%)	12,5%	39,0%	25,3%	16,5%	6,7%	450
MASCHI (%)	78,6%	71,6%	47,4%	78,4%	73,3%	67,5%
ETA' (media $\pm$ DS)	41,4 $\pm$ 7,7	47,2 $\pm$ 11,0	50,8 $\pm$ 12,5	41,4 $\pm$ 7,3	43,9 $\pm$ 2,7	46,3 $\pm$ 10,8
PESO (kg $\pm$ DS)	75,1 $\pm$ 12,7	76,4 $\pm$ 12,8	72,6 $\pm$ 15,5	75,2 $\pm$ 13,1	76,5 $\pm$ 14,2	75,1 $\pm$ 13,6
BMI (kg/m <sup>2</sup> $\pm$ DS)	24,2 $\pm$ 2,7	25,1 $\pm$ 3,3	25,4 $\pm$ 3,9	25 $\pm$ 3,4	25,3 $\pm$ 3,7	25,1 $\pm$ 3,4
Stadio di fibrosi > F3 (Ishak) (%)	39,2%	35,2%	29,8%	35,1%	26,6%	35,1%
Grado di flogosi (media $\pm$ DS)	5,4 $\pm$ 2,0	5,6 $\pm$ 1,9	5,6 $\pm$ 2,0	5,7 $\pm$ 1,9	5,1 $\pm$ 1,7	5,5 $\pm$ 1,9
HCV RNA <5,2 log (IU/mL)	10,7%	18,2%	35,1%	16,2%	13,3%	20,9%
HCV RNA >5,2 <5,8 log (IU/mL)	32,2%	26,1%	24,5%	27,0%	46,7%	28,0%
HCV RNA >5,8 log (IU/mL)	57,1%	55,7%	40,4%	56,8%	40,0%	51,1%

Il genotipo di HCV rappresenta il fattore determinante la durata della terapia antivirale (48 settimane è la durata in caso di infezione con HCV-1 e HCV-4, mentre 24 settimane in caso di HCV-2 e HCV-3). Nonostante ciò la risposta virologica sostenuta, cioè assenza di replicazione virale 6 mesi dopo la sospensione del trattamento, si associa a percentuali di guarigione molto diverse dal 33% in caso di infezione con HCV-1a all' 86% in caso di infezione da HCV-2.



Inoltre, sono state utilizzate curve ROC per la valutazione dei livelli di viremia ed è stato identificato un cut-off di HCV-RNA < 5,2 Log (IU/mL), quale principale fattore predittivo di risposta sostenuta alla terapia, mentre la regressione logistica ha mostrato un OR pari a 6,4; (95% CI 4,1-10,1) Sensibilità di 29,1%; Specificità di 96,4%; (PPV 82,5%, NPV 69,9%).



## **II STUDIO SULLA STADIAZIONE NON-INVASIVA DELLA FIBROSI EPATICA E CONFRONTO DI MARCATORI SIERICI E TESSUTALI.**

Scopo di questa tesi è stato quello di valutare il significato clinico dell'antigene SCCA, quale nuovo marcatore di evoluzione nell'epatite cronica C e di studiare la correlazione esistente tra la sua espressione sierica e tissutale e se la determinazione sierica dell'immunocomplesso SCCA-IgM possa essere utilizzata come un marcatore di progressione di malattia.

Il primo obiettivo è stato, quindi, quello di definire le caratteristiche cliniche, virologiche ed istologiche della popolazione in studio comprendente 63 pazienti affetti da epatopatia cronica HCV correlata a diverso stadio evolutivo afferiti all'Ambulatorio Epatologico della Clinica Medica 5a nel periodo compreso tra Gennaio - Giugno 2006. Tale popolazione composta da 33 maschi (età media:  $44,1 \pm 11,8$  anni) e da 30 femmine (età media:  $52 \pm 11,3$  anni) suddivisi in pazienti con malattia non evolutiva (32 casi, staging <3) e con malattia evolutiva (31 casi, staging  $\geq 3$ ), è stata sottoposta ad anamnesi, visita medica, controlli ematochimici e stadiazione istologica (biopsia epatica).

Il secondo obiettivo è stato, invece, quello di definire il possibile ruolo diagnostico di un nuovo marcatore sierologico, quale l'immunocomplesso SCCA-IgM.

## Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto su 63 pazienti affetti da epatopatia cronica a diversa eziologia e a differente grado di evolutività seguiti nell'ambulatorio epatologico afferente alla Clinica Medica 5<sup>a</sup> tra Gennaio - Giugno 2006. Tale popolazione è stata suddivisa in 2 gruppi in base stadiazione istologica effettuata sulla biopsia epatica: il primo gruppo comprende 32 casi senza progressione di malattia (staging <3) di cui 16 maschi (età media  $35,7 \pm 10,3$  anni) e 16 femmine (età media  $49,9 \pm 11,5$  anni) mentre il secondo gruppo comprende 31 casi con progressione di malattia (staging  $\geq 3$ ) di cui 17 maschi (età media  $52 \pm 6,3$  anni) e 14 femmine (età media  $55,8 \pm 10,7$  anni).

Altri 13 pazienti, di cui 7 affetti da epatite cronica B e 6 da epatite cronica C ma HCV-RNA negativi (in quanto sottoposti a terapia antivirale), afferiti all'Ambulatorio Epatologico nello stesso periodo, sono stati sottoposti allo stesso monitoraggio clinico e strumentale e sono stati confrontati come controlli.

I criteri di inclusione sono stati per tutti i pazienti i seguenti:

- età compresa tra 18 e 75 anni
- presenza di epatite cronica HCV correlata
- assenza di coinfezioni virali (HBV, HIV)
- esecuzione di almeno una istologia
- consenso allo studio da parte del paziente

I criteri di esclusione sono stati per tutti i pazienti i seguenti:

- presenza di cardiopatia, nefropatia o neoplasia
- presenza di infezioni acute o croniche di altro genere
- presenza di cirrosi epatica documentata istologicamente

Tutti i partecipanti allo studio sono stati attentamente valutati al momento dell'esecuzione della biopsia epatica: è stata eseguita una accurata anamnesi con particolare riferimento ai fattori di rischio certi o di probabile contagio per HCV e HBV (trasfusione, tossicodipendenza, rischio professionale, pratiche parenterali endovenose o sottocutanee con materiale potenzialmente contaminante o epatite acuta pregressa) e incerti (aumento delle ALT, riferita storia di epatopatia, riscontro occasionale di anti-HCV o anti-HBV positività).

All'esame obiettivo sono stati valutati parametri antropometrici come il peso e l'altezza, necessari per il calcolo dell'indice di massa corporea (BMI).

Sono stati considerati come segni di evolutività il riscontro di epatomegalia maggiore di 2 cm dall'arco costale di consistenza dura e di splenomegalia, il riscontro all'eco-Doppler di almeno due dei seguenti parametri: a) margini epatici irregolari, b) splenomegalia, c) diametro della vena porta maggiore di 12 mm e/o

flusso portale rallentato e infine il riscontro all'EGDS di gastropatia congestizia o di varici esofagee.

Inoltre è stato eseguito un prelievo venoso a digiuno per la misurazione di globuli rossi, globuli bianchi, piastrine, tempo di Quick, glicemia, ferritina, ALT, GGT, albumina, gammaglobuline e alfafetoproteina.

### ***Tests virologici***

Per la rilevazione degli anticorpi anti-HCV sono stati impiegati test ELISA di terza generazione RIBA-3 (Ortho Diagnostics, Raritan, NY, Chiron Corporation, Emeryville, California, USA).

Per i marcatori di infezione da HBV, rappresentati dagli antigeni HBs e HBe e dagli anticorpi anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe, sono stati impiegati i kit ELISA in commercio (Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA).

La determinazione dell'HCV-RNA qualitativo è stata effettuata utilizzando il COBAS AMPLICOR HCV Test, versione 2.0, mentre per quella dell'HCV-RNA quantitativo è stato usato l'HCV-RNA 3.0 test (Bayer).

Infine è stata effettuata la determinazione del genotipo virale mediante una metodica di ibridazione inversa su striscia (GENOTYPE HCV-III).

### ***Test ELISA per immunocomplessi SCCA-IgM***

La quantificazione sierica dell'immunocomplesso SCCA-IgM è stata eseguita utilizzando un metodo immunoenzimatico su fase solida recentemente standardizzato (Xeptagen, Napoli, Italia).

100 $\mu$ L di anticorpo policlonale di coniglio anti-SCCA umano alla concentrazione di 10  $\mu$ g/mL in PBS pH 7,2 sono stati seminati in ciascuno dei 96 pozzetti di una piastra da microtitolazione in polistirene.

Dopo un'incubazione a 4°C per tutta la notte, i legami aspecifici sono stati bloccati con 100  $\mu$ L di albumina sierica bovina (BSA) all'1% in PBS; dopo 6 lavaggi con 300  $\mu$ L di PBS, 100  $\mu$ L di siero da testare diluito 1:8 con 1% di BSA e 0.05% di Tween 20, sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente.

Gli immunocomplessi SCCA-IgM sono stati rilevati incubando 100  $\mu$ L di una soluzione 1:10 di anticorpo secondario anti-IgM umane coniugato con perossidasi e sviluppando la reazione con ABTS (acido 2,2'-azo-bis (3etilbenziazolin-6-sulfonico)) e perossido di idrogeno.

Ogni campione è stato testato in doppio e la concentrazione di immunocomplessi è stata espressa in unità arbitrarie (AU) calcolate utilizzando una curva di calibrazione a 5 punti inserita in ogni seduta e ottenuta con diluizioni scalari (da 250 AU/mL a 15,6 AU/mL) di una preparazione di immunocomplesso SCCA-IgM

purificato, per gel-filtrazione, da un pool di sieri altamente reattivi e utilizzato come standard di riferimento.

In ogni seduta sono stati inseriti come controlli interni negativi sieri di due campioni di soggetti sani e come controlli positivi, due sieri di pazienti a concentrazione nota.

Il valore di cut off dell'immunocomplesso SCCA-IgM fornito dal kit è di 120 AU/mL; campioni con valori superiori a 250 AU/mL (limite superiore della curva) sono stati diluiti ulteriormente (es. 1:16, 1:32) e ritestati.

I valori dei coefficienti di variabilità intra ed inter-assay sono risultati essere pari al 5,5% e 6,2% rispettivamente.

### ***Valutazione istologica***

Le biopsie epatiche sono state ottenute per via percutanea ecoassistita a “cielo coperto”, previa osservazione ultrasonografica del fegato, e in particolare di una opportuna area del lobo epatico destro, tramite penetrazione per via intercostale.

Attualmente la tecnica più impiegata è quella per aspirazione con ago Surecut che ha un diametro esterno di 16-18 mm e una lunghezza di 90-100 mm, in cui penetra un mandrino con incisura tagliente alla sua estremità e al cui interno viene raccolto il cilindro bioptico con meccanismo aspirante mediante stantuffo.

Questa tecnica si esegue con il paziente posto preferibilmente sul fianco sinistro, dopo aver identificato con la percussione una zona di elezione nell'ambito dell'area di ottusità epatica, scelta tra la linea ascellare media e quella posteriore (di regola in corrispondenza del VII-IX spazio intercostale) che poi viene esplorata anche ecograficamente.

Si effettua un'anestesia del tragitto intercostale con lidocaina e poi si introduce in aspirazione l'ago bioptico nel parenchima epatico con il paziente in apnea.

Se eseguita correttamente la biopsia epatica a “cielo coperto” può essere considerata una tecnica solo relativamente rischiosa (incidenza di complicanze mortali 1-3/10000); le complicanze più frequenti sono l'emoperitoneo, l'emotorace e il coleperitoneo.

Per un corretto esame istologico il frustolo ottenuto deve avere una lunghezza di almeno 20 mm, uno spessore di 1,5 mm e deve presentare almeno 5 spazi portali.

Dopo il prelievo il frustolo va posto il più rapidamente possibile in una provetta contenente una soluzione di formalina tamponata neutra al 10% in modo da fissare il tessuto (il tempo di fissazione è di 4-12 ore).

Il frustolo deve essere quindi incluso in paraffina, in modo da acquisire sufficiente durezza e compattezza. A questo punto dopo il taglio, mediante un microtomo, di

sottili fettine di 2-5 µm di spessore si procede alla sparaffinatura (mediante xilolo) e quindi alla colorazione del campione di tessuto epatico.

Le colorazioni utilizzate sono 3: l'ematossilina-eosina e la soluzione tricromica Van Gieson che sono colorazioni istomorfologiche e l'impregnazione argantica secondo Gomori che è una colorazione istochimica.

L'ematossilina-eosina è costituita da un colorante vegetale, l'ematossilina, che evidenzia i nuclei cellulari in blu-nero, e da un colorante artificiale, l'eosina, che evidenzia il citoplasma, le sostanze intercellulari e il tessuto connettivo in rosa; tale colorazione permette di individuare con precisione la componente flogistica (infiammazione portale-periportale e globulare) e necrotica (attività lobulare).

La soluzione tricromica di Van Gieson viene utilizzata per evidenziare le fibre collagene e quindi per valutare l'entità della fibrosi epatica, vengono impiegati tre coloranti: uno per il nucleo, generalmente l'ematossilina ferrica, e due non nucleari l'acido picrico e la fucsina acida.

Infine il metodo di Gomori permette, attraverso l'impregnazione argantica in due tempi, di distinguere le fibre reticolari in nero e quelle collagene in bruno-violetto fornendo ulteriori informazioni per quanto riguarda la stadiazione della fibrosi.

I preparati così ottenuti sono stati analizzati separatamente in cieco da 2 esperti anatomo-patologi e valutati per quanto riguarda lo stadio di fibrosi e il grado di infiammazione secondo lo score di Ishak.

Lo stadio di fibrosi viene descritto in sette punti:

1. F0: assenza di fibrosi
2. F1: allargamento fibroso di alcuni spazi portali con o senza setti
3. F2: allargamento fibroso della maggioranza degli spazi portali con o senza setti
4. F3: allargamento fibroso della maggioranza degli spazi portali con occasionali ponti porto-portali
5. F4: allargamento fibroso della maggioranza degli spazi portali con numerosi ponti porto-portali e porto-centrali
6. F5: numerosi ponti porto-portali e porto-centrali con occasionali noduli (cirrosi incompleta)
7. F6: cirrosi probabile o certa

Il grado di infiammazione è stato invece classificato con un punteggio massimo di 18 punti suddiviso in quattro categorie che valutano: la piecemeal necrosis (punteggio da 0-4), la necrosi confluyente (0-6), la necrosi focale (0-4) e l'infiammazione portale (0-4).

La steatosi è stata qualitativamente definita come lieve (0-10%), moderata (10-30%) e diffusa (> 30%).

### ***Valutazione immunoistochimica di SCCA***

Per la ricerca di dell'antigene SCCA si utilizza un anticorpo policlonale di coniglio (Hepa-Ab, Xeptagen, Italia) diretto contro la frazione ricombinante SCCA1.

Utilizzando frammenti di SCCA1, ottenuti mediante digestione enzimatica di SCCA1 o sintesi chimica, si è visto che l'anticorpo policlonale di coniglio riconosce numerosi epitopi localizzati sia alle estremità N-terminale e C-terminale che nella porzione centrale di SCCA come è stato dimostrato con il test ELISA o il Western Blot.

Dopo aver inibito l'attività perossidasi endogena con perossido di idrogeno al 3%, attuato lo smascheramento antigenico in microonde ( 10 mM di sodio citrato) e bloccato le proteine di legame non specifiche con siero di capra, i preparati vengono incubati con l'anticorpo primario (4 µg/ml) per 30 minuti. L'anticorpo secondario, biotinilato di capra anti-coniglio o di cavallo anti-ratto (Dako, Copenhagen, Danimarca) viene poi aggiunto per 30 minuti.

Infine i campioni vengono incubati con avidina-biotina-perossidasi e trattati con una miscela di 3,3'-diamino-benzidina tetraidrocloruro (Dako) e perossido di idrogeno. Per tutti gli esperimenti di immunoistochimica, come controllo negativo, ciascun preparato è stato incubato senza l'anticorpo primario, sostituito da una appropriata IgG non immune.

La specificità anticorpale per SCCA è stata confermata utilizzando campioni di cute umana come controlli positivi.

La positività dell'anticorpo è stata ricercata soprattutto nel compartimento citoplasmatico, rare sono state le positività nucleari.

La percentuale di cellule reattive in ogni campione è stata valutata con una scala da 0 a 3 nella quale 0 significa assenza di positività, 1 positività dell'1-30% degli epatociti, 2 del 31-50% e 3 di più del 50% .

### ***Valutazione statistica***

Per le variabili a distribuzione normale è stato utilizzato il test T di Student per campioni indipendenti (tali variabili sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard), mentre per quelle non distribuite normalmente è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney.

Per l'analisi delle tabelle di frequenza, invece, è stato utilizzato il  $\chi^2$  di Pearson.

Le singole variabili sono state, quindi, analizzate con un modello univariato (regressione logistica Logit) e i risultati statisticamente significativi sono stati valutati successivamente con analisi multivariata (regressione logistica Logit).

L'accuratezza di SCCA è stata valutata calcolando l'area sotto la curva ROC (receiver operating characteristic). Un valore di area inferiore a 0,5 indica che il parametro studiato non ha valore diagnostico. L'accuratezza diagnostica è stata calcolata in base alla sensibilità e alla specificità considerando l'evoluzione della malattia come variabile dipendente. Il valore criterio selezionato dalla curva ROC identifica quale sia il valore di riferimento di SCCA che ci consente di stabilire con maggiore specificità e sensibilità quale probabilità abbia il paziente di presentare o meno la malattia.

## Risultati

In questo studio è stata considerata una popolazione di 63 casi costituita da 32 pazienti (primo gruppo) con epatopatia cronica non evolutiva (staging <3) e 31 pazienti (secondo gruppo) affetti da epatopatia cronica evolutiva (staging  $\geq 3$ ). Lo staging misura l'entità della fibrosi epatica che è caratterizzata dalla deposizione di collagene e di altre proteine della matrice extracellulare e dalla loro organizzazione in complessi polimeri insolubili che portano, con il tempo, ad un sovvertimento dell'architettura del parenchima epatico. La fibrosi si sviluppa, inizialmente, a livello dello spazio periportale e, successivamente, si estende all'interno del lobulo epatico verso la vena centrale con la formazione di setti e di ponti di fibrosi (foto 1).

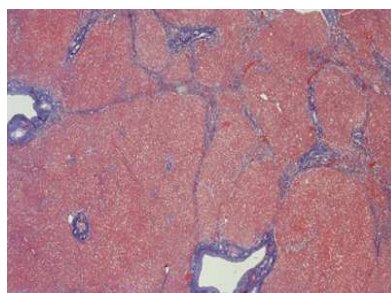
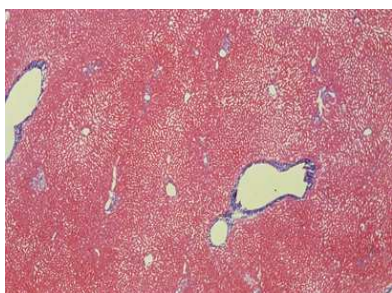


Foto 1

Lo stadio più avanzato è rappresentato dalla cirrosi epatica, che è caratterizzata da una estesa fibrosi (presenza di numerosi ponti porto-portali e porto-centrali) e da noduli di rigenerazione del parenchima epatico (foto 2).

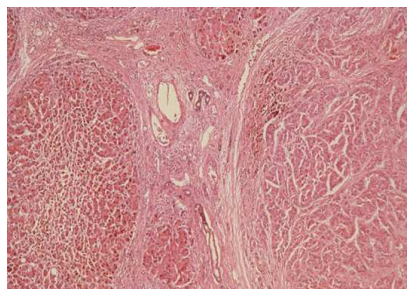
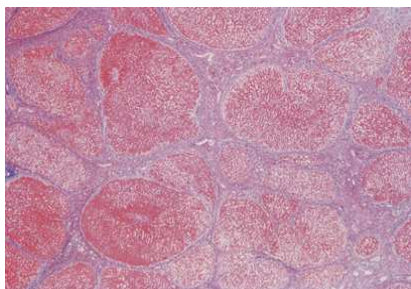


Foto 2

Nella popolazione in studio lo staging è stato classificato utilizzando lo score di Ishak con scala da 0 (assenza di fibrosi) a 6 (cirrosi probabile o certa) . Il primo gruppo comprende 13 pazienti (40,6%) con staging 1 e 19 (59,4%) con staging 2; il secondo gruppo, invece, è costituito da 22 pazienti (71%) con staging 3, 6 (19,3%) con staging 4, 2 (6,5%) con staging 5 e 1 (3,2%) con staging 6.

