

**FONDAZIONE "ISTITUTO DI RICERCA VIROLOGICA ORETTA BARTOLOMEI  
CORSI"**

**Coordinatore: ANNA LINDA ZIGNEGO**

**Titolo del Progetto: L'IMPORTANZA DEL VIRUS DELL'EPATITE C NELLA  
PATOGENESI DELLE MALATTIE EPATICHE ED EXTRAEPATICHE E NEI TUMORI**

- 1. Parola chiave: **Virus epatitici (HCV, HGV)**
- 2. Parola chiave: **Malattie linfoproliferative**
- 3. Parola chiave: **Oncogenesi virale**

**Ente: Università degli Studi di Firenze**

**Istituto: Istituto di Medicina Interna**

**Indirizzo: V.le Morgagni, 85**

**CAP: 50134      Città: Firenze**

**Telefono: 055/416635      FAX: 055/417123**

**E-mail: a.zignego@dfc.unifi.it**

**Direttore di Istituto: Prof. Paolo Gentilini**

**Indirizzo: Istituto di Medicina Interna, V.le Morgagni,85**

**CAP + Città: 50134 Firenze**

**Telefono: 055/411919      FAX: 055/417123**

**Firma:**

**Data: 18/12/1997**

## PROGETTO PRINCIPALE

### ABSTRACT

Il virus C dell'epatite (HCV) è stato riconosciuto come il maggior agente eziologico delle epatiti croniche non-A non-B post-trasfusionali e sporadiche nel mondo. Inoltre, l'HCV sembra essere correlato con lo sviluppo di carcinoma epatocellulare perfino in assenza di lesioni cirrotiche. Questo dato suggerisce un effetto oncogenico diretto dell'HCV su fegato infettato cronicamente. Noi precedentemente abbiamo mostrato che l'HCV non è solo un virus epatotropico, ma anche linfotropico. Inoltre, diversi disordini autoimmuni e linfoproliferativi (DLP), sono stati messi in correlazione con un'infezione cronica da HCV, esempi sono l'epatite autoimmune e la crioglobulinemia mista (CM).

La CM è un disordine linfoproliferativo benigno che in un limitato numero di casi può evolvere in un franco linfoma non Hodgkin's a cellule B (LNH). E' stato inoltre suggerito che la CM stessa sia l'espressione di un LNH a basso grado di malignità. Il linfotropismo dell'HCV suggerisce che questo virus potrebbe essere il fattore scatenante della proliferazione clonale delle cellule B che è alla base della CM e in alcuni casi, della sua evoluzione in un linfoma maligno. Su questa base è possibile ipotizzare che l'HCV potrebbe anche essere coinvolto nella patogenesi del linfoma non-Hodgkin's a cellule B idiopatico maligno. Questa ipotesi è stata recentemente rinforzata dall'osservazione di una significativamente più alta prevalenza di infezione HCV in pazienti con linfoma di Hodgkin's a cellule B rispetto agli appropriati controlli, e questo non solo nei nostri studi e in quelli europei, ma anche in quelli giapponesi e americani.

Gli scopi della nostra ricerca sono:

- 1) definire meglio la possibile associazione dell'infezione HCV con disordini maligni e non, con particolare riguardo per DLP (CM, linfoma a cellule B e T, leucemia linfatica acuta e cronica, macroglobulinemia di Waldenstrom, plasmocitoma, etc.), sulla base di un ampio studio della prevalenza dell'infezione da HCV in queste condizioni cliniche comparate ad un appropriato gruppo di controllo.
- 2) eseguire un'analisi virologica dei pazienti infetti per :
  - capire la storia naturale dell'associazione tra l'infezione da HCV e disordini sia epatici che extra-epatici (es. data dell'infezione/data dello sviluppo della malattia, concomitanza di differenti fattori ambientali e/o dell'ospite coinvolti nella trasformazione maligna; entità e cronologia dell'infezione di cellule linfoidi e tessuti, etc.);
  - valutare la possibile associazione tra DLP e particolari varianti dell'HCV ;
  - elaborare nuovi protocolli terapeutici includenti l'uso di interferone (alfa e beta) e un accurato follow-up sia virologico che onco-ematologico di pazienti con DLP.
- 3) Studiare il possibile ruolo giocato dall'infezione HCV nello sviluppo di una linfoproliferazione maligna, per esempio :
  - analizzando la possibilità che l'infezione HCV di cellule linfoidi possa indurre una trasformazione maligna attraverso un'attivazione di differenti virus linfotropici già precedentemente implicati nella patogenesi di malignità ematologiche (es. virus Herpes umano di tipo 6 e il virus di Epstein Barr) e/o attraverso la cooperazione con nuovi virus epatitici che mostrano analogie strutturali con l'HCV (HGV) ;
  - analizzando le caratteristiche dell'infezione da HCV in cellule linfoidi normali e maligne;
  - studiando la possibilità di un'alterazione del meccanismo regolante l'apoptosi delle cellule linfatiche e/o di una anormale linfoproliferazione indotta da HCV.

