



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FOGGIA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

CORSO DI DOTTORATO IN IMMUNOREUMATOLOGIA E ONCOLOGIA

CLINICA E SPERIMENTALE, BIOETICA ED EPIDEMIOLOGIA DEI TUMORI

COORDINATORE: PROF. G. VENDEMIALE

XXVIII CICLO

---

## **DIRECT-ACTING ANTIVIRALS (DAAs) INCREASE THE SERUM VEGF LEVEL IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C: A RATIONALE FOR TUMOR RECURRENCE**

### **Docente Tutor**

Chiar.mo Prof. Gaetano Serviddio

### **Dottoranda**

Dott.ssa Rosanna Villani

---

Anno accademico 2016-2017



## INDICE

<b>1</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>PARTE PRIMA</b> .....	<b>12</b>
3.1	L'EPATITE C .....	12
3.1.1	Epidemiologia dell'infezione da virus HCV .....	12
3.1.2	L'epatocarcinoma nel paziente con infezione da HCV .....	14
3.2	LE INTERLEUCHINE E I FATTORI DI CRESCITA .....	17
3.2.1	Le interleuchine proinfiammatorie e anti-infiammatorie .....	17
3.2.2	I fattori di crescita .....	35
3.3	I DIRECT-ACTING ANTIVIRALS (DAAS) E LA TERAPIA INTERFERON-FREE .....	50
3.3.1	Farmacodinamica dei DAAs.....	52
3.3.2	Indicazioni al trattamento con DAAS.....	56
3.3.3	Rischio di epatocarcinoma nei pazienti sottoposti a trattamento antivirale con DAAs..	58
<b>4</b>	<b>PARTE SECONDA</b> .....	<b>62</b>
4.1	OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	62
4.2	MATERIALI E METODI .....	63
4.2.1	Pazienti e Dosaggio delle interleuchine.....	63
4.2.2	Test in vitro per lo studio dell'attività angiogenica del siero dei pazienti trattati con DAAs ...	66
4.2.3	Test in vitro per lo studio degli effetti del bevacizumab sulla crescita delle cellule Hepa RG ..	67
4.2.4	Analisi statistica.....	67
4.3	RISULTATI .....	69
4.3.1	PAZIENTI ARRUOLATI .....	69
4.3.2	VEGF .....	73
4.3.3	IL-10 .....	76
4.3.4	EGF.....	77
4.3.5	IL-6 .....	77
4.3.6	IL-8 .....	78
4.3.7	TNF-alfa .....	80
4.3.8	Effetti biologici del siero dei pazienti trattati con DAAs sulla crescita delle cellule endoteliali	81
4.3.9	Effetti del bevacizumab sulle colture di cellule HepaRG.....	83
4.4	DISCUSSIONE.....	84
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>92</b>



## 1 ABSTRACT

The currently available novel combinations of DAAs have completely changed the panorama of hepatitis C therapy. As a result, current HCV infection cure rates have exceeded 90% in a very short time. Data on compensated cirrhosis show rates of sustained virological response (SVR) of around 95-97%, although this is a little lower in more advanced liver diseases [1-5].

However, some authors reported that hepatocellular carcinoma (HCC) seems to develop within weeks or few months of starting treatment with direct-acting antivirals (DAAs).

Reig *et al* reported for the first time that patients with cirrhosis and very early HCCs (single tumor <2 cm) or early HCCs with a low to moderate risk of recurrence showed a probability of recurrence at 4 months of between 17.6 and 21.5%; however, the recurrence rate was approximately 41.2%, which was double the expected rate [6].

Conti *et al.* reported a similar result; however they also observed new diagnoses of HCC. Particularly worrying was the fact that patients who developed HCC after DAAs were younger (median age 56 vs. 73 years) and that, among 16 recurrent cases described by Reig *et al.*, 50% were multinodular and 20% were infiltrative or showed extra-hepatic lesions [7].

On the other hand, some authors considered it unlikely that DAAs have an effect on tumor recurrence. A French group analyzed 307 chronic HCV patients with HCC who were treated with DAAs in 3 different cohorts; they concluded that there was no increased risk of HCC recurrence [8].

It is well established that angiogenesis is a major driver of tumor dissemination and that VEGF is a critical player in liver cancer angiogenesis. VEGF levels in HCC tissues or in circulation correlate with more aggressive disease; therefore this research was aimed at monitoring the serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) and changes in the pattern of circulating interleukins in 103 chronic hepatitis C patients during antiviral treatment with DAA-regimens.

VEGF, epidermal growth factor (EGF), and interleukins (IL-6, IL-10, IL-8, TNF alpha) were assessed at baseline, during treatment, and after treatment.

The biological effect of DAA-treated patient serum on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and Hepa RG cell proliferation in the presence of anti-VEGF monoclonal antibody, bevacizumab, was also confirmed.

The median  $\log_{10}$ VEGF was significantly increased at 4 weeks after initiation of therapy (from 2.18  $\log_{10}$  pg/mL to 2.45  $\log_{10}$  pg/mL,  $p < 0.001$ ), remaining higher at the end of treatment (2.44  $\log_{10}$  pg/mL,  $p < 0.001$  vs. T0), and decreasing to the baseline value upon treatment discontinuation (2.13  $\log_{10}$  pg/mL at SVR4 and 2.28  $\log_{10}$  pg/mL at SVR12)

On the other hand, EGF levels also increased during DAA treatment and subsequently decreased at SVR12; however, this trend was not significant.

The temporal trends of the 2 main inflammatory cytokines, namely IL-10 and TNF-alpha, were different. At 4 weeks, IL-10 significantly

decreased (from 1.44 pg/mL to 0.83 pg/mL;  $p=0.03$ ), whereas TNF-alpha levels remained stable (from 4.05 pg/mL to 4.01 pg/mL,  $p=0.27$ ). Interestingly, while IL-10 levels were substantially suppressed from the end of treatment onwards, the decrease in TNF-alpha started later; it was nearly significant at the end of treatment (2.82 pg/mL,  $p=0.05$ ) and this was confirmed, although with a smaller decrease, at each consecutive time point (2.19 pg/mL and 2.09 pg/mL at SVR4 and 12, respectively). No difference in IL-8 and IL-6 levels was observed during treatment.

The biological activity of sera collected from patients treated with DAAs on human endothelial cells (HUVEC) and Hepa RG was also investigated.

HUVEC proliferation was measured upon stimulation with cell medium supplemented with sera obtained from patients receiving therapy.

A significant induction of HUVEC proliferation was observed upon supplementation of media with sera from patients receiving DAA therapy (mean:  $290\pm 60\%$  vs.  $120\pm 30$ ,  $p<0.0001$ ). Moreover, consistent with the reduction of VEGF upon treatment withdrawal, HUVEC proliferation was comparable to baseline in cell cultures supplemented with sera collected 12 weeks after treatment interruption. Of note, the peak of HUVEC stimulation upon addition of patient sera was comparable to maximal HUVEC stimulation under standard culture conditions

The addition of serum from patients collected during therapy induced HepaRG proliferation that was partially inhibited (decrease of 50%)

by bevacizumab; the effect disappeared 4 weeks after the end of therapy (SVR4). These results suggest that additional factors may be involved in the cellular growth observed after supplementation with sera collected during antiviral therapy.



## 2 INTRODUZIONE

L'avvento dei nuovi farmaci antivirali diretti (Direct-Acting Antivirals o DAAs) ha modificato in maniera sostanziale la gestione terapeutica dei pazienti affetti da epatite cronica HCV-correlata.

Per molti anni, infatti, l'unica possibilità di guarigione dall'infezione cronica era rappresentata dal trattamento con interferone in associazione a ribavirina somministrati per un periodo di tempo compreso tra i sei e i diciotto mesi. I limiti principali della suddetta terapia erano essenzialmente rappresentati dalla manifestazione, durante trattamento, di numerosi effetti collaterali e dalla controindicazione alla somministrazione per i pazienti con malattia epatica avanzata.

Non di secondaria importanza era la bassa probabilità di risposta al trattamento compresa nel complesso tra il 30 e il 70%.

L'utilizzo dei nuovi antivirali diretti garantisce, al contrario, l'ottenimento, in poche settimane di trattamento, della negativizzazione virale e in ultimo della risposta virale sostenuta.

L'efficacia e l'estrema maneggevolezza di questi trattamenti ha consentito l'utilizzo di tali farmaci nei pazienti affetti da cirrosi epatica e in tipologie di pazienti per i quali la terapia antivirale era controindicata o di difficile gestione quali ad esempio i pazienti trapiantati, i pazienti affetti da patologie psichiatriche o semplicemente nei soggetti anziani.

In Italia, a distanza di quasi due anni dall'immissione in commercio, oltre 60 mila pazienti sono stati già sottoposti al trattamento seppur

con le limitazioni economiche imposte dall'Agenzia Italiana del Farmaco che consente attualmente il trattamento solo nei pazienti con fibrosi epatica significativa, nei pazienti con bassa fibrosi e con contemporanee manifestazioni extraepatiche o in lista per trapianto epatico.

A distanza di pochi mesi dalla loro disponibilità, tuttavia, alcuni gruppi di ricerca europei hanno reso pubblici i primi dati di efficacia e di safety nei pazienti cirrotici con contemporanea o pregressa diagnosi di epatocarcinoma segnalando un aumentato rischio di recidiva in questa classe di pazienti.

Da allora nel mondo scientifico mondiale numerosi gruppi di ricerca hanno condiviso i propri dati di esperienza clinica, taluni a conferma dell'ipotesi riportata dai primi gruppi talatri contro e quindi a sostegno di un aumentato riscontro di epatocarcinoma o di recidiva riconducibile ad un rischio di per sé alto, proprio della classe dei pazienti cirrotici.

All'interno di questo scenario si inserisce la presente discussione concepita con l'intento di fornire contributi al fine di dirimere in modo definitivo il dubbio scientifico circa l'effetto diretto o indiretto dei nuovi antivirali sulla probabilità di recidiva di epatocarcinoma nei pazienti già sottoposti a trattamento antineoplastico. Lo scopo dello studio è stato in particolare quello di verificare se il siero dei pazienti sottoposti al trattamento potesse avere un effetto sui fattori di crescita vascolari e sulla crescita cellulare in particolare delle cellule endoteliali che sono in primis coinvolte nella crescita delle cellule neoplastiche in quanto fondamentali nella costituzione della rete

vascolare della neoplasia. L'interesse per questo aspetto fisiopatologico deriva dalla letteratura mondiale ricca di lavori scientifici che hanno mostrato un ruolo chiave dei fattori di crescita sullo sviluppo delle neoplasie e della rete vascolare ad essa associata ritenuta fondamentale per la crescita e diffusione delle cellule neoplastiche.

### **3 PARTE PRIMA**

#### **3.1 L'EPATITE C**

##### **3.1.1 Epidemiologia dell'infezione da virus HCV**

L'epatite C è una delle più frequenti cause di morbidità e mortalità a livello mondiale. [9]

I dati di epidemiologia più recenti riportano una prevalenza di soggetti AntiHCV positivi di 115 milioni pari a circa il 1.6% della popolazione mondiale con picco di prevalenza del 9.2% in Africa e prevalenza minima del 0.1% nell'Oceania. [10]

Nel gruppo di pazienti AntiHCV positivi, il 70% circa ovvero 80 milioni di soggetti hanno HCV RNA rilevabile e sono pertanto affetti da epatite cronica attiva.

I dati epidemiologici europei mostrano una percentuale di soggetti AntiHCV positivi del 1,8% e di questi il 73% ha attiva replicazione virale.

A livello nazionale, infine, i dati più recenti riportano una prevalenza compresa tra il 1.6% e 7.3% di pazienti AntiHCV positivi con prevalenza di AntiHCV viremici del 73.3%. [10]

La distribuzione su base regionale della prevalenza di soggetti AntiHCV mostra una sostanziale differenza tra le regioni del Nord e Centro Italia vs. il Sud e le Isole dove la prevalenza raggiunge in alcune aree sub-regionali picchi del 26%. [11, 12]

Tale dato fa sì che attualmente l'Italia sia, in Europa, il paese a maggior prevalenza di soggetti AntiHCV positivi viremici.[10]

Riguardo invece la distribuzione per genotipi, a livello mondiale è descritta una ampia prevalenza di genotipi 1 (43%) e 3 (22%) mentre i genotipi 2 e 4 sono identificati nel 13% dei casi nei pazienti con epatite cronica attiva.

L'analisi per regioni rivela invece una netta prevalenza di genotipi 1 in Europa, America latina e America del Nord dove esso prevale con una percentuale che raggiunge il 70% dei casi mentre in Asia prevale il genotipo 3 che è identificato nel 40% dei pazienti con infezione da virus C.

L'Egitto infine mostra dati epidemiologici particolarmente interessanti in quanto non solo ha una prevalenza di soggetti HCV positivi particolarmente elevata (oltre il 14% della popolazione) ma anche poichè ha distribuzione genotipica assai peculiare data la netta prevalenza di genotipi 4 (93.1%). [13]

I dati italiani mostrano una prevalenza del genotipo 1a del 4.2%, genotipo 2 del 57.5%, di genotipi 1 non sottoclassificabili del 3%, di genotipo 2 e 3 del 26 e 36 % rispettivamente.

Il genotipo 4 infine ha una prevalenza del 1.8% uguale alla prevalenza di genotipi misti o non compresi nei primi 6 sottogruppi (1.5%).[10]

### **3.1.2 L'epatocarcinoma nel paziente con infezione da HCV**

L'epatocarcinoma è la quinta neoplasia più frequente al mondo e la terza per mortalità.[14, 15]

L'epatocarcinoma è una neoplasia peculiare in quanto la diagnosi riguarda per la gran parte (in circa l'80% dei casi) pazienti con epatite cronica o cirrosi epatica. Pertanto la maggior parte dei pazienti con diagnosi di HCC ha in anamnesi una infezione cronica virus-correlata (HBV/HCV) oppure un danno epatico alcol-correlato o in ultimo una diagnosi di Non Alcoholic SteatoHepatitis (NASH).[15]

L'infezione cronica da HCV è tra queste la causa più frequente di HCC.[15]

In particolare l'infezione da HCV è la causa principale di HCC nella gran parte dei paesi del Nord Africa, America Settentrionale, Europa Occidentale, Australia e Giappone.[16]

In Italia fino al 66% dei pazienti con HCC è HCV positivo.[17, 18]

Ad oggi si ritiene che il rischio di HCC nei pazienti HCV + sia ben 17 volte più alto dei pazienti HCV negativi.[19]

A livello mondiale il 28% dei casi di cirrosi e il 26% dei casi di epatocarcinoma (HCC) sono riconducibili ad una infezione da virus C con una mortalità complessiva dovuta a queste due complicanze di circa 500.000 morti all'anno.[20]

Seppur in mancanza di studi di coorte prospettici di lunga durata, l'incidenza di HCC nei pazienti con infezione da HCV è di 1-3% dopo 30 anni dall'infezione.[21, 22]

Qualora l'infezione cronica sia esitata in cirrosi epatica, evenienza che si verifica nel 15-30% dei pazienti con infezione cronica da HCV[23], il rischio di HCC è del 2-4% all'anno con un picco di incidenza del 7% nel Giappone.[15, 24]

I principali fattori di rischio associati allo sviluppo di HCC HCV-correlato sono l'età > 55 anni, l'elevato consumo di alcol (>50 g/die), il sesso maschile, l'età avanzata al momento dell'infezione, il diabete, l'obesità, la coinfezione con HIV o HBV.[25, 26]

Dati recenti hanno dimostrato che, nei pazienti affetti da epatite cronica HCV correlata e fibrosi avanzata, l'elastografia epatica rappresenta da solo un fattore predittivo di HCC. In particolare i pazienti con stiffness epatica >25Kpa hanno un rischio aumentato di 1.8-2.7 volte rispetto ai pazienti con stiffness epatica <25 Kpa.[27]

Al contrario dati ottenuti dal gruppo di pazienti trattati con interferone hanno dimostrato che il trattamento antivirale e conseguente SVR riduce il rischio di epatocarcinoma.[17, 18, 23, 26, 28-31]

Tale dato, derivante da studi osservazionali o trial clinici non randomizzati, necessita di ulteriore conferma in quanto tali risultati non includevano i pazienti con epatopatia più avanzata per i quali il rischio di HCC è più alto. Pertanto ulteriori dati che includano tale categoria di pazienti è necessaria per escludere il rischio di sovrastima del beneficio derivante dal trattamento.

I dati di sopravvivenza media dopo diagnosi di epatocarcinoma sono variabili in quanto essa è strettamente legata alle condizioni cliniche di base e quindi allo stadio dell'epatopatia cronica al quale si

sovrappone la neoplasia nonché allo stadio della neoplasia al momento della diagnosi.

In generale, ad eccezione delle forme di HCC che complicano la cirrosi epatica HBV-correlata per la quale la sopravvivenza è ridotta rispetto alle altre cause [32-35], la sopravvivenza media dei pazienti con epatocarcinoma è del 20-65% ad un anno, del 10-30% a 3 anni e del 10-20% a 5 anni.[36]

In questo gruppo è chiaramente possibile distinguere i pazienti con percentuale di sopravvivenza massima (70%) a 5 anni qualora la lesione sia unica e sia suscettibile di resezione o trapianto epatico e pazienti con sopravvivenza media inferiore ad un anno perché affetti da HCC multifocale e/o metastatizzato per i quali è indicata la sola terapia palliativa. [37, 38]

Allo stesso modo è possibile documentare tassi di sopravvivenza maggiori nei pazienti con cirrosi CHILD A e minori nei pazienti con cirrosi CHILD C [39, 40]

In generale lo stadio della patologia epatica di base è determinante nella storia dell'evoluzione dell'epatocarcinoma in quanto il tempo di raddoppiamento della neoplasia (dai 70 ai 216 giorni) [40-44] è tale per cui l'applicazione dei protocolli di trattamento risolutivi è garantito se il paziente è correttamente sottoposto alla sorveglianza semestrale come indicato dalle linee guida europee. [45]



## 3.2 LE INTERLEUCINE E I FATTORI DI CRESCITA

### 3.2.1 Le interleuchine proinfiammatorie e anti-infiammatorie

Il termine citochine indica genericamente un ampio gruppo di molecole coinvolte nella comunicazione intercellulare e prodotte durante la risposta immune innata e adattativa. Inizialmente definite linfochine o monochine sono state successivamente definite citochine per indicare più correttamente che tutte le cellule nucleate sono in grado di produrle e di rispondere ad esse.

In più occasioni sono state considerate molecole a funzione similormonale ma attualmente non sono annoverate in questa categoria perché a differenza degli ormoni non sono secrete da una specifica tipologia cellulare e soprattutto non sono secrete in modo costitutivo ma solo in risposta a precisi segnali cellulari.[46]

Le citochine, proteine o glicoproteine con peso molecolare compreso tra 8 e 40.000 Dalton, comprendono:

- le interleuchine (IL)
- gli interferoni (IFN)
- i fattori stimolanti le colonie (CSF)
- le chemochine
- il tumor necrosis factor (TNF $\alpha$  e  $\beta$ )
- il transforming growth factor (TGF $\beta$ )

A seconda della loro funzione di attivazione della risposta infiammatoria o di controllo della risposta flogistica le citochine si dividono in *proinfiammatorie* e *antiinfiammatorie*.

