Indice

INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

1.2 IL VIRUS DELL' EPATITE B

- *CLASSIFICAZIONE E STRUTTURA*

- *GENOMA VIRALE*

1.3 STRUTTURA E FUNZIONI DELLE PROTEINE VIRALI

1.4 CICLO VITALE

1.5 STORIA NATURALE DELL' INFEZIONE E MARCATORI DIAGNOSTICI

1.6 EPIDEMIOLOGIA DI HBV

1.7 PATOGENESI

1.8 DIAGNOSI

1.9 TERAPIA

1.10 VACCINO

1.11 EPIDEMIOLOGIA DELL' EPATOCARCINOMA (HCC)

1.12 MECCANISMI MOLECOLARI DELL' EPATOCARCINOMA INDOTTO DA HBV

SCOPO DELLA TESI

PAZIENTI MATERIALI E METODI

2.1 PAZIENTI

2.2 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI INTRAEPATICI E PURIFICAZIONE ANNESSA

2.3 METODICA DI AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE PRE-S, PRE-C, CORE DI HBV

2.4 CORSA ELETTROFORETICA PER CAPILLARITA' SU QIAxcel

2.5 DILUIZIONE DEI CAMPIONI AMPLIFICATI

2.6 SEQUENZIAMENTO

2.7 SEQUENZIAMENTO NEXT GENERATION SEQUENCING

2.8 ANALISI BIOINFORMATICA

RISULTATI

3.1 PAZIENTI E CAMPIONI CLINICI

3.2 SEQUENZIAMENTO DELLE REGIONI PRE-C CORE E PRE-S TRAMITE LA METODICA SANGER

3.3 ANALISI DI QUASISPECIE TRAMITE SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE

3.4 ANALISI QUANTITATIVE DELLA VARIABILITÀ VIRALE

3.5 ANALISI QUALITATIVA DELLE MUTAZIONI PUNTIFORMI

3.6 ANALISI QUALITATIVA DELLE MUTAZIONI PER DELEZIONE INSERZIONE

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

L'epatite è un processo infiammatorio che interessa il fegato e può essere causato da diversi fattori quali: farmaci, malattie autoimmuni, alcol e virus.

Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (*Oms*), le epatiti virali rappresentano ancora oggi uno dei principali problemi di sanità pubblica a livello mondiale. I dati Oms riferiscono infatti che nel 2015, erano 325 milioni le persone che, nel mondo, vivevano con un'infezione cronica da epatite e 1,34 milioni sono stati i decessi globali correlati a questa malattia. https://www.epicentro.iss.it/epatite/epidemiologia-mondo

Tra i virus identificati e riconosciuti come responsabili della maggior parte delle epatiti virali acute e croniche vi sono il virus dell'epatite B (HBV), C (HCV), che differiscono tra loro per dimensione, peso molecolare, genoma, ciclo replicativo, assetto antigenico, vie di trasmissione ed evoluzione clinica dell'infezione.

In particolare, il danno epatico varia molto a seconda delle zone geografiche: è più diffuso in Asia rispetto a Stati Uniti ed Europa.

La cronicizzazione dell'epatite comporta alterazione della ultra struttura epatocitaria con lisi cellulare e incremento di fibrosi nel lobulo fino alla destabilizzazione della struttura e funzionalità epatica.

Con il subentro dello stadio cirrotico, il quadro clinico tende a complicarsi con lo sviluppo di epatocarcinoma (HCC) o di insufficienza epatica, determinando così la morte o la necessità di trapianto epatico.

Il carcinoma epatobiliare è il sesto tumore più frequente a livello mondiale e la seconda morte per neoplasia.

Nel 2018 è stata stimata la diagnosi di 12.800 nuovi casi di (HCC) in Italia, circa il 3% di tutti i nuovi casi di tumore con un rapporto uomo : donna di circa 2,2 : 1.

https://www.registritumori.it/cms/pubblicazioni/i-numeri-del-cancro-italia-2018

Sebbene l'epatite B e C rappresentino i principali fattori di HCC a livello mondiale, fortunatamente sono stati implementati piani preventivi che prevedono la vaccinazione dall' infezione dell'HBV e la messa in atto di politiche volte a ridurre il rischio di trasmissione interindivuale dei virus.

1.2 IL VIRUS DELL' EPATITE B

CLASSIFICAZIONE E STRUTTURA

Il virus dell'epatite B (HBV) appartiene alla famiglia *Hepadnaviridae* (genere *Orthohepadnavirus*), che comprende virus epatotropi a DNA, responsabili dell'insorgenza di malattie epatiche acute e croniche. [1]

Mofologicamente, una delle caratteristiche più distintive dell'HBV è la

presenza di tre distinte particelle: una sferica di circa 42 nm di diametro, *"particella di Dane",* corrispondente al virione maturo ed infettante, e due sferiche o filamentose di circa 22 nm di diametro, prive di DNA, ma munite degli antigeni di superficie. [2]

La particella di Dane è costituita da un involucro esterno lipoproteico *envelope* e da una struttura interna, *nucleocapside* o *Core* di circa 30 nm.

Il nucleocapside è rivestito da un complesso proteico, *capside,* caratterizzato dall' *antigene del Core* (*HBcAg*), che comprende il DNA virale, circolare a doppia elica parzialmente incompleto, una DNA polimerasi, la cui funzione è richiesta sia per la trascrizione inversa sullo stampo di un RNA (intermedio replicativo).

L' involucro pericapsidico è un involucro fosfolipidico che contiene tre glicoproteine sintetizzate nel citoplasma degli epatociti infetti: *large*, *middle* e *small* derivanti rispettivamente dalle porzioni geniche: preS1, preS2 e S le quali nel loro insieme costituiscono HBsAg. (figura 1)

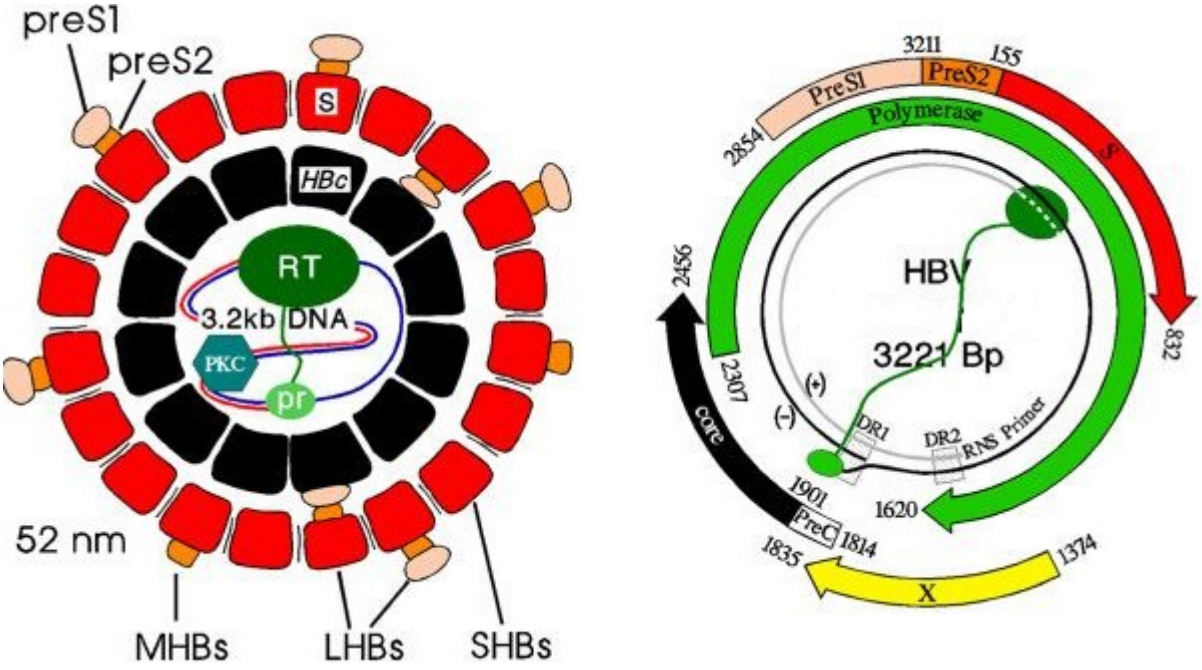


Figura 1 *Struttura del Virus dell'Epatite B*

Nel circolo sanguigno di pazienti infetti da HBV si osservano oltre alle particelle infettive, le particelle subvirali (*SVP*), che presentano forma sferica o filamentosa (figura 2);

L'involucro delle SVP sembra essere determinato dal rapporto delle proteine S e L che si coassemblano durante la morfogenesi. Il coassemblaggio di una pro-porzione più elevata di proteina L con S provoca la formazione della forma filamentosa di HBsAg. [3]

L'eccessiva produzione di SVP può causare tolleranza immunitaria e contribuire alla persistenza dell'infezione cronica. [4]