**Tabella 1: Caratteristiche demografiche ed epidemiologiche**

	Totale	Staging <3	Staging ≥3	p
N. casi	63	32	31	
Sesso M/F	33/30	16/16	17/14	
Età media (anni ± DS)	48,2 ± 12,2	42,8 ± 12,9	53,7 ± 8,7	0,0002*
Età media Maschi (anni ± DS)	43,9 ± 8,3	35,7 ± 10,3	52 ± 6,3	
Età media Femmine (anni ± DS)	52,9 ± 11,1	49,9 ± 11,5	55,8 ± 10,7	
Durata di malattia media (anni ± DS)	18,5 ± 11,3	18,2 ± 10,4	18,7 ± 12,4	
Peso media (kg ± DS)	71,5 ± 13,3	70,6 ± 16,2	72,4 ± 9,6	
BMI media (BMI ± DS)	24,6 ± 3,4	24,1 ± 4	25,2 ± 2,7	
<b>Fattori di rischio parenterale:</b>				
Trasfusioni	24 (38,1%)	13 (40,6%)	11 (35,5%)	
Tossicodipendenza	3 (4,8%)	2 (6,3%)	1 (3,2%)	
Esp. professionale	1 (1,6%)	1 (3,1%)	0	
Alcool (< 30 g/die)	11 (17,5%)	3 (9,4%)	8 (25,8%)	
Fumo	29 (46%)	14 (43,8%)	15 (48,4%)	

\* p calcolata con il test T di Student

Le caratteristiche demografiche ed epidemiologiche sono illustrate nella tabella 1: il primo gruppo comprende 16 maschi e 16 femmine con età media di  $42,8 \pm 12,9$  anni, il secondo 17 maschi e 14 femmine con età media di  $53,7 \pm 8,7$  ( $p=0,0002$ ). La differenza statisticamente significativa tra i due gruppi in relazione all'età è un dato atteso in quanto la progressione dell'epatopatia è verosimilmente correlata all'età del paziente.

La durata media di malattia è risultata essere rispettivamente di  $18,2 \pm 10,4$  anni nel primo gruppo e di  $18,7 \pm 12,4$  anni nel secondo senza differenze statistiche significative tra i due gruppi, anche se solo 16 pazienti (50%) appartenenti al primo gruppo e 12 (38,7%) appartenenti al secondo presentavano un fattore di rischio parenterale certo, mentre negli altri casi non era presente in anamnesi una modalità di contagio nota, fattore che renderebbe meno approssimativa la stima della durata dell'infezione.

In particolare, nel primo gruppo 13 pazienti (40,6%) erano stati sottoposti a trasfusione di emoderivati, 2 (6,3%) dichiaravano un pregresso uso di stupefacenti e.v. e 1 (3,1%) riferiva esposizione professionale. Nel secondo gruppo 11 pazienti (35,5%) erano stati sottoposti a trasfusione di emoderivati e 1 (3,2%) riferiva un pregresso uso di stupefacenti e.v..

Per quanto riguarda l'introito alcolico il 9,4% (3 casi) e il 25,8% (8 casi) dei pazienti appartenenti rispettivamente al primo e al secondo gruppo riferiva l'assunzione abituale di una moderata quantità di alcool (< di 50g/die), mentre l'abitudine al fumo è risultata presente nel 43,8% (14 casi) dei pazienti nel primo gruppo e nel 48,4% (15 casi) di quelli nel secondo.

I valori di BMI sono risultati simili nei due gruppi ( $24,1 \pm 4$  vs  $25,2 \pm 2,7$ ).

**Tabella 2: Parametri bioumorali**

	Totale	Staging <3	Staging ≥3	p
N. casi	63	32	31	
Hb ( media g/dL ± DS)	14,8 ± 11,7	14,6 ± 11,5	14,9 ± 12	
GB (media x 10 <sup>9</sup> /L ± DS)	6,3 ± 1,4	6,4 ± 1,6	6,2 ± 1,3	
PLT (media x 10 <sup>9</sup> /L ± DS)	221,5 ± 53,9	232,7 ± 39	210 ± 64,5	
INR (media INR ± DS)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	
Bilirubina tot (media µmol/L ± DS)	11,7 ± 5,2	11,0 ± 4,5	12,3 ± 5,9	
ALT (media UI/L ± DS)	118 ± 92,3	120,1 ± 102,7	116,8 ± 82	
ALT/ULN** (media ± DS)	2,4 ± 1,8	2,4 ± 2,1	2,3 ± 1,6	
AST (media UI/L ± DS)	64,6 ± 44	60,8 ± 46	68,6 ± 42,1	
AST/ULN** (media ± DS)	1,4 ± 1	1,4 ± 1	1,5 ± 0,9	
GGT (media UI/L ± DS)	62,1 ± 60,7	44,9 ± 40,2	79,3 ± 72,6	0,01*
GGT/ULN** (media ± DS)	1 ± 0,9	0,7 ± 0,6	1,2 ± 1,1	
Colesterolo (media mg/dL ± DS)	176,2 ± 38,7	181,5 ± 43,6	170,7 ± 32,7	
Alfa-fetoproteina (media µg/L ± DS)	6,9 ± 6,1	6,4 ± 5,6	7,3 ± 6,6	
Proteine tot (media g/L ± DS)	75,6 ± 4,7	74,6 ± 3,7	76,5 ± 5,5	
Albumina (media g/L ± DS)	42,7 ± 2,9	43,1 ± 2,9	42,4 ± 2,9	
Gammaglobuline (media g/L ± DS)	12,7 ± 2,9	11,9 ± 1,8	13,6 ± 3,5	0,02*
Ferritina (media µg/L ± DS)	184,8 ± 243,3	114,8 ± 79	257 ± 324,5	0,02*

\*p calcolata con il test T di Student; \*\*ULN: limite superiore di normalità

Tra i parametri ematochimici (tab. 2) solo i valori medi di GGT, gammaglobuline e ferritina sono risultati significativamente più elevati nel secondo gruppo (GGT:  $44,9 \pm 40,2$  UI/L vs  $79,3 \pm 72,6$  UI/L  $p = 0,01$ ; gammaglobuline:  $11,9 \pm 1,8$  g/L vs  $13,6 \pm 3,5$  g/L  $p = 0,02$ ; ferritina:  $114,8 \pm 79$  µg/L vs  $257 \pm 324,5$  µg/L  $p = 0,02$ ).

**Tabella 3: Caratteristiche virologiche**

	Totale	Staging <3	Staging ≥3	p
N. casi	63	32	31	
<b>Genotipo di HCV</b>				
HCV-1	37 (58,7%)	22 (68,8%)	15 (48,4%)	
HCV-2	13 (20,6%)	5 (15,6%)	8 (25,8%)	
HCV-3	6 (9,5%)	3 (9,4%)	3 (9,7%)	
HCV-4	6 (9,5%)	2 (6,2%)	4 (12,9%)	
HCV-5	1 (1,6%)	0	1 (3,2%)	
Carica virale (media x 10 <sup>3</sup> copie/mL ± DS)	5.734 ± 6.885	6.463 ± 7.667	4.982 ± 6.006	n.s.*

\*p calcolata con il test T di Student

Tra le caratteristiche virologiche (tab. 3) la distribuzione dei genotipi virali ha mostrato infezione da HCV-1 in 22 casi (68,8%) nel primo gruppo e in 15 casi (48,4%) nel secondo, mentre i genotipi infettanti diversi da HCV-1 sono stati

rilevati in 10 casi (31,2%) nel primo gruppo e in 16 casi (51,6%) nel secondo con maggiore rappresentazione del genotipo HCV-2 in entrambi i gruppi. La carica virale media è risultata lievemente diversa tra i due gruppi (6,8log nel primo gruppo e 6,7log nel secondo gruppo, p= ns).

**Tabella 4: Caratteristiche istologiche**

	Totale	Staging <3	Staging ≥3	p
<b>N. Casi</b>	63	32	31	
<b>Grading</b>				
Lieve (≤ 4)	33 (52,4%)	22 (68,8%)	11 (35,5%)	0,008*
Moderato (> 4)	30 (47,6%)	10 (31,3%)	20 (64,5%)	
<b>Steatosi</b>				
Lieve (0-10%)	38 (60,3%)	24 (75%)	14 (45,2%)	0,02**
Moderata (10-30%)	13 (20,6%)	5 (15,6%)	8 (25,8%)	
Diffusa (> 30%)	12 (19,1%)	3 (9,4%)	9 (29%)	

\*p calcolata con il test Chi-Quadro; \*\* p calcolata con il test M-L Chi-Quadro

Tra le caratteristiche istologiche (tab. 4) è stata valutata la steatosi epatica che può essere di tipo macro o micro-vescicolare a seconda delle dimensioni delle gocce lipidiche presenti all'interno degli epatociti. Sezioni di tessuto epatico colorate con ematossilina-eosina mostrano epatociti ripieni di vacuoli di grosse dimensioni, vuoti, con il nucleo "spostato" alla periferia della cellula nel caso della forma macro-vescicolare, mentre in quella micro-vescicolare si riscontrano numerosi vacuoli di piccole dimensioni (foto 3).

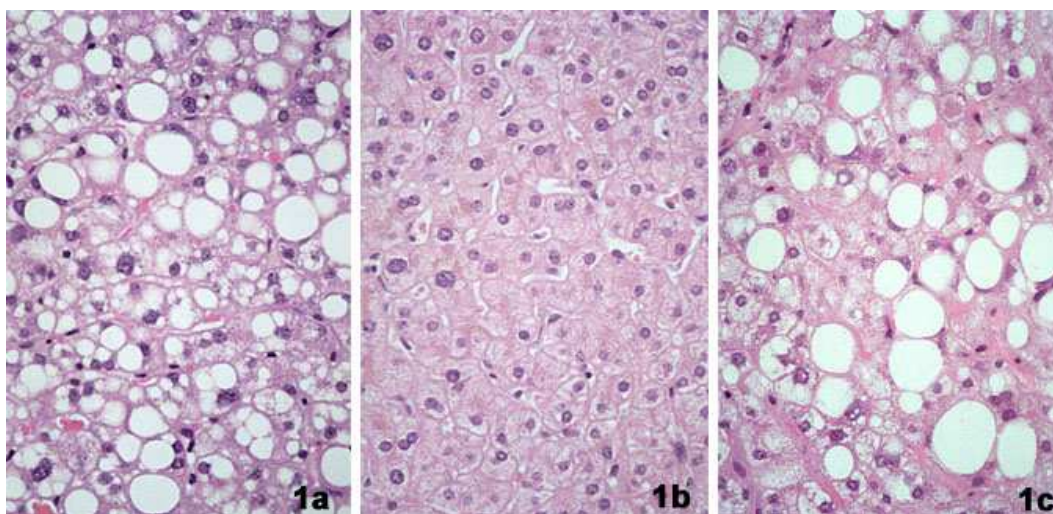


Foto 3

La steatosi è stata classificata come lieve (tra 0-10%), moderata (10-30%) e diffusa (> 30%) rispettivamente in 24 (75%), 5 (15,6%) e 3 (9,4%) pazienti appartenenti al primo gruppo e in 14 (45,2%), 8 (25,8%) e 9 (29%) appartenenti al secondo.

Anche in questo caso si è evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ( $p= 0,02$ ).

Il grading istologico valuta l'attività necrotico-infiammatoria del tessuto epatico; in particolare considera l'entità della necrosi periportale e della piecemeal necrosis (distruzione della lamina limitante degli epatociti periportali da parte di cellule infiammatorie), il grado di necrosi confluyente che forma ponti tra strutture vascolari, tra spazi portali e spazi portali o tra spazio portale e vena centrolobulari (necrosi a ponte). Inoltre, viene valutato il grado di degenerazione e di necrosi focale degli epatociti nel lobulo e il grado di infiammazione portale.

Nella popolazione in studio il grading istologico è risultato di lieve entità ( $\leq 4$ ) nel 68,8% e nel 35,5%, rispettivamente, dei pazienti del primo e del secondo gruppo, e di entità intermedia ( $> 4$ ) nel 31,3% e nel 64,5% dei restanti casi, presentando una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ( $p= 0,008$ ).

In tutti i pazienti è stata valutata la presenza dell'antigene SCC nel campione di tessuto epatico prelevato durante la biopsia mediante tecnica immunohistochimica.

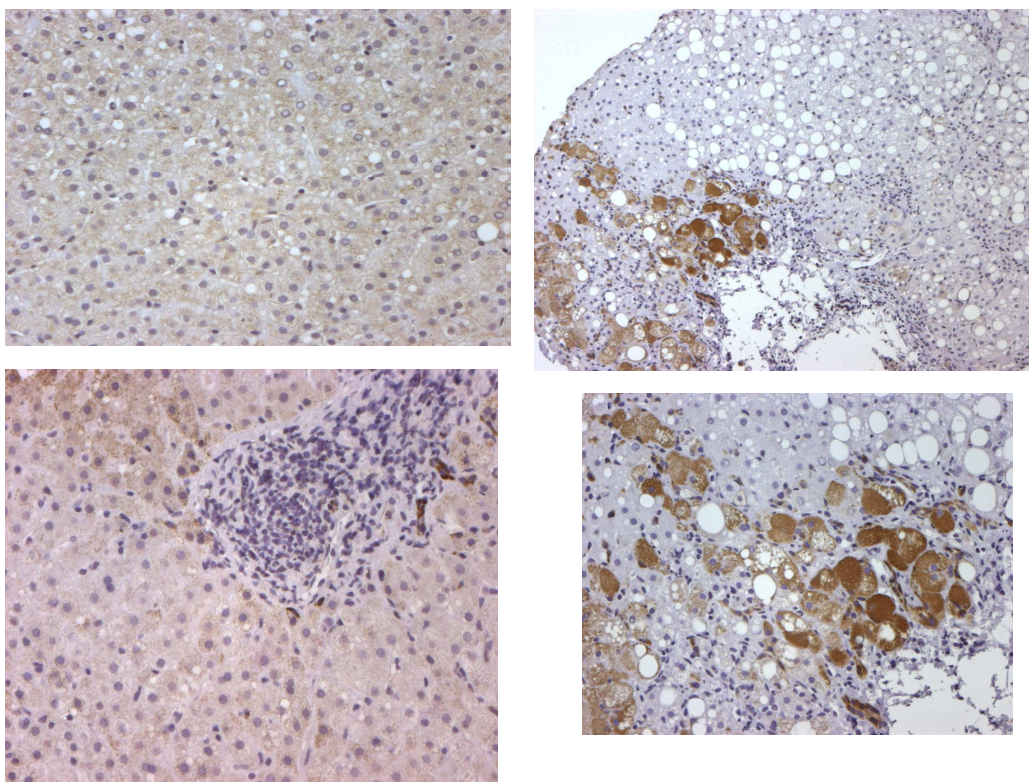


Foto 4

La percentuale di cellule reattive in ogni campione (foto 4) è stata valutata con una scala da 0 a 3 nella quale 0 significa assenza di positività, 1 positività dell'1-30% degli epatociti, 2 del 31-50% e 3 di più del 50% .

**Tabella 5: Caratteristiche di SCCA**

	Totale	Staging < 3	Staging ≥ 3	p
<b>N. Casi</b>	63	32	31	
<b>SCCA tissutale</b>				
Negativo	26 (41,3%)	19 (59,4%)	7 (22,6%)	0,003*
Positivo	37 (58,7%)	13 (40,6%)	24 (77,4%)	
<b>SCCA-IgM sierico</b>				
Negativo	43 (68,2%)	27 (84,4%)	16 (51,6%)	0,005*
Positivo***	20 (31,8%)	5 (15,6%)	15 (48,4%)	
Media (AU/mL ± DS)	435,8 ± 736,2	181,9 ± 163,3	697,9 ± 976,1	0,005**

\*p calcolata con il test Chi-Quadro;

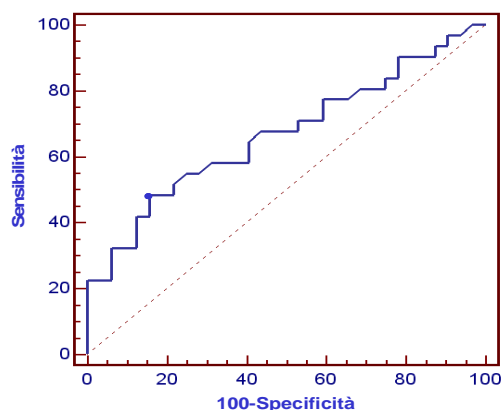
\*\*p calcolata con test T di Student;

\*\*\*positivo: > 190 AU/mL

Nella tabella 5 è descritta la distribuzione tissutale di tale marcatore nei due gruppi di pazienti: nel primo l'antigene SCC è stato rilevato solo nel 40,6% dei pazienti (13 casi su 32), mentre nel secondo nel 77,4% (24 casi su 31) (p= 0,003) confermando l'esistenza di una correlazione tra epatopatia avanzata ed espressione di SCCA nel tessuto epatico.

La presenza nel siero dell'immunocomplesso formato dall'antigene SCC e dall'immunoglobulina di classe IgM è stata rilevata mediante il test ELISA. Nel primo gruppo il valore medio di SCCA-IgM è risultato di 181,9 ± 163,3 AU/mL mentre nel secondo di 697,9 ± 976,1 AU/mL (p=0,005) (tab. 5).

**Figura 9: Curva ROC per SCCA-IgM**



Specificità: 84,4%; Sensibilità: 48,4%; Valore cut off di SCCA: 190 AU/mL

Al fine di valutare l'accuratezza diagnostica del parametro in studio e di stabilire un valore limite (definito valore criterio) che permettesse di monitorare l'evoluitività dell'epatopatia, in base ai valori di SCCA-IgM espressi da ciascun paziente, è stata creata una curva ROC (receiver operating characteristic) (fig. 9). Il valore criterio nella popolazione in studio è risultato essere di 190 AU/mL, con una sensibilità del 48,4%, e una specificità dell'84,4% mentre l'area sotto la curva ROC (che esprime il valore diagnostico del parametro considerato) è risultata di  $0,668 \pm 0,068$ . Nel primo gruppo l'84,4% dei pazienti (27 casi su 32) ha presentato un valore di SCCA-IgM inferiore a 190 AU/mL e solo il 15,6% (5 casi su 32) un valore superiore. Nel secondo gruppo, invece, la distribuzione è risultata più omogenea: il 51,6% dei pazienti (16 casi su 31) ha presentato un valore inferiore a 190 AU/mL e il 48,4% (15 casi su 31) un valore superiore ( $p=0,005$ ) (tab. 5).

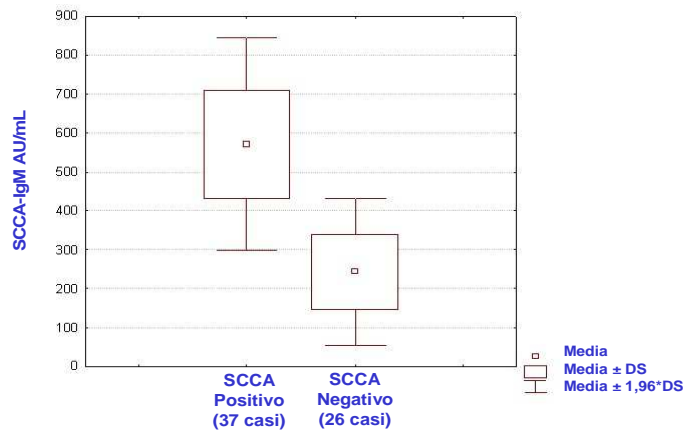
**Tabella 6: Confronto siero tessuto**

	SCCA tissutale negativo (26 casi)		p	SCCA tissutale positivo (37 casi)		p
	Staging < 3	Staging ≥ 3		Staging < 3	Staging ≥ 3	
<b>N. Casi</b>	19	7		13	24	
<b>SCCA-IgM sierico</b>						
<b>Negativo</b>	17 (90%)	4 (57%)	0,003*	10 (77%)	12 (50%)	n.s.*
<b>Positivo</b>	2 (10%)	3 (43%)		3 (23%)	12 (50%)	

\*p calcolata con il test Chi-Quadro

Infine, si è cercato di valutare la correlazione esistente tra l'espressione dell'immunocomplesso SCCA-IgM nel siero e quella del corrispondente antigene nel tessuto (tab. 6). I pazienti che non esprimono l'antigene SCC nel tessuto sono complessivamente 26 (41,3%); in particolare, nel primo gruppo su 19 pazienti che non esprimono l'antigene SCC nel tessuto 17 non lo esprimono nemmeno nel siero, mentre nel secondo gruppo questo si verifica in 4 casi su 7 ( $p=0,003$ ). Nell'ambito dei pazienti che esprimono l'antigene SCC nel tessuto (37 casi su 63, 58,7%) nel primo gruppo dei 13 pazienti che esprimono l'antigene nel tessuto solo 3 lo esprimono anche nel siero mentre nel secondo gruppo questo si verifica in 12 casi su 24 ( $p= n.s.$ ).