Nel primo gruppo sono comprese l'interleuchina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuchina 2 (IL-2), l'interluchina 6 (IL-6), TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , mentre

rientrano nel gruppo delle citochine antiinfiammatorie l'interleuchina 4 (IL-4) e 10 (IL-10).

Di seguito saranno trattate le seguenti interleuchine: IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-alfa.

### 3.2.1.1 L'interleuchina 6

*Struttura e recettore.* L'interleuchina 6, chiamata anche IFN- $\beta$ 2 (IFNB2) o fattore di differenziazione dei linfociti B o B-cell stimulatory factor (BSF2) o hepatocyte stimulatory factor (HSF) o hybridoma growth factor (HGF) è stato identificato per la prima volta come fattore di differenziazione dei linfociti B [47] e solo successivamente considerata come citochina a funzione pleiotropica ovvero di regolazione della risposta immune, della fase acuta, della flogosi e dell'emopoiesi.

È una proteina di 212 aminoacidi che nella fase di maturazione prevede la possibilità di glicosilazione in due differenti siti, condizione che determina la secrezione di due isoforme della stessa proteina, una di 19 kD l'altra di 26 kD. [48]

La trasduzione del segnale prevede il legame al recettore IL-6R che è prodotto nelle due forme, solubile e transmembrana.[49]

La forma transmembrana, dopo legame dell'IL-6, recluta un secondo elemento fondamentale per la trasmissione, gp130, con formazione del complesso necessario alla trasduzione del segnale. La forma solubile, invece, lega IL-6 e successivamente recluta l'unità gp130 con conseguente innesco di multipli segnali intracellulari che vengono definiti "IL-6 trans-signaling".

Affinche il segnale venga trasdotto è necessario che un macrocomplesso costituito da due molecole di IL-6, due recettori per IL-6 e due molecole di gp130 si formi.

Mentre l'espressione del gp130 è ubiquitaria [50], il recettore per l'interleuchina 6 è espresso solo sugli epatociti e su alcuni specifici sottogruppi di linfociti (linfociti B e T).

*Cellule produttrici e cellule bersaglio.* L'interleuchina 6 è prodotta dopo attivazione di numerosi tipi cellulari ovvero linfociti T, linfociti B, granulociti, cellule della muscolatura liscia, eosinofili, condrociti, osteoblasti, mastcellule, cellule gliali e cheratinociti anche se in corso di flogosi sistemica la gran parte della produzione dell'interleuchina 6 è dovuta a cellule endoteliali, fibroblasti, monociti e macrofagi.

LPS, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e GM-CSF rappresentano il principale trigger alla produzione di IL-6 da parte dei monociti/macrofagi mentre il principale controllo negativo sulla produzione della citochina da parte delle stesse cellule è svolto dai glucocorticoidi.

I fibroblasti sono in grado di produrre IL-6 a seguito di stimolazione mediata da IL-1 $\alpha$ , batteri, miceti, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\alpha$ .

Le principali cellule bersaglio dell'interleuchina 6 sono gli epatociti, i linfociti T e B e le cellule ematopoietiche.

*Ruolo nell'immunità.* L'IL-6 è in grado di svolgere numerose funzioni. Innanzitutto è in grado di regolare il processo di differenziazione dei leucociti nonché l'attivazione degli stessi. Nei modelli animali con delezione del gene per IL-6 il reclutamento dei neutrofili presso i siti di infiammazione o infezione è inibita.[51]

In vitro l'interleuchina 6 ha dimostrato una potente attività di stimolo alla secrezione di numerose chemochine quali CXCL5, CXCL6, CCL2, and CCL8.[52]

Oltre al reclutamento di neutrofili e cellule mononucleate, l'interleuchina 6 regola il processo di infiltrazione dei linfociti T mediante la secrezione di chemochine (CXCL10, CCL4, CCL5, CCL11, and CCL17) e mediante l'espressione dei loro recettori (CCR3, CCR4, CCR5, and CXCR3) presenti sulle cellule CD3<sup>+</sup>. Ulteriore ma non meno importante funzione è la regolazione dell'espressione delle ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) e delle VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1). La produzione di IgM, IgG e IgA è inoltre indotta nei linfociti B dall'interleuchina 6 come pure la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule. [53]

IL-6 è in grado di guidare la differenziazione dei macrofagi e la maturazione dei megacariociti.

Svolge infine un importante ruolo nella osteoclastogenesi e nel riassorbimento osseo.

È coinvolta nel reclutamento delle cellule mesenchimali vascolari, nella neoangiogenesi, nella proliferazione dei fibroblasti sinoviali nel rimaneggiamento cartilagineo.[54]

L'interleuchina 6 funge da trigger negli epatociti per la sintesi delle proteine di fase acuta. [55] Essa è infatti in grado di indurre la sintesi di fibrinogeno, ceruloplasmina, aptoglobina, alfa1glicoproteina acida alfa1antitripsina, proteina c reattiva e del complemento.

Ha un effetto inotropo negativo sul cuore ed ha una funzione trofica sulle cellule neuronali colinergiche nonché di stimolazione sulla sintesi di ormone adrenocorticotropo.

In considerazione del ruolo svolto nell'immunità, la disregolazione nella produzione di questa citochina è correlata a numerose patologie

autoimmuni e infiammatorie. L'ipotesi che l'IL-6 potesse svolgere funzioni regolatorie sull'immunità deriva dalla osservazione di manifestazioni autoimmuni nei pazienti con mixoma cardiaco, neoplasia in grado di produrre IL-6.[56]

Successivamente è stato dimostrato che l'IL-6 è coinvolta nelle neoplasie ematologiche della linea B cellulare, nel lupus eritematoso sistemico[57], nella malattia di Castleman, nel mieloma multiplo,[58] nelle artriti [59, 60] e nell'encefalomielite autoimmune sperimentale [61]

Alcune evidenze sperimentali hanno dimostrato un possibile ruolo nella patogenesi del diabete mellito insulino-dipendente e nella psoriasi.[62]

I pazienti con allergia hanno infine aumentati livelli di recettore solubile per IL-6 nelle vie aeree rispetto ai soggetti sani.[63]

### 3.2.1.2 L'interleuchina 8

*Struttura e recettore.* L'interleuchina 8 (IL-8) è stata identificata per la prima volta nel 1987, quando un fattore chemiotattico con azione selettiva su neutrofili è stato purificato dal medium di monociti stimolati con LPS. [64]

Successivamente è stato classificato quale membro della famiglia delle chemochine CXC e denominato CXCL8 o IL-8.

Il gene che codifica per IL-8 è localizzato sul cromosoma 4 in un cluster genico che include altri 10 membri della famiglia delle chemochine.[65]

IL-8 è prodotta sotto forma di precursore proteico di 99 aminoacidi non glicosilato. Le successive modifiche strutturali prevedono il clivaggio di sequenze di aminoacidi tali per cui la proteina finale sia prodotta come multiple isoforme: i monociti producono prevalentemente un'isoforma di 72 aminoacidi con peso molecolare di 8.3 kD mentre le cellule endoteliali producono prevalentemente l'isoforma costituita da 77 aminoacidi. In soluzione IL-8 forma omodimeri ed è una proteina basica resistente alle peptidasi plasmatiche e al calore ma rapidamente inattivata dalla rottura dei ponti disolfuro. Essa non presenta omologia con le altre citochine mostrando invece notevole similitudine con le chemochine CX quali la platelet basic protein (CXCL7), l'IFN- $\gamma$ -inducible protein-10 (CXCL10), e il platelet factor 4 (CXCL4). [66]

*Cellule produttrici e cellule bersaglio.*

L'interleuchina 8 esplica la sua azione mediante legame con due tipi di recettori, il IL-8RA (CXCR1, CDw128a) e il IL-8RB (CXCR2, CDw128b) entrambi espressi sui neutrofili, monociti, linfociti, cellule NK e mastcellule.[67, 68]

Entrambi i recettori appartengono alla famiglia dei recettori delle chemochine CXC e sono caratterizzati dalla presenza nella loro struttura di 7 domini transmembrana e dalla trasduzione del segnale che vede il coinvolgimento delle proteine G.

I recettori CXCR1 e CXCR2 formano omodimeri ed eterodimeri durante la sintesi e maturazione proteica nel reticolo endoplasmatico, prima della traslocazione sulla superficie cellulare.

Sia gli omodimeri che gli eterodimeri hanno stessa affinità per IL-8.  
[69]

*Ruolo nell'immunità.* Numerose tipologie cellulari sono in grado di produrre IL-8 tra cui monociti, macrofagi, neutrofili, linfociti, cellule endoteliali ed epiteliali, fibroblasti, cheratinociti, cellule sinoviali, condrociti, epatociti, cellule della muscolatura liscia e striata nonché numerose tipologie di neoplasie. [70]

La sintesi di IL-8 è generalmente indotta da IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , o LPS, ma anche da acido retinoico, zinco e ossido nitrico sono in grado di stimolarne la produzione. La sua espressione è attivata durante le infezioni virali e dai batteri gram positivi e gram negativi.



### *Ruolo nell'immunità.*

La principale funzione svolta da IL-8 è il reclutamento dei neutrofilo nel sito di infezione o danno. [66] Tale effetto è dimostrato già dopo 30 minuti e persiste tale fino a 6 ore.[71]

Oltre al reclutamento l'IL-8 è in grado di attivare i neutrofilo affinché essi producano i derivati tossici dell'ossigeno, affinché rilascino enzimi lisosomiali e peptidi ad azione antimicrobica e infine affinché esprimano molecole di adesione cellulare quali ad esempio il leukocyte functioning antigen-1 e il CD11b.

Oltre che sui neutrofilo, IL-8 è in grado di svolgere azione chemiotattica su cellule NK, linfociti T, basofilo ed eosinofilo.[72]

In presenza di IL-3, l'interleuchina 8 è in grado di stimolare il rilascio, da parte dei basofilo, di leucotrieni e istamina.

Queste funzioni sottolineano, in sintesi, il ruolo fondamentale svolto da IL-8 nella difesa contro i patogeni.

Oltre alla funzione chemiotattica l'interleuchina 8 svolge una importante funzione di stimolo sul rilascio nel circolo, dal midollo osseo, delle cellule progenitrici ematopoietiche. [73]

I neutrofilo attivati dalla citochina, infatti, rilasciano rapidamente metalloproteinasi con conseguente clivaggio della matrice extracellulare alla quale le cellule staminali ematopoietiche sono adese. [74]

L'interleuchina 8 è fortemente espressa dalle cellule endoteliali, dalle cellule neoplastiche e dai macrofagi.

Si suppone che la sua attività angiogenetica sia mediata in modo autocrino e paracrino mediante legame e attivazione del CXCR2 espresso sulle cellule endoteliali.[75]

L'attivazione di quest'ultimo determina un aumento della sopravvivenza cellulare e la proliferazione delle cellule endoteliali con effetto finale lo sviluppo di una nuova rete vascolare.

Nelle cellule neoplastiche inoltre IL8 induce la produzione di metalloproteinasi, serin e cistein-proteasi capaci di degradare la matrice cellulare e la membrana basale con conseguente ridotta adesione cellulare, migrazione delle cellule neoplastiche e disseminazione sistemica. A tal proposito è interessante notare come le concentrazioni di IL-8 sono direttamente correlate con la densità vascolare intratumorale e inversamente correlate con la sopravvivenza delle cellule neoplastiche. [76, 77]

### 3.2.1.3 L'interleuchina 10

*Struttura e recettore.* L'interleuchina 10 (IL-10) è stata descritta per la prima volta nel 1989 quale fattore prodotto dalle cellule TH2 e capace di inibire la produzione di interferone gamma e altre citochine di origine TH1 nel modello murino.[78]

In ogni caso nell'uomo l'IL-10 è prodotta principalmente dalle cellule TH2, TH1 e dalle cellule Treg.

Il gene che codifica per l'IL-10 è localizzato sul cromosoma 1 (1q31-32)[79]. La sua struttura è altamente conservata e consiste di 5 esoni e 4 introni. L'IL-10 ha un peso molecolare di 18 KD ed è secreta sotto forma di omodimeri costituiti da 2 subunità di 178 aminoacidi. [80, 81]

L'interleuchina 10 si lega ad un complesso recettoriale tetramerico che appartiene alla famiglia del recettore dell'IFN e che è costituito da 2 catene IL-10R1 e due catene IL-10R2. [82]

La catena IL-10R1 è espressa sui linfociti T e B, sulle cellule NK, monociti, mastcellule e cellule dendritiche mentre la catena IL-10R2 è ubiquitaria.[83]

IL-10 è in grado di legare IL-10R1 con alta affinità mentre non interagisce direttamente con IL-10R2.[84]

Nonostante IL-10R2 non sia in grado di interagire direttamente con IL-10 e non sia da solo in grado di attivare la trasduzione del segnale, esso è essenziale per la trasduzione del segnale come dimostrato nel modello animale murino IL-10R2<sup>-/-</sup> che sviluppa un fenotipo simile a IL-10<sup>-/-</sup> ovvero caratterizzato da colite cronica. [85]

Il legame di IL-10 al dominio extracellulare di IL-10R1 è in grado di

attivare Jak1 e Tyr2 che a loro volta fosforilano i residui di tirosina Y427 e Y477 (nel modello murino) oppure Y446 e Y496 (nel modello umano) del dominio intracellulare di IL-10R1.[86]

A sua volta la tirosina fosforilata è in grado di legare STAT3 che lega IL-10R1 per essere fosforilato e rilasciato. In questo modo STAT3 omodimerizza o dimerizza con STAT1 o STAT5. [86]

I dimeri così formati traslocano nel nucleo dove legano le regioni promoter dei geni responsivi a IL-10. STAT3 è essenziale per gli effetti antiinfiammatori di IL-10 come mostrato da un modello sperimentale caratterizzato da delezione di stat3 in macrofagi e neutrofili con conseguente abolizione completa della produzione di citochine antiinfiammatorie e alta suscettibilità a shock endotossico ed enterocolite cronica. [87]

#### *Cellule produttrici e cellule bersaglio*

Nell'uomo la fonte principale di IL-10 sono i monociti, i linfociti T (principalmente le cellule Treg), i linfociti B, i macrofagi e le cellule dendritiche.[83]

Recentemente è stato inoltre dimostrato che anche le mastcellule sono in grado di produrre IL-10 e pertanto di limitare l'infiltrato di leucociti e la flogosi nelle dermatiti da contatto o nell'irradiazione cronica da UVB.[88]

L'espressione del gene per IL-10 è controllata dai fattori di trascrizione ubiquitari Sp1 e Sp2 e dalla presenza di multiple copie di sequenze destabilizzanti l'mRNA presenti nella regione 3' del IL-10 mRNA.[89, 90]

Questi dati suggeriscono che il gene per IL-10 è ubiquitariamente

trascritto e che la reale produzione dipende da segnali post-trascrizionali.

È stato dimostrato in modelli murini che l'IL-27 è un importante induttore dell'espressione di IL-10 nelle cellule T e che l'assenza del suo recettore (IL-27r1<sup>-/-</sup>) sia in grado di bloccare la produzione di cellule TH1 capaci di produrre IFN gamma e IL-10.[91]

Oltre alla IL-10 prodotta dalle cellule, molte proteine definite vIL-10 con sequenza omologa all'IL-10 sono state identificate nel genoma di herpesvirus, poxvirus e cytomegalovirus. Queste proteine sono in grado di legare il recettore di IL-10 e pertanto di indurre simile risposte. [92]

Pertanto i virus che esprimono proteine omologhe all'IL-10 umana con maggiore probabilità evadono la risposta immune attraverso la soppressione della risposta antivirale.

#### *Ruolo nell'immunità*

L'interleuchina 10 è un regolatore chiave della flogosi. Il suo effetto immunosoppressivo previene l'eccessiva risposta infiammatoria in risposta a stimoli quali infezioni microbiche o in corso di malattie autoimmuni. La sua funzione principale è limitare, nei macrofagi e nelle cellule dendritiche, la produzione di citochine e chemochine indotte dagli agonisti del TLR, principalmente LPS. Inoltre modula la funzione di monociti/macrofagi mediante down-regulation dell'espressione delle molecole di MHC di classe II e delle molecole di costimolazione CD80/CD86 su queste cellule.[93]

L'interleuchina 10 inoltre inibisce l'espressione di numerose citochine tra cui IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, e TNF-a, di

chemochine incluse la monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, MCP5, macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, MIP1b, RANTES, IL-8, e della IFN-g-inducible protein 10 (IP-10) e dei recettori delle chemochine.[93, 94]

IL-10 inibisce la proliferazione delle cellule T CD4+ mediante azione indiretta sulle cellule presentanti l'antigene (APCs).[93, 94] e mediante azione diretta da inibizione di CD28 e ICOS (Inducible T-cell COStimulator).[95]

Se da un lato l'azione della IL-10 è prevalentemente inibitoria sulla flogosi, dall'altro lato IL-10 è in grado di indurre l'espressione di MHC di classe II e di stimolare la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule [96] anche se nei topi il-10-/- le concentrazioni di immunoglobuline appaiono conservate.[97]

In virtù della sua funzione immunoregolatoria, l'interleuchina 10 svolge un ruolo protettivo in numerose patologie autoimmunitarie tra cui LES, artrite reumatoide e diabete mellito. È stata infatti dimostrata una correlazione tra i livelli sierici di IL-10 e la severità del LES così come il trattamento con anticorpi monoclonali anti IL-10 ha dimostrato un miglioramento degli outcome.[98]

### **3.2.1.4 Il Tumor Necrosis Factor (TNF)**

#### *Struttura e recettore*

Il TNF alfa, identificato per la prima volta trent'anni fa quale fattore prodotto da linfociti e macrofagi capace di indurre lisi delle cellule neoplastiche [99, 100] è prodotto come precursore transmembrana (233 aminoacidi con peso molecolare di 26kD) ed espresso principalmente sulla superficie cellulare di macrofagi e linfociti.

Dopo essere stato processato da una metalloproteinasi chiamata TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) o ADAMT17, la forma solubile di 157 aminoacidi (17kD) è rilasciata in sede extracellulare. La componente transmembrana che permane dopo clivaggio è dapprima processata dal SPPL2b e successivamente, dopo traslocazione nel nucleo, essa è in grado di svolgere attività di induzione sulla trascrizione di nuove molecole di TNF.

Sia la forma solubile che transmembrana sono presenti sotto forma di omotrimeri ed entrambi sono in grado di legare i recettori del TNF alfa ovvero il TNF-R1 anche conosciuto come TNFRSF1A o CD120a e il TNF-R2 denominato anche TNFRSF1B o CD120b.