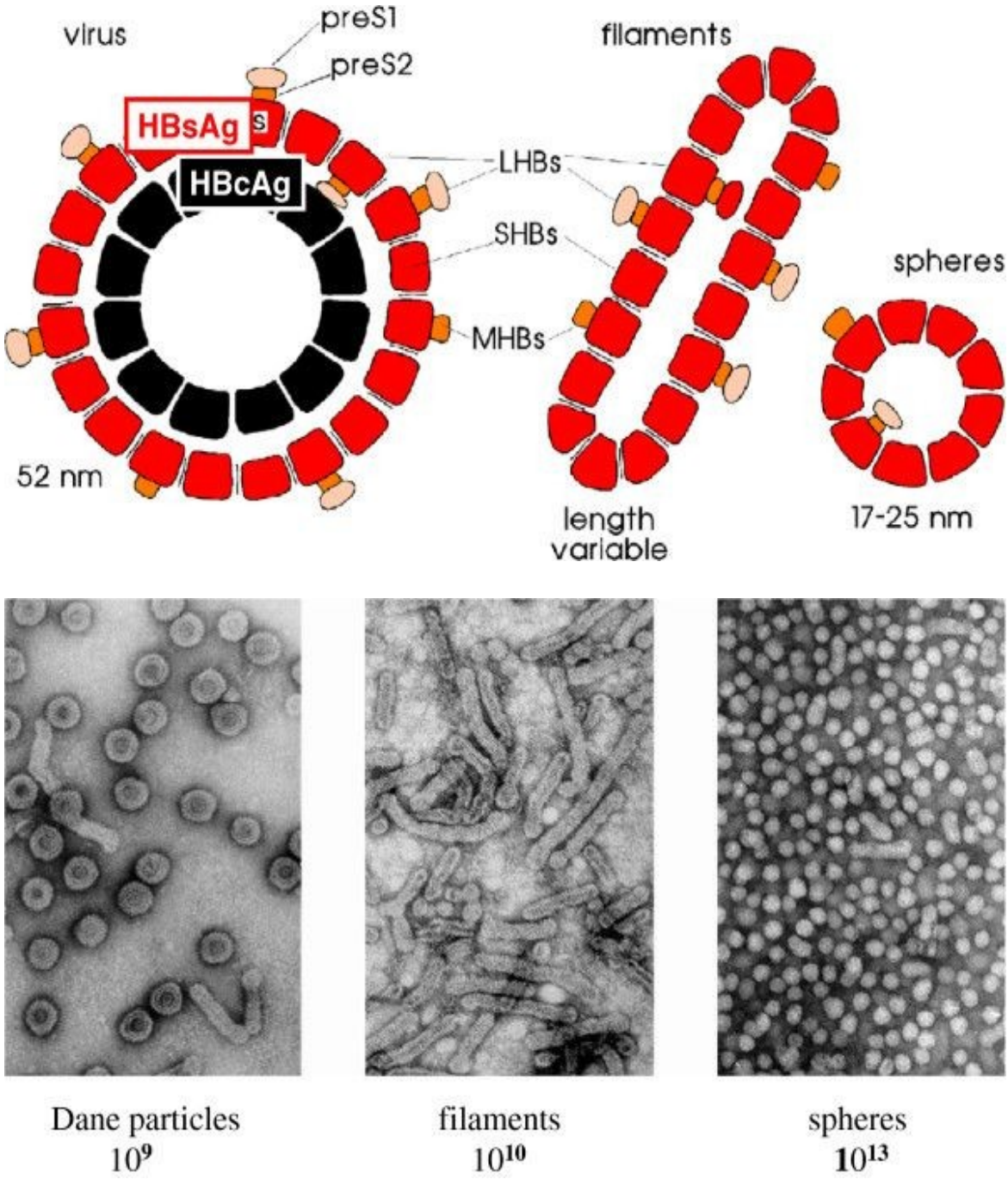


Figura 2 *Forma e struttura delle particelle sub-virali del virus dell'Epatite B*

GENOMA VIRALE

Il genoma del virus dell'epatite B è circolare ed è composto da un filamento completo (L-;3,2Kb) e da uno incompleto (S+ 1,7-2,8Kb, circa il 50-80% del filamento complementare).

Nei due filamenti sono presenti due brevi sequenze ripetute di circa 11-12 basi: DR1 e DR2, importanti per l'inizio della replicazione.

Sebbene presenti una struttura molto compatta, il genoma è organizzato in quattro sequenze geniche sovrapposte su diverse cornici di lettura che dimostrano l'esemplare risparmio genetico del virus.

Queste regioni sono denominate S, C, P e X corrispondenti alle quattro *ORF open reading frame* codificate per sette proteine distinte del virus.

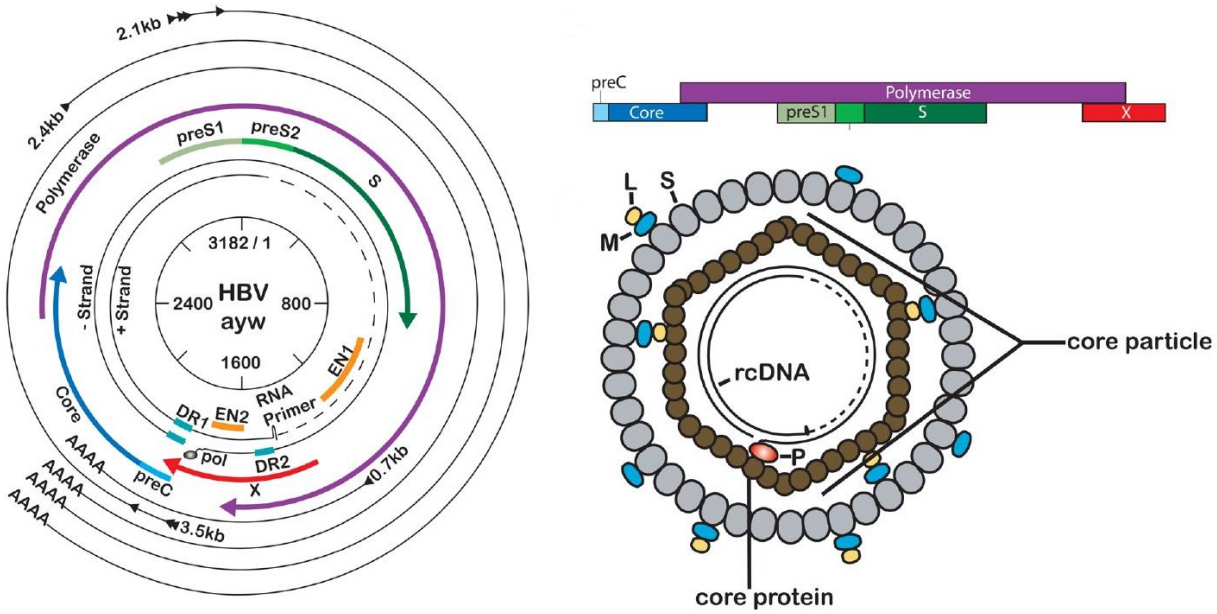


Figura 3 *Genoma e struttura del virus dell'epatite B*

La regione S (superficie) codifica le tre diverse glicoproteine di rivestimento utilizzando tre differenti codoni di inizio AUG e un unico codone di termine.

La regione C (Core) codifica la proteina strutturale del capside e l'antigene 'e' (HBeAg).

La regione P codifica la polimerasi virale che ha attività di DNA polimerasi (DNA Pol), trascrittasi inversa (RT) e RNasi H e agisce anche come proteina terminale (TP).

La regione X codifica per una proteina transattivatrice multifunzionale.

Il genoma contiene anche elementi regolatori (promotori, enhancers) e codifica anche segnali per poliadenilazione e incapsidazione.[5]

Il genoma dell'HBV presenta un tasso di mutazioni casuali tra $1\text{-}3 \times 10^{-5}$ per sito/anno a causa della mancata attività di proof-reading *(correzione bozze)* della polimerasi virale. Quindi tendono a selezionarsi mutazioni a livello di siti e regioni che vanno ad attribuire un vantaggio replicativo al virus o un vantaggio mimetico rispetto all'ospite, questo è da considerarsi una vera e propria strategia evolutiva del virus.[6]

1.3 STRUTTURA E FUNZIONI DELLE PROTEINE VIRALI

Proteine di Superficie

Il gene pre-S / S ha tre frame di lettura aperti (ORF) che codificano tre forme di antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg): le proteine strutturali L, M e S (large, middle e small) dell'involucro virale.

Tuttavia, queste proteine sono tradotte da differenti mRNA: la proteina L viene tradotta da un lungo trascritto di 2,4 kb, mentre le proteine M e S sono tradotte da un trascritto leggermente più corto 2,1 kb. La proteina S è costituita da 226 amminoacidi (aa). La proteina M è un'estensione della proteina S, con un'ulteriore 55 aa (*cioè*, regione pre-S2). La proteina L è un'estensione della proteina M, con ulteriori 108-119 aa a seconda del genotipo (*cioè*, regione pre-S1).

La sequenza amminoacidica presente nel dominio C-terminale delle proteine L e M è identica alla proteina S ed è indicata come regione S. La regione pre-S (pre-S1 e pre-S2) della proteina L è essenziale per la replicazione virale. [7] Sebbene essa costituisca solo il 20% delle proteine dell'envelope e sia la meno rappresentata a livello della superficie virale, la proteina L risulta molto importante per l'infezione e per la morfogenesi virale, essendo implicata sia nel legame del virus al recettore epatocellulare NTCP, nell'assemblaggio del

virione e nel suo rilascio dalla cellula, che nella sollecitazione della risposta delle cellule B e T. [8]

Il protide L può essere presente nel sangue infetto in due forme, quella glicosilata gp 42 e non glicosilata p39 ed è strettamente correlato con l'antigene *HBeAg* e con la presenza di HBV-DNA, due marcatori sierologici dell'infezione acuta. [9]

La proteina M non è essenziale per l'assemblaggio ed il rilascio del virus, ma è fondamentale per la penetrazione del virus nell'epatocita, poichè contiene un recettore per l'albumina umana, inoltre anch' essa può presentarsi in forma glicosidata gp33 gp36 e non glicosilata p30.