## BACKGROUND AND RAZIONALE

Il virus C dell'epatite (HCV) è stato riconosciuto come il maggior agente eziologico delle epatiti croniche non-A non-B post-trasfusionali e sporadiche nel mondo. Inoltre, l'HCV sembra essere correlato con lo sviluppo di carcinoma epatocellulare perfino in assenza di lesioni cirrotiche. Questo dato suggerisce un effetto oncogenico diretto dell'HCV su fegato infettato cronicamente. Precedentemente noi abbiamo dimostrato che l'HCV non è solo un virus epatotropico, ma anche linfotropico. Diversi disordini autoimmuni e linfoproliferativi (DLP), sono stati messi in correlazione con un'infezione cronica da HCV, esempi sono l'epatite autoimmune e la crioglobulinemia mista (CM).

La CM è un disordine linfoproliferativo benigno che in un limitato numero di pazienti può evolvere in un franco linfoma non Hodgkin's a cellule B (LNH). E' stato inoltre suggerito che la CM stessa è l'espressione di un LNH a basso grado di malignità. Il linfotropismo dell'HCV indica che questo virus potrebbe essere il fattore scatenante della proliferazione clonale delle cellule B che è alla base della CM e, in alcuni casi, della sua evoluzione in un linfoma maligno. Su questa base è possibile ipotizzare che l'HCV potrebbe anche essere coinvolto nella patogenesi del linfoma non-Hodgkin's a cellule B idiopatico maligno. Questa ipotesi è stata recentemente rinforzata dall'osservazione di una alta percentuale (> 30%-25%) di marcatori HCV in pazienti con LNH a cellule B e dall'osservazione della ricorrenza della stessa forma patologica maligna in pazienti con epatite cronica da HCV. I nostri dati preliminari sono stati recentemente confermati da studi europei, giapponesi, americani dove è stata determinata una frequenza di infezione da HCV significativamente più alta in soggetti con LNH a cellule B rispetto ai controlli, solo in Inghilterra ci sono sporadicamente dati negativi. Tuttavia, non esistono sufficienti dati che possano correlare in maniera significativa l'infezione da HCV con le patologie maligne delle cellule linfatiche.

Alla luce di questi risultati, gli scopi della nostra ricerca sono :

- 1) studiare la possibile associazione dell'infezione HCV sia con disordini maligni e non maligni, con particolare riguardo per DLP (CM, linfoma a cellule B e T, leucemia linfatica acuta e cronica, macroglobulinemia di Waldenstrom, plasmocitoma, etc.), sulla base di un ampio studio della prevalenza dell'infezione da HCV in queste condizioni cliniche comparate ad un appropriato gruppo di controllo.
- 2) eseguire un'analisi virologica dei pazienti infetti per :
  - capire la storia naturale dell'associazione tra l'infezione da HCV e disordini sia epatici che extra-epatici (es. data dell'infezione/data dello sviluppo della malattia, concomitanza di differenti fattori ambientali e/o dell'ospite coinvolti nella trasformazione maligna; entità e cronologia dell'infezione di cellule linfoidi e tessuti, etc.);
  - valutare la possibile associazione tra DLP e particolari varianti dell'HCV ;
  - elaborare nuovi protocolli terapeutici che includono l'uso di interferone (alfa e beta) e un accurato follow-up sia virologico che onco-ematologico di pazienti con DLP.
- 3) Studiare il possibile ruolo giocato dall'infezione HCV nello sviluppo di una linfoproliferazione maligna, per esempio :
  - analizzando la possibilità che l'infezione HCV di cellule linfoidi possa indurre una trasformazione maligna attraverso un'attivazione di differenti virus linfotropici già precedentemente sospettati di essere implicati nella patogenesi di malignità ematologiche (es. virus Herpes umano di tipo 6 e il virus di Epstein Barr) e/o attraverso la cooperazione con nuovi virus epatitici che mostrano analogie strutturali con l'HCV (HGV) ;
  - analizzando le caratteristiche dell'infezione da HCV in cellule linfoidi normali e maligne;
  - studiando la possibilità di un'alterazione del meccanismo regolante l'apoptosi delle cellule linfoidi e/o di una anormale linfoproliferazione indotta da HCV.