Entrambi i recettori sono in grado di trasdurre il segnale intracellulare e mediare quindi gli effetti pleiotropici del TNF alfa.[101, 102]

Affinchè il segnale venga trasdotto è tuttavia necessario che omotrimeri di TNF leghino omotrimeri di TNFR.[103]

Tuttavia mentre TNF-R1 è espresso ubiquitariamente e può essere attivato sia dal TNF solubile che dalla forma transmembrana il TNF-R2 è espresso solo su neuroni, sulle cellule del sistema immunitario e

sulle cellule endoteliali ed è attivato principalmente dalla forma transmembrana del TNF.[104]

Gli effetti legati all'attivazione di TNF-R1 sono differenti rispetto a quelli evocati dall'attivazione del TNF-R2 in quanto il primo è coinvolto nella trasduzione di segnali intracellulari che esitano in flogosi, degenerazione tissutale, apoptosi o necroapoptosi mentre l'attivazione del TNF-R2 media effetti correlati all'omeostasi quali rigenerazione tissutale e sopravvivenza cellulare e non è in grado in attivare segnali di morte cellulare [104, 105]

#### *Cellule produttrici e cellule bersaglio*

Le principali cellule produttrici di TNF alfa sono i macrofagi e i linfociti mentre cellule target sono i linfociti T, macrofagi, linfociti B, monociti, NK e cellule endoteliali.

#### *Ruolo nell'immunità*

Se da un lato il fattore di necrosi tumorale alfa è un'importante citochina implicata nel contenimento dell'infezione locale, dall'altro è in grado di indurre shock quando rilasciata sistemicamente.

L'importanza di TNF-alfa nel contenere le infezioni locali si può osservare in esperimenti in cui modelli animali infettati localmente limitano l'infezione alla sede di inoculo del batterio mentre l'aggiunta di anticorpi anti TNF determina diffusione sistemica della flogosi.

Inoltre quando l'infezione ha raggiunto il circolo sistemico lo stesso meccanismo tramite cui TNF alfa controlla le infezioni locali può avere degli effetti catastrofici. Quando, infatti, l'infezione ha diffusione sistemica, ovvero in caso di sepsi, si verifica il rilascio di TNF alfa da parte dei macrofagi di milza e fegato. Questo evento



determina vasodilatazione e perdita di volume plasmatico, aumentata permeabilità vascolare e quindi shock. Topi con recettore mutante per TNF alfa sono resistenti allo shock settico ma contemporaneamente sono incapaci di controllare le infezioni locali.

Il contenimento dell'infezione è dovuto all'aumentata permeabilità vascolare locale con aumentato rilascio di proteine in sede locale, aumentata migrazione di macrofagi e linfociti nel tessuto sede di infezione e all'aumentata adesione delle piastrine alla parete dei vasi sanguigni. Questi eventi favoriscono la fagocitosi dei batteri, l'occlusione dei vasi locali e il drenaggio di cellule e plasma ai linfonodi locali con rimozione dell'infezione e sviluppo di immunità acquisita. Nel caso in cui l'infezione raggiunga il circolo sistemico, il massivo rilascio di TNF alfa da parte dei macrofagi attivati e presenti in sede epatica e splenica agisce mediante gli stessi meccanismi descritti poc'anzi ma stavolta con effetti su tutti i vasi sistemici esitando in ultimo in shock e coagulazione vascolare disseminata quest'ultima a sua volta causa di danno multiorgano e morte.

Il TNF alfa, così come IL-1 e IL-6 è in grado di attivare la risposta di fase acuta. Può infatti fungere da pirogeno endogeno. Questo evento mira a ridurre con le alte temperature la crescita dell'agente patogeno nonché a migliorare la risposta dell'ospite. Ad alte temperature infatti le cellule dell'ospite mostrano una maggior "protezione" dagli effetti del TNF alfa.

La risposta di fase acuta inoltre è caratterizzata da secrezione da parte del fegato di proteine quali proteina C reattiva o lecitina legante

mannani in grado di attivare il complemento e di opsonizzare l'agente patogeno.

Il TNF alfa è inoltre in grado di esplicare effetti di aumentata permeabilità sull'endotelio del midollo osseo, processo in grado di mobilizzare neutrofilo coinvolti in ultimo nella fagocitosi. Recettori per il TNF sono infine presenti sulle cellule adipose e muscolari, con lo scopo di aumentare il rilascio di proteine e lipidi necessari all'aumento della temperatura corporea, e sulle cellule dendritiche. Quest'ultimo effetto è in grado di stimolare la migrazione delle cellule stesse verso i linfonodi nonché in grado di indurre la loro maturazione con lo scopo di stimolare la risposta adattativa.[106]

### **3.2.2 I fattori di crescita**

I fattori di crescita, generalmente considerati un subset di citochine, sono proteine implicate nella trasduzione del segnale cellulare e in grado di determinare quale effetto ultimo la stimolazione della crescita cellulare, la differenziazione, la sopravvivenza e la riparazione tissutale. In condizioni fisiologiche numerosi fattori di crescita sono richiesti per il mantenimento della proliferazione e vitalità cellulare.

I fattori di crescita esercitano la loro funzione in modo endocrino, paracrino o autocrino.

La loro azione è mediata da specifici recettori espressi sulla superficie di cellule target e il loro rilascio avviene in modo strettamente controllato.

Benché i singoli fattori presentino uno o più bersagli cellulari preferenziali, i loro effetti sono generalmente caratterizzati da spiccato pleomorfismo su molteplici tipi cellulari.

La maggior parte dei fattori di crescita è presente nei liquidi intercellulari a basse concentrazioni ed agisce esclusivamente a breve distanza (meccanismo paracrino). Il legame dei fattori di crescita a specifiche proteine della matrice extracellulare o alla superficie di cellule stromali ne incrementa la concentrazione locale e ne favorisce la presentazione alle cellule che esprimono il recettore specifico. In alcuni casi, i fattori di crescita si comportano come dei veri e propri ormoni ed agiscono a distanza (meccanismo endocrino) come nel caso dell'eritropoietina. Talora il fattore di crescita è prodotto dalle stesse cellule che ne esprimono il recettore (meccanismo autocrino). I

recettori possono essere localizzati sia sulla membrana cellulare sia all'interno della cellula. Ogni cellula, in genere, possiede poche centinaia di molecole recettoriali ad elevata affinità e specificità. I recettori per i segnali extracellulari coinvolti nella proliferazione cellulare sono classificati in a) *recettori ad attività enzimatica intrinseca*; b) *recettori associati a proteine con attività enzimatica*; c) *death receptors*; d) *recettori nucleari*.

Di seguito saranno affrontati il fattore di crescita epidermico (EGF) appartenente al gruppo dei recettori ad attività enzimatica intrinseca e il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF).[107]

### **3.2.2.1 Il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF)**

L'esistenza di fattori angiogenetici è stata ipotizzata per la prima volta in seguito alla risposta neovascolare indotta da trapianto di tessuti neoplastici in tessuti sani.[108]

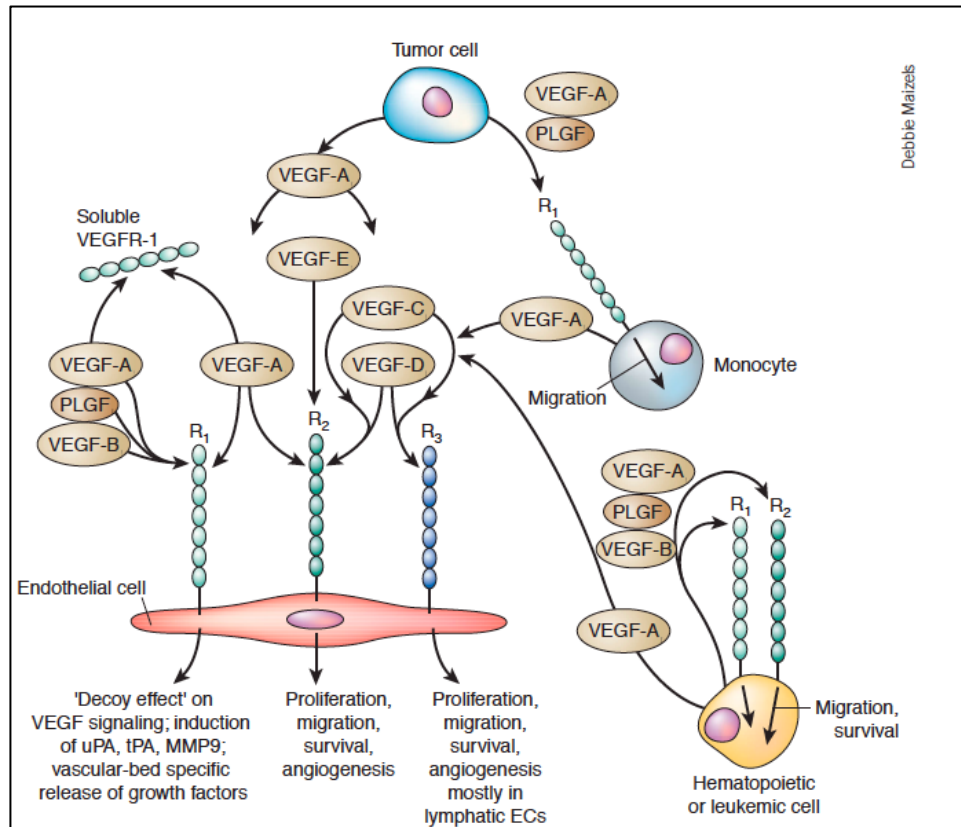
Da successive evidenze sappiamo che la neoangiogenesi è un processo complesso che prevede il coinvolgimento di numerosi ligandi e recettori ma che vede nel segnale indotto dal VEGF una tappa fondamentale e imprescindibile.[109]

La famiglia del VEGF (VEGFs) include il VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e il placental growth factor (PLGF).

I VEGFs svolgono un ruolo fondamentale nella funzione e sviluppo di numerosi organi in primis sistema nervoso centrale, rene, fegato e polmone.[110]

I VEGFs legano con alta affinità i recettori VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 espressi sulle cellule endoteliali.

I tre recettori differiscono per la modalità di attivazione, per la cascata del segnale intracellulare e per gli effetti biologici (Figura 1).[110]



**Figura 1: Ruolo dei recettori del VEGF.** VEGFR1 e VEGFR2 sono espressi sulla superficie delle cellule endoteliali. VEGFR3 è espresso invece prevalentemente sulle cellule endoteliali del sistema linfatico. VEGFA lega i recettori VEGFR1 e VEGFR2, al contrario VEGFRB interagisce solo con VEGFR1. VEGFC e VEGFD legano VEGFR2 e VEGFR3. Il recettore VEGFR2 è implicato nella mitogenesi e sopravvivenza delle cellule endoteliali nonché nella angiogenesi e permeabilità microvascolare. Il VEGFR1 non è implicato nella mitogenesi delle cellule endoteliali ma nello sviluppo embrionale e nella chemiotassi dei monociti. Infine VEGFR1 e VEGFR2 sono implicati nella chemiotassi e sopravvivenza delle cellule staminali ematopoietiche.

Il principale recettore, tra quelli menzionati, è il VEGFR2 mentre all'interno della famiglia dei VEGFs, il VEGFA è il fattore vascolare chiave della neoangiogenesi essendo gli altri coinvolti prevalentemente nell'angiogenesi del sistema linfatico.[111]

Il gene del VEGFA è costituito da 8 esoni e 7 introni. Lo splicing alternativo determina la generazione di 4 differenti isoforme: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> costituiti rispettivamente da 121, 165, 189 e 206 aminoacidi. L'isoforma prevalente è la VEGF<sub>165</sub> che è in minima quota secreta nel circolo mentre in gran parte resta legata alla superficie cellulare e alla matrice extracellulare.[112, 113]

L'espressione genica del VEGF è regolata da 3 fattori ovvero tensione di ossigeno, fattori di crescita e oncogeni.

La tensione di ossigeno svolge un ruolo chiave nell'espressione di numerosi geni. È ormai noto che l'espressione di mRNA VEGF è indotta da esposizione a basse tensioni di ossigeno [114] e che il fattore HIF-1 (hypoxia-inducible factor) svolge un ruolo intermedio chiave tra ipossia e produzione di VEGF.[109]

Numerosi fattori di crescita tra cui EGF (epidermal growth factor), TGF alfa e beta, KGF (keratinocyte growth factor), FGF e il PDGF (platelet-derived growth factor) stimolano l'espressione del mRNA del VEGF. Inoltre altre interleuchine quali IL-1 e IL-6 sono in grado di stimolare la secrezione del VEGF.

Questa osservazione supporta l'ipotesi che il VEGF possa essere il mediatore dell'angiogenesi e dell'aumentata permeabilità nella flogosi.[115]

Multipli eventi infine possono esitare in una aumentata espressione del VEGF tra cui mutazioni oncogeniche o amplificazioni di *Ras* [116, 117]

Nel processo di attivazione del recettore del VEGF, il legame con il ligando determina la dimerizzazione (VEGFR2-VEGFR2) o eterodimerizzazione dei recettori (VEGFR1-VEGFR2 oppure VEGFR2- VEGFR3).

Sulla superficie delle cellule endoteliali il recettore VEGFR2 è presente in quantità dieci volte maggiore rispetto al recettore VEGFR1 [118] ma l'affinità recettoriale del VEGF-A per il VEGFR1 è maggiore rispetto al VEGFR2. [119]

Oltre alla via canonica di attivazione del recettore del VEGF mediante legame con il suo ligando, altri stimoli quali quello meccanico (shear stress) oppure ligandi quali le galectine, il lattato e le LDL sono in grado di attivare i recettori del VEGF.



### 3.2.2.2 Ruolo del VEGF in condizioni fisiologiche e patologiche

Il VEGF è un fattore di crescita fondamentale in condizioni fisiologiche quali lo sviluppo embrionale e nel periodo post-natale, lo sviluppo dell'apparato scheletrico, e nell'angiogenesi ovarica.

Modelli murini con inattivazione di un singolo allele del gene *Vegf* presentano precocissima letalità degli embrioni (in 11<sup>^</sup>-12<sup>^</sup> giornata).

Allo stesso modo la delezione di un allele *Vegf*<sup>+/-</sup> in embrioni è in grado di provocare numerose anomalie dello sviluppo quali alterata vascolarizzazione degli organi o numero marcatamente ridotto dei globuli rossi nelle lacune vascolari del sacco vitellino.

Il VEGF svolge inoltre un importante ruolo nelle prime fasi della vita post-natale. Infatti l'inibizione del segnale mediato dal VEGF determina elevati tassi di mortalità e anomalie di sviluppo degli organi, arresto della crescita e insufficienza renale. [120]

Lo sviluppo endocondrale, fondamentale per la crescita longitudinale delle ossa, è caratterizzato da condrociti ipertrofici che esprimono elevati livelli di mRNA del VEGF. La somministrazione di anticorpi monoclonali contro il VEGF determina un'alterata formazione di osso trabecolare.[121]

La cessazione del trattamento antiVEGF determina il ripristino del letto capillare e della crescita ossea.

La crescita dei follicoli ovarici e lo sviluppo del corpo luteo dipendono strettamente dalla presenza di vasi capillari. Al termine della loro formazione la rete vascolare regredisce suggerendo la

presenza di due azioni coordinate opposte ovvero di stimolo e inibizione dell'angiogenesi.[122]

La somministrazione di inibitori del VEGF determina mancata formazione del corpo luteo e ritardo nello sviluppo follicolare [123-126]

Condizioni patologiche strettamente correlate alla presenza di VEGF sono neoplasie solide o di interesse ematologico, neovascolarizzazione intraoculare, infiammazione e edema cerebrale, patologie correlate agli organi riproduttivi femminili.

Riguardo alle neoplasie solide sappiamo con certezza che mRNA di VEGF è fortemente espresso nei tumori e che anticorpi in grado di bloccare il VEGF determinano un potente effetto inibitorio sulla crescita nelle cellule neoplastiche. [127]

Nonostante le cellule neoplastiche stesse siano importante fonte di VEGF, le cellule dello stroma (macrofagi e fibroblasti) che circondano le cellule neoplastiche sono anch'esse importante fonte di VEGF.[128-130]

Neoplasie di interesse ematologico quali mieloma multiplo, linfoma a cellule T, leucemia linfoblastica acuta, linfoma di Burkitt, leucemia mieloide cronica esprimono VEGF e i recettori VEGFR1 e 2.

Diabete mellito, occlusione della vena centrale retinica, prematurità con conseguente esposizione a ossigeno sono condizioni in grado di indurre neoangiogenesi intraoculare che a sua volta può esitare in emorragie vitreali, distacco della retina, glaucoma neovascolare e cecità.

Il VEGF è considerato fondamentale in numerosi processi infiammatori. È fortemente espresso dai cheratinociti nelle ferite cutanee o nella psoriasi, condizioni caratterizzate da angiogenesi e aumento della permeabilità vascolare.[131]

Il VEGF è implicato nello sviluppo di edema cerebrale e aumentati livelli di VEGF e dei suoi recettori sono espressi nell'encefalo di ratto dopo ischemia cerebrale.[132]

Il blocco del VEGF in queste condizioni determina una riduzione dell'edema tessutale e una riduzione delle dimensioni dell'area infartuale.[133]

### **3.2.2.3 VEGF ed epatocarcinoma**

L'upregulation del VEGF rappresenta una tappa chiave nella neoangiogenesi neoplastica e l'epatocarcinoma è una neoplasia che con elevata frequenza si associa a ipervascolarizzazione.[134]

Da alcuni anni è ormai noto che le cellule di epatocarcinoma umano esprimono elevati livelli di VEGF, VEGFmRNA e VEGFR2 mRNA.[135-138]

Alcuni studi hanno infine dimostrato che l'espressione del fattore di crescita correla infine con l'attività proliferativa e con la neoangiogenesi tumorale.[139] Un altro aspetto particolarmente interessante è il ruolo del VEGF nella diffusione delle cellule neoplastiche e nella permeabilità vascolare.[134]

Il VEGF è in grado infatti di aumentare la permeabilità endoteliale paracellulare e di indurre una alterazione delle tight junction mediante legame con recettori quali Flk-1, Flt-1, VEGFR1 e VEGFR2 [140-142]e con conseguente attivazione del segnale cellulare mediante Src, ERK, MAP chinasi e PKC[143-146]. In particolare l'attivazione di PKC determina la defosforilazione della proteina occludina implicata nella corretta integrità delle tight junction epatocellulari e al tempo stesso in grado di promuovere segnali di angiogenesi e proliferazione cellulare.[134]

L'aumento della permeabilità vascolare indotta da VEGF è in grado, infine, di indurre lo stravasamento di fibrinogeno plasmatico con conseguente formazione di rete di una fibrina in grado di facilitare la migrazione cellulare e quindi la diffusione neoplastica.[147]

Questi dati sostengono l'ipotesi del ruolo chiave del VEGF nella diffusione neoplastica delle cellule di epatocarcinoma nonché fungono da razionale per l'utilizzo di farmaci in grado di bloccare il segnale indotto dal VEGF.

Dal punto di vista clinico sappiamo che oltre il 90% degli epatocarcinomi con diffusione metastatica esprime VEGF mentre le forme capsulate sono positive per la ricerca di VEGF solo nel 64% dei casi.[148]

Alcuni studi hanno dimostrato una correlazione quantitativa tra espressione di VEGF e intensità di segnale durante esami strumentali quali RM o TC addome [149-151] sostenendo clinicamente il dato di correlazione tra densità microvascolare, marcatore di neoangiogenesi tumorale, e livelli di VEGF [152, 153].

Alcuni autori hanno valutato la possibilità di utilizzare il VEGF quale marcatore di trasformazione neoplastica avendo identificato nei pazienti affetti da epatite cronica, cirrosi ed epatocarcinoma livelli rispettivamente e progressivamente crescenti[154].