Alcuni studi hanno suggerito che la *middle protein* possa contribuire al processo oncogeno.[10] [11]

La proteina S o l'*antigene S,* propriamente detto *HBsAg* è la più piccola ma anche la maggiormente rappresentata delle proteine di superficie, perciò viene denominata *major*.

Si presenta in forma glicosilata e non gp26 - p24.

La sua comparsa, così precoce, nel siero costituisce il primo marker sierologico dell'infezione acuta, inoltre persiste nel siero dei portatori cronici.

L' HBsAg presenta tre domini idrofobici di transmembrana e due idrofilici. In differenti studi si è riconosciuto che la maggior parte delle mutazioni

avvengono nei due domini idrofilici poiché le due regioni sono esposte all'attacco degli anticorpi dell'ospite e di conseguenza le mutazioni rappresentano un modello di evasione dalla risposta immunitaria. [12] [13]

Proteine del Core

Come per l'ORF pre-S/S, anche per l'ORF del Core sono presenti due regioni identificate come pre-C e C;

Il gene C codifica per l'antigene del Core (HBcAg), la principale proteina strutturale del nucleocapside.

Essa è lunga 183 residui, i cui 149 residui N-terminali vanno a determinare il dominio dell'assemblaggio, mentre in posizione carbossil-terminale è rilevabile un dominio di 35 residui aminoacidici, ricco in arginina, ad elevata affinità per l'RNA e che favorisce la formazione del capside.

L'antigene del Core *HBcAg* non è facilmente riconoscibile nel circolo sanguigno di pazienti infetti perché è coperto dall'antigene di superficie *HBsAg*, invece, se si presenta sulle membrane degli epatociti infettati diviene l'obiettivo principale della risposta immunitaria cellulo-mediata con conseguente distruzione epatocitaria.

La regione pre-C a monte del gene Core contiene una struttura secondaria detta *HBV-RNA encapsidation signal epsilon* che consiste di una regione terminale dell'RNA pregenomico di circa 130 nucleotidi in posizione 5', con

una struttura stem-loop, necessaria per l'incapsidamento e per l'inizio della sintesi del DNA virale all'interno dei capsidi immaturi.

La stabilità della struttura dello stelo dipende dalla conservazione dell'appaiamento delle basi azotate proprio in questa regione, infatti se si verificano delle mutazioni si ha una riduzione dell'efficienza della replicazione e lo sviluppo di particelle virali non vitali. In letteratura è descritta una mutazione ricorrente da G a A nella posizione 1896 nei ceppi di genotipo A dell'HBV, questa comporta la modifica del triptofano (W) nel codone 28 ($TG_{1896}G$) in un codone di arresto ($TA_{1896}G$) e di conseguenza l'arresto della traduzione impedendo così la sintesi dell'antigene (HBeAg). [14]

Un' altra mutazione è stata osservata nel codone 2 da CAA in TAA. Questa è rilevabile nel 95% dei pazienti HBeAg-negativi con genotipo D. [15] Quindi il preC / C ORF viene trascritto e tradotto in una proteina di fusione Pre-Core / Core.

Durante l'ingresso nel reticolo endoplasmatico (ER), 19 residui dei 29 della regione pre-C vengono scissi da una peptidasi, generando una proteina da 22-kDa.

Quando essa viene trasportata nell' apparato di Golgi, altri aminoacidi vengono rimossi dal C-terminale mediante una proteasi intra-Golgi per formare l'antigene HBe, una proteina eterogenea di 15-18 kDa.

L'HBeAg secreto è considerato un marcatore di infezione rapidamente progressiva.[16] Anche se la funzione biologica del HBeAg rimane irrisolta è stato suggerito che l'HBeAg può contribuire alla replicazione dell'HBV e modulare la risposta del sistema immunitario. [17]

Infatti una positività dell'HBeAg e dell'HBsAg, in donne gravide può aumentare il rischio di trasmissione al feto dell'80-90% e più dell'85% della prole diventa portatore cronico di HBsAg.

Il rischio dipende dal livello di replicazione virale.

Nelle madri HBsAg positive e HBeAg negative il tasso di trasmissione è solo del 2-15%, infatti questi bambini raramente diventano portatori. Una possibile spiegazione è dovuta al passaggio transplacentare dell'HBeAg che rende il bambino tollerante al virus dell'epatite B.

Proteina Pol

Il gene P codifica per una proteina con diversi domini, ciascuno di questi conferisce una funzione differente alla proteina.

Il dominio N-terminale codifica per la proteina terminale (TP), una proteina

legante il genoma, che è in grado di fungere da innesco per la retrotrascrizione. [18]

Il dominio della polimerasi codifica per la DNA-polimerasi DNA- e RNA-dipendente, che determina la retrotrascrizione dell'RNA-pregenomico in DNA. E' riportato in letteratura che la natura del dominio RT del gene causa, nel processo di trascrizione inversa, un alto tasso di mutazione, stimato in 10^{3-6} sostituzioni per ciclo di replicazione. [19]

Infatti il dominio *(RT)* contiene un motivo aminoacidico *(YMDD)* che se mutato, è responsabile della resistenza alla terapia antivirale con analoghi nucleosidici, inibitori della trascriptasi. [20] Infine il dominio C-terminale conferisce attività RNAsica attraverso una RNAsi-H che degrada l'RNA dell'ibrido RNA-DNA formatisi durante la trascrizione inversa dell'RNA pregenomico.

Proteina X

Il gene X è il più piccolo gene dei quattro ORF parzialmente sovrapposti di HBV.

Il genoma comprende 452 nucleotidi, che codificano una proteina regolatrice di 154 aminoacidi con una massa molecolare di 17 kDa.

La proteina HBx è altamente conservata tra i diversi sottotipi del virus ed è comune a tutti i membri del genere *Orthohepadnavirus*.

Essa è presente nel citoplasma e, in misura minore, nel nucleo degli epatociti. [21]

Svolgendo un ruolo transattivante, può attivare vari promotori virali e cellulari e innescare dei meccanismi biochimici e molecolari che inducono carcinogenesi. Infatti la funzione indiretta di transattivazione di HBx può essere esercitata sia nel citoplasma attraverso le vie di segnalazione (Akt; Wnt/β-catenina; NF-κB [p65, p50 e IκB kinase α (IKKα)] ecc) che nel nucleo attraverso proteine leganti il DNA e meccanismi di metilazione e acetilazione. [22]

1.4 CICLO VITALE

Il virus dell'epatite B replica in maniera molto simile ad un retrovirus: si ha la sintesi di un intermedio replicatiivo a RNA che successivamente viene retrotrascritto ad opera della polimerasi virale con attività di trascrittasi inversa.

Il ciclo di replicazione prevede le seguenti fasi:

Adesione e ingresso nella cellula ospite

L'HBV inizialmente si lega all' epatocita tramite interazioni a bassa specificità tra HBsAg all'interno dell'involucro del virus e proteoglicani di eparan-solfato sulla superficie della membrana cellulare. Un'altra interazione specifica si verifica tra gli amminoacidi del dominio N-terminale del preS1

dell'HBsAg e il polipeptide cotrasportatore (NTCP), un trasportatore di sali biliari specifico per gli epatociti, e un recettore cellulare per HBV.

Dopo l'ingresso del virione mediato da recettore, il nucleocapside, contenente il DNA circolare rilassato (rcDNA), viene rilasciato nel citoplasma e trasportato nel nucleo insieme alla polimerasi.

Attraverso l'uso di fattori nucleari delle cellule ospiti, il rcDNA libero viene convertito in DNA circolare covalentemente chiuso (cccDNA).

Questa molecola episomale rappresenta il template per la sintesi degli RNA messaggeri di HBV (mRNA). [23]

Replicazione del virus

Il cccDNA viene trascritto in RNA genomici e subgenomici per mezzo della RNA polimerasi II della cellula ospite; i trascritti successivamente vengono trasportati nel citoplasma dove avviene la traduzione delle proteine strutturali e funzionali del virione;

L'RNA destinato alla replicazione del virus si definisce pregenomico *(pg-RNA)*, questo viene utilizzato anche come mRNA bicistronico per le proteine Core e polimerasi.

L'impacchettamento *(packaging)* del pgRNA è affidato a una struttura secondaria di RNA *(segnale ε)* posta presso l'estremità 5 '.

In seguito, la proteina P co-impacchettata, catalizza la sintesi del DNA del filamento L- mediante la trascrizione inversa dal modello pgRNA.

Con ciò un residuo di tirosina sul suo dominio proteico terminale della polimerasi funge da sito accettore covalente per il primo nucleotide del DNA del filamento L-.

Infine, il dominio RNase H della proteina P taglia il pgRNA, lasciando la parte residua del 5 'che serve da primer per la sintesi del DNA S+.

Assemblaggio ed esocitosi del virione maturo

La particella centrale viene avvolta dalle tre proteine dell'envelope, i virioni sono incorporati attraverso i corpi multivesicolari e infine esocitati. [24]

In alternativa al loro avvolgimento e rilascio come virioni infettivi, le particelle con genoma virale maturo possono rimanere nel nucleo dove il rcDNA viene convertito in cccDNA.

Questo garantisce una quantità stimabile intorno alle 50 copie di cccDNA per cellula sufficiente a sostenere un'infezione persistente.

Oltre al rcDNA, anche il DNA lineare a doppio filamento può essere generato dal pgRNA.