## REFERENCES

1. MS DE MITRI, K. POUSSIN, P. BACCARINI, P. PONTISSO, A. D'ERRICO, N. SIMON, W. GRIGIONI, A. ALBERTI, M. BEAUGRAND, E. PISI et al. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995; 345: 413-5.
2. FERRI C, U. BAICCHI, L. LA CIVITA, F. GRECO, G. LONGOMBARDO, A. MAZZONI, G. CARECCIA, A. MARTINI, AL. ZIGNEGO, MP. MANNNS. Autoimmunity in porphyria cutanea tarda associated with HCV infection. *Eur J Clin Invest* 23:851-855, 1993.
3. C. FERRI, G. LONGOMBARDO, L. LA CIVITA, F. GRECO, F. LOMBARDINI, R. CECCHETTI, S. MARCHI, F. COSTA, P. GENTILINI, M. MONTI, S. BOMBARDIERI, AL. ZIGNEGO, MP. MANNNS. Hepatitis C virus as common cause of mixed cryoglobulinemia and chronic liver disease. *J Inter Med*, 236: 31-6, 1994.
4. C. FERRI, L. LA CIVITA, A. MAZZONI, AL. ZIGNEGO. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell Non Hodgkin's lymphoma. *JAMA*, 272:355-356, 1994.
5. C. FERRI, F. CARACCIOLO, AL. ZIGNEGO, L. LA CIVITA, M. MONTI, G. LONGOMBARDO, F. LOMBARDINI, F. GRECO, E. CAPOCHIANI, A. MAZZONI, C. MAZZARO, G. PASERO. Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Brit J Haematol*, 88: 392-4, 1994.

6. AL ZIGNEGO, C FERRI, C GIANNINI, M MONTI, L LA CIVITA, G CARECCIA, G LONGOMBARDO, F LOMBARDINI, S BOMBARDIERI, P GENTILINI. Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med*, 124: 31-34, 1996.
7. AL ZIGNEGO, D MACCHIA, M MONTI, V THIERS, M MAZZETTI, M FOSCHI, E MAGGI, S ROMAGNANI, P GENTILINI, C BRECHOT. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Hepatol*. 15: 382-386, 1992.
8. AL ZIGNEGO, M DE CARLI, M MONTI, G CARECCIA, G LA VILLA, C GIANNINI, G DEL PRETE, S ROMAGNANI, P GENTILINI. Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected subjects. *J Med Virol* 1995;47:58-64.
9. C FERRI, M MONTI, L LA CIVITA, G LONGOMBARDO, F GRECO, G PASERO, P GENTILINI, S BOMBARDIERI, AL ZIGNEGO. Infection of Peripheral Blood Mononuclear Cells by Hepatitis C Virus in Mixed Cryoglobulinemia. *BLOOD* 12:3701-3704,1993.
10. C FERRI, M MONTI, L LA CIVITA, G CARECCIA, C MAZZARO, G LONGOMBARDO, F LOMBARDINI, F GRECO, G PASERO, S BOMBARDIERI, AL ZIGNEGO. Hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's B-cell lymphoma complicating mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Clin Invest*,24:781-784,1994.
11. MONTEVERDE A, RIVANO MT, ALLEGRA GC, MONTEVERDE AJ, ZIGROSSI P, BAGLIONI P, GOBBI M, et al. Essential mixed cryoglobulinemia type II: a manifestation of low-grade malignant lymphoma? Clinical morphological study of 12 cases with special reference to immunohistochemical findings. *Acta Haematol*. 1988; 79: 20-22.
12. C FERRI, L LA CIVITA, M MONTI, G LONGOMBARDO, F GRECO, G PASERO, AL ZIGNEGO. Can hepatitis C virus infection be complicated by malignant lymphoma ? *Lancet* 1995 già accettato per la pubblicazione.
13. CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987; 162: 156-9.
14. KWOK S, HIGUCHI R. Avoiding false positive results with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-8
15. OKAMOTO H, SUGIYAMA Y, OKATA S, ET AL. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992; 73: 673-9.
16. OKAMOTO H, TOKITA H, SAKAMOTO M, ET AL. Characterization of the genomic sequence of type-V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol* 1993; 74: 2385-90.
17. C GIANNINI, THIERS V, NOUSBAUM J-B, STUYVER L, MAERTENS G AND BRECHOT C. Comparative analysis of two assays for genotyping Hepatitis C virus (HCV) based on genotype-specific primers or probes. *J Hepatol*. 1995; 23: 246-253.
18. ANDONOV A, CHAUNDHARY RK. Genotyping Canadian isolates of hepatitis C virus isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (8) 2031-4.
19. ZUCKERMAN E, ZUCKERMAN T, LEVINE AM ET AL. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Intern Med* 1997 ;127:423-428.
20. IZUMI T, SASAKI R, TSUNODA S. ET AL. B-cell malignancy and hepatitis C infection. *Leukemia* 1997 ;11s :516-518.
21. C FERRI, L LA CIVITA, AL ZIGNEGO, F LOMBARDINI, G LONGOMBARDO, P GENTILINI, G PASERO. Hepatocellular carcinoma in mixed cryoglobulinemia patients. *Clin Exp Rheumatol*, 14: 111-112, 1996.
22. L LA CIVITA, AL ZIGNEGO, M MONTI, G LONGOMBARDO, G PASERO, C FERRI. Mixed cryoglobulinemia as a possible preneoplastic disorder. *Arthritis Rheum*, 38:1859-1860, 1995.
23. C FERRI, L LA CIVITA, AL ZIGNEGO. Lymphoproliferation and hepatitis C virus infection. *Ann. Intern Med*, 125:344. 1996 .
24. P ANDREONE, A GRAMENZI, C CURSARO, M BERNARDI, AL ZIGNEGO. Monoclonal gammopathy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Blood* 88:1122 ,1996.
25. L LA CIVITA, AL ZIGNEGO, M MONTI, G LONGOMBARDO, F GRECO, G PASERO, C FERRI. Type C hepatitis and chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Cancer*, 32A:1819-1820, 1996
26. FERRI C, L LA CIVITA, AL ZIGNEGO, G PASERO. Hepatitis C virus infection and cancer . *Int J Cancer*, 72:1-3, 1997
27. AL ZIGNEGO, C FERRI, C GIANNINI, L LA CIVITA, G CARECCIA, G LONGOMBARDO, G BELLESI, F CARACCILO, V THIERS, G PASERO, S BOMBARDIERI, P GENTILINI. Analysis of HCV infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol*, 142:545-555, 1997
28. AL ZIGNEGO, C FERRI, F INNOCENTI, C GIANNINI, M MONTI, G BELLESI, P GENTILINI. Lack of preferential localization of tumoral mass in B-cell non-Hodgkin's lymphoma associated with hepatitis C virus infection. *Blood*, 9:86-88, 1997
29. C FERRI, L LA CIVITA, F CARACCILO, G BELLESI, AL ZIGNEGO. Hepatitis C virus and LPD. *Blood*, 88:4730, 1996