**Figura 10: Dosaggio di SCCA-IgM in relazione alla positività tissutale di SCCA**



In particolare, indipendentemente dal gruppo di appartenenza, i pazienti che esprimono SCCA nel tessuto hanno presentato valori medi dell'immunocomplesso SCCA-IgM sierico più elevati rispetto ai casi senza positività tissutale ( $571,1 \pm 848,5$  e  $243,3 \pm 491,8$   $p= 0,08$ ) (fig.10).

**Figura 11: Marcatori sierologici non invasivi per la valutazione della fibrosi epatica**

Indice	Parametri	Outcome	Cut-off	AUROC (%)	Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>Forns fibrosis index</b>	Età, piastrine, GGT, colesterolo	<b>Scheuer</b> 2-4	< 4,2	<b>0,81</b>	94	51	40	96
			> 6,9		30	95	66	80
<b>Fib-4 index</b>	Età, piastrine, GGT, colesterolo	<b>Ishak</b> 4-6	< 1,45	<b>0,76</b>	70	74	42	90
<b>SCCA index</b>	SCCA IgM	<b>Ishak</b> 3-6	< 190	<b>0,67</b>	48	84	75	63
<b>Forns-SCCA</b>	Età, piastrine, GGT, colesterolo, SCCA IgM	<b>Ishak</b> 3-6	0,48	<b>0,88</b>	87	84	84	87
<b>Fib-4-SCCA</b>	Età, piastrine, GGT, colesterolo, SCCA IgM	<b>Ishak</b> 3-6	0,39	<b>0,83</b>	90	72	76	89

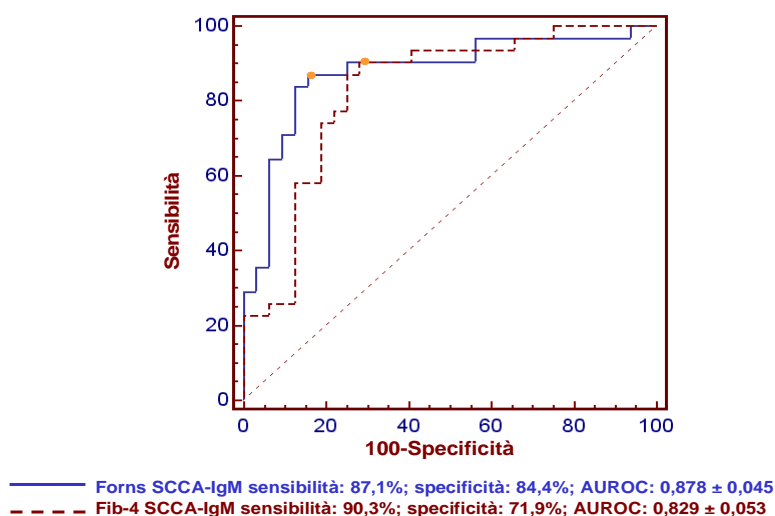
AUROC: area sotto la curva ROC; Se: sensibilità; Sp: specificità; VPP: valore predittivo positivo; VPN: valore predittivo negativo

Dall'analisi univariata (regressione logistica Logit) eseguita per valutare ogni parametro potenzialmente legato all'evoluitività dell'epatopatia, oltre ad SCCA, è risultato che l'età si associa con una sensibilità del 71% e una specificità del 68,8% all'evoluzione di malattia. Inoltre, la combinazione dei due parametri, cioè

età ed SCCA, mediante la stessa analisi multivariata determina un incremento della sensibilità che risulta pari al 74,2% con identica specificità (fig.11).

Sono stati, quindi, presi in considerazione altri due parametri, l'indice di fibrosi di Forns e FIB-4, per ciascuno dei quali è stata calcolata la curva ROC. L'area sotto la curva ROC è risultata, rispettivamente, pari a  $0,857 \pm 0,048$  (sensibilità dell'87,1% e specificità del 75%), e a  $0,802 \pm 0,056$  (sensibilità dell'87,1% e specificità del 68,7%).

**Figura 12: Confronto tra il modello Forns SCCA-IgM e il modello Fib-4 SCCA-IgM**



Quindi, per meglio predire l'evolutività dell'epatopatia, sono stati confrontati due modelli: il primo, prodotto dall'associazione di SCCA e dell'indice di Forns, presenta una sensibilità dell'87,1% e una specificità dell'84,4% mentre il secondo, prodotto dall'associazione di SCCA con FIB-4, presenta una sensibilità del 90,3% e una specificità del 71,9% (fig. 12).

### **III STUDIO SULL'ADERENZA ALLA TERAPIA ANTIVIRALE E SUI MECCANISMI PATOGENETICI DELLA DEPRESSIONE INDOTTA DA INTERFERONE**

Questo studio ha valutato gli effetti collaterali ed in particolare la comparsa di sintomi neuropsichici e di depressione nei soggetti con epatite cronica C sottoposti a terapia antivirale con PEG-IFN- $\alpha$  e ribavirina allo scopo di:

- Individuare la classe più a rischio di sviluppare sintomi psichiatrici con test etero-autosomministrati, con la valutazione della presenza di comorbidità e con i dosaggi dei livelli ematici di triptofano.
- Valutare quali dei test psichiatrici è più adeguato per una precoce identificazione dei sintomi depressivi, le modalità e i tempi di somministrazione.
- Verificare se il trattamento precoce con psicofarmaci aumenta l'aderenza alla terapia evitando la sintomatologia più grave che comporta l'interruzione anticipata e molto spesso il fallimento della terapia antivirale.

## **Materali e metodi**

Sono stati analizzati 53 pazienti (20 femmine e 33 maschi) di età compresa tra 20 e 67 anni (media  $47,17 \pm 11,8$ ), affetti da epatite cronica da HCV. I pazienti, inclusi consecutivamente, sono stati trattati con PEG-IFN- $\alpha$ -2a (180  $\mu$ g/settimana–ROCHE, 17 pazienti) o PEG-IFN- $\alpha$ -2b (1,5  $\mu$ g/kg/settimana–SCHERING-PLOUGH, 36 pazienti) e Ribavirina. I pazienti sono stati osservati con tre tempi di valutazione: basale, al 1° mese (1MT) e al 6° mese (6MT) dall'inizio della terapia. Nello studio sono stati inclusi i pazienti con epatite virale cronica con indicazione al trattamento antivirale e quindi con:

- evidenza sierologia di infezione da HCV (anti-HCV positività sierica con metodica ELISA, HCV-RNA qualitativa positiva con metodica Cobas Amplicor);
- età compresa tra i 18 e i 70 anni;
- elevati livelli sierici di ALT documentati in almeno 2 occasioni negli ultimi 2-6 mesi;
- evidenza istologica di epatite cronica o cirrosi (Child A) da HCV documentata dalla biopsia epatica, eseguita negli ultimi 12-18 mesi.
- Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che soddisfano i seguenti criteri:
- cirrosi avanzata o scompensata
- leucopenia (GB<2.000/ml, PMN<1.500/ml) e/o trombocitopenia (plt<100.000/ml)
- tossicodipendenza o alcolismo attivi
- gravidanza in atto; incapacità ad una contraccezione efficace
- epilessia/convulsioni non controllate
- gravi disturbi cardiaci, o patologie renali o disfunzioni midollari;
- patologie neoplastiche con esordio negli ultimi tre anni;
- coinfezione con HBV e/o HIV;
- presenza di malattie autoimmuni o dismetaboliche a compromissione epatica;

### ***Valutazione psichiatrica***

Prima dell'inizio della terapia, ai fini di una diagnosi descrittiva dei disturbi psichiatrici, è stata somministrata la versione italiana dell'intervista semistrutturata M.I.N.I., versione ridotta della SCID (Structured Clinical Interview for DSM-IV). In particolare sono state considerate la presenza in anamnesi di: episodio depressivo maggiore, distimia, ideazione suicidaria, episodio ipomaniacale, disturbo di panico, agorafobia, fobia sociale, disturbo ossessivo compulsivo, disturbo post-traumatico da stress, disturbi psicotici, anoressia

nervosa, bulimia nervosa, disturbo d'ansia generalizzata, disturbo antisociale di personalità, secondo il DSM-IV. Inoltre è stata raccolta anamnesi dettagliata sul pregresso abuso di alcol e di stupefacenti.

Sono stati somministrati i seguenti test psichiatrici prima dell'inizio della terapia, a 4 settimane (1MT) e a 24 settimane (6MT) dopo l'inizio della terapia.

**La Scala di Hamilton per la Depressione (Ham-D):** misura la presenza e l'intensità di specifici sintomi depressivi. Si tratta di un test compilato dall'intervistatore sulla base della propria esperienza clinica e delle condizioni del paziente al momento del colloquio. Comprende 17 item, con punteggio articolato su 3, 4 o 5 gradi di gravità; i cut-off sono stati fissati, sulla base di numerosi riscontri clinici, sui seguenti valori: 0-7 assenza di depressione; 8-17 depressione lieve; 18-24 depressione moderata;  $\geq 25$  depressione grave. La Ham-D esprime più la pervasività del quadro clinico che la gravità. In riferimento alla scala Ham-D, oltre al punteggio totale sono stati considerati due Subtotali riferiti agli item indaganti gli aspetti "somatici" (item 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16; rispettivamente insonnia iniziale, insonnia centrale e insonnia ritardata, rallentamento, agitazione, ansia somatica, sintomi somatici gastrointestinali, sintomi somatici generali, sintomi genitali, calo ponderale) e gli item riferiti agli aspetti "timici" (item 1, 2, 3, 7, 10, 15, 17: rispettivamente: umore depresso, sentimenti di colpa, suicidio, lavoro e interessi, ansia psichica, ipocondria, insight).

**Beck Depression Inventory (BDI):** misura le manifestazioni comportamentali della depressione. È una scala di autovalutazione. I 21 item della scala esplorano le principali caratteristiche della sintomatologia depressiva osservata in ambiente psichiatrico, ciascun item è valutato da un punteggio compreso tra 0 e 3, con 0 indicante l'assenza del sintomo e 3 l'intensità massima. I punteggi di cut-off per i diversi livelli di gravità sono definiti come segue: 0-9 assenza depressione, 10-17 depressione lieve, 18-29 depressione moderata, 30-63 depressione severa.

La BDI è stata utilizzata in numerosi studi psichiatrici ed è considerato lo strumento di autovalutazione più specifico per la depressione, in quanto esplora una ristretta gamma di sintomi con esclusione di quelli relativi all'ansia.

Per la caratterizzazione dei sintomi depressivi presenti nei pazienti in terapia con peg-IFN, sono stati utilizzati i risultati dell'analisi fattoriale condotta sulla BDI ad opera di Moorley et al. (2002). In particolare, oltre al punteggio totale calcolato alla BDI, gli items sono stati suddivisi in tre gruppi in base agli aspetti che essi indagano. Sono stati pertanto distinti quelli relativi alle manifestazioni "somatiche" (item: 15, 17, 16, 18, 19, 21, 20; rispettivamente corrispondenti a: lavoro, calo

dell'appetito, atteggiamento verso il sesso, stanchezza, insonnia, preoccupazioni per la propria salute, calo ponderale), gli aspetti "cognitivi", legati a una visione negativa del sé (item: 3, 5, 6, 7, 8, 12, 14; rispettivamente: fallimento, colpa, punizione, odio verso se stessi, auto-accusa, interesse per le altre persone, opinione sul proprio aspetto) e infine quelli che riguardano la dimensione "affettiva" (item 1, 2, 4, 9, 10, 11, 13, 19; rispettivamente: tristezza, hopelessness, anedonia, suicidio, tendenza al pianto, prendere decisioni).

**Scala di Hamilton per l'ansia (Ham-A o HAS):** misura la presenza dei sintomi ansiosi. Comprende 14 item, il cui punteggio si articola su 5 gradi di gravità: 0-5 non ansia, 6-14 ansia lieve, >15 ansia patologica. Si tratta di un test eterosomministrato.

**State Trait Anxiety Inventory (S.T.A.I. forma Y):** per misurare l'ansia di stato (20 item) e quella di tratto (20 item) con punteggi da 20 a 80. L'ansia-tratto (S.T.A.I.T) può essere considerata una caratteristica relativamente stabile della personalità, un atteggiamento comportamentale, che riflette la modalità con cui il soggetto tende a percepire come pericolosi o minacciosi gli stimoli e le situazioni ambientali. L'ansia-stato (S.T.A.I.S.) può essere definita come un'interruzione temporanea del continuum emozionale che esprime attraverso una sensazione soggettiva di tensione apprensione, nervosismo, inquietudine. Si tratta di un test autosomministrato.

**Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS):** è composta da 14 item metà dei quali esplorano la depressione e l'altra metà l'ansia. Il periodo esplorato è l'ultima settimana. Non comprende item somatici (come insonnia, perdita dell'appetito etc) che possano essere in rapporto alla patologia somatica, in modo da poter studiare meglio la depressione associata a tale patologia. Si articola su 3 gradi di gravità: punteggi da 0 a 7 è considerato normale, da 8 a 10 borderline, >11 sintomi clinicamente rilevabili. Anche questo test è autosomministrato.

#### **Determinazione degli effetti collaterali e degli esami bioumorali**

Contemporaneamente ai test psichiatrici i pazienti sono stati sottoposti a visita internistica e interrogati sugli effetti collaterali che si sono manifestati a vari tempi dello studio. In particolare è stata indagata l'insorgenza e la gravità di: sintomi similinfluenzali (artromialgie, febbre, cefalea), calo ponderale, astenia, nausea/vomito, diarrea/stitichezza, alterazioni a carico della cute e delle mucose (prurito, eruzioni cutanee, secchezza della cute, xerostomia, eruzioni nel sito di inoculo, alopecia, ulcere orali), insonnia, disgeusia/anosmia, sonnolenza, formicolii/parestesie, dispnea, tosse, alterazioni presso rie, aritmie cardiache,

alterazioni tiroidee (ipotiroidismo/ipertiroidismo), disuria, impotenza/calò della libido, alterazioni mestruali, infezioni.

Inoltre sono stati eseguiti esami bioumorali e virologici in epoca basale e successivamente al primo mese, al terzo e al sesto mese dei seguenti parametri: emocromo con formula e piastrine (mensilmente) AST/ALT (mensilmente), HCV-RNA qualitativo e quantitativo (dopo 4 e 12 settimane di terapia), TSH (dopo 12 e 24 settimane di terapia).

#### ***Determinazione del triptofano***

I prelievi di sangue sono stati eseguiti ai tempi, 1° mese, 6° mese dall'inizio della terapi e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  i campioni. Per l'analisi del triptofano, si è impiegato il metodo Costa et al. (1987) modificato, utilizzando un sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) costituito da due pompe di tipo LC-10AD della Shimadzu Corporation (Kyoto, Giappone), dotato di rivelatore fluorimetrico Shimadzu RF-10AXL. La separazione cromatografica è stata condotta a temperatura ambiente per mezzo di una colonna analitica Platinum EPS C18 100A  $5\mu\text{m}$  250mm x 4.6mm della Alltech (Deerfield, IL, USA) e una precolonna Alltech impaccata con fase stazionaria RP-8 (20-40  $\mu\text{m}$  LiChroprep, della Merck (Darmstadt, Germania). La fase mobile era costituita da acetonitrile/tampone fosfato (0,004 M, pH 3,5) in eluizione isocratica (15:85 v/v) e con velocità di flusso di 1 ml/min. il detector fluorimetrico è stato posto alle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 285 e 345 nm. Sono state poi preparate soluzioni standard, contenenti differenti concentrazioni di L-Trp (da 0,25 a 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Queste soluzioni standard sono servite poi per costruire la retta di taratura e sono state quindi analizzate nel sistema cromatografico prima delle determinazioni dei sieri. 50  $\mu\text{l}$  del siero in esame, diluito 1:20 con acqua bidistillata (Trp totale) sono stati iniettati direttamente nel sistema cromatografico.

#### ***Analisi statistica***

La significatività della differenza fra le medie di variabili distribuite normalmente è stata valutata con il T di Student per variabili indipendenti. Per variabili con distribuzione non normale, è stata utilizzata la statistica non parametrica: il Test U di Mann-Whitney, e per verificare lo scostamento significativo dall'indipendenza stocastica il Chi quadro oppure il Fisher Exact test, se presente numerosità di frequenza molto bassa.

Le modificazioni dei test psichiatrici e del dosaggio di triptofano durante la terapia sono state analizzate mediante analisi della varianza per misure ripetute (ANOVA).

## Risultati

Sono stati analizzati 53 pazienti (20 femmine e 33 maschi) di età compresa tra 20 e 67 anni (media  $47,17 \pm 11,8$ ), affetti da epatite cronica da HCV. I pazienti, inclusi consecutivamente, sono stati trattati con PEG-IFN- $\alpha$ -2a (180  $\mu$ g/settimana–*ROCHE*, 17 pazienti) o PEG-IFN- $\alpha$ -2b (1,5  $\mu$ g/kg/settimana–*SCHERING-PLOUGH*, 36 pazienti) e Ribavirina (15 mg/kg die), per 6 o 12 mesi rispettivamente in base al genotipo HCV 2 e 3 oppure HCV 1 e 4. I pazienti sono stati osservati con 3 tempi di valutazione: basale, al 1° mese (1MT) e al 6° mese (6MT) dall'inizio della terapia.

### *Valutazioni cliniche*

Nella tabella 1 vengono illustrate le caratteristiche demografiche, virologiche ed istologiche basali. I pazienti con cirrosi (staging F5-F6 secondo Ishak) erano 9, tutti in buon compenso (classe A secondo Child-Pugh). Vi erano 25 (47%) pazienti con genotipo HCV-1, 16 (30%) con genotipo 2a/2c, 6 (11%) con genotipo 3, 6 (11%) con genotipo 4.

<b>N.CASI</b>	<b>53</b>
Sesso M/F	20/33
Età (media anni $\pm$ DS)	$47 \pm 11,8$
Peso (media kg $\pm$ DS)	$76,18 \pm 13,75$
Altezza (media cm $\pm$ DS)	$173 \pm 10,27$
BMI (media $\pm$ DS)	$25,25 \pm 3,18$
Epatite cronica (%)	83
Cirrosi (%)	17
HCV-1 (%)	47
HCV-2a/2c (%)	30
HCV-3a (%)	11
HCV-4 (%)	11
HCV-RNA quantitativo (media copie/mL $\pm$ DS)	$11.990.028 \pm 15.833.493$
Peg-IFN $\alpha$ -2a (%)	32
Peg-IFN $\alpha$ -2b (%)	67

Tabella 1: caratteristiche demografiche, virologiche ed istologiche basali

Si segnala come 3 pazienti (2 femmine e 1 maschio) presentassero ipotiroidismo in trattamento sostitutivo e in buon controllo al momento dello studio. Una delle 2 donne in ipotiroidismo ha dovuto ridurre la terapia sostitutiva tiroidea durante il trattamento, e una dall'ipotiroidismo ha sviluppato ipertiroidismo, controllato successivamente con propil-tiouracile. Solo un soggetto maschio ha sviluppato ipotiroidismo al sesto mese di terapia con interferone. 2 pazienti (1 maschio e 1 femmina) risultavano in terapia con antiepilettici per pregresse crisi epilettiche ma in ottimo controllo e non hanno presentato episodi comiziali durante il trattamento antivirale.

### Effetti collaterali ed esami bioumorali

Gli effetti collaterali comparsi durante il trattamento e segnalati dai pazienti che rispondevano ad una dettagliata intervista dopo il 1° (1MT), 3° (3MT), e 6° (6MT) mese, sono riportati nella seguente tabella.

Sintomi	1MT	3MT	6MT
Calo ponderale	52,8%	64,7%	75%
Astenia	71,6%	68,6%	75%
Febbre	71,6%	43,1%	35%
Artromialgie	43,3%	5,8%	15%
Cefalea	64,1%	54,9%	50%
Nausea/vomito	62,2%	21,5%	17,5%
Anoressia	39,6%	35,3%	30%
Diarrea	13,2%	17,6%	12,5%
Stipsi	11,3%	13,7%	15%
Insonnia	37,7%	35,3%	37,5%
Tinnitus/riduzione audiometrica	11,3%	5,8%	12,5%
Disgueusia	37,7%	35,3%	25%
Sonnolenza diurna	18,8%	29,4%	5%
Parestesie	7,5%	2%	2,5%
Dispnea da sforzo moderato/lieve	58,5%	51%	65%
Tosse	43,4%	35,3%	47,5%
Cardiopalmo/aritmie	28,3%	11,7%	22,5%
Iperensione	0%	4%	0%
Ipotensione	7,5%	4%	0%
Disuria	2%	2%	0%
Impotenza/calò della libido	1,8%	7,8%	7,5%
Alterazioni mestruali	0%	2%	0%
Stomatite/Ulcere orali	20,7%	13,7%	10%
Alopecia	7,5%	23,5%	57,5%
Eritema da inoculo	56,6%	53%	52,5%
Eruzioni cutanee/prurito	19%	41%	40%
Infezioni	5,6%	13,7%	10%











 Calo ponderale	 Neurologici	 dermatologici	 infezioni
 Astenia	 Flu-like	 respiratori	
 Gastroenterologici	 Cardiologici	 Genito-urinari	

Tabella 2: effetti collaterali registrati durante la terapia antivirale

Nella successiva tabella sono stati illustrati gli effetti della terapia sulla crisi ematica che molto spesso influenzano le condizioni cliniche del paziente e richiedono una diminuzione della posologia o la sospensione del farmaco.