Tale DNA lineare si può integrare in quello cromosomico, fornendo a volte uno sviluppo dell’epatocarcinoma (HCC) a seconda del sito di integrazione. [25]

Un' ultima peculiarità del sistema replicativo dell'HBV è che la maggioranza delle particelle sub-virali non contiene alcun DNA, questo perché l'assemblaggio delle particelle rivestite di HBsAg non richiede l'incapsidamento di pgRNA, quindi, dall' esocitosi di quest' ultime, hanno origine le particelle subvirali che entrano in circolo e contribuiscono alla persistenza dell'infezione cronica. [26]

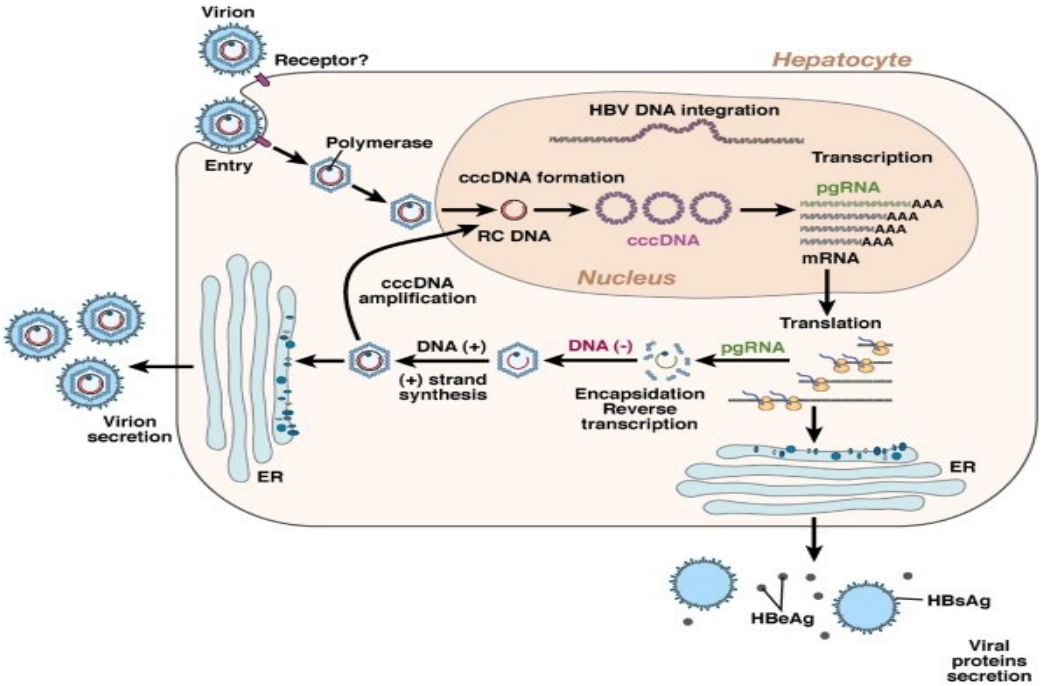


Figura 4 *Ciclo vitale dei virus dell'epatite B*

1.5 STORIA NATURALE DELL' INFEZIONE E MARCATORI DIAGNOSTICI

L'infezione da virus dell'epatite B (HBV) è un importante problema di salute globale e può causare sia infezioni acute che croniche nell'uomo.

I sistemi di contagio possono essere correlati all'infezione perinatale o l'infezione tramite contatto sessuale.

Queste sono le principali vie di trasmissione dell'HBV in aree ad alta endemia, come il sud-est asiatico, la maggior parte dell'Africa, le isole del Pacifico e dell'Artico.

Mentre, nelle regioni a bassa endemia, come i paesi occidentali, l'epatite B è principalmente una malattia di adulti e adolescenti a seguito di attività sessuale ad alto rischio e all' uso di droghe iniettabili.

Il quadro clinico dell'infezione da HBV varia da epatite sintomatica ad acuta o, raramente, epatite fulminante durante la fase acuta, oppure dallo stato di portatore dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) che a volte cronicizza epatite cronica di varia gravità istologica a cirrosi e sue complicanze durante la fase cronica. [27]

Circa Il 15-40% dei pazienti con epatite B cronica progredisce verso la cirrosi, epatopatia ed infine morte.

Comprendere la storia naturale e la prognosi dell'epatite B è di fondamentale importanza per la gestione del paziente e per valutare i trattamenti più consoni.

L' infiammazione primaria da virus dell'epatite B (HBV) può manifestarsi in differenti forme (asintomatica, anitterica, con ittero colestatico e più raramente con insufficienza epatica).

Nell'infezione perinatale i pazienti non hanno sintomi, i livelli di alanina aminotransferasi (ALT) risultano normali o leggermente aumentati e l'attività istologica è minima.

Questo giustifica il fatto che ci sia un'anergia immunitaria o una risposta molto debole contro gli epatociti infetti. [28]

Si stima che oltre il 50% delle infezioni acute negli adulti sani siano asintomatiche.

Nel restante casi, i pazienti soffrono di ittero, dolore addominale, nausea e malessere, in gran parte indistinguibili da altre malattie del fegato.

Circa l'1-5 % delle infezioni acute sono caratterizzate da epatopatia che porta precipitosamente all'insufficienza epatica (chiamata epatite fulminante) [29]

L' infezione persistente da HBV si realizza in seguito a un'infezione primaria, molto spesso asintomatica che può sfociare in epatite cronica.

Quest' ultima è definita dalla presenza di HBsAg per un periodo di oltre 6 mesi e dalla presenza di HBV DNA nel siero.

Il rischio di cronicizzazione è correlato a due fattori: l'età di acquisizione dell'infezione e le condizioni "immunitarie" del soggetto che viene a contato con il virus.

Infine un evento clinicamente sfavorevole per i portatori cronici di HBV è la superinfezione con il virus difettivo dell'epatite D. [30]

1.6 EPIDEMIOLOGIA DI HBV

Prevalenza, distribuzione e modalità di trasmissione

La distribuzione di HBV è dovuta dalla presenza di più genotipi associati a differenti aree geografiche e dai schemi di trasmissione.

Globalmente, si stima che 260 milioni di persone siano cronicamente infette dall'HBV e ogni anno ci sono quasi 900.000 decessi correlati all'HBV, principalmente dovuti a cirrosi o carcinoma epatocellulare. [31]

Dall'immissione di un vaccino efficace nel 1982, la copertura immunitaria globale dei bambini è gradualmente aumentata fino all'87% nel 2016 nei paesi Europei e quindi il numero di nuove infezioni croniche è drasticamente diminuito tra i bambini immunizzati. [32] [33]

Tuttavia, la prevalenza globale di HBV, indicata dalla presenza di portatori cronici HBV nella popolazione che è sieropositiva per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), varia fortemente tra le diverse regioni geografiche.

Si stima che il 70% delle nuove infezioni croniche da HBV si verifichino nei paesi a basso reddito. [34]

Infatti come riportato nella (Figura 5) è possibile riscontrare la massima prevalenza delle infezioni nelle regioni equatoriali e prevalentemente povere e nel Sud-est asiatico e Africa

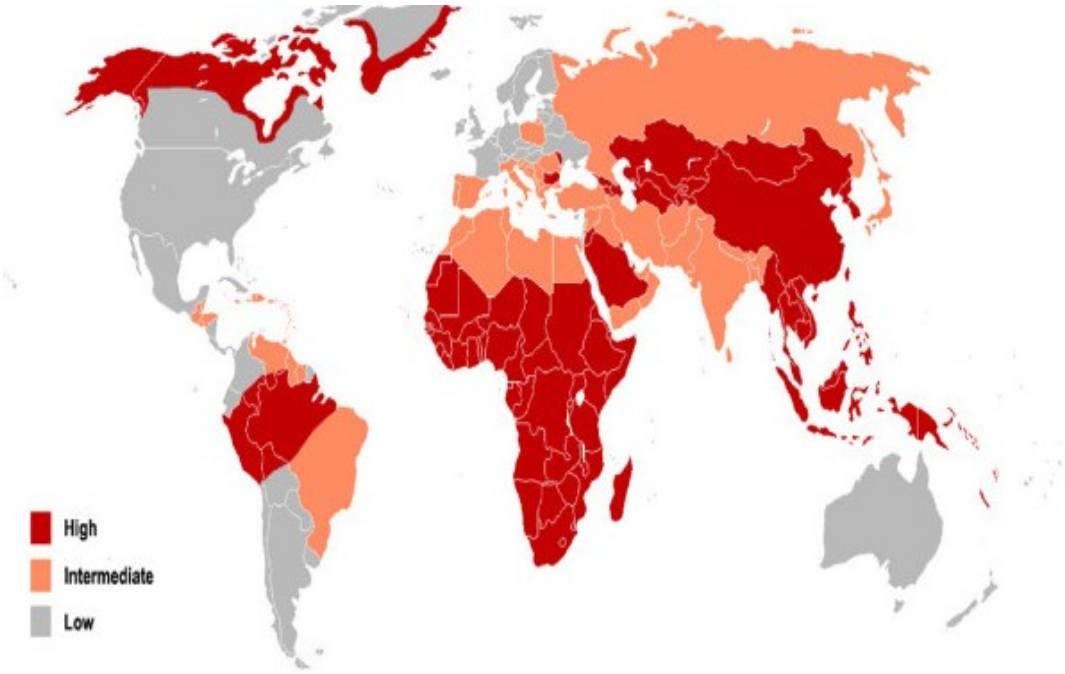


Figura 5 *Distribuzione geografica dell'infezione cronica da HBV*

Secondo una convenzione che identifica i genotipi in basa a una divergenza di sequenza superiore all'8% nell'intero genoma di HBV, sono stati identificati 8

genotipi (A-H) e altri due ipotetici genotipi, designati come genotipo I e genotipo J, questi sono stati isolati in Vietnam e in Giappone.