30. C FERRI, L LO JACONO, M MONTI, F CARACCILO, L LA CIVITA, LA BARSANTI, G LONGOMBARDO, F LOMBARDINI, G CARECCIA, AL ZIGNEGO. Lymphotropic virus infection of peripheral blood mononuclear cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Haematol.*

31. AL ZIGNEGO, C GIANNINI, G BELLESI, P GENTILINI, S HADZYIANNIS, C FERRI. May HGV infection be implicated in lymphomagenesis? *Brit J Haematol*, 1997 ;98 :778-779.

## DESCRIZIONE DELLE PROPOSTE DI RICERCA

### 1) Analisi dell'associazione tra infezione da HCV e malattie maligne e non, in particolare tra infezione virale e disordini linfoproliferativi (DLP).

Lo studio dell'associazione da HCV con disordini HCV-correlati, ed in particolare, con differenti malattie linfoproliferative maligne (linfoma a cellule B e T, leucemia linfatica acuta e cronica, macroglobulinemia di Waldstrom, plasmocitoma), sarà fatto sulla base di un ampio studio della prevalenza dell'infezione da HCV in queste condizioni cliniche rispetto ad appropriati gruppi di controllo.

Questo studio sarà principalmente indirizzato verso l'analisi di pazienti reclutati fra quelli che alla prima diagnosi presentavano evidenze di malattie linfoproliferative, ciò per evitare interferenze con infezioni virali nosocomiali e/o con precedenti terapie. Questo studio epidemiologico a lungo termine rappresenterà la base per il progetto di ricerca, comprovante l'opportunità di descrivere ulteriormente l'associazione, precedentemente dimostrata, tra infezione da HCV e alcuni disordini linfoproliferativi (CM, LNH a cellule B durante il corso di una CM, LNH a cellule B idiopatico). Questo possibilmente permetterà :

- inclusione/esclusione di differenti disordini linfoproliferativi in/da un gruppo di malattie significativamente associate con l'infezione da HCV con conseguente riferimento a popolazioni di pazienti che devono essere studiate ;
- dati epidemiologici (differenze geografiche, incidenza, ecc.).

### 2) Analisi virologica di pazienti HCV-positivi con DLP.

La selezione di pazienti con marcatori di infezione da HCV in atto/o pregressa (vedi punto 1) sarà seguita mediante analisi virologiche più approfondite in pazienti infetti per :

- capire la storia naturale dell'associazione tra l'infezione da HCV e disordini sia epatici che extra-epatici (es. data dell'infezione/data dello sviluppo della malattia, concomitanza di differenti fattori ambientali e/o dell'ospite coinvolti nella trasformazione maligna; entità e cronologia dell'infezione di cellule linfoidi e tessuti, etc.);
- valutare la possibile associazione tra DLP e particolari varianti dell'HCV ;
- elaborare nuovi protocolli terapeutici includenti l'uso di interferone (alfa e beta) e un accurato follow-up sia virologico che onco-ematologico di pazienti con DLP.