	<b>Grado</b>	<b>1MT</b>	<b>3MT</b>	<b>6MT</b>
Anemia	1: -2gr/l del basale >11 g/L	49%	68,6%	62,5%
	2: 10,9-9,5	18,8%	15,7%	22,5%
	3: <9,5	1,8%	1,9%	0%
Leucopenia	1: 3,9-3x1000 mm <sup>3</sup>	20,7%	43,1%	42,5%
	2: 2,9-2 x1000 mm <sup>3</sup>	34%	27,4%	35%
	3: <2 x1000 mm <sup>3</sup>	4%	8%	10%
Neutropenia	1: 1,9-1,5 x1000 mm <sup>3</sup>	19%	21,5%	17,5%
	2: 1,4-8 x1000 mm <sup>3</sup>	51%	45%	50%
	3: <8 x1000 mm <sup>3</sup>	13,2%	11,7%	15%
Piastrinopenia	1: 99-75 x1000 mm <sup>3</sup>	3,7%	2%	0%
	2: 74-50 x1000 mm <sup>3</sup>	3,7%	5,8%	7,5%
	3: <50 x1000 mm <sup>3</sup>	3,7%	2%	2,5%

Tabella 3: effetti della terapia sulla crasi ematica

#### *Eventi avversi e sospensione della terapia*

I pazienti che hanno sospeso terapia al primo mese sono stati 2 (3,7%): uno per aumento della mioglobina, e uno per grave anemia.

Al terzo mese un paziente in trattamento per ipotiroidismo, ha sviluppato ipertiroidismo non controllabile, ed è stato quindi necessario sospendere il trattamento.

Un paziente ha presentato grave eruzione cutanea con verosimile quadro di tossidermia che ha comportato l'interruzione della cura al quarto mese. In questi ultimi due pazienti, tuttavia, si è mantenuto una risposta sostenuta (HCV-RNA negativo dopo 6 mesi dalla sospensione). Al sesto mese 9 pazienti (19%) sono risultati non responsivi (HCV-RNA positivo).

#### *Valutazione psichiatrica*

Sei pazienti (5 femmine e 1 maschio) erano già in trattamento con SSRI (5 per sindrome depressiva, 1 per disturbo di personalità) prima dell'inizio della terapia, e al momento dello studio erano in buon compenso psichiatrico. Tale gruppo di pazienti (gruppo A) non differiva da tutti gli altri (gruppo B) per età ( $46,66 \pm 6,88$  vs  $46,53 \pm 12,21$ ,  $p=0,97$ ) ma vi era una netta prevalenza di donne (M/F:1/5 vs 32/15,  $p=0,02$ ). Inoltre nel gruppo B 2 pazienti presentavano pregresso episodio depressivo maggiore, 1 presentava pregresso disturbo di panico e agorafobia, 10 avevano pregresso abuso alcolico e 10 avevano pregresso abuso di stupefacenti. Dopo l'inizio della terapia hanno dichiarato di assumere oppioidi (cannabis) a scopo voluttuario 2 pazienti. Nessun paziente ha dovuto sospendere la terapia per effetti collaterali di tipo neuro-psichiatrico. Durante

l'osservazione 8 pazienti hanno presentato depressione clinicamente rilevabile (Ham-D>10) al primo mese e 6 di questi hanno richiesto la somministrazione di SSRI. Sei pazienti invece hanno presentato sintomi depressivi più tardivamente (Ham-D>10).

*Confronto tra pazienti che sviluppano o non sviluppano depressione interferon-indotta*

Complessivamente 14 pazienti (gruppo depressi) hanno sviluppato una depressione clinicamente rilevabile mostrando punteggi di Ham-D>10, e sono stati confrontati con gli altri 33 (gruppo non depressi) che non avevano presentato sintomi di depressione durante l'osservazione. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra i due gruppi per quanto riguarda l'età ( $p=0,72$ ), il sesso ( $p=0,31$ ), lo stato civile ( $p=0,57$ ) o il grado di istruzione ( $p=0,54$ ). Inoltre nessuna differenza è stata riscontrata per quanto riguarda lo stadio di malattia ( $p=0,23$ ), il genotipo-HCV ( $p=0,49$ ), il tipo di interferone ( $p=0,59$ ), il peso corporeo ( $p=0,35$ ), il BMI ( $p=0,87$ ), i livelli di transaminasi basali ( $p=0,67$ ). Neppure i fattori di rischio comunemente considerati: anamnesi di disturbi psichiatrici, familiarità per disturbi psichiatrici, anamnesi positiva per pregresso abuso alcolico, o per tossicodipendenza sono risultati correlare con lo sviluppo di depressione interferon-indotta. Si evidenzia che 2 dei 4 soggetti con alterazioni tiroidee durante la terapia con interferone, hanno anche manifestato depressione precoce, tuttavia data la scarsa numerosità del campione non possiamo affermare che le alterazioni tiroidee predispongano a manifestazioni depressive ( $p=0,34$ ). Nessuna differenza statisticamente significativa vi è inoltre tra i depressi e i non depressi per quanto riguarda la risposta virologica al 1MT e alla fine della terapia, anche se ciò potrebbe essere imputabile alla numerosità del campione ( $p=0,08$ ).

<b>N casi</b>	<b>Depressi 14</b>	<b>Non depressi 33</b>	<b>p</b>
Età (media anni $\pm$ DS)	47,5 $\pm$ 12,25	46,12 $\pm$ 12,35	0,72
Eta $\geq$ 60 %	14	18	0,55
Sesso M/F	9/3	21/12	0,31
Coniugato %	78	75	0,57
Grado di istruzione elementare %	35	39	0,54
Cirrosi/epatite cronica	1/13	7/26	0,23
Genotipo 1/2/3/4	7/6/0/1	16/9/5/3	0,49
Peg- $\alpha$ 2a/Peg- $\alpha$ 2b	4/10	10/33	0,59
Peso (media Kg $\pm$ DS)	80,5 $\pm$ 15,5	76,54 $\pm$ 12,4	0,35
BMI (media $\pm$ DS)	25,3 $\pm$ 2,9	25,5 $\pm$ 3,3	0,87
Emoglobina basale (media g/dL $\pm$ DS)	15,4 $\pm$ 1,3	14,9 $\pm$ 1,2	0,18
ALT basale (media U/L $\pm$ DS)	109,71 $\pm$ 55	122,15 $\pm$ 103	0,67
GGT basale (media U/L $\pm$ DS)	61,95 $\pm$ 46,7	58,67 $\pm$ 52,4	0,84
Alterazioni tiroidee %	14	6	0,34
Abuso alcolico %	7	24	0,17
Tossicodipendenza %	7	21	0,23
Anamnesi psi. personale pos %	2	1	0,20
Anamnesi familiare psi. pos %	28	9	0,09
HCV-RNA neg al 1MT %	57	30	0,08
HCV-RNA neg fine terapia %	71	66	0,51
Anemizzazione 1MT (1/2/3)* %	14/64/21/0	39/45/12/3	0,3
Astenia 1MT %	71	66	p=0,28

\*1=-2g/dL del basale >11 g/dL; 2=10,9-9,5 g/dL; 3=<9,5

Tabella 4: confronto tra pazienti depressi e non depressi

Per quanto riguarda i test somministrati al momento basale, come si può desumere dalla tabella 5, la BDI sembra differire in maniera statisticamente significativa tra chi sviluppa depressione e chi rimane asintomatico (p=0,01) e questo sembra rispecchiare soprattutto la componente somatica del test (p=0,02). Per quanto riguarda Ham-D un punteggio più alto al momento basale sembra predire lo sviluppo di depressione anche se sfiora la significatività statistica (p=0,06). Anche la presenza di punteggio di HADS basale elevato risulta correlato con lo sviluppo di depressione (p=0,017). Non sono state invece riscontrate significative differenze tra il gruppi dei depressi e il gruppo dei non depressi per quanto riguarda il test STAI (STAI-S, p=0,94; STAI-T, p=0,3 ) e Ham-A (p=0,94) .

N.CASI	Depressi (14)	Non depressi (33)	p
BDI basale (mediana)	3	1	0,02
BDI subtot somatico basale (mediana)	2	0	0,02
BDI subtot cognitivo basale(mediana)	0,5	0	0,15
BDI subtot affettivo basale (mediana)	1	0	0,16
Ham-D basale (mediana)	2	1	0,06
Ham-D subtot timico basale (mediana)	1	0	0,16
Ham-D subtot somat basale (mediana)	1	0	0,15
Ham-A basale (mediana)	2	1	0,94
HADS basale (mediana)	4	2	0,01
STAI S basale (media±DS)	36,85±8,19	35,45±10,82	0,57
STAI T basale (media±DS)	35,21±6,63	32,63±4,08	0,33

Tabella 5: confronto depressi e non depressi

Utilizzando l'analisi della varianza per misure ripetute (ANOVA) abbiamo studiato quali dei test psichiatrici presentassero variazione più significative in corso di terapia, cioè al primo e sesto mese nei rispettivi gruppi di depressi e non depressi.

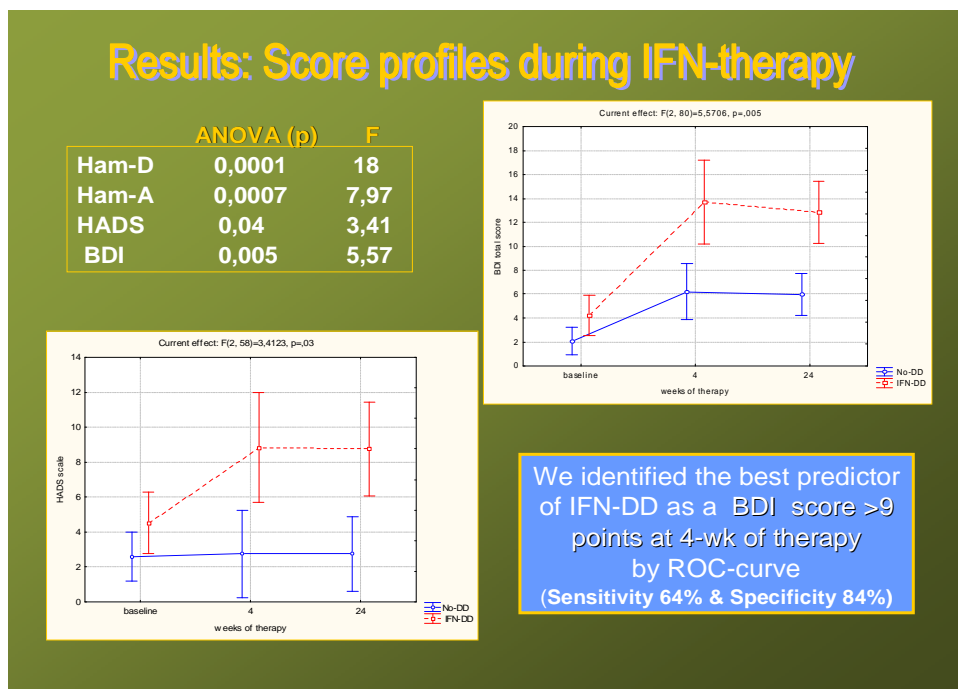


Figura 1

Come si può notare dalla figura 1, per entrambi i gruppi, il massimo dei sintomi depressivi per BDI viene avvertito al primo mese di terapia, poi la sintomatologia tende a regredire o stabilizzarsi. La BDI aumenta in maniera statisticamente significativa dal basale al primo mese e al sesto mese per i pazienti depressi rispetto ai non depressi ( $p<0,01$ ). Nella tabella vengono riportati i valori delle analisi delle varianze per misure ripetute (ANOVA) di ciascun test psichiatrico

somministrato al basale, 1MT, 6MT nei due gruppi di pazienti depressi e non depressi. In conclusione è stato definito, con l'esecuzione di una curva ROC, il valore di BDI somministrata al primo MT in grado di predire e diagnosticare lo sviluppo di depressione. Il punteggio di BDI >9 ha mostrato una sensibilità del 64% e una specificità del 84,4% di predire lo sviluppo di depressione interferon-indotta.

### Il ruolo del triptofano

Il dosaggio del triptofano sierico effettuato al tempo basale, al primo e al sesto mese dall'inizio della terapia ed analizzato con test della varianza per misure ripetute (ANOVA) (figura 2), ha mostrato un decremento statisticamente significativo complessivo in tutti i 53 pazienti reclutati nello studio. Si può osservare una diminuzione significativa dei valori di concentrazione del triptofano (media ug/mL  $\pm$  DS) già dopo un mese dal trattamento ( $13,45 \pm 2,68$  vs  $12,45 \pm 2,29$ ,  $p=0,002$ ), ma ancora più marcata dopo sei mesi di terapia ( $13,45 \pm 2,68$  vs  $12,00 \pm 2,38$ ,  $p<0,001$ ), mentre nessuna differenza significativa è stata riscontrata nei livelli di triptofano tra maschi e femmine, né tra i due tipi di Peg-IFN somministrati.

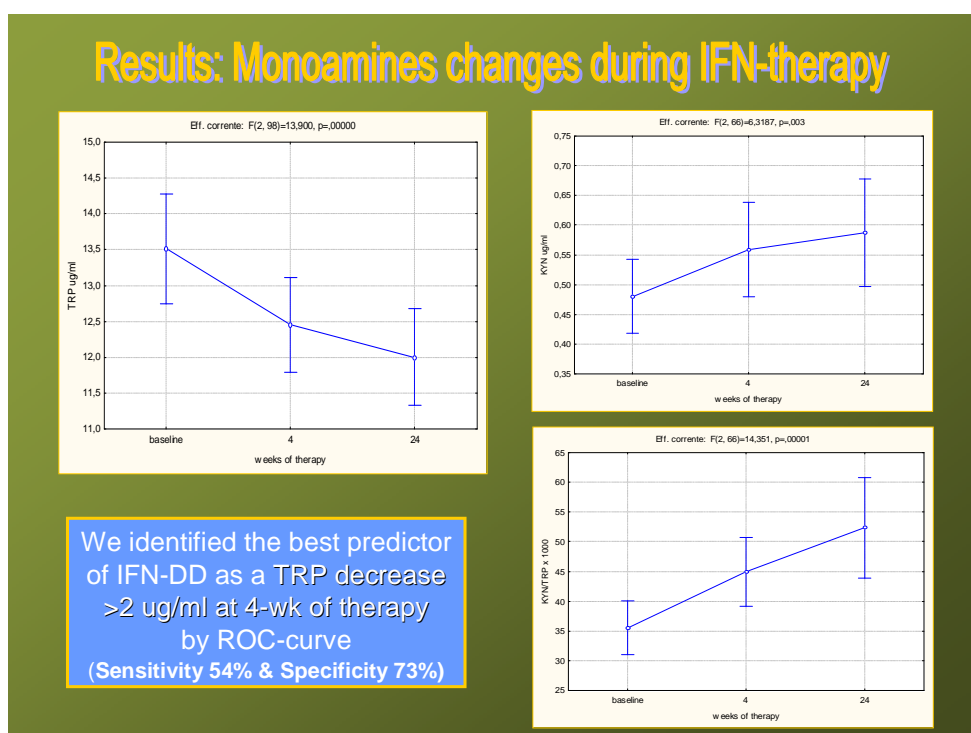


Figura 2

Non vi è significativa differenza nella concentrazione di triptofano nei tre momenti di osservazione neppure tra i pazienti depressi e quelli non depressi ma è stata definita una soglia di caduta dei livelli ematici di triptofano dal prelievo basale a

quello del primo MT ed un decremento di 2 ug/mL ha mostrato una sensibilità del 50% ed una specificità del 72,7% di correlare con lo sviluppo di depressione. Così come è risultata una significativa correlazione con l'aumento dei livelli di kinurenina dosati e del ratio KYN/TRP.

E' stato inoltre valutato se l'uso della terapia antidepressiva con SSRI avesse mostrato influenza sui test psichiatrici somministrati. Come si può notare dalla figura 3 l'uso degli SSRI migliora i sintomi depressivi al sesto mese di terapia rispetto al picco registrato nei punteggi al primo mese con BDI, ma in particolare ripristina i livelli sierici di triptofano, mentre i pazienti che non assumono farmaci, mostrano palesemente il progressivo decremento fino al sesto mese.

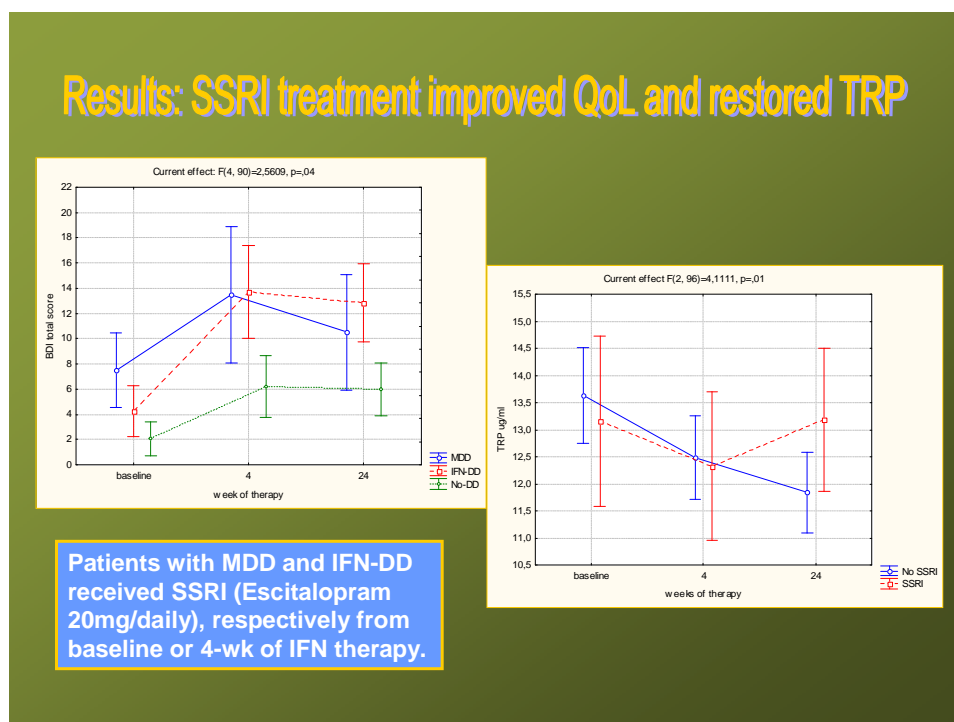


Figura 3

#### **IV STUDIO SULL'IMPIEGO DELLA TERAPIA ANTIVIRALE PER L'EPATITE C NEL VENETO: MODALITA' D'USO, EFFICACIA E COSTI.**

L'obiettivo di questo studio è stata l'analisi retrospettiva *post-hoc* dei soggetti con epatite cronica C trattati con Peg-IFN alfa e Ribavirina al fine di valutare: la modalità d'impiego di questi farmaci, l'efficacia terapeutica, in termini di soggetti eradicati dall'infezione ed i costi complessivi e per risposta virologica sostenuta (casi con eradicazione virale) ottenuti con i vari regimi posologici usati per Peg-IFN alfa-2b e con dose fissa per Peg-IFN alfa-2a. Questo studio, condotto nell'ambito di un programma regionale, ha riguardato il monitoraggio della farmacoutilizzazione dei Peg-IFN alfa in associazione a Ribavirina nei centri epatologici delle unità operative di Medicina Interna e di Malattie Infettive delle province di Padova e Venezia. I centri coinvolti hanno seguito, per un periodo medio di  $2,6 \pm 0,9$  anni, 450 soggetti (317 maschi e 133 femmine) di età media  $45,5 \pm 11$  anni, affetti da epatite cronica o cirrosi (il 52% con infezione da genotipo HCV-1) e trattati con Peg-IFN alfa-2a o Peg-IFN alfa-2b in associazione a Ribavirina. La differente numerosità tra i gruppi (166 soggetti trattati con Peg-IFN alfa-2a e 284 trattati con Peg-IFN alfa-2b) è motivata dalla diversa data di commercializzazione dei 2 tipi di Peg-IFN. Il reclutamento prospettico della casistica e la suddivisione in gruppi omogenei, ha consentito il confronto dal punto di vista statistico della popolazione studiata.