I genotipi HBV possono essere ulteriormente divisi in subgenotipi se la divergenza nel genoma è tra il 4-8%.

Figura 6 *Distribuzione geografica dei genotipi dell'HBV*

Il genotipo A è endemico nelle regioni dell'Africa meridionale e occidentale (subgenotipi A1, A3-A5) e in Europa settentrionale (subgenotipo A2).

I genotipi B e C sono endemici in oriente e in Asia Sud-orientale.

Il genotipo D è endemico nell'area mediterranea, in Medio Oriente e in altre parti dell'Ovest dell'Asia.

Il genotipo E è limitato all'Africa occidentale e i genotipi F, G e H sono frequenti in America latina.

Infine in Cina si sono riscontrati prevalentementi subgenotipi B2 (27,3%), C1(10,7%) e C2 (58 %). [35] [36]

Nei Paesi ad alta endemia, in particolare nella regione Asia-Pacifico la via di contagio predominante è quella verticale come quella madre-figlio che nel 95% dei casi cronicizza a differenza dell'infezione in età adulta che porta all' epatite cronica in meno del 5% dei casi.

La trasmissione può anche avvenire per via orizzontale come l'esposizione a sangue infetto e altri fluidi corporei come: la saliva, liquidi mestruali, vaginali e seminali e anche grazie al riutilizzo di aghi e siringhe sia in strutture sanitarie che tra persone che fanno uso di droghe.

1.7 PATOGENESI

L'epatite virale B è una malattia epatica necroinfiammatoria di gravità variabile. L'infezione persistente da HBV è spesso associata a malattia epatica cronica che può portare allo sviluppo di cirrosi e di carcinoma epatocellulare (HCC).

La replicazione dell'HBV non è direttamente citotossica per gli epatociti, questa osservazione si accorda bene con l'evidenza che molti portatori di HBV sono asintomatici e hanno un danno epatico minimo nonostante la

prolungata e abbondante replicazione intraepatica del virus.

La clearance virale e la patogenesi della malattia sono ampiamente mediate dalla risposta immunitaria adattativa che, si pensa, si evolva in seguito a un inefficiente innesco delle cellule T CD4 + durante la fase iniziale dell'infezione e seguito da un'inefficace risposta delle cellule T CD8 +.

Altri fattori che potrebbero contribuire alla persistenza virale sono la tolleranza immunologica, l'inattivazione dell'epitopo, l'integrazione del genoma virale, la down-regolazione incompleta della replicazione virale e l'infezione dei tessuti immunologicamente privilegiati.

L'infezione persistente è caratterizzata dal danno cronico delle cellule del fegato, dalla rigenerazione, dall' infiammazione, dal danno del DNA e dall' alterata regolazione dei geni di controllo della crescita cellulare che, collettivamente, portano alla cirrosi del fegato e al carcinoma epatocellulare [37].

Negli epatociti l'HBV produce particelle subvirali e virioni di HBsAg.

Entrambi i tipi di particelle, presenti nel circolo sanguigno vengono riconosciute da macrofagi e linfociti natural killer (*NK*), componenti dell'immunità naturale.

Durante la fase sintomatica dell'infezione acuta vi è l'attivazione della risposta cellulare specifica determinata da linfociti T citotossici CD8+ e T

helper CD4+. I primi riconoscono gli antigeni *HBcAg* e *HBsAg* presentati sulla superficie cellulare dell'epatocita infetto, associati a molecole MHC-I. Questa induce la lisi diretta dell'epatocita infetto e il rilascio di citochine quali IFN-ɤ e TNF-α in grado di diminuire la replicazione virale negli epatociti circostanti.

All'attivazione dei linfociti T citotossici consegue l'innesco della risposta infiammatoria aspecifica, sostenuta da TNF, radicali liberi e proteasi responsabili del danno cellulare.

A supporto dell'azione antivirale dei linfociti T citotossici si sviluppa la risposta cellulare mediata dai linfociti T helper, limitata agli antigeni *HBcAg* e *HBeAg*, presentati sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC), quali i macrofagi, in associazione a molecole MHC-II.

I linfociti T helper sono, inoltre, responsabili della differenziazione delle plasmacellule in linfociti B attivati, e quindi della risposta anticorpale. La produzione di anticorpi è un elemento critico per la neutralizzazione di particelle virali in circolo e per impedire l'ingresso dei virioni negli epatociti. [38]

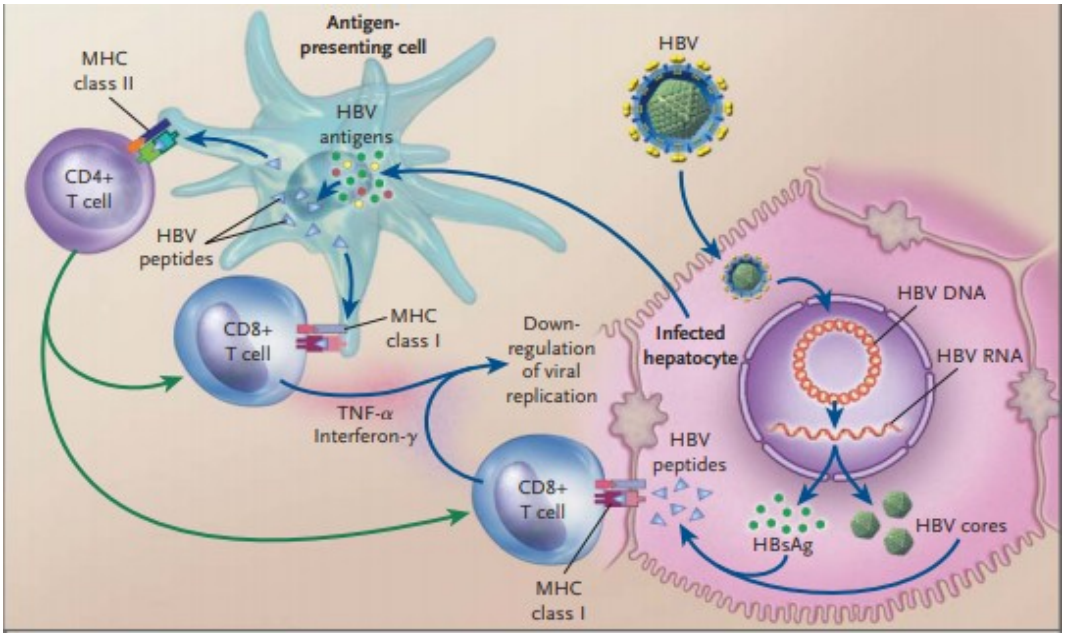


***Figura** 7 Risposta immunitaria cellulo-mediata ad HBV*

INFEZIONE ACUTA

Il decorso clinico dell'infezione acuta da HBV prevede un primo periodo di incubazione: dall' esposizione al virus alla comparsa dei sintomi clinici, che varia da 60-ai 180 giorni.

Il quadro clinico può presentarsi sia in forma sintomatica che asintomatica Si stima che circa il 70- 90% dei pazienti adulti non presenta sintomi.

Le infezioni sintomatiche prevedono: astenia, dolori articolari, dolori addominali, perdita di appetito, nausea, vomito e ittero.

La possibilità che si presentino o meno dei disturbi dipende dall'età dell'infezione, dallo stato immune del paziente e dalla clearance virale.

HBsAg e HBeAg sono rilevabile circa 4-8 settimane dopo il contagio e nel momento in cui i sintomi compaiono le IgM anti-HBc si positivizzano e

persistono per mesi, mentre le IgG anti-HBc compaiono qualche settimana dopo e persisteranno molto a lungo.

Gli anticorpi anti-HBs compaiono più tardivamente, andando a definire lo stato di infezione in via di risoluzione dimostrato dal titolo di HBsAg che diventa negativo.

In corso di epatite acuta, la diagnosi biochimica rivela valori alterati di bilirubina e soprattutto di transaminasi, che spesso sono superiori a 500 U/L.

La maggior complicanza dell'infezione acuta è l'epatite fulminante, con l'instaurarsi di insufficienza epatica acuta, encefalopatia epatica e morte.

Questa condizione molto pericolosa va diagnosticata rapidamente per una buona gestione, che spesso ha come cura il trapianto di fegato.

Un' ulteriore condizione critica è *acute-on-chronic* ossia una sindrome epatica che dovrebbe essere differenziata da insufficienza epatica acuta, cirrosi epatica acuta scompensata e insufficienza epatica cronica. La patogenesi di ACLF non è ancora pienamente compres, nonostante ciò i fattori virali come la mutazione A1846T e G1896A nella regione BCP e la mancata funzione delle cellule T del sistema immunitario rivestono un ruolo fondamentale nel decorso della malattia. [39]

INFEZIONE CRONICA

L' infezione persistente da HBV si rivela dopo un'infezione primaria con la persistenza, di oltre 6 mesi dell'HBsAg e con la determinazione di oltre >105cp/ml di HBV DNA.

I portatori cronici positivi per HBeAg mostrano livelli di HBV-DNA maggiori nel plasma rispetto i portatori negativi.

Il livello di danno epatico è variabile ed è valutato anche su base istologica, considerando il livello fibrotico e infiammatorio.