Allo stesso modo livelli progressivamente crescenti di VEGF sono stati identificati nei pazienti con displasia di basso grado, alto grado ed HCC.[139]

Numerosi studi hanno affrontato il quesito della possibile influenza svolta dal VEGF sulle caratteristiche clinicopatologiche nonché sulla prognosi dei pazienti affetti da epatocarcinoma.

In uno studio condotto su 105 pazienti sottoposti a resezione epatica, coloro che avevano noduli VEGF positivi (circa il 70%) più frequentemente presentavano all'analisi istologica infiltrazione

capsulare, vascolare e metastatizzazione intraepatica nonché mediana della sopravvivenza più breve bassa rispetto ai pazienti con neoplasie VEGF negativi.[155]

L'espressione del VEGF è stato infine correlato ad un maggior rischio di recidiva nei pazienti sottoposti a resezione o ablazione.[156-159]

Oltre che all'espressione su campione istologico ad oggi sappiamo che i livelli sierici di VEGF correlano con l'espressione tumorale del VEGF e pertanto esso può essere utilizzato come valutatore indiretto di espressione cellulare di VEGF.[160]

Pertanto livelli di VEGF sierici risultano correlati allo stadio di malattia nonché a forme più aggressive di neoplasia.[148]

Pazienti con dimensioni della neoplasia maggiore di 2 cm hanno mostrato una mediana delle concentrazioni sieriche di VEGF più elevata rispetto ai pazienti con nodulo singolo < 2 cm.[161]

Pazienti con concentrazioni di VEGF >245 pg/ml hanno dimostrato una sopravvivenza inferiore rispetto al gruppo di pazienti con VEGF inferiore al cut off riportato. In tal senso alcuni autori hanno proposto l'utilizzo del VEGF quale marcatore diagnostico e prognostico.[134]

In merito al ruolo del VEGF quale strumento di screening, attualmente sono disponibili dati definitivi anche se la combinazione di VEGF e alfafetoproteina con valori soglia di 355 pg/ml e 20 ng/ml rispettivamente hanno dimostrato una sensibilità del 95% versus il 86% e 68% dei singoli test rispettivamente. [162]

#### **3.2.2.4 Il fattore di crescita epidermico (EGF)**

Il fattore di crescita epidermico è una proteina di 6 KDa e costituita da 53 aminoacidi, inizialmente isolata dalla ghiandola parotide, e successivamente identificata in numerosi tessuti e fluidi corporei (liquido amniotico, saliva, colostro, latte e urine).[163]

L'EGF è dotato di potente effetto mitogeno sulla gran parte dei tessuti epiteliali, fibroblasti, e cellule endoteliali.[164]

Esso è prodotto dai macrofagi attivati, cheratinociti e ghiandole salivari.[165]

Le prime evidenze suggerivano un effetto del EGF nella riparazione dei tessuti e risale agli anni '60 da esperimenti su conigli con ustioni corneali in trattamento con colliri a base di EGF estratto da ghiandole sottomandibolari di topo.[166]

Oltre all'EGF, la famiglia del fattore di crescita epidermico comprende il trasformino growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), l'heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), l'amfiregulina, l'epiregulina, betacellulina e la neuregulina.[167]

Tutti i suddetti fattori esibiscono attività mitogenica mediante legame su 4 differenti tipi di recettori (EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 ed HER4/ErbB4).[166]

Dopo legame con il ligando, la formazione di omodimeri EGFR/EGFR o di eterodimeri EGFR/HER2, EGFR/HER3 o EGFR/HER4 causa fosforilazione ATPasi dipendente di specifici residui di tirosina del dominio intracellulare del recettore EGFR, una glicoproteina transmembrana di 170 kDa. [166, 168]

Le due principali pathway intracellulari attivate da EGFR determinano essenzialmente proliferazione cellulare e citoprotezione. Questo significa che la stimolazione mediante agonisti di EGFR determina uno shift verso programmi cellulari volti alla mitosi e alla sopravvivenza cellulare e pertanto in ultimo aumento del numero della popolazione cellulare.

Un altro importante effetto, dovuto alla formazione del complesso EGF/EGFR è la stimolazione della migrazione delle cellule epiteliali e dei fibroblasti attraverso la fosforilazione e conseguente attivazione della fosfolipasi C $\gamma$ 1 e la cascata di ERK/MAP chinasi.[169]

Questo segnale indotto nei cheratinociti svolge una funzione fondamentale nella riepitelizzazione.[166]

Il recettore EGFR è espresso da numerose tipologie di cellule umane: fibroblasti, cellule endoteliali e cheratinociti.[170]

EGF ed EGFR sono inoltre overespressi in numerose neoplasie tra cui quella mammarie, polmonari ed epatiche.[171-173]

Il fattore di crescita epidermico può essere prodotto dalle cellule di epatocarcinoma in modo autocrino e paracrino e l'overespressione di EGF/EGFR nei pazienti con epatocarcinoma si associa ad una peggior prognosi.[168]

EGF è stato correlato alla sintesi di DNA, crescita cellulare e progressione nei pazienti affetti da HCC.[168]

Ed è stato infine associato allo sviluppo di flogosi nel sito della neoplasia anche se le pathway coinvolte non sono ancora chiare.

EGF è inoltre in grado di stimolare la produzione da parte delle cellule neoplastiche di numerosi fattori di flogosi tra cui IL-8, CXCL-12, IL-



6, e IL-1 che contribuiscono alla creazione del microambiente infiammatorio [174, 175] e al reclutamento di monociti, neutrofilii, e linfociti a loro volta poi in grado di indurre il rilascio di mediatori di flogosi. [176]

In ultimo ma non meno importante, la dimostrazione da parte di Huang et al che cellule neoplastiche di epatocarcinoma con caratteristiche di basso potenziale metastatico per effetto della stimolazione mediata da EGFR possono acquisire caratteristiche di elevato potenziale metastatico e pertanto di elevata invasività.[168]

### **3.3 I DIRECT-ACTING ANTIVIRALS (DAAS) E LA TERAPIA INTERFERON-FREE**

L'interferone associato a ribavirina è stato per decenni il trattamento gold standard per la cura dell'infezione cronica da virus C.

Il trattamento era caratterizzato da alta incidenza di effetti collaterali e da tassi di eradicazione virale, la cosiddetta risposta virale sostenuta o SVR, in media del 50% con percentuali di risposta inferiori nei pazienti portatori di HCV genotipo 1.[177, 178]

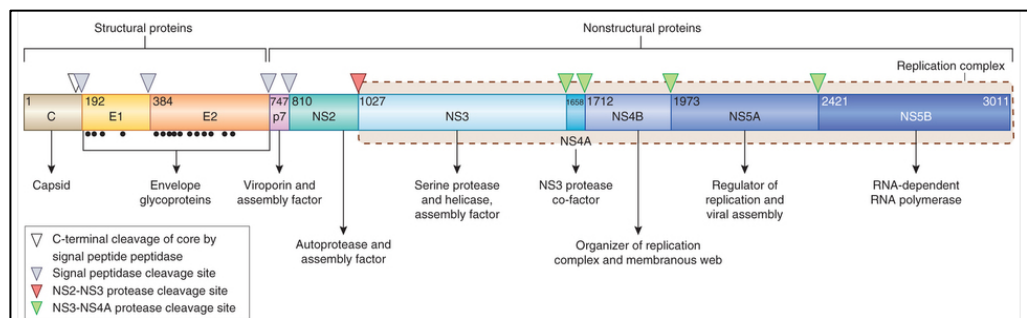
Il miglioramento della conoscenza del genoma virale e della struttura delle proteine virali ha portato allo sviluppo dei nuovi farmaci definiti antivirali diretti (Direct-acting antivirals o DAAs) i primi dei quali, boceprevir e telaprevir sono stati commercializzati in Europa a partire dal 2011. L'aggiunta dei nuovi farmaci al trattamento standard con interferone peghilato e ribavirina ha garantito un aumento del tasso di eradicazione virale fino al 70% [179, 180] pur in presenza di numerosi fattori limitanti il loro utilizzo in primis l'indicazione al trattamento del solo genotipo 1, la presenza di numerose interazioni farmacocinetiche e la necessità di assunzione di numerose compresse (fino a 18 al giorno) in aggiunta al trattamento con interferone peghilato. I numerosi effetti collaterali, oltre a quelli già riconducibili all'uso dell'interferone, e un elevato rischio di sviluppo di resistenze virali ne ha tuttavia limitato fortemente l'utilizzo e la necessità di nuovi trattamenti che non prevedessero il ricorso all'interferone e che avessero una maggiore gestibilità dei farmaci permaneva.

Nel Dicembre 2013 venne approvato un nuovo DAA di seconda generazione, il sofosbuvir, la cui immissione in commercio ha rivoluzionato del tutto la terapia dell'epatite C. Da allora infatti numerosi altri farmaci (simeprevir, ledipasvir, daclatasvir, paritaprevir, ombitasvir, dasabuvir) sono entrati a far parte dei protocolli di trattamento dell'epatite C con tassi di SVR di poco inferiori al 100%.

### 3.3.1 Farmacodinamica dei DAAs

Il genoma virale del virus HCV è costituita da 10 geni (C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). I geni C, E1 ed E2 codificano proteine strutturali. In particolare il gene C codifica il capside virale mentre E1 ed E2 codificano glicoproteine dell'envelope.[181]

I geni p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B codificano invece proteine non strutturali la cui funzione è riassunta sinteticamente nella Figura 2.



**Figura 2: Genoma del virus HCV e funzione delle proteine virali.**

La replicazione virale comprende una prima fase durante la quale viene prodotta un'unica lunga poliproteina virale dal cui clivaggio in siti specifici sono prodotte le 10 proteine, tre strutturali e sette non strutturali. Sono indicati i siti di clivaggio proteico che è operato da peptidasi cellulari (triangolo grigio), da NS3/NS4A (triangolo verde) oppure da autoclivaggio (triangolo in rosso), quest'ultimo mediato da NS2/NS3. Sono infine riportati per E1 ed E2 i siti di glicosilazione proteica (punti neri).

La replicazione virale prevede la sintesi di un'unica lunga poliproteina dal cui clivaggio sono prodotte le tre proteine strutturali e le sette proteine non strutturali.

I farmaci appartenenti alla classe dei DAAs hanno come target 3 proteine non strutturali ovvero NS3 e suo cofattore NS4A, NS5A e NS5B.

Le tre rispettive classi di farmaci sono quindi:

1. Inibitori del NS3/NS4A ovvero gli inibitori delle proteasi
2. Inibitori del NS5A ovvero del complesso di replicazione virale
3. Inibitori del NS5B ovvero inibitori delle polimerasi [182]

Il complesso NS3/NS4A è una serin proteasi ed è responsabile del clivaggio della poliproteina nelle dieci proteine strutturali.[183]

I primi DAAs ad essere approvati (e pertanto definiti DAAs di I generazione), boceprevir e telaprevir, appartengono a questa classe.

Numerose altre molecole appartenenti a questa classe sono state successivamente immesse in commercio. Esse definite DAAs di II generazione includono: simeprevir, paritaprevir, asunaprevir e grazoprevir.

Essi sono approvati per l'utilizzo nel genotipo 1 e presentano una bassa barriera genetica per cui richiedono l'associazione con altri farmaci dato l'alto rischio di resistenza.[182]

Inoltre il sito attivo degli inibitori della proteina NS3 non è altamente conservato nei genotipi diversi dal genotipo 1 per cui sono utilizzabili solo nel genotipo 1.[182] La loro attività svolge una potente azione antivirale, motivo per il quale nonostante le limitazioni di funzione sono conservati nei protocolli di trattamento interferon-free.

La proteina NS5A ha una funzione non chiaramente definita ma con certezza sappiamo che essa fa parte del complesso di replicazione virale ed è essenziale durante la fase di replicazione e di assemblaggio proteico virale.[183] Il meccanismo d'azione degli inibitori di NS5A si ritiene sia rappresentato dal blocco della formazione del complesso di replicazione virale mediante blocco della dimerizzazione dei complessi NS5A. Il primo inibitore del NS5A ad essere identificato è stato il daclatasvir seguito poi da ledipasvir e ombitasvir.[182]

Rispetto agli inibitori delle proteasi la loro funzione è garantita in tutti i genotipi virali ma come questi ultimi hanno una bassa barriera genetica per cui il loro utilizzo non è possibile in monoterapia.

La proteina NS5B è una RNA polimerasi-RNA dipendente fondamentale per la replicazione virale. [184]

Due sottoclassi di inibitori della polimerasi sono inclusi in questo gruppo di farmaci: gli inibitori nucleosidici e non nucleosidici. Gli inibitori nucleosidici dopo legame sul loro sito attivo determinano una interruzione nel processo di allungamento dell' RNA. Sono farmaci ad alta barriera genetica in quanto eventuali modifiche nella catena aminoacidica del sito attivo in corso di mutazioni virali, sono svantaggiose per la replicazione virale. Inoltre il sito attivo è altamente conservato tra i vari genotipi così da esse molecole ad attività pangenotipica.[185]

Il più importante membro di questa famiglia è il sofosbuvir, inizialmente approvato per il genotipo 2 e 3 e successivamente esteso anche al trattamento degli altri genotipi.

Gli inibitori non nucleosidici legano allostericamente siti diversi dal sito attivo determinando una modifica conformazionale della RNA polimerasi che impedisce l'allungamento della catena del nascente RNA. [184]

A causa del loro meccanismo d'azione, gli inibitori non nucleosidici del RNA polimerasi sono meno potenti rispetto ai nucleosidici e pertanto più suscettibili di sviluppare resistenze virali. A questo gruppo appartiene il dasabuvir.

### **3.3.2 Indicazioni al trattamento con DAAS**

Le linee guida della società europea (EASL) e l'Associazione italiana per lo studio del fegato (AISF) hanno stilato le nuove linee guida per la regolamentazione dell'accesso ai nuovi farmaci per la cura dell'epatite cronica dell'epatite C.[45, 186]

Attualmente, con limitazioni di carattere prettamente economico e legate ai criteri di rimborsabilità dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), le categorie di pazienti per i quali è rimborsato il trattamento antivirale sono:

1. Paziente con cirrosi CHILD-PUGH A o B e/o con HCC con risposta completa a terapie resettive chirurgiche o loco-regionali, non candidabili a trapianto epatico, nei quali la malattia epatica sia determinante per la prognosi
2. Pazienti con epatite ricorrente HCV-RNA positiva del fegato trapiantato in paziente stabile clinicamente e con livelli ottimali di immunosoppressione
3. Paziente con epatite cronica con gravi manifestazioni extra-epatiche HCV-correlate (sindrome crioglobulinemica con danno d'organo, sindromi linfoproliferative a cellule B)
4. Paziente con epatite cronica con fibrosi METAVIR F3 (o corrispondente ISHAK)
5. Paziente in lista per trapianto epatico con cirrosi MELD <25 e/o con HCC all'interno dei criteri di Milano con la possibilità di attesa in lista di almeno 2 mesi



6. Paziente con epatite cronica dopo trapianto di organo solido (non fegato) o di midollo con fibrosi METAVIR  $\geq 2$  (o corrispondente ISHAK)
7. terapia del paziente con epatite cronica con fibrosi METAVIR F0-F2 (o corrispondente ISHAK)

### **3.3.3 Rischio di epatocarcinoma nei pazienti sottoposti a trattamento antivirale con DAAs**

L'ampio utilizzo dei DAAs nella gran parte dei paesi europei ha consentito di ottenere su larga scala dati di efficacia, di cui già ampiamente discusso nelle precedenti sezioni, e soprattutto dati di safety.

Nell'Aprile 2016 Reig *et al.* ha riportato per la prima volta, durante la riunione annuale dell'International Liver Congress, i risultati di un'analisi su 58 pazienti con HCC anamnestico e sottoposti a trattamento antivirale con DAAs [6]. I pazienti, sottoposti a trattamento antivirale 11.2 mesi dopo resezione o ablazione di HCC, avevano presentato un alto tasso di recidiva (27.6%) entro i primi 6 mesi dopo la fine del trattamento antivirale con mediana temporale tra inizio del trattamento e diagnosi di recidiva di 3.5 mesi (1.1-8 mesi). Gli autori concludevano per un alto tasso di recidiva di epatocarcinoma verosimilmente non correlato all'azione oncogena diretta dei DAAs ma piuttosto legata alla potente attività antivirale dei farmaci, capaci pertanto di indurre una rapidissima scomparsa del virus dal circolo e un troppo rapido riassetto delle popolazioni linfocitarie con escape immunologico di eventuali cellule neoplastiche attive.

Da allora altri gruppi di ricerca hanno pubblicato dati osservazionali retrospettivi riguardanti il rischio di recidiva dopo trattamento con DAAs.

Conti *et al.*, riportando i primi dati italiani sul rischio di epatocarcinoma nei cirrotici con e senza anamnesi per pregressa

neoplasia epatica e concordando con i dati riportati da Reig, concludeva per alto rischio di recidiva di epatocarcinoma in pazienti precedentemente sottoposti a resezione, ablazione o chemioembolizzazione e assenza di una riduzione del rischio di insorgenza di HCC nei pazienti con anamnesi negativa per pregresso HCC [7]. Il rischio di recidiva non risultava correlato alla tipologia di trattamento antineoplastico a cui sono stati sottoposti i pazienti. L'intervallo tra trattamento tumorale e inizio della terapia antivirale era di 376 giorni (range: 45-2706) mentre il follow up a cui sono stati sottoposti dopo inizio della terapia DAAs era di 24 settimane.

Dall'altro lato il lavoro francese pubblicato dal gruppo di studio ANRS e basato sulla revisione di dati provenienti da tre coorti multicentriche per un totale di 660 pazienti con anamnesi per epatocarcinoma e trattati con DAAs non ha evidenziato un aumento del rischio[8]. In particolare nella prima coorte il 7% dei pazienti trattati con DAAs aveva riportato una recidiva vs il 47% nel gruppo dei pazienti non trattati; nella seconda coorte la recidiva era stata evidenziata nel 12.7% (24 pazienti di 189) dei trattati con DAAs e del 20.5% (16 pazienti di 78) nel gruppo dei non trattati.

Kozbial *et al* hanno riportato un aumento dell'incidenza di HCC annuale del 8% (vs 1% riportato nei pazienti con SVR dopo trattamento con interferone)[187].

I casi segnalati dal gruppo Austriaco sono stati 19 di cui 16 senza pregresso HCC. Gli autori concludevano per un aumento del rischio legato alla down regulation sulla trascrizione di geni quali recettori di IFN tipo II e III e di geni correlati all'interferone in grado di

controllare la crescita di cellule neoplastiche e il ruolo di miR-122 in grado di controllare l'epatocarcinogenesi e ridotta dopo trattamento con DAAs.

Zavaglia *et al.* ha riportato un unico caso di recidiva di HCC su 31 pazienti trattati e concludeva per assenza di aumentato rischio pur considerando, rispetto ai primi dati riportati da Reig, un più lungo intervallo temporale tra trattamento locoregionale e inizio della terapia (mediana di 19 mesi)[188].

Yang *et al* ha incluso 112 pazienti in lista per OLT e ha registrato un rischio di recidiva di HCC più elevata nel gruppo di pazienti sottoposti a terapia con DAAs (5 di 18 pazienti pari al 27.8% dei trattati) se comparati al gruppo dei non trattati (6 di 63 pazienti ovvero il 9.5%).