## **Materiali e Metodi**

### *Modalità di raccolta e farmacoutilizzazione*

Da gennaio 2003 a dicembre 2005 sono stati raccolti consecutivamente 450 casi con epatite cronica e cirrosi correlata ad infezione da HCV, trattati con Peg-IFN alfa-2a o Peg-IFN alfa-2b in associazione a Ribavirina. Tutti i centri partecipanti allo studio hanno adottato gli stessi criteri d'inclusione ed esclusione per il reclutamento dei pazienti ed hanno fornito dati dettagliati sulle caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei pazienti e sui regimi posologici antivirali impiegati. E' stato così possibile effettuare una analisi di farmacoutilizzazione dei diversi regimi terapeutici adottati, considerando sia il trattamento previsto dalle indicazioni in scheda tecnica, che il trattamento realmente prescritto.

Il costo della terapia con Peg-IFN e Ribavirina è stato calcolato utilizzando i prezzi ex-factory IVA esclusa (Peg-IFN riferimento al tariffario nazionale 2005, per Ribavirina 2,88€/capsula), mentre il consumo è stato stimato attraverso il conteggio delle fiale/capsule prescritte al paziente in relazione alla durata della terapia (48 settimane per i casi con genotipo HCV-1-4 e 24 settimane per HCV - 2-3) ed alla risposta, infatti nei casi non responsivi la terapia è stata interrotta come da linea guida dopo sole 12 settimane di trattamento. Il costo per risposta sostenuta è stato definito dividendo il costo complessivo della terapia in ciascun gruppo di Peg-IFN alfa per il corrispondente numero di casi con risposta sostenuta e inoltre separatamente per genotipo di HCV).

In considerazione all'impiego di dosaggi diversi dalla dose standard di 1,5 µg/kg/settimana nel gruppo trattato con Peg-IFN alfa-2b, è stata effettuata la valutazione in 2 sottogruppi, soggetti che avevano ricevuto dosi < 1 (98 casi) o > 1 µg/Kg/settimana (186 casi). Inoltre un ulteriore sottogruppo di soggetti (125 casi) trattati con la dose piena di 1,5 µg/Kg e la rispettiva percentuale di risposta sostenuta conseguita con tale dosaggio è stato utilizzato per stimare il costo-efficacia della terapia in termini di efficacia terapeutica massimale. Questo sottogruppo in quanto rappresentativo della dose consigliata in scheda tecnica è stato utilizzato anche nell'analisi che ha considerato la diversa distribuzione dei pazienti secondo 4 intervalli di peso corporeo: 40-64, 65-75, 76-85 e >85 Kg in relazione alla risposta sostenuta, visto che dati in letteratura hanno indicato il peso corporeo come fattore intrinseco di resistenza alla terapia antivirale.

### *Selezione del paziente e valutazione della risposta*

Sono stati avviati al trattamento antivirale tutti i soggetti adulti con: età compresa tra 18 e 60 anni, presenza d'infezione cronica da HCV con segni bioumorali ed istologici di epatite cronica o cirrosi, reale disponibilità a seguire scrupolosamente

la terapia ed il monitoraggio clinico e spettanza di vita superiore a 5 anni. Sono stati esclusi tutti i casi con controindicazioni assolute alla terapia o senza valida motivazione da parte del paziente a garanzia di una reale compliance ed aderenza alla terapia.

La risposta alla terapia è stata definita come:

- non risposta, se non rilevabile un calo di almeno 2 logaritmi di viremia (cioè di almeno 100 volte) alla 12ma settimana (HCV-RNA nel siero) rispetto al basale;
- risposta a fine terapia, quando non rilevabile HCV-RNA alla sospensione della terapia;
- riattivazione dopo terapia, quando risultava nuovamente rilevabile HCV-RNA nel siero entro 6 mesi dalla sospensione;
- risposta sostenuta, se HCV-RNA restava non rilevabile a 6 mesi dalla sospensione (completa eradicazione virale).

#### *Test virologici*

La determinazione del genotipo di HCV è stata ottenuta mediante metodica di ibridazione inversa su striscia (INNOLIPA, Genotype HCV-III). La determinazione dell'HCV-RNA è stata effettuata utilizzando il metodo quali-quantitativo (COBAS TaqMan HCV, Roche).

#### *Analisi statistica*

Le variabili continue, testate con distribuzione normale, sono state espresse come media + la deviazione standard (DS) e confrontate usando il test T di Student per campioni indipendenti, mentre le differenze tra variabili categoriche sono state valutate attraverso il test del Chi-quadro di Pearson. Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0,05$ . Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software di Statistica 7.1.

## Risultati

Non vi sono differenze statisticamente significative tra i parametri considerati nei 2 gruppi di trattamento con Peg-IFN alfa-2a o alfa-2b, in particolare nella distribuzione dei genotipi di HCV e nell'indice di massa corporea (IMC), fattori maggiormente determinanti l'efficacia terapeutica, come viene illustrato nella tabella

<b>CARATTERISTICHE EPIDEMIOLOGICHE DELLA POPOLAZIONE</b>				
	<b>Tutti i casi (%)</b>	<b>Peg-IFN alfa-2a + Ribavirina</b>	<b>Peg-IFN alfa-2b + Ribavirina</b>	<b>p</b>
<b>N° Casi</b>	<b>455</b>	<b>167</b>	<b>288</b>	
<b>Maschi/Femmine % maschi</b>	<b>321/134 (71%)</b>	<b>117/50 (70%)</b>	<b>204/84 (71%)</b>	<b>n.s.</b>
<b>Età media ± DS</b>	<b>46±11</b>	<b>47±10</b>	<b>45±11</b>	<b>n.s.</b>
<b>Peso medio ± DS</b>	<b>73±13</b>	<b>75±14</b>	<b>73±12</b>	<b>n.s.</b>
<b>IMC* ± DS</b>	<b>25±3,4</b>	<b>25±3,7</b>	<b>25±3,3</b>	<b>n.s.</b>
<b>Genotipo HCV-1 e 4</b>	<b>272 (60%)</b>	<b>99 (59%)</b>	<b>173 (60%)</b>	<b>n.s.</b>
<b>Genotipo HCV-2 e 3</b>	<b>183 (40%)</b>	<b>68 (41%)</b>	<b>115 (40%)</b>	<b>n.s.</b>

\*IMC, indice di massa corporea, peso (Kg) / superficie corporea (m2).

**Tabella I:** Caratteristiche epidemiologiche della popolazione in studio suddivisa in base al tipo di Peg-IFN ricevuto (alfa-2a o 2b), in associazione per entrambi a Ribavirina.

L'utilizzo dei 2 tipi di Peg-IFN, nella comune pratica clinica, è risultato più discordante dalle raccomandazioni nel gruppo di trattati con Peg-IFN alfa-2b, come si può osservare nelle colonne trattamento consigliato e trattamento prescritto in Tabella II, evidenziando l'impiego di dosi subottimali in ben il 58% dei casi rispetto a Peg-IFN alfa-2a, che essendo somministrato a dose fissa, ha risentito di questo problema solo nel 5% dei casi.

## FARMACOUTILIZZAZIONE NEL VENETO

	Dose raccomandata	Dose prescritta	Costo settimana Ex-factory
<b>PEG-IFN <math>\alpha</math>-2a</b>			
- 180 $\mu$ g/sett	167 (100)	158 (95)	186 €
- 135 $\mu$ g/sett	0	9 (5)	140 €
<b>RIBAVIRINA</b>			
- 800 mg/die	68 (41)	63 (38)	81 €
- 1000 mg/die (<75 kg)	50 (30)	59 (35)	101 €
- 1200 mg/die (>75 kg)	49 (29)	45 (27)	121 €
<b>PEG-IFN <math>\alpha</math>-2b</b>			
- 50 $\mu$ g/sett (<40 Kg)	0	79 (27)	85 €
- 80 $\mu$ g/sett (40-64 Kg)	66 (23)	100 (35)	135 €
- 100 $\mu$ g/sett (65-75 Kg)	112 (39)	60 (21)	170 €
- 120 $\mu$ g/sett (76-85 Kg)	71 (25)	39 (14)	204 €
- 150 $\mu$ g/sett (>85 Kg)	39 (13)	10 (3)	254 €
<b>RIBAVIRIN</b>			
- 600 mg/die (<40 kg)	0	24 (8)	60,5 €
- 800 mg/die (40-64 kg)	66 (23)	126 (44)	81 €
- 1000 mg/die (65-85 kg)	183 (64)	118 (41)	101 €
- 1200 mg/die (86-120 kg)	35 (12)	20 (7)	121 €
- 1400 mg/die (>120 kg)	4 (1)	0	141 €

**Tabella II.** Farmacoutilizzazione dei 2 tipi di Peg-IFN in commercio in confronto alla dose standard prevista secondo scheda tecnica\* e costo/fiala impiegata.

Questa variazione nell'impiego posologico ha significativamente condizionato la risposta alla terapia e i costi, specialmente per quanto ha riguardato Peg-IFN alfa-2b, in quanto prescritto secondo il peso corporeo del paziente e con un costo per fiala variabile in base al dosaggio usato. Non vi sono state differenze nell'utilizzo della posologia di Ribavirina nei 2 gruppi di trattamento, impiegata sempre a 15mg/Kg/die e circa il 10% dei casi ha avuto la necessità di scalare il dosaggio di 200 mg/die per il riscontro di valori di emoglobina inferiori a 10 mg/dl. In Tabella III, sono indicati i tipi di risposta ottenuti in tutti i casi e, per confronto, con l'uso dei 2 Peg-IFN alfa; si può vedere che complessivamente è stata raggiunta una risposta sostenuta pari al 61%, mentre solo il 15% ha mostrato riattivazione virale dopo la terapia, senza differenze statistiche tra i gruppi.

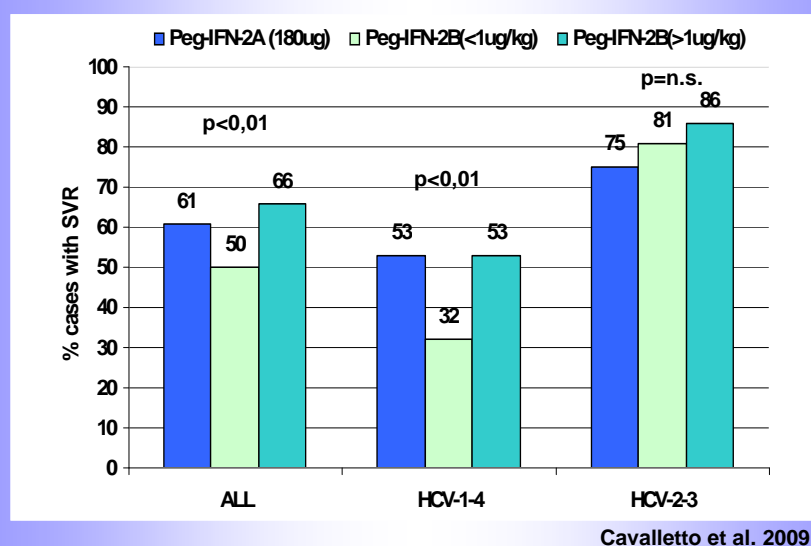
### RISPOSTA ALLA TERAPIA CON PEG-IFN E RIBAVIRINA

Tipo di risposta	Tutti i casi (%)	Peg-IFN alfa-2a + Ribavirina	Peg-IFN alfa-2b + Ribavirina	p
Non risposta	111 (24%)	39 (23%)	72 (25%)	n.s.
Risposta a fine terapia	344 (76%)	128 (77%)	216 (75%)	n.s.
Riattivazione dopo terapia	68 (15%)	27 (16%)	41 (14%)	n.s.
Risposta sostenuta	276 (61%)	101 (61%)	175 (61%)	n.s.

**Tabella III:** Tipi di risposta alla terapia conseguiti con i 2 tipi di Peg-IFN e Ribavirina.

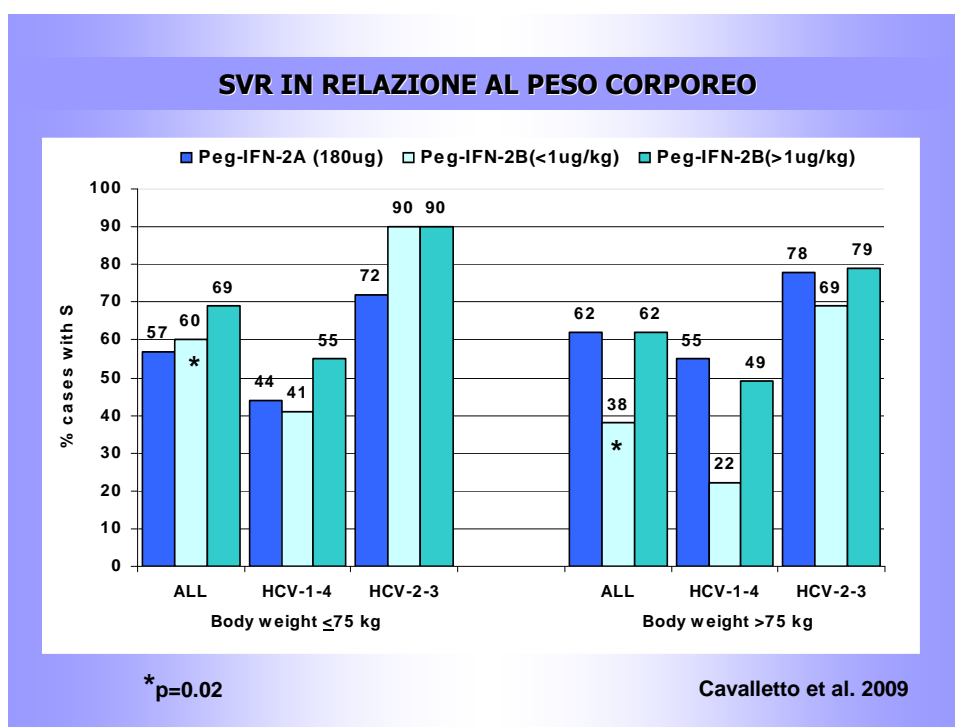
In considerazione dell'ampia discrepanza osservata tra la dose consigliata o standard (1,5 µg/kg/settimana) rispetto alla dose realmente prescritta (dose media ricevuta 1,16±0,35 µg/Kg), nel gruppo trattato con Peg-IFN alfa-2b, è stata effettuata un'analisi più dettagliata in 2 sottogruppi che avevano ricevuto dosi < 1 (100 casi) o ≥ 1 µg/Kg/settimana (188 casi), in relazione al genotipo come descritto nella Figura 1.

### SVR IN RELAZIONE AL GENOTIPO



**Figura 1:** Valutazione della risposta sostenuta nei trattati con Peg-IFN alfa-2a (167 casi) e con Peg-IFN alfa-2b < 1 (100 casi) o ≥ 1 (188 casi) in relazione al genotipo.

Si noti il significativo incremento di efficacia terapeutica in associazione all'uso della dose maggiore, in particolare nella valutazione della risposta sostenuta in tutti i casi (50% vs. 66%;  $p < 0,01$ ), nei casi con genotipo HCV-1-4 (32% vs. 53%;  $p < 0,01$ ), ma non nei soggetti con HCV-2-3 (81% vs. 86%;  $p = n.s.$ ) più sensibili alla terapia antivirale e che possono verosimilmente beneficiare anche di dosi subottimali.

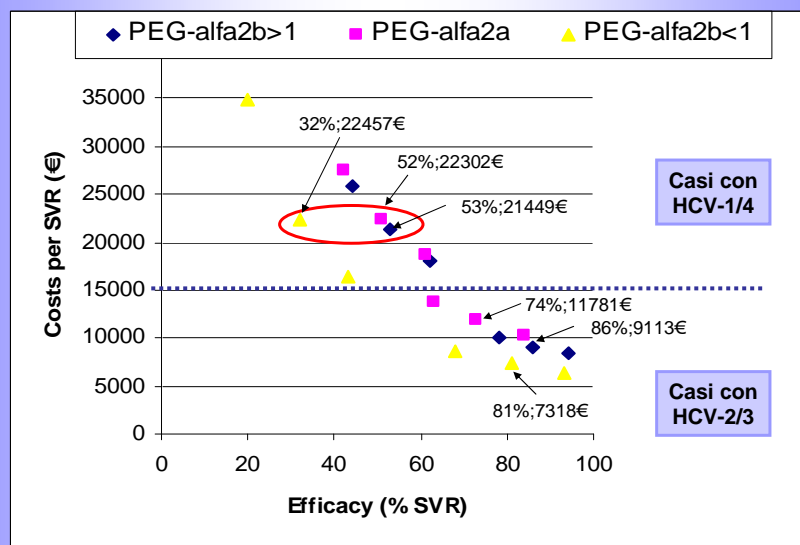


**Figura 2:** Valutazione della risposta sostenuta nei trattati con Peg-IFN alfa-2a (167 casi) e con Peg-IFN alfa-2b < 1 (100 casi) o  $\geq 1$  (188 casi) in relazione al peso corporeo.

In Figura 2 è stata analizzata la risposta sostenuta stratificando la casistica secondo il peso corporeo <75 o >75 kg, illustrando come il peso corporeo maggiore possa influenzare negativamente l'efficacia terapeutica se non viene utilizzata la dose piena di 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in tutti i trattati ( $p = 0.02$ ) e specialmente nel genotipo HCV-1-4.

Infine, il costo complessivo del trattamento antivirale impiegando i 2 tipi di Peg-IFN in associazione alla Ribavirina di questa casistica, sono stati calcolati considerando la dose prescritta al paziente per una durata di terapia di 12 settimane nei casi non responsivi, di 24 settimane per i genotipi HCV1-4 e di 48 settimane per i genotipi HCV-2-3. Nella Figura 3 è stato calcolato un base-case (costo/SVR) per ciascuna schedala di terapia facendolo variare all'interno degli intervalli di confidenza (Minimo-Massimo) del tasso di risposta sostenuta ottenuti nel peggiore o migliore scenario.

### ANALISI DI COSTO-EFFICACIA DELLA TERAPIA ANTIVIRALE PER L'EPATITE C: ONE-WAY SENSITIVITY ANALYSIS

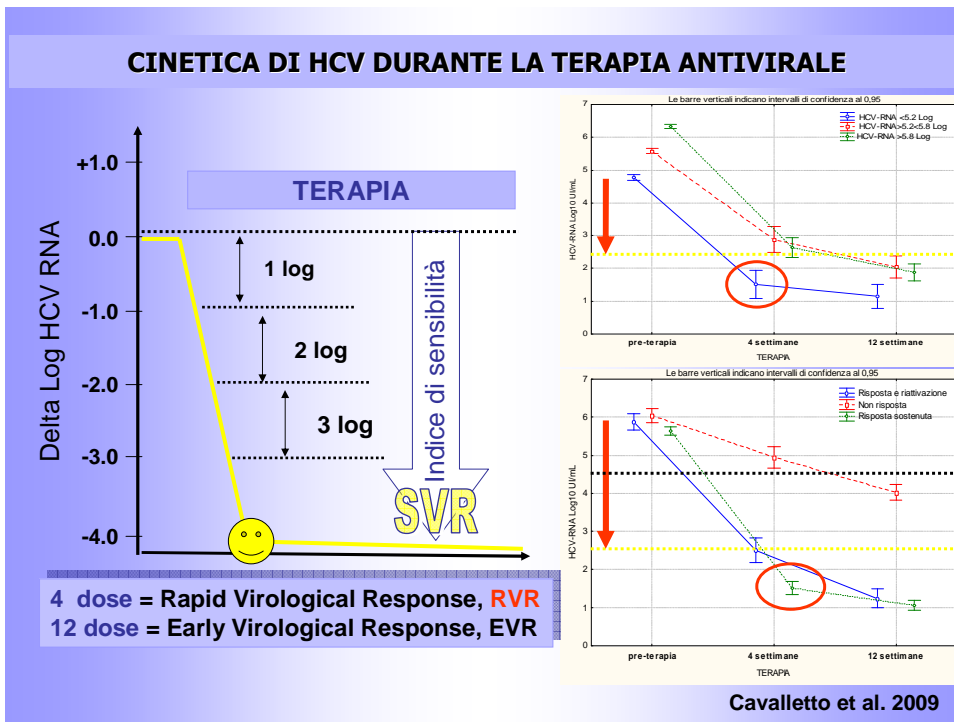


Cavalletto et al. 2009

**Figura 3:** analisi farmaco-economica di sensibilità ad una via

Si noti nel caso di genotipo HCV-1-4 una pari efficacia e quindi un costo efficacia simile per peg-alfa 2b>1 e peg-alfa 2a, mentre peg-alfa 2b<1 è risultato meno efficace e non confrontabile. Per quanto riguarda invece il genotipo HCV-2-3 sono stati riscontrati tassi di SVR molto simili tra peg-alfa 2b>1 e <1 ottenendo un risparmio del 20% utilizzando la dose bassa invece della standard e del 38% in confronto all'uso di peg-alfa 2°, che tra l'altro ha presentato in questo studio tassi di risposta inferiori alle altre schedale utilizzate.