Il rischio di sviluppare un'infezione cronica è correlato all' età (10 volte più elevato nei neonati) e allo stato immune dell'ospite (più elevato nei pazienti immunocompromessi).

https://www.epatiteb.com/patologia/infezione-acuta-cronica

1.8 DIAGNOSI

La diagnosi di laboratorio si avvale di marcatori sierologici e molecolari quali:

HBsAg definisce l'infezione in atto: la persistenza per più di 6 mesi consente di sospettare un'infezione cronica.

Anti-HBs indica immunità duratura e appare dopo la scomparsa immediata di HBsAg

HBeAg è un marcatore di replica virale e di infettività. E' associato ad alti titoli di HBV-DNA nel siero, malattia epatica attiva ed alto grado di infettività.

Anti-HBe La sieroconversione da HBeAg a anti-HBe indica classicamente la risoluzione della fase dell'infezione ad altissima replicazione, ma la positività degli anti-HBe Ab nell' infezione cronica non esclude replica/infettività

Anti-HBc IgM differenzia l'infezione acuta dall'infezione cronica. Può perdurare per breve tempo nell'infezione risolta, inoltre è positivo a bassi livelli durante la fase di infezione cronica.

Anti-HBc IgTot è presente in tutte le fasi dell'infezione, inoltre può essere l'unico marcatore nelle infezioni occulte.

L' interpretazione dei marcatori sierologici permette di comprendere e distinguere le differenti fasi infettive come riportato in tabella:

			INFEZIONE CRONICA		
MARKER	**INFEZIONE ACUTA**	**RIATTIVAZIONE INF. ACUTA**	**HBeAg POSITIVO**	**HBeAg NEGATIVO**	**PORTATORE INATTIVO**
HBsAg	✓(< 6mesi)		✓	✓	✓
Anti-HBs		✓			
Anti-HBc IgM	✓	(+/-)	(+/-)	(+/-)	
Anti-HBc	✓		✓	✓	✓
HBeAg	✓		✓		
Anti-HBe		(+/-)		✓	✓
HBV DNA	✓	non rillevato	$>10^5$cpI/ml	$>10^4$ cp/ml	<1000 cp/ml
ALT	elevate	normali	elevate	elevate	normali

Tabella 1 *Quadro diagnostico dei marcatori sierologici e molecolari dell'HBV*

Fra i marcatori molecolari vi è la determinazione dell'HBV-DNA nel siero.

Il virus dell'epatite B ha un elevato potere replicativo e può raggiungere nel sangue titoli superiori a 10^9 virioni per ml.

Per tale ragione il valore dell'HBV DNA è misurato in scala logaritmica e la risposta terapeutica è espressa come riduzione logaritmica della viremia.

Fra le metodiche di determinazione vi è l'estrazione e la purificazione dell'acido nucleico seguito dall' amplificazione.

Inoltre, sono stati aggiunti test diagnostici per la rivelazione di genotipi virali e la determinazione di mutazioni, queste possono contribuire alla scelta terapeutica.

1.9 TERAPIA

L' obiettivo del trattamento farmacologico è di ridurre o annullare gli effetti della replicazione del virus dell'epatite B in fase acuta e cronica.

La terapia dell'infezione acuta è principalmente basata sul supporto del sistema immunitario del paziente al fine di eliminare il virus.

Quindi durante la fase acuta è importante un monitoraggio degli esami biochimici del sangue.

Nel momento in cui le transaminasi, in particolare le ALT sono elevate, vi è un'attiva replicazione virale, danno epatico da moderato a severo e fibrosi e quindi si procede a stabilire i punti di risoluzione come:

-sieroconvesione eAg/Anti-e

-scomparsa di HBV-DNA sierico (test PCR)

-normalizzazione ALT

-prevenzione dello scompenso epatico, HCC, morte.

Attualmente si possono utilizzare 2 strategie:

- il controllo immuno-mediato dell'infezione da HBV ottenuto mediante la terapia con Peg-IFN somministrato per 48-96 settimane;

- la soppressione della replicazione virale con i farmaci analoghi nucleotidici o nucleosidici somministrati per lungo termine.

Il trattamento con Peg-IFN è indicato nei pazienti HBeAg positivi o HBeAg negativi con fibrosi epatica moderata/grave o quadro istologico di cirrosi e ha l'obiettivo primario di ottenere una risposta virologica, come livelli sierici di HBV-DNA, inferiori a 2,000 IU/m e le transaminasi nella norma, confermate almeno 12 mesi dopo la sospensione della terapia.

Mentre per quanto riguarda NAs che sono stati approvati in Europa, per il trattamento dell'HBV, comprendono la lamivudina (LAM), l'adefovir dipivoxil (ADV), l'entecavir (ETV), la telbivudina (TBV), il tenofovir

disoproxil fumarato (TDF) e tenofovir alafenamide (TAF).

Questi possono essere classificati in quelli a bassa barriera genica (LAM, ADV, TBV) e quelli ad alta barriera (ETV, TDF, TAF). [40]

Il trattamento con farmaci analoghi nucleosidici o nucleotidici è indicato:

- nei pazienti HBeAg positivi con una con fibrosi moderata o severa, che hanno fallito la sieroconversione dopo un ciclo di Peg-IFN.
- nei pazienti HBeAg negativi con una fibrosi moderata o severa che sono stati già trattati con Peg-IFN senza successo
- nei pazienti HBeAg positivi o HBeAg negativi con cirrosi compensata o scompensata a prescindere dalla probabilità di sieroconversione, dei livelli sierici di HBV DNA e dei valori di ALT.

La scelta del farmaco si basa su:

- la potenza dei farmaci, in grado di indurre una risposta virologica fino a livelli sierici di HBV DNA non rilevabili con un test real-time PCR;
- la barriera genetica che evita l'insorgenza di mutazioni virali durante un trattamento a lungo termine; http://www.simit.org/IT/formazione/linee-guida.xhtml

Oggi, non è più appropriata la terapia con lamivudina, telbivudina o adefovir, che pur avendo una buona potenza virologica e un buon profilo di tollerabilità nel caso di lamivudina e telbivudina, hanno tutti una bassa barriera genetica

con una probabilità di indurre mutazioni virologiche che supera il 60% dopo 5 anni per la lamivudina, varia tra il 10% e il 25% dopo 2 anni per la telbivudina e raggiunge il 29% dopo 5 anni per l'adefovir.

Solo entecavir e tenofovir hanno un profilo terapeutico che risponde ai criteri di massima efficacia e tollerabilità.

1.10 VACCINO

Il vaccino contro l'epatite B è considerato la più valida misura di profilassi.

In particolare esso è caratterizzato da elevate quantità di HBsAg in modo tale da permettere l'elevata produzione di anti-HBs.

Nel 1983, in Italia, era stato avviato un programma di vaccinazione allo scopo di proteggere i gruppi di individui a rischio di infezione da HBV, successivamente con la legge del 27 maggio 1991 la vaccinazione anti-epatite-B è diventata obbligatoria per tutti i nuovi nati e gli adolescenti nel dodicesimo anno di età e sempre secondo la stessa legge del 1991, risultò obbligatorio lo *screening* per *HBsAg* di tutte le donne gravide nell'ultimo trimestre di gestazione al fine di sottoporre i neonati di madri infette ad un protocollo specifico di profilassi tramite somministrazione di immunoglobuline e vaccino, da somministrare entro 24 ore dalla nascita.

Tale strategia è stata creata per proteggere i neonati, vista l'età e lo stato immunologico del paziente. [41]

1.11 EPIDEMIOLOGIA DELL' EPATOCARCINOMA (HCC)

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è una delle neoplasie più frequenti e presenta un alto tasso di mortalità.

L'incidenza di HCC differisce notevolmente in base all'area geografica.

L'Asia orientale e sud-orientale, così come l'Africa subsahariana e occidentali hanno la più alta incidenza di HCC, anche se negli ultimi anni è aumentata anche nei paesi occidentali come gli Stati Uniti e l'Europa.

Si è dimostrato che l'influenza di cancro al fegato aumenta con l'età e la distribuzione varia tra regioni e paesi. [42]

In Cina, l'intervallo di età media alla diagnosi è di 55-59 anni, in Europa e Nord America 63-65 anni e nelle popolazioni a basso rischio 75 anni o più.

Inoltre più studi hanno rilevato che la prevalenza negli uomini è maggiore rispetto nelle donne.