Le principali metodiche necessarie per lo svolgimento della ricerca sono le seguenti :

**Estrazione RNA.** L'RNA totale viene estratto da vari materiali (siero, cellule mononucleate del sangue e dell'aspirato midollare, tessuti) utilizzando una versione modificata del metodo di Chomczynsky & Sacchi(13). L'RNA viene quindi rissospeso in H<sub>2</sub>O DEPC, aliquotato, se non utilizzato immediatamente, conservato a -80°C o in azoto liquido.

Per la determinazione dell'HCV-RNA viene eseguita una RT-Nested PCR(9). Al fine di assicurare un'alta sensibilità la reazione viene effettuata utilizzando due coppie di primers, una interna all'altra (nested PCR), localizzati nella regione altamente conservata posta a 5' del genoma virale (5'UTR). Il rischio di falsi positivi dovuti alla riamplicazione di prodotti preesistenti, viene eliminato utilizzando particolari accorgimenti oltre a quelli già descritti in letteratura (14) quali :

- "One-tube" nested PCR che consente di effettuare le due reazioni di amplificazione nello stesso tubo senza doverlo aprire tra il primo ed il secondo step.

- Uso di stanze separate per le varie fasi della metodica (estrazione RNA, sintesi di cDNA, preparazione delle miscele di reazione, amplificazione, elettroforesi su gel).

- Incorporazione di dUTP al posto di dTTP nella miscela di reazione della PCR per creare prodotti di amplificazione contenenti dUTP che possono poi essere degradati dall'azione dell'enzima Uracil-N-Glicosilasi che viene aggiunto ad entrambe le miscele di reazione.

**Determinazione del genotipo dell'HCV.** La principale tecnica di genotipizzazione adottata è quella che si basa sull'amplificazione di una regione del core con primers genotipo-specifici (15,16), alla quale abbiamo apportato alcune modifiche per incrementarne sia la sensibilità che la specificità ; infatti, le reazioni di amplificazioni (come descritto precedentemente), sono effettuate non miscelando nella stessa provetta i vari primers genotipo-specifici, ma eseguendole separatamente in presenza di un solo primer specifico. Per la rilevazione del genotipo 2, viene utilizzato il nuovo primer tipo specifico sintetizzato sulla base di un ampio studio di sequenze di isolati virali europee (17). In assenza di primer genotipo specifici per distinguere i genotipi meno frequenti 4 e 5, usiamo in caso di risultati indeterminati, un'altra tecnica di determinazione del genotipo HCV basata sull'ibridazione di prodotti di PCR della regione 5' UTR contro sonde genotipo-specifiche immobilizzate su supporti di nitrocellulosa (Linee Probe Assay, LIPA).

Nel caso di infezione di più di un genotipo all'interno dello stesso individuo, questi sono evidenziabili quasi esclusivamente dalla PCR genotipo-specifica anche se talvolta sono stati descritti risultati ambigui dovuti a fenomeni di cross-annealing da parte dei vari primers (18). Per tale ragione è stata messa a punto un'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) dei prodotti di PCR tipo-specifica che si avvale di endonucleasi di restrizione che tagliano specificatamente un genotipo rispetto ad un altro.

**Tecniche di sequenziamento del DNA.** Per quanto riguarda il sequenziamento diretto dei prodotti di PCR vengono utilizzati due metodi :

-sequenziamento ciclico in PCR con una DNA polimerasi termostabile che consente di partire da quantità infinitesime (dell'ordine delle fmoli) di DNA a doppia elica. Tale metodo è utilizzato specialmente per molecole a basso peso molecolare come i prodotti della PCR genotipo-specifica.

- Tecniche di sequenziamento in fase solida con la polimerasi T7 per prodotti di PCR ; in alternativa al clonaggio in vettori procarioti per ottenere DNA a singola elica altamente purificato vengono impiegate delle resine magnetiche rivestite di avidina. Biotilinando uno dei due primer della PCR (generalmente il primer antisenso) si ottengono, dopo una breve denaturazione con alcali, le singole eliche pronte per il sequenziamento.

Sono di corrente utilizzo anche tecniche di clonaggio di vettori procariotici sia per la generazione di DNA a singola elica per il sequenziamento, sia per la produzione di sonde per southern e northern blotting.