I cinque pazienti che hanno presentato la recidiva di HCC avevano metastasi extraepatiche (polmone, surrene, mediastino)[189].

Lo studio di Cardoso *et al.* ha coinvolto 54 pazienti con anamnesi negativa per HCC. Quattro pazienti hanno sviluppato entro 7 mesi dalla negativizzazione virale un HCC ovvero il 7% versus 1.2-1.4% dei pazienti trattati con interferone[190].

Minami *et al* ha riportato un rischio di HCC non aumentato nel gruppo dei trattati con DAAs se comparati ai pazienti trattati con interferone e al gruppo dei non trattati. Infatti il rischio di HCC è stato ad un anno del 21.1%, 26.3% e del 30.5% nel gruppo DAAs, interferone e controllo rispettivamente e a due anni del 29.8%, 52.9% e 61 % sempre nei tre gruppi rispettivamente [191].

Alla stessa conclusione sono infine giunti Petta *et al.* e Cheung *et al* [192, 193].

Adhoue *et al*, concorde con l'assenza di un aumentato rischio, notava tuttavia che seppur in presenza di stesso tasso di recidiva i pazienti sottoposti a trattamento con DAAs avevano una recidiva più precoce (12 mesi vs 38.5 mesi del gruppo dei non trattati)[194].

I dati a nostra disposizione dunque non mostrano una univocità e non consentono al momento di escludere o confermare l'aumentato rischio pur considerando che i dati analizzati finora presentano una notevole eterogeneità in modo particolare l'intervallo temporale tra trattamento antineoplastico locoregionale e inizio del trattamento antivirale appare l'elemento che da solo è in grado di influenzare la possibilità di trarre delle conclusioni definitive e univoche.

## **4 PARTE SECONDA**

### **4.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Obiettivo principale dello studio è stato valutare il profilo delle citochine (in particolare IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNFalfa) e del VEGF sierici durante trattamento con DAAs in pazienti con fibrosi significativa (Stadio F3 Metavir o cirrosi epatica) HCV-correlata.

Obiettivo secondario è stato verificare se *in vitro* (su cellule endoteliali ombelicali umane o HUVEC), l'aggiunta del siero dei pazienti sottoposti a trattamento con DAAs e con aumento dei livelli sierici di VEGF, avesse degli effetti biologici ovvero di stimolazione della proliferazione cellulare.

## **4.2 MATERIALI E METODI**

### **4.2.1 Pazienti e Dosaggio delle interleuchine**

Centodiciassette pazienti sottoposti a trattamento con DAAs e seguiti presso il centro CURE (Centro per la Ricerca e la Cura delle Epatopatie) dell'Università di Foggia sono stati arruolati nel periodo compreso tra Marzo e Dicembre 2015. Tre pazienti avevano anamnesi positiva per epatocarcinoma sottoposto a trattamento secondo le linee guida BCLC (Barcellona Clinic Liver Cancer classification) prima dell'inizio della terapia antivirale. La terapia è stata intrapresa solo dopo accertamento della risposta completa al trattamento antineoplastico. Per evitare interferenze nello studio dei livelli sierici del VEGF, i pazienti con epatocarcinoma attivo o con uno o più noduli sospetti per HCC sono stati esclusi dallo studio. Tutti i pazienti sono stati sottoposti, al baseline e a fine trattamento, ad ecografia addome. I pazienti con precedente diagnosi di HCC sono stati sottoposti a monitoraggio strumentale mediante ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) ogni 3 mesi ed a TC e RM con mezzo di contrasto ogni 6 mesi. Tutti i pazienti con AST o ALT oltre il limite di normalità (40 UI/L) dopo la 4<sup>a</sup> settimana di trattamento sono stati inoltre sottoposti a valutazione ecografica epatica.

Campioni di plasma sono stati raccolti durante predefiniti time point durante trattamento in particolare al baseline, alla 4<sup>a</sup> settimana di trattamento (T4wk), il giorno di fine trattamento (End of Treatment o EoT), 4 settimane dopo fine trattamento (Sustained Virological

Response 4 o SVR4), 12 settimane dopo fine trattamento (Sustained Virological Response 12 o SVR12).

Solo i pazienti con almeno 3 dosaggi (baseline; T4wk o EoT; SVR4 o SVR12) sono stati inclusi nell'analisi finale.

Il trattamento antivirale della durata di 12 o 24 settimane è stato stabilito in ciascun paziente sulla base del genotipo virale e della severità della fibrosi come indicato dalle raccomandazioni delle linee guida dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF) e i criteri di rimborsabilità indicati dall'Agenzia Italiana del farmaco (AIFA).

I pazienti con trattamenti combinati ovvero Interferone + DAAs sono stati esclusi dall'analisi finale.

Dove previsto dalle linee guida, è stata somministrata ribavirina con dose calcolata da assumere a seconda del peso corporeo (1000 mg/die se peso corporeo inferiore a 75 Kg e 1200 mg se maggiore o uguale a 75 Kg).

Il dosaggio virale quantitativo è stato eseguito mediante Real Time PCR con limite di detection pari a 12 UI/L.

Durante trattamento antivirale i pazienti sono stati sottoposti a monitoraggio clinico e laboratoristico mensile. Il dosaggio del HCV RNA è stato effettuato in corrispondenza dei seguenti time point: baseline, T4wk, EoT, SVR4 ed SVR12.

SVR4 ed SVR12 sono state ottenute qualora HCV RNA quantitativo fosse non rilevato in corrispondenza della 4<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> settimana dopo la fine del trattamento antivirale.

Tutti gli eventi avversi, clinici o biochimici, sono stati riportati.



Il dosaggio delle citochine è stato effettuato mediante Biochip Array Technology-Radox Laboratories. Il dosaggio è stato effettuato presso il Laboratorio Centrale mediante apparato Radox come da linee guida fornite dall'azienda produttrice. Ciascun campione è stato testato in duplicato con successivo calcolo della media. In corrispondenza dei time point indicati (baseline, T4wk, EoT, SVR4 ed SVR12) sono stati testati, oltre all' HCVRNA quantitativo e alle citochine, la funzione epatica.

#### **4.2.2 Test in vitro per lo studio dell'attività angiogenica del siero dei pazienti trattati con DAAs**

Cellule endoteliali ombelicali umane (Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)) sono state coltivate nel medium basale per HUVEC (CC-3156 Lonza, Italia) supplementato con EGM-2 Bullet kit (CC-3156, Lonza, Italy) come da indicazioni dell'azienda produttrice.

Prima dello studio di stimolazione, le HUVEC sono state valutate mediante test del trypan blue al fine di valutarne la vitalità e successivamente 5.000 cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti. Dopo 24 ore le cellule sono state stimulate con

1. Medium standard completo (controllo positivo)
2. Medium standard diluito (diluizione 1:15) per ridurre significativamente i fattori di crescita e i nutrienti cellulari (controllo negativo)
3. Medium standard diluito 1:15 arricchito con 100 µl di siero dei pazienti

Le cellule sono state poste in coltura per ulteriori 72 ore in ambiente umidificato, a 37 °C, con percentuale di anidride carbonica del 5%.

La conta cellulare è stata effettuata mediante Countess II FL Automated Cell Counter (Life Technologies).

Tre replicati sono stati effettuati per ciascun esperimento.

### **4.2.3 TEST DI INIBIZIONE CON ANTI-VEGF, BEVACIZUMAB, sulla crescita delle cellule Hepa RG**

Per valutare se gli effetti delle cellule di epatocarcinoma (HEPA-RG) fossero dipendenti da VEGF è stato predisposto un modello di coltura con anticorpi bloccanti il VEGF (BEvacizumab). Le HEPA-RG sono state coltivate per 72 ore in piastre da 6 pozzetti con terreno di Williams nelle seguenti condizioni:

1. Medium standard (FBS 10%)
2. Medium standard (FBS 10%) + 150 µl siero dei pazienti
3. Medium standard diluito (FBS 0,125%) + 150 µl siero dei pazienti
4. Medium standard completo (FBS 10%) + bevacizumab (2,5 mg/ml)
5. Medium standard completo (FBS 10%) + 150 µl siero dei pazienti + bevacizumab (2,5 mg/ml)
6. Medium standard diluito (FBS 0,125%) + 150 µl pazienti + bevacizumab (2,5 mg/ml)

### **4.2.4 Analisi statistica**

Le variabili categoriche sono state espresse come frequenze e percentuali; le variabili continue come mediane e range. Per migliorare la normalità della distribuzione e per ottenere un range più ristretto più facilmente rappresentabile sui grafici, i valori di VEGF e IL-8 sono stati espressi sotto forma di  $\text{Log}_{10}$ .

I trend temporali delle citochine dosate sono state analizzate mediante test non parametrico dei ranghi con segno di Wilcoxon e confronti di valore consecutivi (per ogni time point) di ogni singola citochina e confronti di ciascun time point con il baseline. L'analisi è stata

condotta dapprima sull'intera popolazione e successivamente nei due sottogruppi (terapia sofosbuvir-based versus ombitasvir+paritaprevir+ritonavir con o senza dasabuvir). I confronti nei due sottogruppi per ogni singola citochina sono stati effettuati per ogni time point mediante test di Kruskal-Wallis.

I dati risultanti dalle colture cellulari sono stati presentati come media e deviazione standard della media. La differenza delle medie è stata calcolata mediante t test a due code. L'analisi statistica è stata effettuata mediante software statistico R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e la significatività è stata definita qualora  $p < 0.05$  (a due code).

## **4.3 RISULTATI**

### **4.3.1 PAZIENTI ARRUOLATI**

Sono stati arruolati 103 pazienti le cui caratteristiche demografiche e cliniche sono riportate nella tabella 1

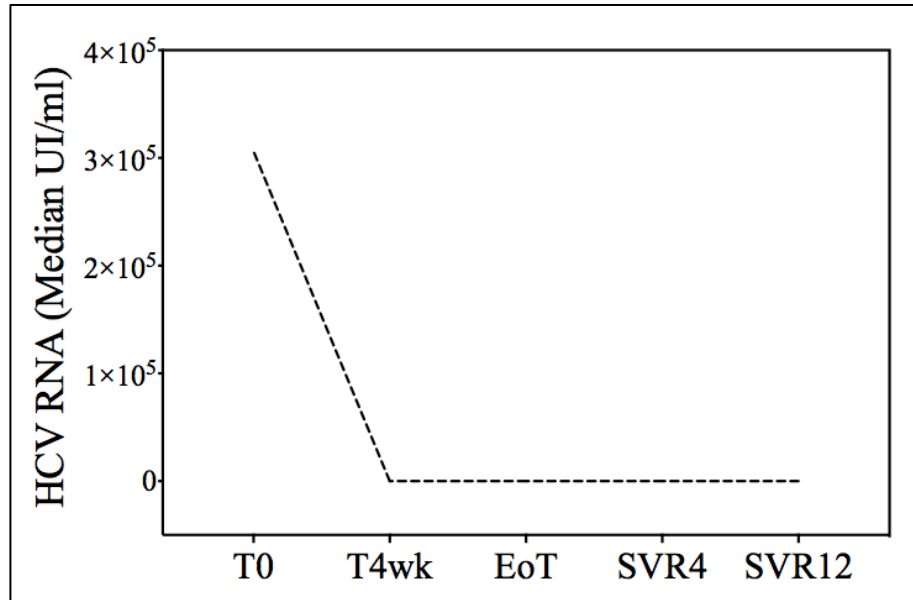
**Tabella 1:** Caratteristiche della popolazione studiata. ULN: Upper Limit Normal

<b>Variabile</b>	<b>N=103</b>	
<b>Età (anni)</b>	68 (38-84)	
<b>Sesso (M/F)</b>	56 (54.4%)/47 (45.6%)	
<b>Genotipo</b>	1a	7 (6.8%)
	1b	59 (57.3%)
	2	23 (22.3%)
	3	8 (7.8%)
	4	6 (5.8%)
<b>Durata Trattamento 12/24 wks n (%)</b>	62 (60.2%)/41 (39.8%)	
<b>Cirrotici</b>	52 (50.5%)	
	CHILD-A	46 (44.7%)
	CHILD-B	6 (5.8%)
<b>Genotipo IL28B</b>	CC	16 (15.5%)
	CT	35 (34%)
	TT	8 (7.8%)
	na	44 (42.7%)
<b>ALT</b>	<1.5 x ULN	53 (51.5%)

	>1.5 x ULN	50 (48.5%)
<b>Log<sub>10</sub> HCV RNA (IU/mL)</b>	5.5 (2.3-6.8)	
<b>Terapia antivirale</b>	Sofosbuvir + Ribavirin	28 (27.2%)
	Sofosbuvir + Simeprevir	19 (18.4%)
	Sofosbuvir/Ledipasvir	11 (10.7%)
	Sofosbuvir + Daclatasvir	15 (14.6%)
	Ombitasvir + Paritaprevir + Ritonavir ± Dasabuvir	30 (29.1%)
<b>Utilizzo ribavirina, n (%)</b>	42 (40.8%)	
<b>Precedenti trattamenti</b>	PEG-IFN + ribavirina	38 (36.9%)
	DAAs I generazione	11 (10.7%)
	DAAs II generazione	1 (0.9%)
	Naive	53 (51.5%)

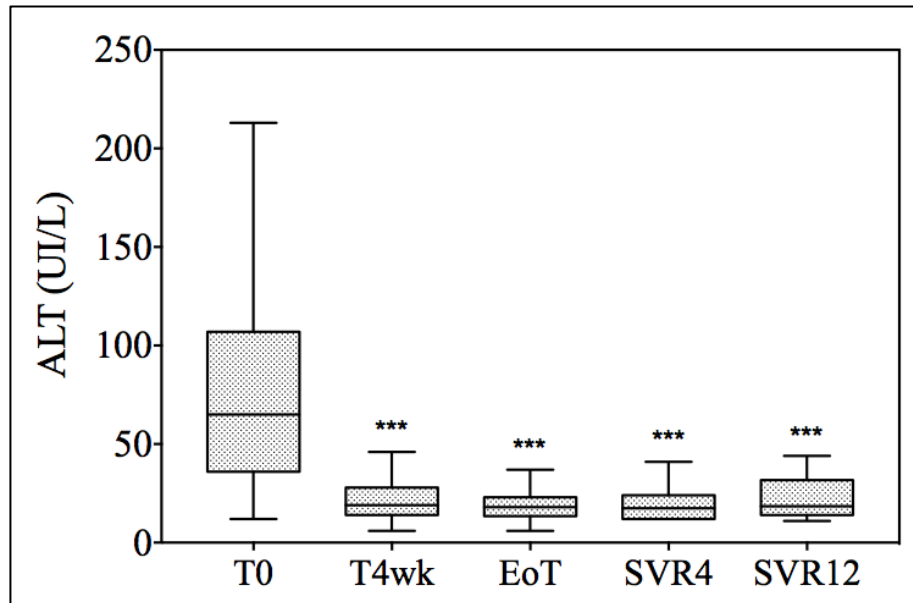
Il 54.4% della popolazione arruolata era di sesso maschile e metà della popolazione studiata aveva al baseline ipertransaminasemia (ALT >1.5 x ULN). La mediana dell'HCV RNA quantitativo (espressa in Log<sub>10</sub>) al baseline è stata di 5.5 UI/ml (range: 2.3-6.8 UI/ml). Nella distribuzione dei genotipi, il genotipo 1 è stato il più frequente (64.1%). Il 29.1% della popolazione studiata è stata trattata

con ombitasvir+paritaprevir+ritonavir±dasabuvir mentre il 70.9% con regime sofosbuvir-based. Il trattamento antivirale ha indotto una rapida clearance virale con associata normalizzazione delle transaminasi (Figure 1 e 2).



**Figura 1: Cinetica virale durante trattamento con Direct-acting antivirals (DAAs).** Nelle prime 4 settimane il trattamento antivirale ha determinato una rapida riduzione della carica virale fino a completa clearance virale.  
T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.





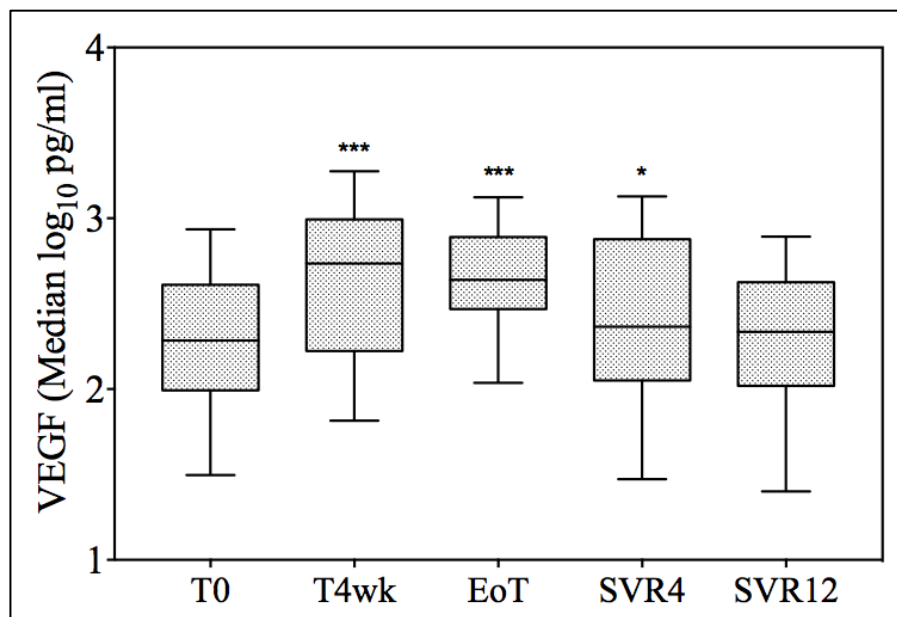
**Figura 2: ALT durante trattamento antivirale.** A partire dalla 4<sup>a</sup> settimana di trattamento la mediana dei livelli sierici di ALT si è ridotta significativamente ( $p < 0.0001$ ) rispetto al baseline. Le concentrazioni sieriche di alanina aminotransferasi sono espresse come mediane e range interquartili (IQR).

\*\*\*  $p < 0.0001$ ; T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.

#### 4.3.2 VEGF

Dopo 4 settimane di trattamento la mediana del  $\text{Log}_{10}$  VEGF è risultato essere significativamente aumentato (da 2.18  $\text{Log}_{10}$  pg/mL a

2.45 Log<sub>10</sub> pg/mL, p< 0.001). Dalla 4<sup>a</sup> settimana fino alla fine del trattamento, i livelli sierici di VEGF sono rimasti sostanzialmente invariati per cui nel confronto tra concentrazioni di VEGF al baseline versus EoT la significatività è stata confermata (2.44 Log<sub>10</sub> pg/mL, p< 0.001 vs baseline) con ritorno ai valori basali in corrispondenza della SVR4 ed SVR12 (2.13 Log<sub>10</sub> pg/mL alla SVR4 e 2.28 Log<sub>10</sub> pg/mL alla SVR12) (Figura 3). Tale andamento è stato osservato sia nel gruppo di pazienti trattati con ombitasvir+paritaprevir+ritonavir±dasabuvir che con regime antivirale sofosbuvir-based.