Infine molto interessante la possibilità di abbattere i costi della terapia antivirale di un ulteriore 10%, valutando la caduta della viremia dai valori pre-terapia fino alla negativizzazione precoce che può garantire la completa eradicazione del virus.



**Figura 4:** lo studio della cinetica virale.

Il primo concetto consiste nel rilievo che più bassa è la carica virale pre-terapia, più facilmente si consegue una negativizzazione precoce a 4 settimane di terapia e quindi una maggiore probabilità di eradicazione persistente come illustrato nella Figura 4.

Il secondo passaggio oggi potrebbe consistere in una ancora più precoce sospensione della terapia, qualora HCV-RNA abbia ancora livelli pari a 4Log dopo 4 settimane di terapia.

## DISCUSSIONE

L'epatite C è una malattia lentamente ma inesorabilmente progressiva, causata dal virus epatotropo HCV (Hepatitis C Virus) che determina una cronicizzazione in circa l'80% dei casi. In Italia, questo tipo di epatopatia provoca la morte di migliaia d'individui ogni anno ed è la principale causa di tumore primitivo del fegato e di trapianto epatico. Esiste oggi una terapia "curativa", cioè in grado di eradicare l'infezione virale ed è ormai comprovata la regressione della epatopatia nella maggioranza dei casi guariti, perciò la terapia antivirale può garantire un reale vantaggio clinico ed economico nei soggetti con epatite cronica C. Nel **primo studio** presentato in questa tesi viene posto in evidenza come l'applicazione dei metodi di ultima generazione in biologia molecolare per la diagnosi e nel monitoraggio, rappresenta oggi un importante strumento per migliorare in termini di rapporto costo-efficacia la terapia dell'epatite cronica C che, nonostante abbia realmente modificato la storia naturale di questa patologia, è sempre gravata da molteplici effetti collaterali talora severi per il paziente, da responsabilità professionali impegnative per l'epatologo e da elevati costi farmaceutici e sanitari per la regione.

Oggi la necessità della determinazione del genotipo virale nella caratterizzazione/selezione del paziente candidato alla terapia antivirale ci ha consentito di condurre un'analisi epidemiologica che ha confrontato la distribuzione del genotipo virale in *1949 casi* con verosimile contagio in epoca antecedente il 1995 (data d'inizio dell'applicazione routinaria dello screening per HCV con tecniche di biologia molecolare), rispetto a *978 casi* infettati probabilmente nel periodo successivo, e che ha dimostrato differenze statisticamente significative nella prevalenza dei genotipi infettanti prima e dopo il 1995. In particolare le infezioni con genotipi HCV-1B e HCV-2 passavano da una prevalenza globale di 72,8% a 62,8% (-10%), mentre HCV-1A, HCV-3 ed HCV-4 cumulativamente presentavano un aumento del 10% da 27,2% a 37,2%, ( $p < 0.01$ ). Questo rilievo ha confermato la presenza nel tempo di almeno 2 epidemie caratterizzate: *la prima*, più numerosa, da una popolazione con pregresso rischio trasfusionale, età media più avanzata, infezione da genotipi virali HCV-1B e HCV-2 e presenza di cirrosi nel 24% dei casi e *la seconda*, rappresentata prevalentemente da soggetti maschi, più giovani, con storia di tossicodipendenza, genotipo HCV-1A, HCV-3 e HCV-4 e presenza di cirrosi nel 10%. I pazienti con infezione da HCV-2 hanno presentato una minor prevalenza di sesso maschile (47,4%) rispetto al tasso superiore al 70% degli altri genotipi e

livelli di HCV-RNA  $<5.2$  Log IU/mL nel 35% dei casi in confronto ad un tasso variabile tra il 10 e il 18% degli altri. Infine il genotipo infettante HCV-2 si è associato alle percentuali di guarigione più elevate ottenendo un tasso di SVR pari a 86%, rispetto a quelle più basse ottenute in caso di infezione da HCV-1a (36%). I livelli viremici più bassi individuati mediante ROC curve come predittori di SVR indipendentemente dal genotipo, si sono collocati sotto il cut-off di 5,2 Log, mostrando una maggiore probabilità di eradicazione virale con un Odds ratio di almeno 6 volte.

La storia naturale dell'epatite cronica C rimane, ancora oggi, oggetto di incertezze sia per quanto riguarda il tasso di progressione della malattia, sia per quanto riguarda l'identificazione dei fattori che la determinano. Dall'analisi dei lavori della Letteratura pubblicati su questo argomento si evince che l'evoluzione della malattia epatica è variabile da soggetto a soggetto e che si ricercano marcatori sierologici di danno epatico non invasivi dotati di sufficiente accuratezza ed in grado di sostituire la biopsia epatica. Tale metodica è cruenta, le complicanze si possono verificare nello 0,6-5% dei pazienti, ed è un esame costoso che richiede l'ospedalizzazione per almeno 6-18 ore. Infine, confrontando la biopsia epatica effettuata per via percutanea e per via laparoscopica si è visto che la cirrosi non viene correttamente diagnosticata nel 10-30% dei casi ed altri studi hanno evidenziato l'importanza delle dimensioni del campione epatico per una corretta stadiazione della fibrosi. Per tutti questi motivi, negli ultimi anni, particolare attenzione è stata rivolta allo studio di marcatori non invasivi di fibrosi che possano rappresentare una valida alternativa alla biopsia epatica nella stadiazione della fibrosi. Attualmente la classificazione dei pazienti si avvale di alcuni sistemi validati su casistiche limitate ed i più noti sono rappresentati dall'APRI, dall'indice di fibrosi di Forns, dal Fibrotest e dal FIB-4 . Tuttavia questi sistemi di valutazione non sono universalmente accettati a causa di una non adeguata accuratezza diagnostica; in particolare, il test APRI e l'indice di fibrosi di Forns non sono in grado di classificare correttamente molti pazienti e presentano una accuratezza diagnostica che non supera l'80-85%. Inoltre, il test APRI non è ancora completamente standardizzato a causa della variabilità del range di normalità delle AST nei differenti laboratori di analisi, mentre l'attendibilità dell'indice di Forns potrebbe risultare modificata nei pazienti con alterati livelli di colesterolo. Il Fibrotest utilizza parametri, come l'alfa-2-macroglobulina, l'aptoglobina o l'apolipoproteina A1, che non vengono dosati comunemente nella pratica clinica rimane un test costoso in quanto coperto da

brevetto. Uno studio recentemente condotto, ha suggerito che sia possibile utilizzare più indici non invasivi di fibrosi epatica per aumentare l'accuratezza diagnostica rispetto all'uso di un singolo test e la necessità di eseguire la biopsia epatica verrebbe così ridotta del 50-70%.

**Nel secondo studio** presentato in questa tesi, è stata analizzata una casistica di 63 soggetti con epatite cronica C a diverso stadio evolutivo, afferita alla Clinica Medica 5<sup>a</sup> nel periodo compreso tra Gennaio e Giugno 2006. Oltre a definire le caratteristiche cliniche, virologiche ed istologiche della popolazione in studio, l'obiettivo è stato quello di valutare il possibile ruolo diagnostico di un nuovo marcatore sierologico, quale l'immunocomplesso SCCA-IgM. SCCA è una proteina avente un peso molecolare di circa 45kDa, che appartiene alla superfamiglia delle serpine (inibitori delle proteasi seriniche), in particolare presenta omologia di sequenza con le ov-serpine, così chiamate per la loro omologia con l'ovoalbumina. Studi effettuati recentemente hanno evidenziato la presenza dell'antigene SCC anche nel siero, prevalentemente associato ad immunoglobuline di tipo IgM, nel 70% (35/50) dei casi di epatocarcinoma, nel 26% (13/50) dei casi di cirrosi epatica e nel 18% (9/50) dei casi di epatite cronica. Confrontando questi dati con quelli ottenuti, mediante tecnica immunoistochimica, dall'analisi dei corrispondenti campioni di tessuto epatico, si è visto che la concentrazione dell'immunocomplesso SCCA-IgM riflette l'espressione dell'antigene nel fegato. Infatti, l'antigene l'SCC è presente nel 93% dei casi di epatocarcinoma, nel 75% di quelli di cirrosi epatica e nel 50% dei casi di epatite cronica.

L'analisi del comportamento nel tempo dell'immunocomplesso SCCA-IgM ha evidenziato livelli stabili nelle forme di epatopatia cronica non evolutive, ma un significativo aumento nelle forme evolutive, in particolare in quelle che hanno presentato evoluzione in epatocarcinoma. Il monitoraggio dell'immunocomplesso SCCA-IgM e la sua espressione in termini di variazione nel tempo, potrebbero essere utile, quindi, ai fini prognostici per la valutazione non solo dell'epatopatia cronica ma anche per identificare la sottopopolazione con malattia già evoluta a rischio di epatocarcinoma.

La popolazione in studio suddivisa in pazienti con malattia non evolutiva (32 casi, staging <3) e con malattia evolutiva (31 casi, staging ≥3), è stata valutata sia per la presenza dell'antigene SCC nel campione di tessuto epatico sia per la presenza dell'immunocomplesso SCCA-IgM nel siero. Per quanto riguarda la distribuzione tissutale: l'antigene SCC nel primo gruppo è stato rilevato solo nel 40,6% dei pazienti (13 casi su 32), mentre nel secondo nel 77,4% (24 casi su 31)

( $p=0,003$ ), confermando l'esistenza di una correlazione tra epatopatia avanzata ed espressione di SCCA nel tessuto epatico. Nel siero, invece, nel primo gruppo il valore medio di SCCA-IgM è risultato di  $181,9 \pm 163,3$  AU/mL mentre nel secondo è risultato maggiore in modo statisticamente significativo di  $697,9 \pm 976,1$  AU/mL ( $p=0,005$ ). In base ai valori di SCCA-IgM espressi da ciascun paziente per valutare l'accuratezza diagnostica del parametro in studio e stabilire un valore limite (definito valore criterio) che permettesse di monitorare l'evolutiveità dell'epatopatia, è stata creata una curva ROC (receiver operating characteristic). Il valore criterio nella popolazione in studio è risultato essere di 190 AU/mL, con una sensibilità del 48,4%, e una specificità dell'84,4% mentre l'area sotto la curva ROC è risultata di  $0,668 \pm 0,068$ . Nel primo gruppo l'84,4% dei pazienti (27 casi su 32) ha presentato un valore di SCCA-IgM inferiore a 190 AU/mL e solo il 15,6% (5 casi su 32) un valore superiore. Nel secondo gruppo, invece, la distribuzione è risultata più omogenea: il 51,6% dei pazienti (16 casi su 31) ha presentato un valore inferiore a 190 AU/mL e il 48,4% (15 casi su 31) un valore superiore ( $p=0,005$ ).

Infine, si è cercato di valutare la correlazione esistente tra l'espressione dell'immunocomplesso SCCA-IgM nel siero e quella del corrispondente antigene nel tessuto: pazienti che non esprimono l'antigene SCC nel tessuto sono complessivamente 26 (41,3%); in particolare, nel primo gruppo su 19 pazienti che non esprimono l'antigene SCC nel tessuto, 17 non lo esprimono nemmeno nel siero, mentre nel secondo gruppo questo si verifica in 4 casi su 7 ( $p=0,003$ ). Nell'ambito dei pazienti che esprimono l'antigene SCC nel tessuto (37 casi su 63; 58,7%) nel primo gruppo: solo 3 dei 13 pazienti che esprimono l'antigene nel tessuto, lo esprimono anche nel siero, mentre nel secondo gruppo questo si verifica in 12 casi su 24.

L'analisi univariata (regressione logistica Logit) eseguita per valutare ogni parametro potenzialmente legato all'evolutiveità dell'epatopatia, oltre ad SCCA, ha evidenziato che l'età si associa con una sensibilità del 71% e una specificità del 68,8% all'evoluzione di malattia; combinando insieme i due parametri, si ottiene un incremento della sensibilità che risulta pari al 74,2% con identica specificità.

Sono stati, quindi, presi in considerazione altri due parametri, l'indice di fibrosi di Forns e FIB-4, per ciascuno dei quali è stata calcolata la curva ROC. L'area sotto la curva ROC è risultata, rispettivamente, pari a  $0,857 \pm 0,048$  (sensibilità dell'87,1% e specificità del 75%), e a  $0,802 \pm 0,056$  (sensibilità dell'87,1% e specificità del 68,7%). Sono stati, quindi prodotti due modelli: il primo, dato dall'associazione di SCCA e dell'indice di Forns, presenta una sensibilità

dell'87,1% e una specificità dell'84,4% mentre il secondo, prodotto dall'associazione di SCCA con FIB-4, presenta una sensibilità del 90,3% e una specificità del 71,9%.

I limiti di questo studio sono rappresentati dal numero limitato di pazienti che sono stati sottoposti a screening ed il modello prodotto dovrebbe essere validato su un gruppo avente caratteristiche simili alla popolazione in studio (gruppo di validazione).

Prima dell'inizio della terapia antivirale, un'accurata anamnesi personale, per diagnosticare eventuali alterazioni di tipo psichiatrico in fase clinica o latente, molto spesso dovute ad un pregresso episodio di depressione maggiore, ad un episodio di depressione post-traumatica oppure alla presenza di altra tipologia di disturbo della personalità, può consentire, se i pazienti mostrano un buon controllo farmacologico (SSRI o altri farmaci psicoattivi) di effettuare un trattamento con IFN in ambito di sicurezza, di aderenza e quindi di efficacia terapeutica. **Nel terzo studio** presentato in questa tesi, 6 dei 53 pazienti reclutati infatti, hanno iniziato la terapia antivirale essendo già in trattamento antidepressivo e nessuno di questi ha dovuto sospendere per effetti collaterali di tipo neuro-psichiatrico. Nessuno dei fattori (anamnesi personale o familiare di disturbo psichiatrico, pregresso abuso alcolico, pregressa tossicodipendenza, l'età più anziana, lo status socio-culturale) comunemente considerati a rischio di sviluppo di depressione durante la terapia per epatite cronica da HCV, ha mostrato in questa casistica una rilevanza statistica verosimilmente per una relativa scarsa numerosità del campione analizzato.

Lo studio ha comunque messo in evidenza un importante ruolo dei test auto-somministrati quali BDI e HADS nel diagnosticare i sintomi depressivi indotti dall'interferone e per la loro rapidità di auto-somministrazione sono gli strumenti di maggiore utilità nella diagnosi anche subclinica, di ansia o depressione, nel periodo immediatamente precedente e nel monitoraggio durante la terapia. Anche Hauser et al. (2002) hanno rilevato lo sviluppo di depressione in 13 su 39 pazienti trattati, rilevando un punteggio basale medio di BDI significativamente più alto nei soggetti che hanno poi sviluppato depressione e Capuron et al (1999) dimostrarono una significativa correlazione della scala Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS) tra lo stato depressivo dei pazienti pre-trattamento e al primo mese.

Infatti questi test auto-somministrati ripetuti al primo mese, sono risultati particolarmente sensibili, per poter discriminare i soggetti a rischio ed iniziare

quindi precocemente una terapia antidepressiva di supporto (6 pazienti della nostra casistica iniziano l'assunzione di SSRI dopo il primo mese di IFN e rimangono aderenti alla terapia antivirale). In particolare la BDI somministrata al primo MT con punteggio >9 ha mostrato una sensibilità del 64% e una specificità del 84,4% nella correlazione con lo sviluppo di depressione interferon-indotta, mentre l'HADS che non comprende gli item sugli effetti collaterali somatici, molto frequenti nei primi tre mesi di terapia, sembra cogliere ancor meglio la comparsa di sintomi depressivi o ansiosi.

Per quanto riguarda il dosaggio di triptofano: è stato riscontrato un significativo decremento dei suoi livelli sierici durante la terapia in tutti i pazienti trattati con IFN. Tenendo presente che il dosaggio di triptofano è influenzato dal tipo di dieta, dallo stato ormonale e dal ciclo mestruale ed è quindi molto difficile poter stabilire delle condizioni comparabili per tutti i pazienti, è stato verificato mediante una roc-curve che un decremento >2 ug/mL al 1 MT è predittivo con sensibilità 50% e specificità 73% di sviluppo di depressione interferon-indotta. Molto interessante inoltre il riscontro di una significativa correlazione della diminuzione dei livelli sierici di triptofano, con l'aumento di quelli di kinurenina e del ratio KYN/TRP, quali indicatori dell'attività di IDO e dell'interferone.

Questo studio è risultato molto importante anche nella conferma dell'uso della terapia antidepressiva con SSRI che ha migliorato i sintomi depressivi al sesto mese di terapia rispetto al picco registrato nei punteggi di BDI al primo mese ed in particolare ha ripristinato i livelli sierici di triptofano.

L'epatite C rappresenta un serio problema di salute pubblica infatti è gravata da elevati costi sanitari sia diretti, quali la diagnosi, l'ospedalizzazione, le terapie e/o interventi specifici (spesa farmaceutica degli antivirali, trapianto epatico, ecc), sia costi indiretti di maggior impatto sociale, come l'aumento fino a 3 volte della mortalità correlata alla patologia, tanto che la cirrosi epatica risulta la prima causa di morte nella fascia d'età 35-45 anni. In Italia, il costo della terapia per l'epatite C si aggira intorno ai 150 milioni di € ma questa spesa può risultare come un guadagno se si considera la netta riduzione di morbilità e mortalità associate all'infezione da HCV nei casi trattati. Infatti la terapia antivirale ha completamente modificato la storia naturale dell'epatite cronica e cirrosi da HCV ed è quindi atteso in futuro un significativo decremento dei casi con complicanze tipiche della fase evolutiva della cirrosi (ascite, encefalopatia, insufficienza epatica, emorragie digestive ed epatocarcinoma), che oggi determinano i costi sanitari e sociali più rilevanti di questa patologia identificata eziologicamente solo

20 anni fa. Il beneficio e la completa restituzione della speranza di vita si ottiene soprattutto nei soggetti che attraverso il trattamento antivirale eradicano l'infezione e quindi interrompono definitivamente la progressione della epatopatia, eliminando la flogosi ed il danno epatico causato da HCV.

La disponibilità del trattamento con Peg-IFN alfa-2a e alfa-2b in associazione a Ribavirina dal 2002 ha offerto risultati molto promettenti in termini d'efficacia, incrementando la risposta virologica sostenuta di circa un 20% in confronto all'uso degli IFN ricombinanti e presentando un ottimo rapporto costo-efficacia, come valutato in numerosi studi condotti in varie nazioni Europee, ma anche negli Stati Uniti ed in Cina. La terapia antivirale è oggi tuttavia gravata in circa 20-30% dei casi da una minor tollerabilità con più frequente insorgenza di effetti collaterali (neutropenia ed anemia), rispetto alla terapia con IFN ricombinanti o naturali, in passato utilizzati anche a basse dosi per migliorare l'aderenza alla terapia. Probabilmente per questi motivi, almeno nel primo periodo della introduzione dei Peg-IFN alfa nella pratica clinica epatologica, abbiamo assistito a un uso "prudente" con la prescrizione di dosaggi inferiori a quelli previsti in scheda tecnica, fatto che potrebbe, specialmente nel genotipo HCV-1, aver in parte compromesso l'obiettivo terapeutico principale cioè la completa eradicazione di HCV.

La farmacoutilizzazione dei Peg-IFN nel Veneto valutata nel **quarto studio** ha evidenziato che le nuove strategie terapeutiche con Peg-IFN alfa-2a e alfa-2b e Ribavirina possono realmente essere efficaci con tassi di eradicazione intorno al 60% dei soggetti trattati, con una variabilità dal 32-53% nell'infezione da genotipo HCV-1-4, più resistente, al 72-86% nei genotipi HCV-2-3, più sensibili al trattamento. Questi dati, sorprendentemente, hanno confermato anche nella popolazione generale dei trattati tassi di risposta sostenuta simili a quelli descritti nei megastudi condotti per ottenere l'autorizzazione in commercio del farmaco. Tale "successo" può derivare dalla presenza nel nostro territorio di alcune condizioni favorevoli al conseguimento della risposta virologica sostenuta (razza caucasica, peso corporeo medio < 75 kg e maggiore distribuzione di genotipi sensibili, in particolare HCV 2). Ovviamente queste alte percentuali di risposta sostenuta conseguite nella nostra comune pratica clinica hanno determinato costi di terapia estremamente vantaggiosi per entrambi i tipi di Peg-IFN alfa-2a e alfa-2b. L'uso di Peg-IFN alfa-2a alla dose fissa di 180 µg/settimana si è dimostrato dal lato pratico di più facile somministrazione, al punto che solo nel 5% dei casi la terapia è stata sotto-dosata ed è stata correlata con una perdita di risposta sostenuta. Al contrario, pur essendo ampia la variazione tra dose consigliata e

dose prescritta (58%), l'uso subottimale di Peg-IFN alfa-2b non ha mostrato un peggior rapporto costo/beneficio rispetto a Peg-IFN alfa-2a, in quanto la risposta virologica sostenuta è stata comunque del 61%. Inoltre, l'analisi specifica condotta dopo aver suddiviso i trattamenti effettuati con dosi  $< 1 \mu\text{g/kg}$  o  $\geq 1 \mu\text{g/kg}$  di Peg-IFN alfa-2b, ha mostrato la migliore efficacia della dose maggiore come risposta sostenuta (66% vs. 50%;  $p < 0,01$ ) e questo vantaggio si è significativamente correlato ai casi con i genotipi più resistente HCV-1-4 (risposta sostenuta 53% vs. 32%;  $p = 0,01$ ).