### 3) Studio del possibile ruolo giocato dall'infezione da HCV nello sviluppo di linfoproliferazioni maligne.

- analizzando la possibilità che l'infezione HCV di cellule linfoidi possa indurre una trasformazione maligna attraverso un'attivazione di differenti virus linfotropici già precedentemente sospettati di essere implicati nella patogenesi di malignità ematologiche (es. virus Herpes umano di tipo 6 e il virus di Epstein Barr) e/o attraverso la cooperazione con nuovi virus epatitici che mostrano analogie strutturali con l'HCV (HGV) ;

-analizzando le caratteristiche dell'infezione da HCV in cellule linfoidi normali e maligne;

-studiando la possibilità di un'alterazione del meccanismo regolante l'apoptosi delle cellule linfoidi e/o di una anormale linfoproliferazione indotta da HCV.

I principali metodi necessari per la realizzazione di questo progetto sono quelli già descritti al punto 2 con l'aggiunta dei seguenti:

**Culture cellulari.** L'analisi della replicazione virale all'interno di cellule del sistema linfatico viene effettuata anche grazie a culture cellulari B e T e monociti provenienti sia dal sangue periferico o da linfociti provenienti dall'infiltrato infiammatorio intraepatico. Cloni linfocitari T sono ottenuti da tali popolazioni cellulari tramite immediata coltura in adeguato medium in presenza di interleuchina-2. Dopo la coltura è protratta per vari giorni (circa 9), i cloni linfocitari vengono ottenuti tramite diluizioni limite delle suddette linee cellulari (8); quindi, il fenotipo cellulare viene determinato grazie ad analisi citofluorimetriche. Su cloni di linfociti T e su linee di cellule B immortalizzate (da EBV) sono previsti esperimenti di infezione HCV artificiale utilizzando sieri umani o di scimpanzè sulla base di protocolli esistenti in letteratura, da noi parzialmente modificati e già mostratisi efficaci in esperimenti preliminari (8).

**Esperimenti su topi "SCID".** I topi "SCID" (Severe Combined Immuno Deficient) sono roditori privi di cellule B e T funzionanti e possono rappresentare un ottimo modello sperimentale per evidenziare l'infezione, la replicazione e la permanenza del virus C in cellule linfatiche o tessuti. Esperimenti preliminari evidenziano che dopo l'inoculo di cellule mononucleate (HCV RNA positive) provenienti da soggetti con infezione cronica, il virus permaneva nell'animale anche a distanza di varie settimane. Questi risultati preliminari suggeriscono l'uso di tale modello animale per esperimenti di inoculo di cellule leucemiche/linfomatose provenienti da pazienti HCV-positivi nei quali successivamente sarà effettuata un'approfondita analisi virologica.

Infine, è previsto l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare e cellulare per l'analisi del possibile intervento di un'alterazione dei meccanismi fisiologici apoptotici regolanti l'omeostasi del sistema linfatico a seguito dell'infezione virale.

**Analisi della ricombinazione di bcl-2.** La determinazione del segmento di fusione bcl-2/JH è stata effettuata con la metodica della PCR (MBR bcl-2/JH PCR) utilizzando DNA totale (0,1 µg) estratto da cellule mononucleate del sangue periferico o dell'aspirato midollare secondo Gribben et al. (9) con minori modificazioni. In ogni esperimento erano inclusi controlli positivi costituiti da un ugual quantitativo di DNA proveniente da PBMC di pazienti con linfoma follicolare non-Hodgkin's che presentavano la traslocazione e DNA proveniente dalla linea cellulare DHL-6, e controlli negativi costituiti dal tampone di PCR senza DNA.

Ogni campione è stato amplificato almeno tre volte usando i metodi già descritti per evitare risultati falsamente positivi (3).

**Caratterizzazione immunoistochimica delle cellule linfoidi in sezioni epatiche e di midollo,** con particolare interesse per la determinazione del bcl-2 e dei prodotti c-myc, dei fenotipi e monotipi IgMK relativamente alle cellule B con Ig di superficie.

**Analisi dell'espansione clonale delle cellule B** utilizzando metodi di RTPCR già descritti (10,11).

### REFERENCES.

- 1- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987; 162: 156-9.
- 2- C FERRI, M MONTI, L LA CIVITA, G LONGOMBARDO, F GRECO, G PASERO, P GENTILINI, S BOMBARDIERI, AL ZIGNEGO. Infection of Peripheral Blood Mononuclear Cells by Hepatitis C Virus in Mixed Cryoglobulinemia. BLOOD 12:3701-3704,1993.