La causa della disparità di genere non è ben compresa, ma è da considerare le incidenze delle infezioni virali, il consumo di alcool, l'epigenetica e la risposta immunitaria. [43]

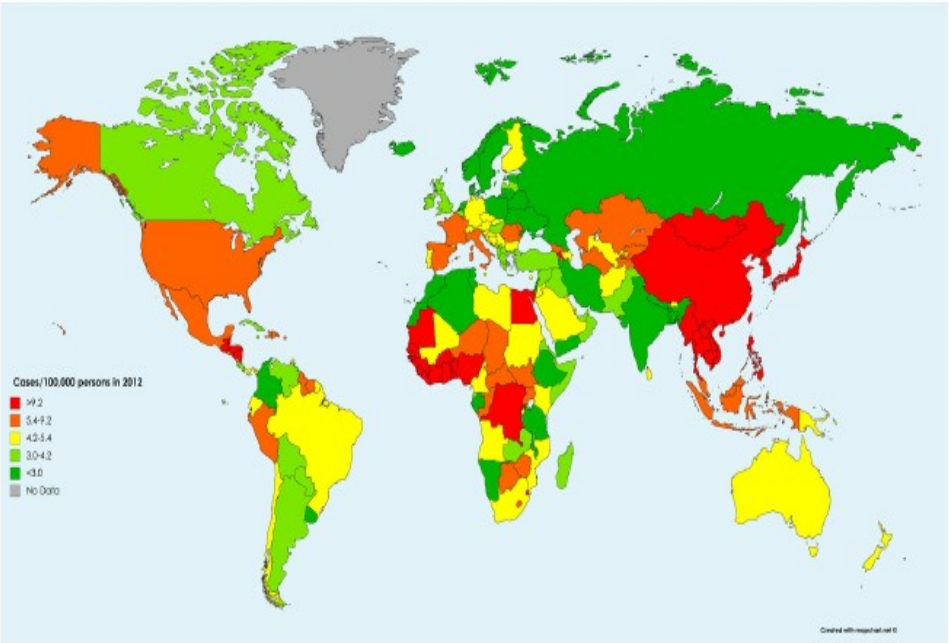


Figura 8 *Distribuzione geografica dell'epatocarcinoma nel mondo*

Fra i fattori di rischio per lo sviluppo di HCC sono ben noti e comprendono: cirrosi, infezione da virus dell'epatite B (HBV), infezione da virus dell'epatite C (HCV), consumo di alcool, fumo, diabete steatoepatite non alcolica e intossicazione da aflatossine.

La cirrosi è il fattore di rischio più significativo.

Infatti è considerata un vero e proprio marcatore di cancerogenesi, non a caso la maggioranza dei pazienti (80% -90%) con HCC la presenta.

Questa correlazione è particolarmente evidente nelle popolazioni occidentali con epatite virale tranne nelle zone in cui l'infezione da HBV è endemica o vi è una elevata esposizione all' aflatossine. [44]

Recenti stime attribuiscono all' HBV la seconda causa di rischio di tumore, per cui, oltre al processo cirrotico, si può postulare la presenza di altri meccanismi carcinogenetici come l'attivazione da proteine virali e l'integrazione del suo genoma in quello dell'ospite con conseguente attivazione di oncogeni e la repressione di geni oncosoppressori.

Si stima che il 20% di HCC attribuibile a HBV è presente in USA, il 65% in Cina e in estremo-oriente, il 18% in Europa occidentale e il 51% nell' est e sud Europa.

La molteplicità dei fattori di rischio, gli alti tassi di recidiva del tumore e di resistenza agli agenti chemioterapici rendono la gestione dell'HCC impegnativa.

Nonostante ciò, è stato osservato un notevole miglioramento della sopravvivenza (sopravvivenza di 5 anni dal 40% al 70%) quando i pazienti vengono diagnosticati in una fase iniziale e ricevono una terapia potenzialmente curativa sotto forma di trapianto di fegato, resezione chirurgica o ablazione. [45]

Infatti se un epatocarcinoma è diagnosticato allo stadio iniziale e il suo avanzamento viene fermato più frequentemente con conseguente riduzione della mortalità associata alla malattia.

La sorveglianza è affidata ad alcuni test come l'ecografia, rilevo di marker tumorali come: l'Alfa-fetoproteina (AFP), Des-Gamma-carbossil-protrombina DCP che vengono utilizzati in modi differenti tra il mondo orientale e occidentale.

Tuttavia l'obiettivo comune è quello di ridurre la mortalità e migliorare la gestione dell'HCC.

1.12 MECCANISMI MOLECOLARI DELL' EPATOCARCINOMA INDOTTO DA HBV

Il virus dell'epatite B (HBV) contribuisce allo sviluppo del carcinoma epatocellulare (HCC) attraverso meccanismi diretti e indiretti dimostrando un tasso di alterazioni cromosomiche maggiore rispetto agli altri HCC causati da altri fattori.

I principali meccanismi sono:

1. L' instabilità genomica è garantita dall' integrazione del DNA dell'HBV nel genoma ospite che si verifica nei primi stadi dell'espansione del tumore, inducendo la mutagenesi inserzionale diretta da diversi geni correlati al cancro.
2. L'espressione prolungata della proteina regolatrice e transattivante HBx.

3. Versioni alterate delle proteine di superficie preS/S e delle proteine del Core preC/Core che alterano il controllo della trascrizione e della proliferazione cellulare e sensibilizza le cellule epatiche a fattori cancerogeni.

Meccanismi di integrazione genomica virale

Il ruolo dell'integrazione dell'HBV DNA nel genoma dell'ospite non è essenziale per la replicazione virale, ma provoca riarrangiamenti genomici, delle delezioni nei siti di inserzione e delle traslocazioni cromosomiche.

I siti preferiti per l'inserzione sono le isole CpG o sequenze ripetute. [47]

In letteratura, molti studi riportano che l'inserzione nel promotore del gene che codifica per la trascrittasi telomerasi inversa, una polimerasi ribonucleoproteica che mantiene le estremità dei telomeri mediante l'aggiunta di nucleotidi, è molto frequente.

In particolare, sono stati riscontrati, dei break-point di integrazione nell' introne 2-3-6 che hanno comportato una sovraregolazione con sviluppo immediato di HCC.

Un altro evento molto ricorrente, come già detto, è l'integrazione di HBV nel gene MLL4.

Sono stati scoperti siti integrativi in particolar modo nella regione degli esoni

1-3 e 6 che hanno portato una iperproduzione di MLL4 soprattutto nei tessuti tumorali.

Altre inserzioni sono state individuate nel gene del recettore beta dell'acido retinoico (*RARB*) e della ciclina umana A2 (*CCNA2*), ciò ha permesso di generare proteine chimeriche oncogene, inoltre, l'integrazione si può verificare anche nel gene (*MLL4)* provocando una sovraregolazione dello stesso. [48]

Le integrazioni dell'HBV possono anche portare ad altre forme di trascritti fusi homo-virus presenti sia nel tessuto epatico non tumorale che nelle linee cellulari HCC HBV-positive, ad esempio nelle sequenze ripetute *LINEs* o microsatelliti.

Questi nuovi trascritti di fusione non codificanti attivano il pathway di Wnt/β-catenina, promuovendo così l'HCC. [49]

La stabilità di questo pathway è data dal degradosoma, un complesso costituito dalle proteine APC, AXIN1, AXIN2, la proteina fosfato 2 e GSK3B.

Quest'ultimo fosforila i residui terminali di serina e treonina della β-catenina e ne provoca l'ubiquitinazione con la conseguente degradazione tramite l'azione del proteasoma.

Si è riscontrato che le mutazioni e le inserzioni nella regione che codifica il complesso di degradazione, portano perdita di funzione e infine promuovono l'oncogenesi. [50]

In sintesi l'integrazione di HBV nel genoma ospite rispecchia il grado massimo di instabilità genica correlabile all' HCC.

Potere transattivante di HBx

Molti studi in letteratura sono concordi nell' attribuire alla proteina X delle proprietà transattivanti.

Infatti la sua nota distintiva risiede nelladalla sua capacità di interferire con le proteine cellulari che modulano la proliferazione cellulare, la morte, la trascrizione e il riparo del DNA.

HBx attiva differenti cascate di segnale che portano alla trascrizione di fattori come AP-1 (activator protein-1), NFkB (fattore nucleare kappa B), SP1 e oct-1.

Durante la replicazione di cellule HBV-positive, HBX attiva il cytosolic calcium pathway;

HBx interagisce con proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL attraverso il legame con il fattor BH3 provocando l'aumento del calcio nel citosol e morte cellulare. [51]

D’ altra parte elevati livelli di HBx bloccano la trascrizione del fattore di necrosi tumorale alpha attraverso l’ attivazione di NF-kB suggerendo così la sopravvivenza di epatociti infetti. [52]

Uno dei meccanismi fondamentali riguardante il potere transattivo di HBx interessa il ruolo di questa proteina nel minicromosoma HBV cccDNA:

HBx influenza il controllo epigenetico della funzione del cccDNA dell'HBV stimolando il reclutamento di enzimi modificanti la cromatina sul minicromosoma virale. [53]

Un secondo ruolo altrettanto importante riguarda l’iper-espressione della proteina X associata al fattore MSL2 che attiva la replicazione dell'HBV modificando il cccDNA nelle cellule del fegato, portando epatocarcinogenesi. [54]

Come terzo ruolo, si evince in letteratura un coinvolgimento della proteina X nella modifica strutturale e funzionale del gene onCorepressore p53localizzato sul cromosoma 17p13.

In alcuni modelli di HCC, si è osservata una alterazione puntiforme all’ interno della sequenza genica che codifica per questo gene, accompagnata dalla perdita del braccio corto del cromosoma 17.

La proteina HBx insieme all’ aflatossina AFB1 determina una variazione dei nucleotidi C:G in T:A al codone 249 di p53.

Inoltre la proteina HBx con la sua capacità di legare direttamente p53 impedisce il legame con il DNA cellulare e di conseguenza blocca l'apoptosi e favorisce lo sviluppo dell'epatocarcinoma. [55]

Quindi, è deducibile che la proteina X è da considerarsi multifunzionale ed è in grado di modulare le vie di degradazione delle proteine, l'apoptosi, la trascrizione, la trasduzione del segnale, l'attivazione del ciclo cellulare e la stabilità genetica, interagendo direttamente o indirettamente con i fattori ospite concretizzando lo stadio assoluto di HCC.