**Figura 3 Livelli sierici di VEGF prima, durante e dopo trattamento antivirale.**

Dopo 4 settimane di terapia i livelli sierici di VEGF hanno mostrato un incremento significativo (T4wk vs T0 p<0.001). Dalla 4<sup>a</sup> settimana di trattamento e fino a fine terapia i livelli sierici di VEGF sono rimasti stabili e pertanto significativamente aumentati rispetto al valore dosato prima dell'inizio del trattamento (EoT vs T0 p<0.001).

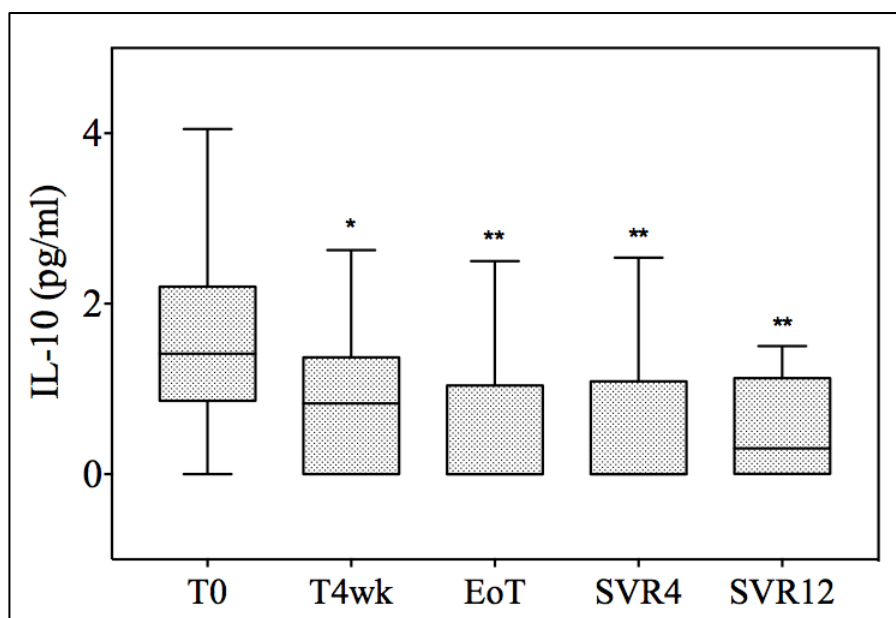
Dopo la fine del trattamento il livelli sierici di VEGF sono ritornati a valori simili al baseline. Le concentrazioni sieriche di VEGF sono espresse come mediane e range interquartili (IQR).

VEGF : Vascular Endothelial growth factor o fattore di crescita vascolare endoteliale; \*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*  $p < 0.05$ ; T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.

### 4.3.3 IL-10

Dall'analisi del trend dell'IL-10 si osserva una brusca riduzione dei valori di tale citochina dopo 4 settimane di trattamento (concentrazioni sieriche al baseline 1.44 pg/mL versus concentrazioni al T4wk 0.83 pg/mL;  $p = 0.03$ ).

I valori rilevati nei successivi time point sono sostanzialmente sovrapponibili con conferma della significatività nel confronto di ciascun time point con il baseline e assenza di significatività nei confronti a due tra tempi successivi al baseline (Figura 4).



**Figura 4** Livelli sierici di IL-10 prima, durante e dopo trattamento antivirale.

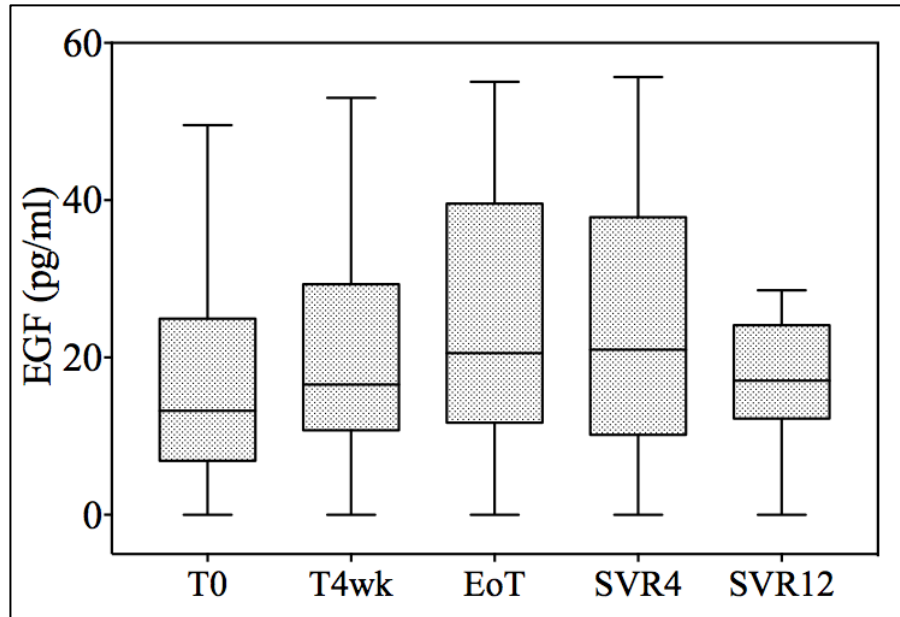
Dopo 4 settimane di terapia i livelli sierici di IL-10 hanno mostrato un significativo decremento (T4wk vs T0  $p < 0.05$ ) divenuto più marcato alla fine del trattamento (EoT vs T0  $p < 0.01$ ).

Le concentrazioni sieriche di IL-10 sono espresse come mediane e range interquartili (IQR).

\*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.

#### 4.3.4 EGF

I livelli di EGF non hanno presentato durante trattamento una variazione statisticamente significativa seppur con lieve aumento dal baseline all'End of treatment e ripristino dei valori basali in corrispondenza della SVR12.



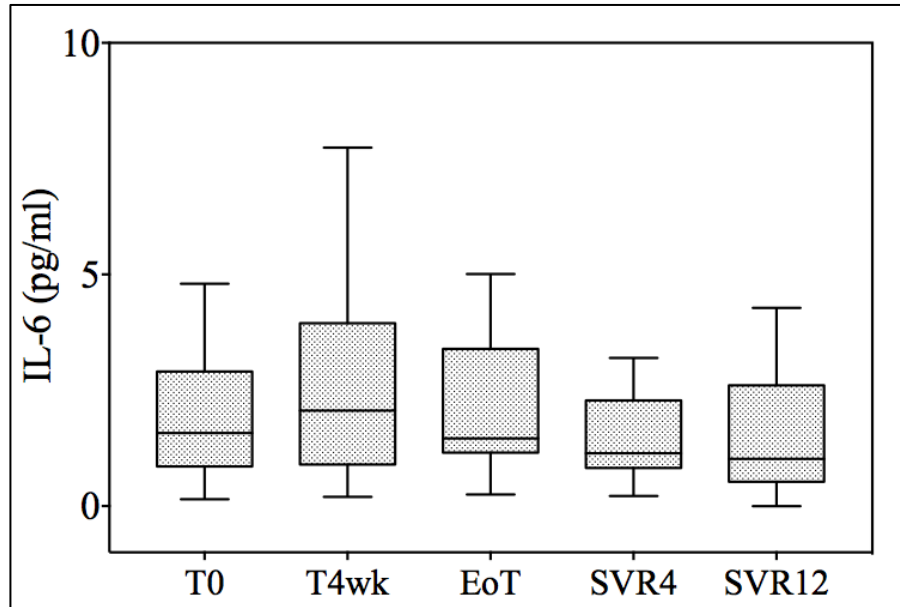
**Figura 5: Livelli sierici di EGF prima, durante e dopo trattamento antivirale.** Le concentrazioni sieriche di EGF non hanno mostrato significative variazioni durante e dopo la fine del trattamento con DAAs. Le concentrazioni sieriche di EGF sono espresse come mediane e range interquartili (IQR).

EGF: epidermal growth factor o fattore di crescita epidermico; T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.

#### 4.3.5 IL-6

I livelli sierici di IL-6 sono aumentato nel confronto tra baseline e T4wk senza però raggiungere la significatività statistica (da 1.43

pg/mL a 2.78 pg/mL;  $p = 0.39$ ). Nei successivi time point, le concentrazioni sieriche di IL-6 hanno presentato una graduale riduzione dei valori fino a valori inferiori rispetto al baseline senza, tuttavia, raggiungere mai la significatività statistica.

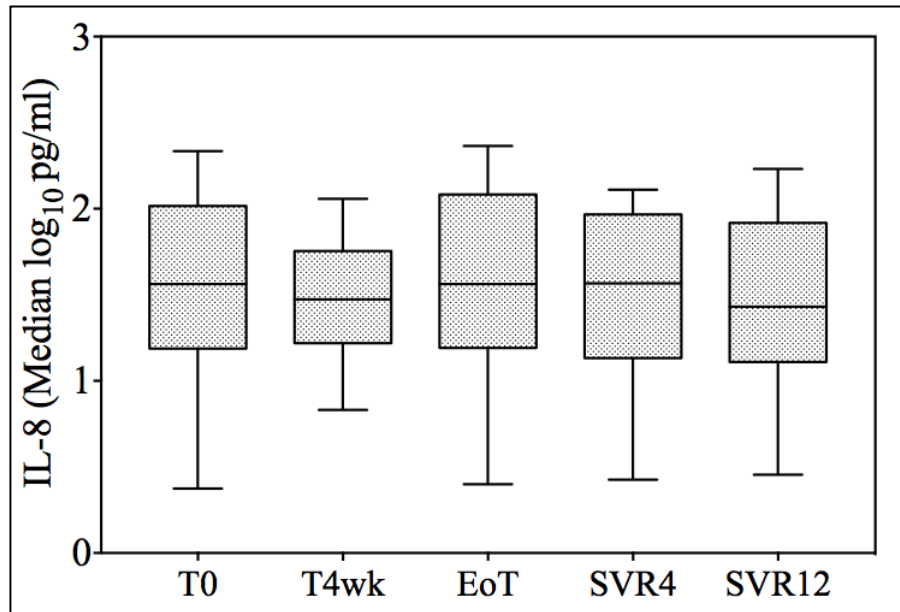


**Figura 6: Livelli sierici di IL-6 prima, durante e dopo trattamento antivirale.** Le concentrazioni sieriche di IL-6 non hanno mostrato significative variazioni durante e dopo la fine del trattamento con DAAs. Le concentrazioni sieriche di EGF sono espresse come mediane e range interquartili (IQR).

T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.

#### 4.3.6 IL-8

I livelli sierici di  $\text{Log}_{10}$  IL-8 non hanno presentato variazioni durante tutto il trattamento e nei controlli dopo terapia.

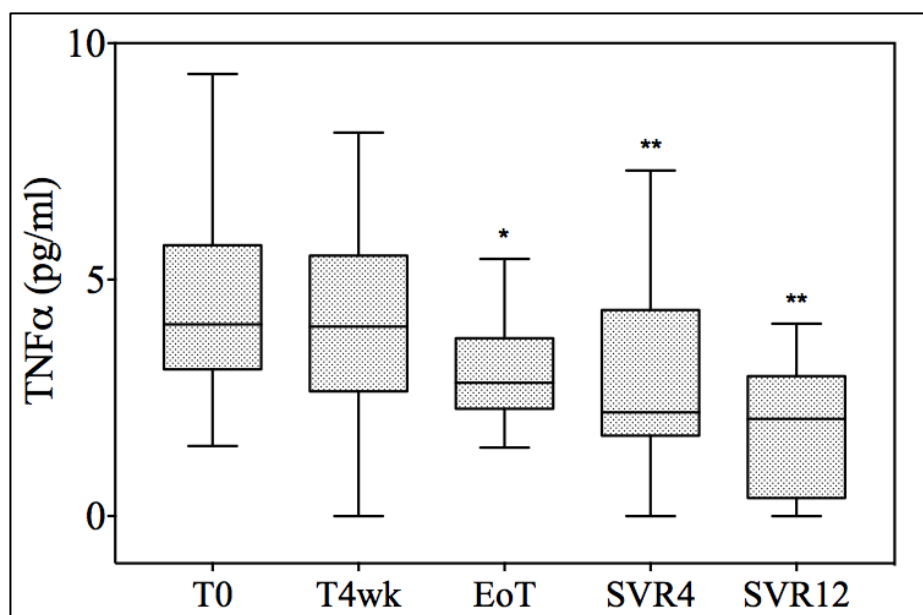


**Figura 7: Livelli sierici di IL-6 prima, durante e dopo trattamento antivirale.** Le concentrazioni sieriche di IL-8 non hanno mostrato significative variazioni durante e dopo la fine del trattamento con DAAs. Le concentrazioni sieriche di IL-8 sono espresse come mediane e range interquartili (IQR).

T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.

### 4.3.7 TNF-alfa

A differenza dell'IL-10 i livelli sierici di TNF-alfa non hanno presentato variazioni durante le prime 4 settimane di trattamento (da 4.05 pg/mL del baseline a 4.01 pg/mL;  $p = 0.27$ ) mentre a fine trattamento (2.82 pg/mL,  $p = 0.05$  vs baseline) e nei successivi tempi (2.19 pg/mL e 2.09 pg/mL alla SVR4 ed SVR12 rispettivamente) i valori sono significativamente ridotti rispetto al baseline.



**Figura 8: Livelli sierici di TNFα prima, durante e dopo trattamento antivirale.**

Le concentrazioni sieriche di TNFα hanno mostrato una riduzione progressiva fino a raggiungere la significatività statistica nel confronto tra baseline ed EoT ( $p < 0.05$ ). Tale riduzione è stata confermata nei successivi controlli post-trattamento. Le concentrazioni sieriche di TNFα sono espresse come mediane e range interquartili (IQR).

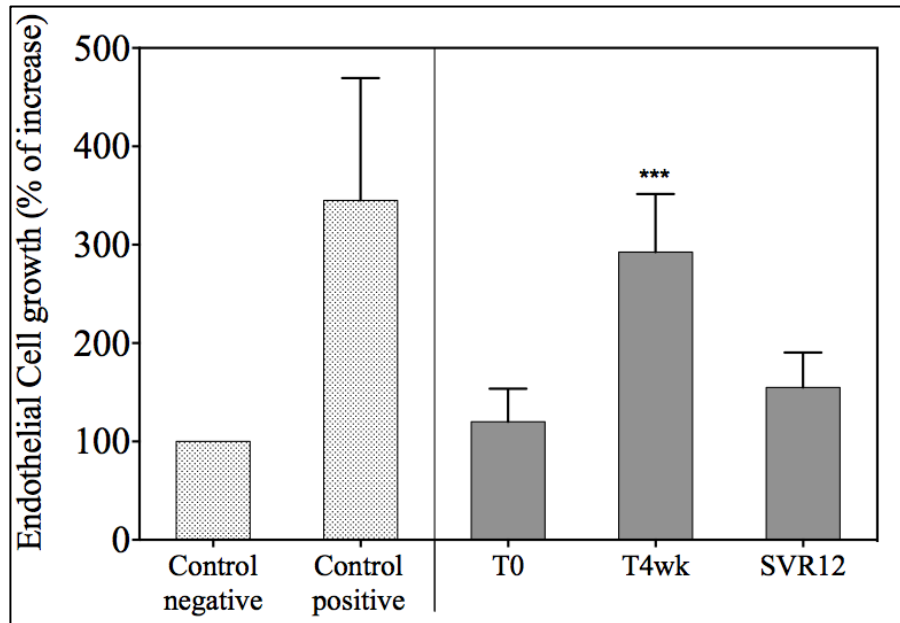
T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; EoT: end of treatment; SVR4: 4 settimane dopo la fine del trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.



#### **4.3.8 Effetti biologici del siero dei pazienti trattati con DAAs sulla crescita delle cellule endoteliali**

Per valutare i possibili effetti biologici delle significative variazioni sieriche di VEGF osservate durante e dopo trattamento con DAAs, sono stati effettuati test in vitro su cellule HUVEC. Al baseline la crescita cellulare è risultata essere pari al controllo negativo ovvero alla coltura cellulare avente come terreno di coltura standard diluito 1:15. L'aggiunta nel terreno di coltura standard diluito 1:15 arricchito con siero campionato nei diversi tempi del trattamento antivirale ha mostrato un aumento significativo della replicazione cellulare quando le piastre di coltura sono state supplementate con siero di pazienti alla 4<sup>a</sup> settimana di trattamento (T4wk  $290 \pm 60\%$  vs.  $120 \pm 30$  del baseline,  $p < 0.0001$ ). Tale dato è concorde con l'aumento del valore di VEGF osservato dopo 4 settimane di trattamento.

Colture cellulari arricchite con siero campionato alla fine del trattamento antivirale (EoT) ha mostrato invece il ripristino della crescita cellulare a valori non significativamente diversi dal controllo negativo (SVR12 =  $160 \pm 40\%$ ).



**Figura 9: Effetto del siero dei pazienti trattati con DAAs sulla crescita delle cellule endoteliali (HUVEC).** La ricerca di eventuali effetti della supplementazione di siero di pazienti sulla crescita delle cellule endoteliali è stata effettuata utilizzando sieri raccolti alla 4<sup>a</sup> settimana di trattamento e alla fine del trattamento. L'aggiunta di siero di pazienti alla 4<sup>a</sup> settimana di trattamento ha determinato un significativo aumento della crescita cellulare (290±60% vs 120±30% del baseline). L'aggiunta alla coltura cellulare di siero di pazienti alla 12<sup>a</sup> settimana dopo fine trattamento non ha determinato significative variazioni rispetto al baseline.

\*\*\* p<0.0001; T0: baseline; T4wk: dopo 4 settimane di trattamento; SVR12: 12 settimane dopo la fine del trattamento antivirale.

#### **4.3.9 Effetti del bevacizumab sulle colture di cellule HepaRG**

Dopo aver verificato che il siero dei pazienti trattati con DAAs ha determinato un aumento della crescita delle cellule HUVEC, è stato valutato l'effetto della supplementazione di siero dei pazienti in trattamento antivirale sulle cellule di epatocarcinoma Hepa RG. I risultati sono stati i seguenti:

1. L'aggiunta di siero dei pazienti al medium di coltura ha determinato un aumento della crescita delle cellule Hepa RG del 200%.
2. L'aggiunta di siero dei pazienti al terreno supplementato con FBS diluito ha determinato una crescita cellulare del 200%
3. L'aggiunta del bevacizumab al medium + siero dei pazienti ha determinato una riduzione della crescita cellulare del 50% rispetto alla coltura con medium + siero dei pazienti.
4. L'aggiunta del bevacizumab al terreno supplementato con FBS diluito e siero dei pazienti ha determinato una riduzione del 25% della crescita cellulare rispetto alla coltura con medium diluito + siero dei pazienti.

#### 4.4 DISCUSSIONE

L'epatite cronica da virus C è causa di morbidità e mortalità. Le linee guida europee per il trattamento dell'epatite HCV+ raccomandano l'utilizzo dei nuovi farmaci DAAs nei pazienti affetti da cirrosi epatica o fibrosi avanzata o qualora vi siano manifestazioni extraepatiche HCV-correlate e nei pazienti con epatocarcinoma candidati a OLT. Nell'Aprile 2016 Reig *et al* hanno pubblicato i risultati di un'analisi retrospettiva fatta su pazienti affetti da HCC e trattati con antivirali diretti mostrando un significativo e precoce aumento della recidiva di HCC [6]. Successivamente numerosi lavori hanno riportato dati di effetto del trattamento antivirale sul rischio di recidiva nei pazienti con e senza pregresso epatocarcinoma senza, nel complesso, fornire dati univoci [7, 8, 187-194].