- 3- ZIGNEGO AL, FERRI C, GIANNINI C, MONTI M, LA CIVITA L, CARECCIA G, LONGOMBARDO G, LOMBARDINI F, BOMBARDIERI S, GENTILINI. Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia. 1996 ;Ann Intern Med, 124: 31-34.
- 4- OKAMOTO H, SUGIYAMA Y, OKATA S, ET AL. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. J Gen Virol 1992; 73: 673-9.
- 5- OKAMOTO H, TOKITA H, SAKAMOTO M, ET AL. Characterization of the genomic sequence of type-V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. J Gen Virol 1993; 74: 2385-90.
- 6- C GIANNINI, THIERS V, NOUSBAUM J-B, STUYVER L, MAERTENS G AND BRECHOT C. Comparative analysis of two assays for genotyping Hepatitis C virus (HCV) based on genotype-specific primers or probes. J Hepatol. 1995; 23: 246-253.
- 7- ANDONOV A, CHAUNDHARY RK. Genotyping Canadian isolates of hepatitis C virus isolates by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32 (8) 2031-4.
- 8- AL ZIGNEGO, M DE CAREÌ, M MONTI, G CARECCIA, G LA VILLA, C GIANNINI, G DEL PRETE, S ROMAGNANI, P GENTILINI. Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected subjects. J Med Virol 1995;47:58-64.
- 9- GRIBBEN JG, FREEDMAN AS, WOO SD, BLAKE K, SHU RS, FREEMAN G, LONGTINE JA, PINKUS G S, NADLER LM. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. Blood 1991 ;78 :3275-3280.)
- 10- DEANE M and NORTON JD. Detection of immunoglobulin gene rearrangement in B lymphoid malignancies by polymerase chain reaction gene amplification. Brit J Haematol 1990 ;74 :251-256.
- 11- FRANZIN F, EFREMOV DJ, POZZATO G et al. Clonal B-cell expansion in peripheral blood of HCV infected patients. Brit J Haematol 1995 ;90 :548-552.)



## ESPOSIZIONE E VALORE DEL PROGETTO

L'infezione da virus C dell'epatite, sia per la sua diffusione che per la severità dei sintomi, costituisce un problema medico di primaria importanza sia nei paesi industrializzati che non industrializzati. Secondo studi recenti almeno 100 milioni di persone nel mondo sono portatori cronici di HCV. In Italia, studi sierologici eseguiti su donatori di sangue, hanno rilevato che almeno l'1,15% dei soggetti adulti apparentemente sani sono portatori cronici di infezione da HCV, mentre dati ricavati da studi eseguiti su una popolazione random mettono in evidenza una percentuale di circa 2-4% in una fascia di età più elevata. La scoperta del linfotropismo dell'HCV e l'associazione dell'infezione del virus con una ampia serie di disordini extraepatici basati su meccanismi di tipo autoimmune e/o linfoproliferativo, mostrano il potenziale patogenetico di questo virus, non solo nell'insorgenza di epatopatie, ma anche di disordini del sistema emopoietico.

In particolare, dal punto di vista oncologico, l'HCV sembra essere coinvolto da un lato nella patogenesi della maggior parte degli epato-carcinomi, dall'altro nella determinazione di alcuni DLP maligni conosciuti attraverso meccanismi che potrebbero presentare dei possibili passaggi in comune.

In accordo al fatto che l'individuazione dell'agente virale di una patologia è sempre il primo passo per una razionale valutazione delle misure preventive e terapeutiche, appare chiaro che l'individuazione della relazione fra HCV e DLP, l'eventuale importanza di effetti co-operativi di una coinfezione con altri virus linfotropi e, più in generale, i possibili meccanismi attraverso i quali l'infezione da HCV possa favorire una linfomagenesi, così come la valutazione della risposta a specifiche terapie, potrebbero essere considerati di primaria importanza.

Per una appropriata comprensione della precisa relazione esistente fra l'infezione da HCV e processi linfoproliferativi, gli studi clinico-epidemiologici devono essere affiancati con parallele analisi virologiche della popolazione, inoltre negli stessi pazienti, tramite tecniche di biologia molecolare, deve essere valutato il coinvolgimento di particolari meccanismi oncogenici e anti-apoptotici.

Questo implica una sostanziale riorganizzazione del gruppo di ricerca con importanti costi in termini di reagenti/strumenti, tempo e personale.

## FASI DI RICERCA

### 1) Analisi dell'associazione fra infezione da HCV e disordini HCV-correlati :

- a- inclusione/esclusione di differenti disordini extraepatici nel/dal gruppo di malattie associate significativamente con l'infezione da HCV con conseguente selezione della popolazione di pazienti da studiare.
- b- raccolta dei dati epidemiologici (differenze geografiche, incidenze, etc.); **ottenibile in 3 anni. Tempo totale durata: 1-36 mesi del progetto.**