Anche la valutazione di altri aspetti, come il peso corporeo o l'indice di massa corporea, notoriamente correlati alla risposta alla terapia, ha confermato nella nostra casistica che l'impiego di dosi subottimali di Peg-IFN alfa-2b ha determinato un netto decremento di risposta sostenuta particolarmente nei soggetti con peso  $> 75 \text{ Kg}$  e maggiori probabilità di risposta possono essere raggiunte solo con l'uso della dose  $> 1 \text{ ug/Kg}$ . Queste ultime evidenze ci fanno pensare che in particolare l'ottimizzazione della terapia con Peg-IFN alfa-2b, permetta oggi una maggiore potenzialità per ottenere una maggiore aderenza da parte dei pazienti e, non ultimo, per contenere la spesa farmaceutica, in considerazione dell'impiego di un dosaggio razionalizzato pro/kg, che si diversifica nel costo rispetto alla dose fissa.

Attualmente, inoltre l'uso ottimale della terapia antivirale si può avvalere del monitoraggio della viremia con l'adozione dell'algoritmo di negativizzazione di HCV-RNA a 12 settimane piuttosto che a 24 settimane, ma anche della determinazione di HCV-RNA dopo solo 4 settimane di terapia (risposta virologica rapida), che risulta il migliore predittore di risposta sostenuta. Questo tipo di gestione clinica conduce all'esigenza di un uso più sistematico delle dosi standard di Peg-IFN (alfa-2a,  $180 \mu\text{g/settimana}$  e alfa-2b,  $1,5 \mu\text{g/Kg/settimana}$ ) e Ribavirina ( $15 \text{ mg/Kg/die}$ ) per ottenere:

- una più rapida soppressione della replicazione virale nel soggetto responsivo che consente la riduzione della durata del trattamento;
- una corretta definizione dei soggetti non responsivi e quindi la sospensione precoce della terapia;
- una riduzione massima dei casi con riattivazione dopo la terapia che comporta meno cicli di ritrattamento.

Analizzando la cinetica della viremia, come proposta in questo studio e determinata dopo la 4 e 12 settimana rispetto ai valori basali, abbiamo notato 2 differenti profili: uno, noto ed associato al genotipo ed uno relativo alla rapidità della discesa viremica. Infatti è stato osservato un diverso e significativo

decremento dei valori di viremia già dopo 4 settimane, con un decremento max di 3,81 Log nel gruppo dei soggetti responsivi alla terapia, rispetto ai resistenti. E' quindi ragionevole sulla base di questi dati ipotizzare la possibilità di continuare o interrompere la terapia basandosi sui valori delle viremie conseguite alla quarta settimana; in particolare: sospendere ancor più precocemente la terapia nei pazienti non responsivi e poter più adeguatamente modulare la durata della terapia nei pazienti che negativizzano HCV-RNA (risposta virologica rapida) manifestando il migliore predittore di risposta sostenuta ed eradicazione virale e consentendo un abbattimento della spesa farmaceutica di un ulteriore 10%, senza contare il vantaggio di evitare pesanti effetti collaterali ai pazienti che comunque non potrebbero beneficiare del successo terapeutico.

## **CONCLUSIONI**

### **I Studio**

1. La determinazione del genotipo virale nella caratterizzazione della nostra coorte, ha mostrato un significativo aumento nel tempo dei genotipi virali trasmessi con la tossicodipendenza (HCV 1A, HCV 3 e HCV 4) e una progressiva riduzione dei ceppi ancestrali a trasmissione post-trasfusionale (HCV 1B e HCV 2).
2. L'applicazione di metodiche più sensibili per il monitoraggio della viremia (RT-PCR COBAS TaqMan) nei pazienti sottoposti a terapia antivirale per l'epatite C, può notevolmente migliorare il rapporto costo-efficacia del trattamento, identificando nei soggetti con HCV-RNA < 5,2 Log IU/mL una maggiore probabilità di successo terapeutico (OR SVR = 6,4).
3. Nella nostra pratica clinica, il riscontro di bassi livelli di replicazione virale, potrebbe nei genotipi "difficili" HCV 1 e 4, migliorare l'identificazione e la compliance dei soggetti destinati al trattamento, mentre, nei genotipi più sensibili quali HCV 2 e 3, potrebbe consentire la modulazione della durata della terapia (4 o 6 mesi) sulla quale, ad oggi, non vi è un consenso basato su linee guida internazionali.

### **II Studio**

1. L'espressione tessutale di SCCA è risultata statisticamente correlata allo stadio della fibrosi e al dosaggio sierico dell'immunocomplesso SCCA-IgM.
2. Il livelli sierici di SCCA-IgM >190AU/mL (cut-off) correlano con l'evoluitività dell'epatopatia cronica ed il test può pertanto costituire un indicatore non-invasivo di fibrosi più avanzata.
3. La ricerca di SCCA IC sul siero, associata al rilievo di semplici parametri clinico-biumorali, potrebbe costituire una metodica non invasiva per monitorare l'evoluitività delle forme di epatopatia cronica HCV correlata, migliorando sensibilità e specificità degli indicatori di fibrosi già in uso (es. indici di Forns e Fib-4).

### **III Studio**

I pazienti con depressione maggiore o altri disturbi psichiatrici secondo il DSM-IV, non vanno esclusi a priori dal trattamento con IFN ma necessitano di supporto farmacologico e di un attento monitoraggio clinico e psichiatrico perchè possano

risultare aderenti alla terapia. Provvedimenti utili a mantenere l'aderenza alla terapia antivirale per l'epatite C si sono dimostrati:

1. utilizzare i test auto-somministrati BDI e HADS; pazienti con elevati punteggi di BDI e di HADS prima della terapia vanno ritenuti a rischio di sviluppo di depressione durante la terapia e quindi attentamente monitorati già nelle prime settimane e/ o sottoposti anche a profilassi con antidepressivi (SSRI);
2. somministrare BDI e HADS nuovamente al primo mese ed ai successivi controlli e l'eventuale comparsa di un punteggio di BDI>9 potrebbe richiedere terapia con SSRI;
3. i dosaggi nel sangue delle monoamine quali il triptofano e i suoi prodotti di degradazione potrebbero essere meglio caratterizzati nella depressione IFN indotta, ma già questi dati confermano che un calo della concentrazione sierica del triptofano > 2 ug/mL mostra una significativa correlazione con lo sviluppo di depressione e con l'aumento dei livelli dosati di kinurenina e del ratio KYN/TRP, quale indicatori dell'attività dell'IDO e quindi dell'IFN.

#### **IV Studio**

1. La razionalizzazione della terapia con Peg-IFN alfa deve prevedere sempre il corretto uso della dose da impiegare, in questo modo non appaiono differenze nell'efficacia clinica conseguita con i 2 tipi di PEG-IFN alfa.
2. Nei pazienti con genotipo HCV 2 e 3 la terapia con PEG-IFN alfa-2b può essere somministrata con dosi di 1ug/kg/sett. con un guadagno netto del 20% (1800 euro/SVR) rispetto alla dose standard di 1,5ug/kg/sett. e del 38% (4500 euro/SVR) rispetto alla dose fissa di 180 ug/sett. Ottenendo una SVR pari a 81%.
3. L'uso sub-ottimale di Peg-IFN alfa-2b rispetto alla dose standard di 1,5 ug/kg/settimana ha compromesso, particolarmente nel genotipo HCV-1 e nei soggetti più pesanti il conseguimento di tassi più elevati di risposta sostenuta.
4. La determinazione della viremia basale e l'induzione di una risposta virologica rapida a 4 settimane sono i principali fattori che possono determinare la durata della terapia antivirale.
5. L'uso di nuovi algoritmi di sospensione precoce della terapia può contribuire ad ottimizzare il trattamento dell'epatite C nella regione Veneto, con un ulteriore risparmio del 10% in termini di spesa per i farmaci antivirali, ma anche evitando effetti collaterali e costi sanitari indiretti con una elevata ricaduta socio-economica

## BIBLIOGRAFIA

1. Abe H, Okuno N, Takeda O, Suminami Y, Kato H, Nakamura K. Analysis of heterogeneity of squamous cell carcinoma antigen by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1994; 15: 988-991.
2. Alberti A. Ottimizzazione della terapia in relazione ai principali fattori predittivi: è possibile individualizzare la terapia?. Torino 27-31 Marzo 2004
3. Amodio P., De Toni E., Cavalletto L. et al., "Mood, cognition and EEG changes during interferon  $\alpha$  (alpha-IFN) treatment for chronic hepatitis C". *J. of affective disorders*, 2005; 84: 93-98.
4. Arango V., Underwood M.D., Mann J.J., "Alterations in monoamine receptors in the brain of suicide victims." *J Clin. Psychopharmacology*, 1992; 112: 8-12.
5. Arend W.P. "Interleukin 1 Receptor Antagonist". *Adv Immunol*, 1993; 54: 167-227.
6. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology*. 2000; 31: 777-82.
7. Ascione A. L'evoluzione della terapia anti-HCV. *HepatoNews* Anno 1, numero di dicembre 2003
8. Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto MG, Benvegnù L, Calabrese F, Gatta A, Pontisso P, Fassina G. Squamous Cell Carcinoma Antigen-immunoglobulin M complex as a novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 2558-65.
9. Benvegnù L, Chemello L, Noventa F, Fattovich G, Pontisso P, Alberti A. Retrospective analysis of the effect of interferon therapy on the clinical outcome of patients with viral cirrhosis. *Cancer*. 1998; 83: 901-9.
10. Bernardinello E, Caberlotto C, Piovesan S, Mezzocolli I, Cavalletto L, Chemello L. Antiviral therapy may change natural history of hepatitis C: clinical and histological modifications in a cohort of naive and treated patients. *Farmaci* 2006; 30:
11. Blalock J.E., Smith E.M. "Human Leukocyte Interferon (HuIFN $\alpha$ ): Potent Endorphin-Like Opioid Activity". *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 5972-74.
12. Bocci V., Pacini A., Muscettola M. et al. "Renal Filtration, Absorption and Catabolism of Human Alpha Interferon". *J.Interferon Res*, 1981; 1: 347-352.
13. Bodenheimer H.C.Jr, Lindsay K.L., Davis G.L., et al., "Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial", *Hepatology* 1997; 26: 473-477.
14. Bonaccorso S., Marini V., Puzella A, et al. "increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha induced changes in the serotonergic system". *J Clin Psychopharmacol*, 2002; 22: 86-90.
15. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis*. 1995; 15: 41-63.
16. Camma C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol*. 2001; 34: 593-602.
17. Capuron L., Gumnick J.F., Musselman D.L., et al. "Neurobehavioral Effects of Interferon- $\alpha$  in Cancer Patients: Phenomenology and Paroxetine Responsiveness of Symptom Dimension". *Neuropsychopharmacology*, 2002; 26(5): 643-52.
18. Capuron L., Miller A.H. "Cytokines and Psychopathology: Lessons from Interferon- $\alpha$ ". *Biol Psychiatry*, 2004; 56: 819-24
19. Capuron L., Neurauter G., Musselman D.L., et al. "Interferon- $\alpha$ -Induced Changes in Tryptophan Metabolism: Relationship to Depression and Paroxetine Treatment". *Biol Psychiatry*, 2003; 54(9): 906-14.
20. Capuron L., Raison C.L., Musselman D.L., et al. "Association of Exaggerated HPA Axis Response to the Initial Injection of Interferon- $\alpha$  with Development of Depression during Interferon- $\alpha$  Therapy". *Am J Psychiatry*, 2003; 160(7): 1342-5.
21. Capuron L., Ravaud A., "Prediction of the depressive effects of interferon alfa therapy by the patient's initial affective state", *N.Engl J.Med* 1999; 340:1370.

22. Capuron L., Ravaud A., Dantzer R., "Timing and specificity of the cognitive changes induced by interelukin-2 and interferon- $\alpha$  treatment in cancer patients", *Psychosom Med* 2001; 63: 376-386.
23. Caraceni A., Gangeri L., Martini C. et al. "Neurotoxicity of Interferon-Alpha in Melanoma Therapy: Results from a Randomized Controlled Trial". *Cancer*, 1998; 83: 482-489.
24. Cavanaugh S. "Diagnosing Depression in the Hospitalized Patient with Chronic Medical Illness". *J Clin Psychiatry*, 1984; 45: 13-6
25. Chemello L., Cavalletto L., Bernardinello E, Mezzocolli I, Colombari R, Cecchetto A, Alberti A, Merkel C, Gatta A. La storia naturale dell'epatite C. Atti IX convegno "Epatopatie Croniche" Padova 1999.
26. Chemello L., Cavalletto L., Bernardinello E., Guido M., Pontisso P., Alberti A. "The Effect of Interferon Alpha and Ribavirin Combination in Naive Patients with Chronic Hepatitis". *J Hepatology*, 1995; 23: 8-12.
27. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244: 359-62.
28. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J. Hepatol* 2003; 39: 239-244.
29. Corsmitt E.P., Heyligenberg R., Enders E., Sauerwein H.P., Romijn J.A. "Acute Effects of Interferon-alpha Administration on Thyroid Hormone Metabolism in Healthy Men". *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80(11): 3140-4.
30. Costa E., Neff N.H., *Handbook of Neurochemistry*, Ed. Lajtha. Plenum Press, N.Y., London IV 1970, 49-90.
31. Cozzi A., Zignego A.L., Carpendo R., Biagiotti T., Aldinucci A., Monti M., Giannini C., Rosselli M, Laffi G., Moroni F., "Low serum tryptophan levels, reduced macrophage IDO activity and high frequency of psychopathology in HCV patients". *J. Viral Hepatitis* 2006; 13, 402-408.
32. Crone C., Gabriel G., "Comprehensive review of Hepatitis C for psychiatric: risk, diagnosis, treatment and interferon-based therapy complications", *J. of Psychiatric Practice*, 2003; vol 3 (2), 93-10.
33. Daniel P.M., Lam P.K.C., Pratt O.E. "Comparison of the Vascular Permeability of the Brain and Spinal Chord to Mannitol and Inulin in Rats". *J Neurochem*, 1985; 45: 647-649.
34. Davis G.L., Balart L.A., Schiff E.R. et al. "Assessing health-related quality of life in chronic hepatitis C using Sickness Impact Profile". *Clin Ther*, 1994; 16: 334-343.
35. Davis G.L., Esteban-Mur R., Rustgi V., et al. "Interferon Alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin for the Treatment of Relapse of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. International Hepatitis Interventional Therapy Group". *N Engl J Med*, 1998; 339(21): 1493-9.
36. Dieperink E., Ho S.B., Thuras P., et al. "A Prospective Study of Neuropsychiatric Symptoms Associated with Interferon-a-2b and Ribavirin Therapy for Patients with Chronic Hepatitis C". *Psychosomatics*, 2003; 44(2): 104-12
37. Eccleston D., Ashcroft G.W., Crawford T.B.B., "5-hydroxyindole metabolism in rat brain. A study of intermediate metabolism using the technique of tryptophan loading. II. Applications and drug studies". *J Neurochem*, 1965; 12: 493-503.
38. Fattovich G., Giustina G., Favaro S., Ruol A., "A survey of adverse events in 11.241 patients with chronic viral hepatitis treated with alpha interferon", *J. Hepatol*, 1996; 24: 38-47.
39. Fekkes D., Van Gool A.R., "Interferon, tryptophan and depression", *acta Neuropsychiatrica*, 2003; 15: 8-14.
40. Fernstrom J.D., "Dietary precursors and brain neurotransmitter formation." *Am Rev Med*, 1981; 32: 413.
41. Fernstrom J.D., Wurtman R.J., " Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels". *Science*, 1971; 173: 149-151.
42. Fontana RJ, Lok AS. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36: S57-64.
43. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002; 36: 986-92.

44. Forton D.M., Taylor-Robinson S., Thomas H.C., "Cerebral dysfunction in chronic hepatitis C infection". *Journal of viral hepatitis*, 2003; 10: 81-86.
45. Forton D.M., Thomas H.C., Murphy C.A. et al. "Hepatitis C and cognitive impairment in a cohort of patients with mild liver disease". *Hepatology* 2002; 35: 433-439.
46. Foster G.R., Goldin R.D., Thomas H.C., "Chronic Hepatitis C virus causes a significant reduction in quality of life in the absence of chirrrosis". *Hepatology* 1998; 27: 209-212.
47. Fried M.W. "Side Effects of Therapy of Hepatitis C and Their Management". *Hepatology*, 2002; 36: S237-S244 .
48. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., et al. "Peginterferon Alpha-2a Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection". *N Engl J Med*, 2002; 26, 347(13): 975-82.
49. Furusyo N., Hayashi J., Ohimiya M, et al., "Differences between interferon-alpha and beta treatment for patients with chronic hepatitis C virus infection". *Dig Dis. Scu.*1999; 44: 608-617.
50. Garson JA, Ring CJA, Tuke PW. Improvement of HCV genome detection with "short" PCR products. *Lancet* 1991; 338: 1466-1467.
51. George J. Biochemical markers of hepatic fibrogenesis: single measurements are not reliable enough to replace liver biopsy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15: 819-21.
52. Gerrard T.L., Siegel J.P.; Dyer D.R., Zoon K.C. "Differential Effects of Interferon-alpha and Interferon-Gamma on Interleukin-1 Secretion by Monocytes". *J Immunology*, 1987; 138: 2535-6.
53. Gershon A., Margulies M., Gorczynski R., Heathcote E.J., "Serum cytochine values and fatigue in chronic hepatitis C infection". *J. Viral Hepat* 2000; 7: 397-402.
54. Gessa G.L., Tagliamonte A., "Possible role of free serum tryptophan in the control of brain tryptophan level and serotonin synthesis". *Adv Biochem.Psychopharmacol.*, Vol.2, Raven Press, N.Y., 1974.
55. Glue P., Rouzier-Panis R., Raffanel C., et al. For the International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). "A Dose-Ranging Study of Pegylated Interferon Alpha 2b and Ribavirin in Chronic Hepatitis C". *Hepatology*, 2000; 32: 647-653 .
56. Goh J., Coughlan B, Quinn J., O'Keane J.C., Crowe J., "Fatigue does not correlate with the degree oh hepatitis or the presence of autoimmune disorders in chronic hepatitis C infection". *Eur J Gastroenterology Hepatol* 1999; 11: 833-838.
57. Gohier B., Goeb J.L., Rannou-Dubas K., et al., "Hepatitis C, alpha interferon, anxiety and depression disorder: a prospective study of 71 patients", *W. J. Biol. Psychiatry*, 2003; 4: 115-118
58. Green A.R., Curzon G., "Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol.", *Nature*, 1968; 220: 1095.
59. Gunneson TJ, Menon KV, Wiesner RH, Daniels JA, Hay JE, Charlton MR, Brandhagen DJ, Rosen CB, Porayko MK. Ultrasound-assisted percutaneous liver biopsy performed by a physician assistant. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 1472-5.
60. Habib D.V., Lipton K., Cantell K. "Interferon Crosses Blood Cerebrospinal-Fluid Barrier in Monkeys". *Proc Soc Exp Biol Med*, 1975; 149: 287-289.
61. Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, Hashimoto K, Hirose S, Kyo S, Ito M. Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1518: 124-31.
62. Hammer M.B., Diammond B.I. "Plasma Dopamine and Norepinephrine Correlations with Psychomotor Retardation, Anxiety, and depression in Non-Psychotic Depressed Patients: A Pilot Study". *Psychiatry Res*, 1996; 64: 209-11.
63. Harper A.E., Human Aminoacid and Nitrogen Requirements as the Basis for Evaluation of Nutritional Quality of Protein, in: "Food Proteins", Whitaker J.R. , Tonnenbaum S.R., ed Publishing Co.Inc.Westport,1977:363-386.
64. Hauser P., Khosla J., Aurora H., et al."A prospective study of the incidence and open-label treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C" *Mol. Psychiatry*, 2002; 7: 942-947.