La disomogeneità delle popolazioni studiate e la diversità nella metodologia di trattamento hanno indubbiamente influenzato i dati finali per cui ad oggi dati di indiscutibile safety o dati di assenza della stessa nei pazienti con epatocarcinoma non sono ancora disponibili.

Trial prospettici in grado di valutare mediante la comparazione diretta, pazienti con epatocarcinoma con o senza trattamento con DAAs, il rischio assoluto e relativo non sono attualmente disponibili. L'eventuale disegno di studio che preveda quindi la possibilità di indagare definitivamente il rischio di recidiva mediante confronto diretto potrebbe, alla luce dei dati di efficacia attualmente disponibili, non essere considerata del tutto etica.

Dubbi di eticità potrebbero inoltre derivare dall'analisi del ridotto rischio di incidenza di scompensi e della riduzione della mortalità che

nei pazienti con cirrosi avanzata rappresentano in ogni caso un target da raggiungere nel più breve tempo possibile con terapie, come appunto i DAAs, per i quali non è richiesto un monitoraggio clinico stretto dato il basso rischio di effetti collaterali.

I dati che oggi abbiamo a disposizione in merito al rischio di recidiva di HCC derivano pertanto da analisi retrospettive caso-controllo, uniche per metodologia in grado di fornire in breve tempo dati che in uno studio prospettico potrebbe richiedere un numero elevato di pazienti e un tempo di osservazione molto lungo.

Dall'altro lato l'osservazione che pazienti con recente anamnesi di HCC sottoposti a trattamento con DAAs abbiano presentato una progressione di malattia più rapida e una maggior aggressività nella presentazione clinica della neoplasia, suggerisce che la terapia antivirale possa in qualche modo essere coinvolta nella storia naturale della neoplasia e che possa quindi favorire meccanismi che portino in ultima analisi alla crescita tumorale e/o alla disseminazione delle cellule neoplastiche. In un recente editoriale, Nault e Colombo [195] hanno ipotizzato che la rapida riduzione fino a scomparsa del virus dovuto alla potente terapia antivirale possa determinare una disregolazione immunitaria con effetti sulla risposta antitumorale e questo evento potrebbe in ultima analisi essere il trigger della recidiva. Inoltre la recidiva potrebbe essere facilitata mediante meccanismi diretti di stimolo della crescita delle cellule neoplastiche. Tale evento assai difficilmente può verificarsi nei pazienti trattati con interferone in considerazione della lenta risposta antivirale e quindi lenta modifica

delle citochine coinvolte nella regolazione immune, oltre che alle proprietà antiproliferative che l'interferone di per sé possiede.

D'accordo con l'ipotesi della possibile presenza di meccanismi di facilitazione che possano favorire, nei pazienti trattati con DAAs e con recente diagnosi di epatocarcinoma, la crescita e disseminazione delle cellule neoplastiche e sulla base dei dati già ampiamente descritti in letteratura che mostrano un ruolo chiave del VEGF nella progressione e disseminazione delle cellule neoplastiche è stato concepito il presente progetto di ricerca basato su due fasi fondamentali. Il primo ha previsto il dosaggio dei livelli circolanti di VEGF, il secondo la verifica di possibili effetti biologici degli stessi. Dall'analisi preliminare è innanzitutto emerso che i livelli sierici di VEGF di 103 pazienti sottoposti a trattamento con DAAs hanno presentato un significativo incremento dopo 4 settimane di trattamento. Un ulteriore dosaggio del VEGF sierico effettuato a fine trattamento ha mostrato concentrazioni sieriche concordi con i valori identificati alla 4<sup>a</sup> settimana per cui è stato possibile dedurre che a partire dalla 4<sup>a</sup> settimana e fino a fine trattamento i livelli circolanti del fattore di crescita vascolare sono immutati e stabilmente elevati.

Incubando cellule endoteliali umane con il siero dei pazienti trattati e per ogni paziente effettuando lo studio mediante incubazione con siero dei tre tempi di trattamento ovvero del baseline (prima del trattamento), durante trattamento (della quarta settimana o di fine trattamento) e dodici settimane dopo la fine del trattamento è emerso

che il siero dei pazienti ha proprietà angiogenetiche ed è in grado di indurre una significativa crescita delle cellule endoteliali.

Il VEGF è considerato un elemento chiave nell'angiogenesi delle neoplasie epatiche e gli elevati livelli circolanti sono correlati ad una maggiore aggressività della neoplasia [196].

Il VEGF agisce mediante meccanismi diretti e indiretti con esito principale la crescita delle cellule neoplastiche e la sopravvivenza cellulare. Sia le cellule endoteliali che le cellule neoplastiche dipendono dal segnale cellulare indotto dal fattore di crescita vascolare [197].

Le cellule di epatocarcinoma umano esprimono il VEGF e la sua presenza è in grado di garantire la proliferazione delle cellule neoplastiche e il suo potenziale neoangiogenetico probabilmente perché il VEGF è in grado non solo di indurre proliferazione delle cellule endoteliali ma anche di aumentare la permeabilità vascolare e alterare le tight junction, tutte condizioni favorevoli alla disseminazione sistemica delle cellule neoplastiche [134, 135, 139].

Elevati livelli di VEGF circolante dopo trattamento chirurgico, ablazione mediante radiofrequenza o TACE correlano con cattiva prognosi e rapida insorgenza di recidiva nei pazienti con HCC [196].

In questo contesto i risultati del presente studio forniscono un'ipotesi basata su solide basi scientifiche che possono spiegare i numerosi casi di recidiva segnalati in letteratura.

I risultati dello studio possono inoltre giustificare la maggior aggressività clinica e la rapida disseminazione qualora la recidiva si sia instaurata.

Che il VEGF abbia da solo un ruolo chiave in questo evento lo testimoniano i livelli di EGF, che pur essendo un fattore di crescita cellulare di indiscussa importanza, appare immutato durante tutto il trattamento.

I test in vitro compiuti sulle cellule di epatocarcinoma hanno dimostrato che l'aggiunta di siero dei pazienti è in grado di determinare un aumento della crescita cellulare e che tuttavia l'aggiunta di bevacizumab non è in grado di ripristinare le condizioni basali per cui ulteriori fattori promuoventi la crescita delle cellule di epatocarcinoma, presenti nel siero dei pazienti sottoposti a trattamento, possono esser coinvolti in questo processo.

Tale dato tuttavia necessita di ulteriori e più ampie conferme basate su studi di maggiore numerosità campionaria.

Dati di conferma sono inoltre necessari nella valutazione del possibile impatto degli aumentati livelli di VEGF in altre tipologie di neoplasie in considerazione del fondamentale ruolo svolto dal fattore di crescita vascolare in numerose tipologie di neoplasie.

Il secondo importante risultato del presente studio è stato l'identificazione delle modifiche del pattern citochinico in grado di giustificare le possibili alterazioni dell'immunosorveglianza contro le cellule neoplastiche.

Gli effetti dei DAAs sulla risposta immune è stata recentemente studiata da Serti *et al.* che hanno riportato la ricostituzione dell'immunità innata dopo trattamento con DAAs [198]. Tale osservazione è stata ipotizzata a seguito di dati che mostravano down



regulation degli interferoni di tipo II e III e aumento dell'espressione dell'interferone di tipo I [199].

Questo fa sì che la rapida riduzione della viremia induca una forte attenuazione del segnale di flogosi con ripercussioni positive sulla progressione di malattia. Dall'altro lato però questo può avere un impatto negativo sul controllo immunologico dei tumori.

I dati del presente progetto confermano che i DAAs inducono una rapida riduzione della viremia e normalizzazione entro 4 settimane dell'ipertransaminasemia. La rapida riduzione dell'IL-10 e del TNF alfa dovuta alla clearance virale è indicativa di una sostanziale modifica del pattern infiammatorio sistemico tipico dei pazienti affetti da epatite cronica.

L'IL-10 è una molecola che svolge un ruolo chiave nell'immunoregolazione e questo è testimoniato dalla presenza dei suoi recettori su numerose cellule ematopoietiche, sui linfociti B e T e sui macrofagi. L'IL-10 è una citochina antinfiammatoria coinvolta in definitiva nel controllo della funzione T. Essa tipicamente sopprime la produzione di citochine proinfiammatorie e regola la proliferazione dei linfociti B e dei linfociti T CD4 e CD8. Il suo effetto si esplica inoltre sulle cellule presentanti l'antigene (macrofagi e cellule del Kupffer) con modulazione della loro attività [200].

Il blocco della pathway cellulare indotta da IL-10 determina una rapida clearance virale nonché la soppressione della risposta immune adattativa mediante alterazione della funzione delle cellule presentanti l'antigene e l'alterazione della funzione delle cellule T [201, 202].

L'interleuchina 10 è considerata la molecola chiave nel processo di cronicizzazione dell'infezione cronica da virus C essendo implicata nelle alterazioni della sorveglianza immunologica dell'ospite ed è ampiamente dimostrato in letteratura che alti livelli di IL-10 sono un elemento costante nei pazienti con cronicizzazione dell'infezione.

Il sistema immune svolge un ruolo fondamentale nella genesi e progressione della carcinogenesi e se da un lato la risposta flogistica è marcata in corso di neoplasia e facilita la crescita delle cellule neoplastiche dall'altra i linfociti T citotossici sono in grado di distruggere le cellule tumorali. Le due risposte rappresentano gli estremi di un processo del quale l'IL-10 sembra essere il principale regolatore.

In definitiva numerosi sono i punti da chiarire in primis quale possa essere la fonte di VEGF e inoltre il ruolo di possibili mediatori intermedi che, a partire dalla riduzione dell'IL-10, possano condurre alle alterazioni immunologiche implicate nel mancato controllo delle cellule neoplastiche. L'unico elemento sul quale vi è senza dubbio convergenza scientifica, sia sulla base della non univocità dei dati di letteratura pubblicati negli ultimi mesi che sulla base della presente ricerca, è che tutti i pazienti con anamnesi patologica prossima per epatocarcinoma sottoposti a trattamento, qualsiasi esso sia, necessitano di stretta sorveglianza durante e dopo trattamento antivirale e che un ulteriore elemento di sicurezza clinica potrebbe essere considerato un adeguato intervallo temporale tra trattamento antineoplastico e terapia antivirale.

I farmaci antivirali a nostra disposizione sono estremamente potenti tanto da indurre in poche settimane, talvolta pochi giorni, una clearance completa del virus e tale risultato può essere considerato un traguardo di grande importanza in ambito medico-scientifico. Dall'altro lato però le alterazioni del sistema immunitario, in particolare dei mediatori cellulari, indotte repentinamente nell'organismo umano durante trattamento e i loro effetti sono punti chiave da chiarire con sollecitudine e degni di interesse da parte di tutto il mondo epatologico.

## 5 BIBLIOGRAFIA

1. Lawitz E, Makara M, Akarca US, Thuluvath PJ, Preotescu LL, Varunok P, Morillas RM, Hall C, Mobashery N, Redman R *et al*: Efficacy and Safety of Ombitasvir, Paritaprevir, and Ritonavir in an Open-Label Study of Patients With Genotype 1b Chronic Hepatitis C Virus Infection With and Without Cirrhosis. *Gastroenterology* 2015, 149(4):971-980 e971.
2. Reddy KR, Bourliere M, Sulkowski M, Omata M, Zeuzem S, Feld JJ, Lawitz E, Marcellin P, Welzel TM, Hyland R *et al*: Ledipasvir and sofosbuvir in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection and compensated cirrhosis: An integrated safety and efficacy analysis. *Hepatology* 2015, 62(1):79-86.
3. Charlton M, Everson GT, Flamm SL, Kumar P, Landis C, Brown RS, Jr., Fried MW, Terrault NA, O'Leary JG, Vargas HE *et al*: Ledipasvir and Sofosbuvir Plus Ribavirin for Treatment of HCV Infection in Patients With Advanced Liver Disease. *Gastroenterology* 2015, 149(3):649-659.
4. Poordad F, Hezode C, Trinh R, Kowdley KV, Zeuzem S, Agarwal K, Shiffman ML, Wedemeyer H, Berg T, Yoshida EM *et al*: ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *N Engl J Med* 2014, 370(21):1973-1982.
5. Poordad F, Schiff ER, Vierling JM, Landis C, Fontana RJ, Yang R, McPhee F, Hughes EA, Noviello S, Swenson ES: Daclatasvir with sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C virus infection with advanced

- cirrhosis or post-liver transplantation recurrence. *Hepatology* 2016, 63(5):1493-1505.
6. Reig M, Marino Z, Perello C, Inarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, Diaz A, Vilana R, Darnell A, Varela M *et al*: Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol* 2016, 65(4):719-726.
  7. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, Foschi FG, Lenzi M, Mazzella G, Verucchi G *et al*: Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol* 2016, 65(4):727-733.
  8. stanislas.pol@aphp.fr AcsgohcEa: Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts. *J Hepatol* 2016, 65(4):734-740.
  9. Cooke GS, Lemoine M, Thursz M, Gore C, Swan T, Kamarulzaman A, DuCros P, Ford N: Viral hepatitis and the Global Burden of Disease: a need to regroup. *J Viral Hepat* 2013, 20(9):600-601.
  10. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H: Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014, 61(1 Suppl):S45-57.
  11. Ansaldi F, Bruzzone B, Salmaso S, Rota MC, Durando P, Gasparini R, Icardi G: Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med Virol* 2005, 76(3):327-332.
  12. Mele A TM, Spada E: Epidemiology of acute viral hepatitis: twenty years of surveillance through SEIEVA in Italy and a review of the literature. *Rapporti Istisan (06/12)* 2006.

13. PetruzzIELlo A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C: Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2016, 22(34):7824-7840.
14. Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001, 2(9):533-543.
15. El-Serag HB, Rudolph KL: Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007, 132(7):2557-2576.
16. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP: The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006, 45(4):529-538.
17. Ikeda K, Saitoh S, Arase Y, Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Nakamura I, Murashima N, Kumada H *et al*: Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology* 1999, 29(4):1124-1130.
18. Bruno S, Battezzati PM, Bellati G, Manzin A, Maggioni M, Crosignani A, Borzio M, Solforosi L, Morabito A, Ideo G *et al*: Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001, 34(5):748-755.
19. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C *et al*: Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis

- virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002, 155(4):323-331.
20. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY *et al*: Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012, 380(9859):2095-2128.
  21. Grebely J, Dore GJ: What is killing people with hepatitis C virus infection? *Semin Liver Dis* 2011, 31(4):331-339.
  22. McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP: Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. *Arch Intern Med* 1990, 150(5):1051-1054.
  23. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM: Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001, 34(4 Pt 1):809-816.
  24. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F: Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004, 127(5 Suppl 1):S35-50.
  25. Hamada H, Yatsunami H, Yano K, Daikoku M, Arisawa K, Inoue O, Koga M, Nakata K, Eguchi K, Yano M: Impact of aging on the development of hepatocellular carcinoma in patients with posttransfusion chronic hepatitis C. *Cancer* 2002, 95(2):331-339.
  26. Cramp ME: Hbv + Hcv = Hcc? *Gut* 1999, 45(2):168-169.

27. Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, Imamura J, Goto T, Kanai F, Kato N *et al*: Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 2009, 49(6):1954-1961.
28. Serfaty L, Aumaitre H, Chazouilleres O, Bonnand AM, Rosmorduc O, Poupon RE, Poupon R: Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1998, 27(5):1435-1440.
29. Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hurter D, Nawrocki M, Kruska L, Hensel F, Petry W *et al*: Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998, 28(6):1687-1695.
30. Valla DC, Chevallier M, Marcellin P, Payen JL, Trepo C, Fonck M, Bourliere M, Boucher E, Miguet JP, Parlier D *et al*: Treatment of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology* 1999, 29(6):1870-1875.
31. Okanoue T, Itoh Y, Minami M, Sakamoto S, Yasui K, Sakamoto M, Nishioji K, Murakami Y, Kashima K: Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: a retrospective study in 1148 patients. Viral Hepatitis Therapy Study Group. *J Hepatol* 1999, 30(4):653-659.
32. Lerosé R, Molinari R, Rocchi E, Manenti F, Villa E: Prognostic features and survival of hepatocellular carcinoma in Italy: impact of stage of disease. *Eur J Cancer* 2001, 37(2):239-245.



33. Wong LL, Limm WM, Tsai N, Severino R: Hepatitis B and alcohol affect survival of hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2005, 11(23):3491-3497.
34. Cantarini MC, Trevisani F, Morselli-Labate AM, Rapaccini G, Farinati F, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegnu L, Zoli M, Borzio F *et al*: Effect of the etiology of viral cirrhosis on the survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2006, 101(1):91-98.
35. Chen CH, Su WW, Yang SS, Chang TT, Cheng KS, Lin HH, Wu SS, Lee CM, Changchien CS, Chen CJ *et al*: Long-term trends and geographic variations in the survival of patients with hepatocellular carcinoma: analysis of 11,312 patients in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, 21(10):1561-1566.
36. Nguyen VT, Law MG, Dore GJ: Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. *J Viral Hepat* 2009, 16(7):453-463.
37. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso Mdel C, Sala M, Bru C, Rodes J, Bruix J: Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999, 29(1):62-67.
38. Padhya KT, Marrero JA, Singal AG: Recent advances in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2013, 29(3):285-292.
39. Trevisani F, De Notariis S, Rapaccini G, Farinati F, Benvegnu L, Zoli M, Grazi GL, Del PP, Di N, Bernardi M *et al*: Semiannual and annual surveillance of cirrhotic patients for hepatocellular carcinoma: effects

- on cancer stage and patient survival (Italian experience). *Am J Gastroenterol* 2002, 97(3):734-744.
40. Singal AG, Pillai A, Tiro J: Early detection, curative treatment, and survival rates for hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *PLoS Med* 2014, 11(4):e1001624.
  41. El-Serag HB, Kramer JR, Chen GJ, Duan Z, Richardson PA, Davila JA: Effectiveness of AFP and ultrasound tests on hepatocellular carcinoma mortality in HCV-infected patients in the USA. *Gut* 2011, 60(7):992-997.
  42. Tong MJ, Sun HE, Hsien C, Lu DS: Surveillance for hepatocellular carcinoma improves survival in Asian-American patients with hepatitis B: results from a community-based clinic. *Dig Dis Sci* 2010, 55(3):826-835.
  43. Wong GL, Wong VW, Tan GM, Ip KI, Lai WK, Li YW, Mak MS, Lai PB, Sung JJ, Chan HL: Surveillance programme for hepatocellular carcinoma improves the survival of patients with chronic viral hepatitis. *Liver Int* 2008, 28(1):79-87.
  44. Tanaka H, Nouse K, Kobashi H, Kobayashi Y, Nakamura S, Miyake Y, Ohnishi H, Miyoshi K, Iwado S, Iwasaki Y *et al*: Surveillance of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection may improve patient survival. *Liver Int* 2006, 26(5):543-551.
  45. European Association For The Study Of The L, European Organisation For R, Treatment Of C: EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012, 56(4):908-943.

46. Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000, 118(2):503-508.
47. Teranishi T, Hirano T, Arima N, Onoue K: Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor- (TRF) like factor(s). *J Immunol* 1982, 128(4):1903-1908.
48. May LT, Ghrayeb J, Santhanam U, Tatter SB, Sthoeger Z, Helfgott DC, Chiorazzi N, Grienering G, Sehgal PB: Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* 1988, 263(16):7760-7766.
49. Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T: Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol* 1992, 148(7):2175-2180.
50. Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T: Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* 1992, 148(12):4066-4071.
51. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK: IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998, 101(2):311-320.
52. McLoughlin RM, Hurst SM, Nowell MA, Harris DA, Horiuchi S, Morgan LW, Wilkinson TS, Yamamoto N, Topley N, Jones SA: Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. *J Immunol* 2004, 172(9):5676-5683.

53. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A *et al*: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986, 324(6092):73-76.
54. Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Caterson B, Jones SA: IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Matrix Biol* 2000, 19(6):549-553.
55. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G: Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994, 368(6469):339-342.
56. Hirano T, Taga T, Yasukawa K, Nakajima K, Nakano N, Takatsuki F, Shimizu M, Murashima A, Tsunasawa S, Sakiyama F *et al*: Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84(1):228-231.
57. Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J, Michael D, Honda M, Taylor KD, Paul-Labrador M, Fischel-Ghodsian N, Fraser PA, Klinenberg JR: Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. *Genes Immun* 1999, 1(1):45-52.
58. Hirano T: Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 1998, 16(3-4):249-284.

59. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G: Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 1998, 187(4):461-468.
60. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M *et al*: Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(14):8222-8226.
61. Eugster HP, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A: IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998, 28(7):2178-2187.
62. Fujishima S, Watanabe H, Kawaguchi M, Suzuki T, Matsukura S, Homma T, Howell BG, Hizawa N, Mitsuya T, Huang SK *et al*: Involvement of IL-17F via the induction of IL-6 in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2010, 302(7):499-505.
63. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad el B, Lehr HA, Schmitt E, Bopp T *et al*: The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 2005, 115(2):313-325.
64. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ: Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84(24):9233-9237.

65. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K: Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 1989, 143(4):1366-1371.
66. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988, 167(6):1883-1893.
67. Murphy PM, Tiffany HL: Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991, 253(5025):1280-1283.
68. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI: Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991, 253(5025):1278-1280.
69. Wilson S, Wilkinson G, Milligan G: The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem* 2005, 280(31):28663-28674.
70. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O *et al*: Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 127(3):701-721 e701-770.
71. Colditz IG, Zwahlen RD, Baggiolini M: Neutrophil accumulation and plasma leakage induced in vivo by neutrophil-activating peptide-1. *J Leukoc Biol* 1990, 48(2):129-137.

72. Burke SM, Issekutz TB, Mohan K, Lee PW, Shmulevitz M, Marshall JS: Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood* 2008, 111(12):5467-5476.
73. Laterveer L, Lindley IJ, Hamilton MS, Willemze R, Fibbe WE: Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 1995, 85(8):2269-2275.
74. Pruijt JF, Willemze R, Fibbe WE: Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8. *Curr Opin Hematol* 1999, 6(3):152-158.
75. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Luger N, Domschke W *et al*: Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003, 278(10):8508-8515.
76. Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML, Lee YC, Yang PC: Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9(2):729-737.
77. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M: Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997, 151(4):1105-1113.

78. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989, 170(6):2081-2095.
79. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW: Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992, 148(11):3618-3623.
80. Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW: Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(4):1172-1176.
81. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Wlodawer A: Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci* 1996, 5(10):1955-1962.
82. Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW: Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 1994, 152(4):1821-1829.
83. Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R: Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol* 2004, 4(5):577-592.
84. Tan JC, Indelicato SR, Narula SK, Zavodny PJ, Chou CC: Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *J Biol Chem* 1993, 268(28):21053-21059.
85. Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M: The orphan receptor CRF2-4 is



- an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* 1998, 187(4):571-578.
86. Weber-Nordt RM, Riley JK, Greenlund AC, Moore KW, Darnell JE, Schreiber RD: Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 1996, 271(44):27954-27961.
87. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S: Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999, 10(1):39-49.
88. Grimbaldston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ: Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* 2007, 8(10):1095-1104.
89. Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H: IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* 2000, 165(1):286-291.
90. Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M: Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 2000, 165(1):292-296.
91. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, Hunter CA: Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007, 8(12):1363-1371.

92. Liu Y, de Waal Malefyt R, Briere F, Parham C, Bridon JM, Banchereau J, Moore KW, Xu J: The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* 1997, 158(2):604-613.
93. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE: Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991, 174(4):915-924.
94. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991, 174(5):1209-1220.
95. Taylor A, Akdis M, Joss A, Akkoc T, Wenig R, Colonna M, Daigle I, Flory E, Blaser K, Akdis CA: IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J Allergy Clin Immunol* 2007, 120(1):76-83.
96. Itoh K, Hirohata S: The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol* 1995, 154(9):4341-4350.
97. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993, 75(2):263-274.
98. Llorente L, Richaud-Patin Y, Garcia-Padilla C, Claret E, Jakez-Ocampo J, Cardiel MH, Alcocer-Varela J, Grangeot-Keros L,

- Alarcon-Segovia D, Wijdenes J *et al*: Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000, 43(8):1790-1800.
99. Granger GA, Shacks SJ, Williams TW, Kolb WP: Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* 1969, 221(5186):1155-1157.
100. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975, 72(9):3666-3670.
101. Bradley JR: TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008, 214(2):149-160.
102. MacEwan DJ: TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 2002, 135(4):855-875.
103. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, 104(4):487-501.
104. Kalliolias GD, Ivashkiv LB: TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016, 12(1):49-62.
105. Probert L: TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 2015, 302:2-22.
106. Janeway: Immunobiologia fisiologia e fisiopatologia del sistema immunitario, Piccin - V edizione edn; 2001.
107. Bonadonna: Medicina oncologica, Ottava edizione edn: Elsevier; 2007.

108. Ribatti D: Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis* 2008, 11(1):3-10.
109. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003, 9(6):669-676.
110. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L: Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016, 17(10):611-625.
111. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K: Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol* 2002, 4(1):E2-5.
112. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991, 5(12):1806-1814.
113. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991, 266(18):11947-11954.
114. Dor Y, Porat R, Keshet E: Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 280(6):C1367-1374.
115. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999, 13(1):9-22.
116. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D: Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial

- growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995, 270(43):25915-25919.
117. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS: Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(7):3609-3614.
118. Imoukhuede PI, Popel AS: Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 2011, 317(7):955-965.
119. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, Pyles EA, Yancopoulos GD, Stahl N, Wiegand SJ: Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 2012, 15(2):171-185.
120. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999, 126(6):1149-1159.
121. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999, 5(6):623-628.

122. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG: Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998, 78(11):1385-1394.
123. Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, Shopp GM, O'Neill CA: Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol* 1999, 27(1):78-86.
124. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998, 4(3):336-340.
125. Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA, Bicknell R: Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 2000, 141(3):995-1000.
126. Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J, Ferin M: Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(2):768-772.
127. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993, 362(6423):841-844.
128. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK *et al*: Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998, 94(6):715-725.

129. Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N: Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000, 60(22):6253-6258.
130. Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK: Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* 2000, 60(22):6248-6252.
131. Detmar M, Yeo KT, Nagy JA, Van de Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, Dvorak HF: Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1995, 105(1):44-50.
132. Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, Fukui M: VEGF andflt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 1996, 27(10):1865-1872; discussion 1872-1863.
133. van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M *et al*: VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 1999, 104(11):1613-1620.
134. Schmitt M, Horbach A, Kubitz R, Frilling A, Haussinger D: Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *J Hepatol* 2004, 41(2):274-283.

135. Mise M, Arii S, Higashitaji H, Furutani M, Niwano M, Harada T, Ishigami S, Toda Y, Nakayama H, Fukumoto M *et al*: Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology* 1996, 23(3):455-464.
136. von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S: Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001, 48(1):87-96.
137. Shimamura T, Saito S, Morita K, Kitamura T, Morimoto M, Kiba T, Numata K, Tanaka K, Sekihara H: Detection of vascular endothelial growth factor and its receptor expression in human hepatocellular carcinoma biopsy specimens. *J Gastroenterol Hepatol* 2000, 15(6):640-646.
138. Yamaguchi R, Yano H, Nakashima Y, Ogasawara S, Higaki K, Akiba J, Hicklin DJ, Kojiro M: Expression and localization of vascular endothelial growth factor receptors in human hepatocellular carcinoma and non-HCC tissues. *Oncol Rep* 2000, 7(4):725-729.
139. Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C: Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124(7):1061-1065.
140. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993, 72(6):835-846.



141. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994, 269(43):26988-26995.
142. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998, 92(6):735-745.
143. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998, 97(1):99-107.
144. Radisavljevic Z, Avraham H, Avraham S: Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2000, 275(27):20770-20774.
145. Kroll J, Waltenberger J: The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1997, 272(51):32521-32527.
146. Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, Granger HJ: Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am J Physiol* 1999, 276(2 Pt 2):H535-542.
147. Kaseb AO, Hanbali A, Cotant M, Hassan MM, Wollner I, Philip PA: Vascular endothelial growth factor in the management of

- hepatocellular carcinoma: a review of literature. *Cancer* 2009, 115(21):4895-4906.
148. Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY: Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005, 4(2):220-226.
149. Kanematsu M, Osada S, Amaoka N, Goshima S, Kondo H, Nishibori H, Kato H, Matsuo M, Yokoyama R, Hoshi H *et al*: Expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver: correlation with angiographically assisted CT. *AJR Am J Roentgenol* 2004, 183(6):1585-1593.
150. Kanematsu M, Semelka RC, Osada S, Amaoka N: Magnetic resonance imaging and expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular nodules in cirrhosis and hepatocellular carcinomas. *Top Magn Reson Imaging* 2005, 16(1):67-75.
151. Wang B, Gao ZQ, Yan X: Correlative study of angiogenesis and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging features of hepatocellular carcinoma. *Acta Radiol* 2005, 46(4):353-358.
152. Tseng PL, Tai MH, Huang CC, Wang CC, Lin JW, Hung CH, Chen CH, Wang JH, Lu SN, Lee CM *et al*: Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients. *J Surg Oncol* 2008, 98(5):349-357.
153. Wada H, Nagano H, Yamamoto H, Yang Y, Kondo M, Ota H, Nakamura M, Yoshioka S, Kato H, Damdinsuren B *et al*: Expression

- pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1 alpha. *Liver Int* 2006, 26(4):414-423.
154. Brodsky SV, Mendeleev N, Melamed M, Ramaswamy G: Vascular density and VEGF expression in hepatic lesions. *J Gastrointest Liver Dis* 2007, 16(4):373-377.
155. Deli G, Jin CH, Mu R, Yang S, Liang Y, Chen D, Makuuchi M: Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. *World J Gastroenterol* 2005, 11(7):960-963.
156. Cui J, Dong BW, Liang P, Yu XL, Yu DJ: Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol* 2004, 10(10):1533-1536.
157. Guo RP, Zhong C, Shi M, Zhang CQ, Wei W, Zhang YQ, Li JQ: Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006, 132(9):547-555.
158. Sheen IS, Jeng KS, Shih SC, Kao CR, Chang WH, Wang HY, Wang PC, Wang TE, Shyung LR, Chen CZ: Clinical significance of the expression of isoform 165 vascular endothelial growth factor mRNA in noncancerous liver remnants of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005, 11(2):187-192.
159. Wang ZL, Liang P, Dong BW, Yu XL, Yu DJ: Prognostic factors and recurrence of small hepatocellular carcinoma after hepatic resection or

- microwave ablation: a retrospective study. *J Gastrointest Surg* 2008, 12(2):327-337.
160. Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST: Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004, 91(10):1354-1360.
161. Tseng CS, Lo HW, Chen PH, Chuang WL, Juan CC, Ker CG: Clinical significance of plasma D-dimer levels and serum VEGF levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004, 51(59):1454-1458.
162. el-Houseini ME, Mohammed MS, Elshemey WM, Hussein TD, Desouky OS, Elsayed AA: Enhanced detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Control* 2005, 12(4):248-253.
163. Negahdari B, Shahosseini Z, Baniasadi V: Production of human epidermal growth factor using adenoviral based system. *Res Pharm Sci* 2016, 11(1):43-48.
164. Bennett NT, Schultz GS: Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993, 165(6):728-737.
165. Robbins: Fondamenti di patologia e fisiopatologia IX edizione edn: Edra; 2013.
166. Berlanga-Acosta J, Gavilondo-Cowley J, Lopez-Saura P, Gonzalez-Lopez T, Castro-Santana MD, Lopez-Mola E, Guillen-Nieto G, Herrera-Martinez L: Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int Wound J* 2009, 6(5):331-346.

167. Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001, 37 Suppl 4:S3-8.
168. Huang P, Xu X, Wang L, Zhu B, Wang X, Xia J: The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *J Cell Mol Med* 2014, 18(2):218-230.
169. Wells A: EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31(6):637-643.
170. Wenczak BA, Lynch JB, Nanney LB: Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. *J Clin Invest* 1992, 90(6):2392-2401.
171. Breindel JL, Haskins JW, Cowell EP, Zhao M, Nguyen DX, Stern DF: EGF receptor activates MET through MAPK to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis. *Cancer Res* 2013, 73(16):5053-5065.
172. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT: Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 136(2):331-345.
173. Finot F, Masson R, Desmots F, Ribault C, Bichet N, Vericat JA, Lafouge P, Guguen-Guillouzo C, Loyer P: Combined Stimulation with the Tumor Necrosis Factor alpha and the Epidermal Growth Factor Promotes the Proliferation of Hepatocytes in Rat Liver Cultured Slices. *Int J Hepatol* 2012, 2012:785786.
174. Wong VW, Yu J, Cheng AS, Wong GL, Chan HY, Chu ES, Ng EK, Chan FK, Sung JJ, Chan HL: High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *Int J Cancer* 2009, 124(12):2766-2770.

175. Liu H, Pan Z, Li A, Fu S, Lei Y, Sun H, Wu M, Zhou W: Roles of chemokine receptor 4 (CXCR4) and chemokine ligand 12 (CXCL12) in metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell Mol Immunol* 2008, 5(5):373-378.
176. Shirabe K, Mano Y, Muto J, Matono R, Motomura T, Toshima T, Takeishi K, Uchiyama H, Yoshizumi T, Taketomi A *et al*: Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surg Today* 2012, 42(1):1-7.
177. Lee SS, Bain VG, Peltekian K, Krajden M, Yoshida EM, Deschenes M, Heathcote J, Bailey RJ, Simonyi S, Sherman M *et al*: Treating chronic hepatitis C with pegylated interferon alfa-2a (40 KD) and ribavirin in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther* 2006, 23(3):397-408.
178. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER *et al*: Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009, 361(6):580-593.
179. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R *et al*: Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011, 364(25):2405-2416.
180. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N *et al*: Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011, 364(13):1195-1206.

181. Fusco DN, Chung RT: Novel therapies for hepatitis C: insights from the structure of the virus. *Annu Rev Med* 2012, 63:373-387.
182. Gutierrez JA, Lawitz EJ, Poordad F: Interferon-free, direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2015, 22(11):861-870.
183. Pawlotsky JM: NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2013, 59(2):375-382.
184. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM: Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004, 39(1):5-19.
185. Gerber L, Welzel TM, Zeuzem S: New therapeutic strategies in HCV: polymerase inhibitors. *Liver Int* 2013, 33 Suppl 1:85-92.
186. (AISF) AIpISdF: Documento di Indirizzo dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato per l'uso razionale di antivirali diretti di seconda generazione nelle categorie di pazienti affetti da epatite C cronica ammesse alla rimborsabilità italiana 20 Maggio 2016.
187. Kozbial K, Moser S, Schwarzer R, Laferl H, Al-Zoairy R, Stauber R, Stattermayer AF, Beinhardt S, Graziadei I, Freissmuth C *et al*: Unexpected high incidence of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with sustained virologic response following interferon-free direct-acting antiviral treatment. *J Hepatol* 2016, 65(4):856-858.
188. Zavaglia C, Okolicsanyi S, Cesarini L, Mazzarelli C, Pontecorvi V, Ciaccio A, Strazzabosco M, Belli LS: Is the risk of neoplastic recurrence increased after prescribing direct-acting antivirals for HCV patients whose HCC was previously cured? *J Hepatol* 2017, 66(1):236-237.

189. Yang JD, Aql BA, Pungpapong S, Gores GJ, Roberts LR, Leise MD: Direct acting antiviral therapy and tumor recurrence after liver transplantation for hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016, 65(4):859-860.
190. Cardoso H, Vale AM, Rodrigues S, Goncalves R, Albuquerque A, Pereira P, Lopes S, Silva M, Andrade P, Morais R *et al*: High incidence of hepatocellular carcinoma following successful interferon-free antiviral therapy for hepatitis C associated cirrhosis. *J Hepatol* 2016, 65(5):1070-1071.
191. Minami T, Tateishi R, Nakagomi R, Fujiwara N, Sato M, Enoku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S *et al*: The impact of direct-acting antivirals on early tumor recurrence after radiofrequency ablation in hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016, 65(6):1272-1273.
192. Petta S, Cabibbo G, Barbara M, Attardo S, Bucci L, Farinati F, Giannini EG, Tovoli F, Ciccarese F, Rapaccini GL *et al*: Hepatocellular carcinoma recurrence in patients with curative resection or ablation: impact of HCV eradication does not depend on the use of interferon. *Aliment Pharmacol Ther* 2017, 45(1):160-168.
193. Cheung MC, Walker AJ, Hudson BE, Verma S, McLauchlan J, Mutimer DJ, Brown A, Gelson WT, MacDonald DC, Agarwal K *et al*: Outcomes after successful direct-acting antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C and decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2016, 65(4):741-747.
194. Adhoute X OG, Raoul JL, Castellani P, Oules V, Le Folgoc G, Riso A, Benal S, Bourlière M: Impact of direct acting antivirals (DAA)



- against chronic hepatitis C (HCV) on hepatocellular carcinoma (HCC) recurrence: a case-control study *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2016, 31(suppl 3):381.
195. Nault JC, Colombo M: Hepatocellular carcinoma and direct acting antiviral treatments: Controversy after the revolution. *J Hepatol* 2016, 65(4):663-665.
196. Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK: HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8(5):292-301.
197. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilio M: Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 2010, 140(2):268-279.
198. Serti E, Chepa-Lotrea X, Kim YJ, Keane M, Fryzek N, Liang TJ, Ghany M, Rehermann B: Successful Interferon-Free Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection Normalizes Natural Killer Cell Function. *Gastroenterology* 2015, 149(1):190-200 e192.
199. Meissner EG, Wu D, Osinusi A, Bon D, Virtaneva K, Sturdevant D, Porcella S, Wang H, Herrmann E, McHutchison J *et al*: Endogenous intrahepatic IFNs and association with IFN-free HCV treatment outcome. *J Clin Invest* 2014, 124(8):3352-3363.
200. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR: Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res* 2011, 51(2-3):170-182.

201. Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB: Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 2006, 12(11):1301-1309.
202. Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, Crotty S, von Herrath MG: Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med* 2006, 203(11):2461-2472.