### 2) Analisi virologica dei pazienti con DLP e HCV-positivi.

- a- analisi della storia naturale dell' associazione tra infezione da HCV e disordini associati (es. data dell'infezione/data dell'inizio della malattia); studio della concomitanza dei fattori ambientali e/o dell'ospite probabilmente coinvolti nella trasformazione maligna; entità e cronologia dell'infezione delle cellule linfoidi e del tessuto; **Ottenibile nello stesso tempo del punto 1 (almeno 3 anni). Tempo totale di durata: 1-36 mesi del progetto.**
- b- valutazione della possibile associazione fra DLP e particolari varianti dell'HCV ; **ottenibile in 1 anni. Tempo totale durata: 1-12 mesi del progetto.**
- c- elaborazione e realizzazione di nuovi protocolli terapeutici per DLP includenti l'uso dell'interferone e un accurato follow-up virologico dei pazienti in aggiunta a quello onco-ematologico ; **ottenibile in 3 anni. Tempo totale durata: 1-36 mesi del progetto.**

### 3) Studio del possibile ruolo giocato dall'infezione da HCV nello sviluppo di linfoproliferazioni maligne.

- a- analisi della possibilità che l'infezione da HCV delle cellule linfoidi induca una trasformazione maligna attraverso l'attivazione di differenti virus linfotropi già sospettati di essere implicati nella patogenesi di malignità ematologiche (es. virus herpes umano di tipo 6 e virus di Epstein Barr) e/o attraverso una co-operazione con nuovi virus epatitici mostrandoti una analogia strutturale con l'HCV (HGV) o con differenti varianti genotipiche dell'HCV presenti nello stesso paziente; **ottenibile in 1 anno. Tempo totale di durata: 1-12 mesi del progetto.**
- b- analisi delle caratteristiche dell'infezione da HCV nelle cellule linfoidi sia normali che maligne; **ottenibile in 1 anno. Tempo totale di durata: 12-24 mesi del progetto.**
- c- Studio della possibilità dell'alterazione nelle cellule linfoidi del meccanismo regolante l'apoptosi e/o un'anormale linfoproliferazione indotta dall'HCV ; **ottenibile in 3 anni. Tempo totale di durata: 1-36 mesi del progetto**

## POTENZIALE DI ATTUAZIONE DEL PROGETTO

**Esperienza, qualificazione, passate esperienze e lavori attuati dal responsabile del gruppo e di grande rilevanza per il compimento del progetto del lavoro proposto.**

Anna Linda Zignego ha acquisito esperienze nei seguenti settori di ricerca:

- a- studi clinici : c/o Istituto di Medicina Interna (clinica e ambulatorio) e presso l'Unità di Trapianto di Fegato, Ospedale di Paul Brousse, Villejuif, France ;
- b- biologia molecolare, biologia cellulare e tecniche di immunologia: c/o Istituto Pasteur, Unità de Ricombinazione e Espressione Genetica, e Hybridotest (Prof. Pierre Tiollais e Prof. Christian Brechot) e laboratori di Immunologia Clinica dell'Università di Siena e di Firenze (vedi c.v.).

La responsabile è attualmente Dottore in Medicina, Dottore di Ricerca, Assistente medico, Specialista in Immunologia Clinica e dal 1990 dirige il laboratorio di ricerca di Virologia Molecolare e Oncologia Virale dell'Istituto di Medicina Interna dell'Università di Firenze; nel quale ha pubblicato 315 lavori tra cui articoli su riviste internazionali e nazionali, review, capitoli su libri scientifici, monografie e abstracts accettati per la presentazione e discussione in congressi sia nazionali che internazionali (citation Index al Dicembre 1996 : 442). E' membro di diverse società scientifiche sia nazionali che internazionali quali : European Association for the Study of the Liver (EASL), Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF), Italian Liver Foundation (ILF : membro della commissione scientifica), Associazione Italiana per la Lotta contro le Crioglobulinemie (ALCRI), Società Italiana Medicina Interna (SIMI). Precedente esperienza nello specifico campo del progetto di ricerca è attestata da una serie di pubblicazioni internazionali (vedi Pubblicazioni).

## PERSONALE COINVOLTO NELLA RICERCA

Nome	ruolo nel progetto
ANNA LINDA ZIGNEGO	Coordinatore
PAOLO GENTILINI	professore ordinario (Direttore dell'Istituto di Medicina Interna)
MONICA MONTI	tecnico
CARLO GIANNINI	dottorando di ricerca
FRANCESCA GIANNELLI	dottorando di ricerca
M.EUGENIA MARROCCHI	dottorando di ricerca
STEFANIA MOSCARELLA	tecnico
BRUNO BRUNETTI	tecnico
STEFANIA MADIÀ	tecnico
ROSSANA FONTANA	borsista
SILVIA PULITI	specializzanda
CRISTINA TOSTI GUERRA	tecnico
ANTONIO MAZZOCCA	dottorando di ricerca
ANTONELLA SIMONI	tecnico