65. Heathcote EJ. Treatment considerations in patients with hepatitis C and cirrhosis. *J Clin Gastroenterol.* 2003; 37: 395-8.
66. Hisalbeck R.C., Perry W., Hassanein T.I. "Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C". *Hepatology* 2002; 35: 440-446.
67. Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol.* 1999; 73: 1165-74.
68. Hoofnagle J.H., Di Bisceglie A.M. "The Treatment of Chronic Viral Hepatitis". *N Engl J Med*, 1997; 336: 347-56.
69. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S21-S29.
70. Hunt C.M., Dominitz J.A., Bute B.P. , Waters B., Blasi U., Williams D.M. "Effects of Interferon- $\alpha$  Treatment of Chronic Hepatitis C on Health Related Quality of Life". *Dig Dis Sci*, 1997; 42: 2482-6.
71. Ikeda I. Two-site radioimmunometric (sandwich) assay of SCC antigen using monoclonal antibodies. In Kato H, De Bruijn HWA, Ebert W, Herberman, Johnson JT, eds. *SCC Antigen in the Management of Squamous Cell Carcinoma*. Princeton, Excerpta Medica, 1987; 215-226.
72. Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T; MULTIVIRC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet.* 2001; 357: 1069-75.
73. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H et al. Histologic grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatology* 1995; 22: 696-699.
74. Jackson IM., "The thyroid axis and depression". *Thyroid*, 1998; 8: 951-956.
75. Janicki P.K. "Binding of Human Alpha-Interferon in the Brain Tissue Membranes of Rat". *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1992; 75: 117-120.
76. Janssen H.L., Brouwer J.T., van der Mast R.C., Schalm S.W. "Suicide Associated with Alpha Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis". *J Hepatol*, 1994; 21: 241-43.
77. Jeugling F., Ebert D., Cut O., et al., "Prefrontal cortical hypometabolism during low dose interferon alpha treatment". *Psychopharmacology*, 2000; 152: 383-389.
78. Kamei S., Tanaka N., Mastuura M. et al.,: "Alterations of quantitative EEG and mini mental state examination in interferon-alpha- treated hepatitis C". *European Neurology*, 2002; 48 (2): 102-107.
79. Kanno A., Yamada M., Abe M., et al. "A Case of Interferon- $\alpha$ -Induced Manic Psychosis in Chronic Hepatitis C". *Tohoku J Exp Med*, 1999; 187(1): 79-82.
80. Kato H, Nagaya T, Torigoe T. Heterogeneity of a tumor antigen TA-4 of squamous cell carcinoma in relation to its appearance in the circulation. *Gann.* 1984; 75: 433-5.
81. Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977;40: 1621-8.
82. Kato H. Squamous cell carcinoma antigen. In: Sell S, ed. *Serological Cancer Markers*. Totowa, NJ, Humana Press. 1992; 437-451.
83. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol.* 2000; 74: 2046-51.
84. Koskinas J., Merkuoraki P., Manesis E., et al., "Assessment of depression in patients with chronic hepatitis: effect of interferon treatment". *Dig. Dis.* 2002; 20: 284-288.
85. Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003;50:242-9.
86. Kramer L, Bauer E., Funk G., Hofer H., Jessner W., Steindl -Munda P. et al., "Subclical impairment of brain function in chronic hepatitis C infection". *J Hepatol* 2002; 37: 349-354.
87. Kraus MR, Schafer A., Faller H., et al."Psychiatric symptoms in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b therapy". *J. Clinical Psychiatry.* 2003; 64: 708-714.
88. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989; 244: 362-4.

89. Kuwano A, Kodo I, Kishi F, Suminami Y, Kato H. Assignment of the squamous cell carcinoma antigen locus (SCC) to 18q21.3 by in situ hybridization. *Genomics* 1995; 30: 626.
90. Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, Bauer B, Stauber RE. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005; 41: 1376-82.
91. Langer S.Z., Schoemaker H., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1988; 12 (2-3): 193-216.
92. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001 Jul; 345: 41-52.
93. Le Calvez S, Thabut D, Messous D, Munteanu M, Ratzu V, Imbert-Bismut F, Poynard T. The predictive value of Fibrotest vs. APRI for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2004; 39: 862-3.
94. Licinio J., Kling M.A., Hauser P. "Cytokines and Brain Function: Relevance to Interferon-Alpha-Induced Mood and Cognitive Changes". *Semin Oncol*, 1998; 25(1Suppl.1): 30-8.
95. Lindor KD, Bru C, Jorgensen RA, Rakela J, Bordas JM, Gross JB, Rodes J, McGill DB, Reading CC, James EM, Charboneau JW, Ludwig J, Batts KP, Zinsmeister AR. The role of ultrasonography and automatic-needle biopsy in outpatient percutaneous liver biopsy. *Hepatology*. 1996 May; 23: 1079-83.
96. Lindsay K.L., Schafer A., Csef H., et al., and the Hepatitis Interventional Therapy group, "Response to higher doses of interferon alfa2b in patients with chronic hepatitis C: a randomized multicenter trial." *Hepatology*, 1996; 24: 1034-1040.
97. Loftis J.M., Socherman R.E., Howell C.D., Whitehead A.J., Hill J.A., Dominitz J.A., Hauser P., "Association of interferon-alpha induced depression and improved treatment response in patients with hepatitis C", *Neurosci Lett.*, 2004; 365: 87-91.
98. Maes M., Verkerk R., Bonaccorso S., Ombelet W., Bosmans E., Scharpè S. "Depressive and Anxiety Symptoms in the Early Puerperium are Related to Increased Degradation of triptophan into Kyneurine, a Phenomenon which is Related to Immune Activation". *Life Sci*, 2002; 71(16): 1837-48
99. Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, Pudifin DJ. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet*. 1986; 1: 523-5.
100. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 25: 1527-38.
101. Makino M., Kitano Y., Komiyama C., et al., "involvement of central opioid system in human interferon -alpha induced immobility in the mouse forced swimming test". *Br. J. Pharmacol.*, 2000; 130: 1269-1274.
102. Malaguarnera M., Laurino A., Di Fazio I., et al., "Neuropsychiatric effects and type of IFN- $\alpha$  in chronic hepatitis C", *J Interferon Cytokine Res*, 2001; 21: 273-278.
103. Manns M.P., McHutchinson J.G., Gordon S.C., et al., and the International Hepatitis Interventional Therapy Group, "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: 958-965.
104. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and Disease Progression in Hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 47-56.
105. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*. 1992; 66: 3225-9.
106. Mc Arthur J.N., Dawkins P.D., "The effect of sodium salicylate on the binding of L-tryptophan to serum proteins". *J. Pharm Pharmacol.*, 1969; 21 (11): 744-750.
107. Mc Menamy R.H., "Binding of indole analogues to human serum albumin. Effects of fatty acids". *J Biol Chem*, 1965; 240: 4235.
108. Mc Menamy R.H., Oncley J.L., "The specific binding of L-tryptophan to serum albumin". *J Biol Chem.*, 1958; 233: 1436.
109. McDonald E.M., Mann A.H., Thomas H.C. "Interferons as Mediators of Psychiatric Morbidity: an Investigation in a Trial of Recombinant  $\alpha$ -Interferon in Hepatitis-B Carriers". *Lancet*, 1987; II (8569): 1175-8.

110. McHutchinson J.C., Gordon S.C., Schiff E.R., Schiffman M.L., Lee W., Rustgi V., Goodman Z., Ling M.H., Cort S., Albrecht J. "Interferon alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin as Initial Treatment of Chronic Hepatitis C". *N Engl Med*, 1998; 339: 1485-82.
111. McHutchinson J.C., Gordon S.C., Schiff E.R., Schiffman M.L., Lee W., Rustgi V., Goodman Z., Ling M.H., Cort S., Albrecht J. "Interferon alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin as Initial Treatment of Chronic Hepatitis C". *N Engl Med*, 1998; 339: 1485-82.
112. McHutchinson JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15: 945-51.
113. Mellerup E.T., Plenge P., Engelstoft M., "High affinity binding of [3H]paroxetine and [3H]imipramine to human platelet membranes". *Eur J Pharmacology*, 1983; 96:303-309.
114. Meyers C.A., Scheibel R.S., Forman A. "Persistent Neurotoxicity of Systematically Administered Interferon-alpha". *Neurology*, 1991; 41: 672-6.
115. MG Ghany, DE Kleiner, H Alter et al. Progression of fibrosis in Chronic Hepatitis C; *Gastroenterology* 2003; 124: 97-104.
116. Mohr D.C., Likosky W., Dwyer P., Van Der W.J., Boudewyn A.C., Goodkin D.E., "Course of depression during the initiation of interferon beta-1a treatment for multiple sclerosis", *Arch. Neurol*. 1999; 56: 1263-1265.
117. Moir A.T.B., Eccleston D., "The effects of precursor loading in the cerebral metabolism of 5-hydroxyindoles". *J Neurochem*, 1968; 15: 1093.
118. Morikawa O, Sakai N, Obara H, Saito N. "Effects of Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  and cAMP on the Transcriptional Regulation of the Serotonin Transporter". *Eur J Pharmacol*, 1998; 349: 317-24
119. Murakami A, Suminami Y, Hirakawa K, Nawata S, Numa F, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br J Cancer* 2001;84:851-8.
120. Musselman D.L., Lawson D.H., Gumnick J.F., et al. "Paroxetine for the prevention of depression induced by high dose interferon alfa", *N Engl J Med*. 2001; 344(13): 961-966.
121. Numa F, Takeda O, Nakata M, Nawata S, Tsugana N, Hirabayashi K, Suminami Y, Kato H, Hamanaka S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates the production of squamous cell carcinoma antigen in normal squamous cells. *Tumor Biol* 1996;17:6040-6.
122. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 3392-6.
123. Otsubo T., Miyaoka H., Kamijima K., Onuki M., Ishii M., Mitamura K. "Depression During Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Patients – a Prospective Study". *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, 1997; 99: 101-27
124. Owen M.J., Nemeroff C.B. "Physiology and Pharmacology of Corticotropin Releasing Factor". *Pharmacol Rev* 1991; 43(4): 425-73.
125. Owen MJ, Nemeroff CB. "Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter". *Clin Chem* 1994; 40: 288-95.
126. Pagliaro L, Rinaldi F, Craxi A, Di Piazza S, Filippazzo G, Gatto G, Genova G, Magrin S, Maringhini A, Orsini S, Palazzo U, Spinello M, Vinci M. Percutaneous blind biopsy versus laparoscopy with guided biopsy in diagnosis of cirrhosis. A prospective, randomized trial. *Dig Dis Sci*. 1983; 28: 39-43.
127. Pariante M., Orru M.G., Baita A., Farci M.G., Upinicho B., "Treatment with interferon-alpha in patients with chronic hepatitis and mood or anxiety disorders", *Lancet*, 1999; 354:131-132 (letter).
128. Perrault J, McGill DB, Ott BJ, Taylor WF. Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients. *Gastroenterology* 1978; 74: 103-6.
129. Poniachik J, Bernstein DE, Reddy KR, Jeffers LJ, Coelho-Little ME, Civantos F, Schiff ER. The role of laparoscopy in the diagnosis of cirrhosis. *Gastrointest Endosc*. 1996; 43: 568-71.
130. Pontisso P, Calabrese F, Benvegnù L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, De Falco S, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 2004; 90: 833-837.

131. Pontisso P, Calabrese F, Benvegnù L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, De Falco S, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 2004; 90: 833-837.
132. Pontisso P, Quarta S, Caberlotto C, Beneduce L, Marino M, Bernardinello E, Tono N, Fassina G, Cavalletto L, Gatta A, Chemello L. Progressive increase of SCCA-IgM Immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2006; 119: 735-40.
133. Pountianen E., Hokkanen L., Niemi M.L., Farkkila M., "Reversible cognitive decline during high dose alpha interferon treatment". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1994; 47: 901-905.
134. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997; 49: 825-32.
135. Poyrand T., Marcellin P., Lee S.S., et al., for The International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). "Randomised Trial of Interferon Alpha-2b Plus Placebo for 48 Weeks or for 24 Weeks Versus Interferon Alpha-2b Plus Placebo for 4.
136. Raber J., Joob G.F., Bloom F.E. "Interferon-alpha and Transforming Factor-Beta 1 Regulate Corticotropin Releasing Factor Release from the Amigdala: Comparison with the Hypotalamic Response". *Neurochem Int*, 1997; 30: 455-63.
137. Raison C.L., Borisov A.S., Broadwell S.D., et al. "Depression during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy: prevalence and prediction", *J Clin Psychiatry*, 2005; 66: 41-48.
138. Raison C.L., Broadwell A.S., Borisov A.S., Matanunga A.K., Capuron L., Woolwine B.J., Jacobson I.M., Nemeroff C.B., Miller A.H., "Depressive symptoms and viral clearance in patients receiving interferon- $\alpha$  and ribavirin for hepatitis C", *Brain Behav Immun*, 2005; 19: 23-27.
139. Raison C.L., Demetrashvili M, Capuron L, Miller AH. "Neuropsychiatric Adverse Effects of Interferon-alpha". *CNS Drugs*, 2005; 19(2): 105-23.
140. Rasenack J., Zeuzem S. Feinman S.V., et al., "Peginterferon alpha-2a improves HR-QOL outcomes compared with unmodified interferon alpha-2a in patients with chronic hepatitis C". *Pharmacoeconomics*, 2003; 21: 341-349.
141. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol*. 1998; 143: 2493-503.
142. Rodger A.J., Jolley D., Thompson S.C., Lanigan A., Crofts N., "The impact of diagnosis of hepatitis C virus on quality of life". *Hepatology* 1999; 30: 1299-1301.
143. Rosestain D.L., Lemer D., Cai J., "More on the depressive effects of interferon alpha", *N. Engl. J. Med.*, 1999; 341: 849-850.
144. Russo S., I.P. Kema, E.B. Haagsma, J.C. Boon, P.H.B. Willemse, J.A. Den Boer, et al., "Irritability rather than depression during interferon treatment is linked to increased tryptophan catabolism". *Psychosomatic Medicine* 2005;67:773-777.
145. Rye D.B., Jankovic J. "Emerging Views of Dopamine in Modulating Sleep/Wake State from an Unlike Source: PD". *Neurology*, 2002; 58: 341-6.
146. Schaefer M., Schmidt F., Folwaczny C., et al. "Adherence and Mental Side Effects During Hepatitis C Treatment with Interferon- $\alpha$  and Ribavirin in Psychiatric Risk Groups". *Hepatology*, 2003; 37(2): 443-51.
147. Schaefer M., Schweiger M., Pich M., et al. "Neurotransmitter Changes by Interferon-alpha and Therapeutic Implications". *Pharmacopsychiatry*, 2003; 36(Suppl. 3): S203-6.
148. Schick C, Kamachi Y, Bartuski AJ, Cataltepe S, Schechter NM, Pemberton PA, Silverman GA. Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J Biol Chem*. 1997; 272: 1849-55.
149. Schick C, Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartuski AJ, Gornstein ER, Bromme D, Chapman HA, Silverman GA. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*. 1998; 37: 5258-66.

150. Schloss P., Williams D.C. "The Serotonin Transporter: a Primary Target for Antidepressant Drugs". *J Psychopharmacol* 1998; 12: 115-21
151. Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, Treter SD, Hui SM, Silverman GA. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 3147-51.
152. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2006; 44: 686-93.
153. Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ, Wright EC, Cain CMB, Buskell ZJ, Ishak KG et al. Long term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: a National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology* 2001; 33: 455-463.
154. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36: S35-46.
155. Seeff LB. Why is there such difficulty in defining the natural history of hepatitis C? *Transfusion*. 2000; 40: 1161-4.
156. Shuto H., Kataoka Y., Horikawa T., Fujiara N., Oishi R. "Repeated Interferon-Alpha Administration Inhibits Dopaminergic Neural Activity in the Mouse Brain". *Brain Res*, 1997; 747: 348-51.
157. Siever L.J., Davis K.L. "Overview: Toward a Dysregulation Hypothesis of Depression". *Am J Psychiatry*, 1985; 142: 1017-31.
158. Silverman GA, Bartuski AJ, Cataltepe S, Gornstein ER, Kamachi Y, Schick C, Uemura Y. SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tumour Biol*. 1998; 19: 480-7.
159. Smith R.A., Norris F., Palmer D., Bernhardt L., Wills R.J. "Distribution of Alpha Interferon in Serum and Cerebrospinal Fluid after Systemic Administration". *Clin Pharmacol Ther*, 1985; 37: 85-88.
160. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, S Sulkowski M, Torriani FJ, Dieterich DT, Thomas DL, Messinger D, Nelson M; APRICOT Clinical Investigators. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43: 1317-25.
161. Striter D., Valentine A.D., Meyers C.A. "Manic Episodes in two Patients Treated with Interferon". *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1997; 9(2): 273-6.
162. Suehiro Y, Kato H, Nagai M, Torigoe T. Flow cytometric analysis of tumor antigen TA-4 in cervical cytologic specimens. *Cancer* 1986; 57: 1380-84
163. Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 181: 51-8.
164. Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, Nawata S, Gondo T, Hirakawa H, Numa F, Silverman G, Kato H. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killers cells. *Cancer Res* 2001;61:1776-80.
165. Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic N, Hirabayashi K, Kato H. Inhibition of apoptosis in human tumor cells by the tumor-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer* 2000; 82: 981-9.
166. Sunami M., Nishikawa T., Yorogi A., Shimoda M. "Intravenous Administration of Levodopa Ameliorated a Refractory Akathisia Case Induced by Interferon-Alpha". *Clin Neuropharmacol*, 2000; 23: 59-61.
167. Sved A.F., Precursor control of the function of monoaminergic neurons, in: "Nutrition and the brain", Wurtman R.J., Wurtman J.J., eds Raven Press, New York, Vol.6, 223-275, 1983.
168. Tagliamonte A., Biggio G., Vargiu L., Gessa G.L., "Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis". *Life Sci*, 1973; 12: 277.
169. Tagliamonte A., Tagliamonte P., Perez-Cruett J., Gessa G.L., "Increase of brain tryptophan caused by drugs which stimulate serotonin synthesis". *Nature-New Biology*, 1971; 229: 125.
170. Takeshima N, Suminami Y, Takeda O, Abe H, Okuno N, Kato H. Expression of mRNA of SCC antigen in squamous cells. *Tumour Biol*. 1992; 13: 338-42.
171. Thabut D, Simon M, Myers RP, Messous D, Thibault V, Imbert-Bismut F, Poinard T. Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 37:1220-1.

172. Trask P.C., Esper P., Riba M., et al. "Psychiatric Side Effects of Interferon Therapy: Prevalence, Proposed Mechanism, and Future Directions". *J Clin Oncol*, 2000; 18(11): 2316-26.
173. Valentine A.D., Meyers C.A., Kling M., Richelson E., Hauser P. "Mood and Cognitive Side Effects of Interferon-alpha Therapy". *Semin Oncol*, 1998; 25(Suppl.1): 39-47.
174. Van Thiel D.H., Friedlander L, De Maria N, et al."Treatment of chronic hepatitis C in individuals with pre-existing or confounding neuropsychiatricdisease", *Hepatogastroenterology*, 1998; 45: 328-330.
175. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38: 518-26.
176. Wang Y.S., Elliot K. "Virologia Medica". In: *Principi di Medicina Interna*. Harrison, Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Eds, McGraw-Hill Publ, Milano, 1999; parte 7, sez 11: 1234-5.
177. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of Hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Seminars in liver disease* Vol. 20, N.1, 2000; 1-16.
178. Weissenborn K., Krause J., Bokemeier M., Hecker H., Schuler A., Ennen J.C., Ahl B., Manns M.P., Boker K.W., "Hepatitis C virus infection affects the brain-evidence from psycometric studies and magnetic resonance spectroscopy". *Journal of Hepatology* 2004; 41: 845-851.
179. Wessely S., Pariante C., "Fatigue, depression and chronic hepatitis C infection". *Psychol Med* 2002; 32: 119-121.
180. Wong JB, Koff RS. Watchful waiting with periodic liver biopsy versus immediate empirical therapy for histologically mild chronic hepatitis C. A cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med*. 2000; 133: 665-75.
181. Wong M.L., Bongiorno P.B., Al-Shekhlee A., et al. "IL-1beta, IL-1 Receptor Type I, i-NOS, Gene Expression in Rat Brain Vasculature and Prevascular Area". *Neuroreport*, 1996; 7: 2445-8.
182. Yamano M. , Yuki H., Yasuda S., Miyata K. "Corticotropin Releasing Hormone Receptors Mediate Consensus Interferon-Alpha YM643-Induced Depression Like Behaviour in Mice". *J Pharmacol Exp Therapy*, 2000; 292:191-7.
183. Zeuzem S., Feinman S.V., Rasenack J., et al. "Peginterferon Alpha -2a in Patients with Chronic Hepatitis C". *N Engl J Med*, 2000; 343 (23): 1666-72.