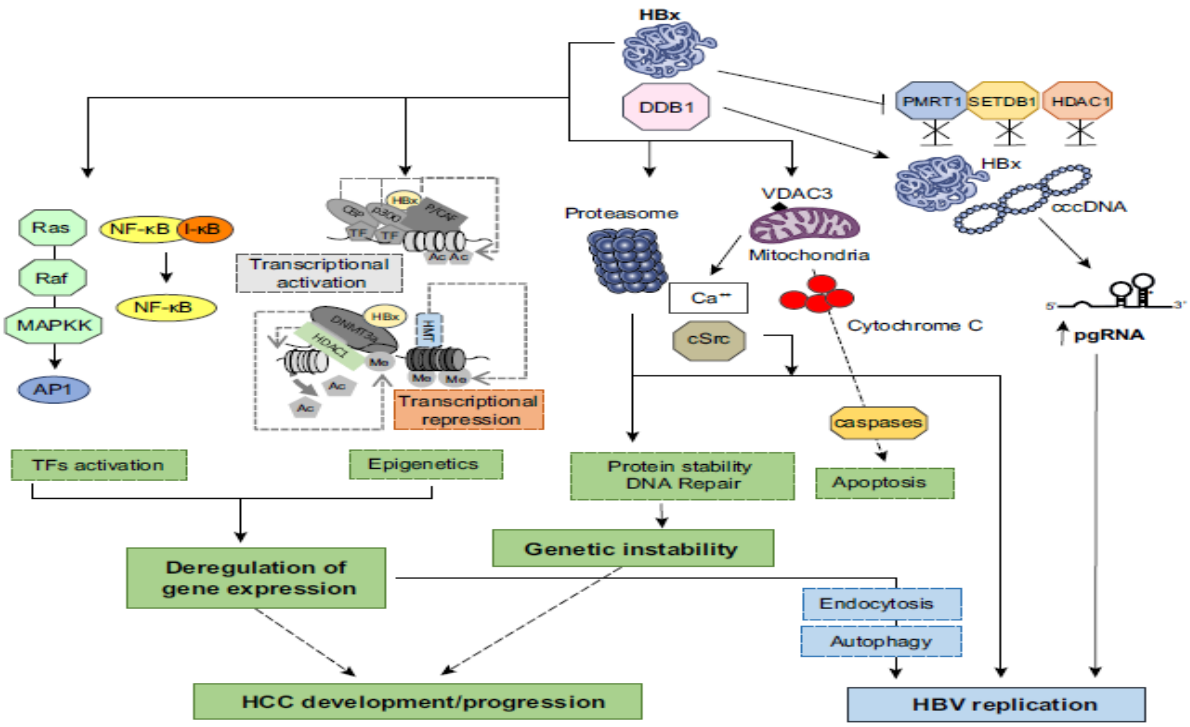


Figura 9 *Meccanismi molecolari transattivanti della proteina X (HBx)*

Mutazioni della regione BCP Pre-Core/Core

Durante il corso dell'infezione cronica, il genoma dell'HBV accumula dei cambiamenti che consentono il suo adattamento ad un ambiente selettivo. Queste mutazioni esercitano vari effetti sulla replicazione virale, sulle caratteristiche cliniche e sulla patogenesi.

In particolare, nella fase tardiva dell'infezione cronica, si verificano mutazioni nel promotore del nucleo basale (BCP) e nella regione PRE-C/Core.

Nei genotipi orientali la mutazione predominante in BCP è la doppia mutazione in A1762T / G1764A.

È stato dimostrato che questa doppia mutazione down-regola la trascrizione dell'RNA Pre-Core, l'espressione di HBeAg e aumenta il tasso di replicazione virale.

Entrambe le mutazioni sono state associate alla progressione dell'infezione cronica da HBV. [56]

La doppia mutazione influenza anche la sequenza amminoacidica del gene che codifica per HBV X, sovraregolando Skp2 e down-regolando l'espressione di p21.

La combinazione di questi cambiamenti contribuisce alla soppressione dell'mRNA Pre-Core e aumenta l'espressione nella trascrizione del pgRNA, con conseguente aumento della replicazione virale, che può eventualmente portare a HCC. [57]

Infatti, secondo lo studio di Yuehua e colleghi la doppia mutazione TA nella regione CP provoca dei cambiamenti amminoacidici nella proteina HBx (K130M / V131I) e può aumentare il rischio di HCC modulando le funzioni biologiche della proteina X. [58]

Una seconda mutazione puntiforme più recentemente identificata consiste nella sostituzione di una G con una A, in posizione 1896 (G1896A), localizzata nel gene Pre-Core. Questa sostituzione comporta l'introduzione di uno stop codon (TAG) al posto del codone che codifica per il triptofano, comportando la prematura terminazione della trascrizione e quindi la mancata sintesi dell'*HBeAg*. Tale mutazione non influisce sulla produzione dell'antigene *HBcAg*, in quanto la sua traduzione inizia a valle del codone di stop.

Inoltre, si è scoperto che questa doppia mutazione può anche essere associate al cambiamento della fase immunologica e alla conseguente gravità della malattia epatica negli adulti con infezione cronica da HBV, nonostante ci siano pareri contrastanti.

Sono state osservate anche delle mutazioni a livello del gene Core in pazienti immunocompromessi ed in pazienti orientali con epatite cronica o carcinoma epatocellulare. Tali varianti virali comportano la perdita degli epitopi

riconosciuti dalle cellule B e T, conferendo un vantaggio selettivo al virus contro la risposta immunitaria dell'ospite.

Mutazione e Delezioni di HBs

Durante il decorso dell'infezione cronica da HBV, sono state identificate frequentemente mutazioni della regione Pre-S specialmente in uno stadio tardivo della malattia.

Le alterazioni del gene Pre-S che sono state trovate, includono delezioni al 3' terminale della regione Pre-S1, al 5' terminale della regione Pre-S2 e mutazioni puntiformi nel codone di inizio Pre-S2.

Entrambe le mutazioni Pre-S1 e Pre-S2 sono state riportate come causa di sovrapproduzione e accumulo della proteina di superficie dell'epatite B (LHB) nel reticolo endoplasmatico (ER), determinando uno stress significativo che può indurre danni al DNA e instabilità genomica e quindi avere un possibile ruolo nell'epatocarcinogenesi.

Inoltre si è scoperto che la capacità di trascrizione della sequenza Pre-S2 tronca, quando integrata in un genoma ospite, può contribuire al meccanismo oncogenico.

Le mutazioni Pre-S2, che sono quelle più frequenti, inducono anche una degradazione dell'inibitore della chinasi dipendente dalla ciclina CDk, portando delle alterazioni nel ciclo cellulare.

Queste alterazioni provocano la formazione di epatociti (GGH) di tipo II, correlabili con malattie epatiche più gravi, come la cirrosi e l'HCC.

Nello studio di Pok e collaboratori, sono stati confrontati pazienti con carcinoma epatocellulare e non-HCC per età, sesso, stato HBeAg e genotipo HBV.

Senza gli effetti di questi fattori, la prevalenza delle delezioni Pre-S nei pazienti HCC è risultata più alta rispetto a quella nei pazienti non-HCC, confermando l'associazione delle delezioni Pre-S con lo sviluppo di HCC.

Inoltre, le delezioni Pre-S2 sono state rilevate con una frequenza più elevata rispetto alle delezioni Pre-S1.

Questo ha dimostrato un maggior potenziale oncogeno delle delezioni Pre-S2, rispetto a quello delle delezioni Pre-S1.

Ulteriori ricerche hanno dimostrato che le delezioni Pre-S2 dell'HBV erano frequentemente riscontrate nei pazienti HBeAg-negativi rispetto ai pazienti HBeAg-positivi indipendentemente dalla presenza o dall'assenza di HCC. [59]

Considerando le interazioni cellula-virus che avvengono nell' ambiente epatocitario è stato possibile avere una visione più chiara del ruolo e dei meccanismi che interessano la proteina di superficie negli organelli della cellula ospite.

Tra i diversi domini S-HBsAg, quello C-terminale (dall'amminoacido [aa] 179 al 226) è idrofobo ed è coinvolto nella mediazione del transito delle glicoproteine di superficie attraverso il reticolo endoplasmatico.

Mutazioni in questo dominio possono portare a una catena stabile, glicosilata, ma non secreta, influenzando così la biogenesi e la secrezione delle particelle subvirali. Quindi le alterazioni in questo dominio possano promuovere un accumulo intracellulare di S-HBsAg e, a sua volta, contribuire a promuovere la proliferazione cellulare. Fra le mutazioni riscontrate maggiormente nel dominio HBsAg sono state rilevate sP203Q e sS210R. [60]

In particolare, la prima è legata all' aumento di cellule nella fase S, mentre sS210R porta ad un aumento di cellule in fase G2 / M del ciclo cellulare, questo dimostra la loro capacità di promuovere l'avanzamento e / o la proliferazione delle cellule.

Mutazioni sP203Q e sS210R ostacolano il corretto ripiegamento del dominio C- terminale HBsAg nella membrana del reticolo endoplasmatico, compromettendo così il rilascio di HBsAg e determinando il suo accumulo nell' apparato di Golgi. [61]Quindi, grazie a diversi studi, è stato possibile dimostrare che gli effetti oncogeni non virali e virali cooperano allo sviluppo di HCC in pazienti con infezione da HBV e che quest' ultimo agisce come fattore cancerogeno negli epatociti.

SCOPO DELLA TESI

L'infezione da HBV in Italia, per via della vaccinazione dei bambini, sta diventando rarissima nei giovani, ma nelle persone oltre i 40 anni, tuttavia rappresenta ancora un problema nosologico imponente. Infatti, il gran numero di infezioni acquisite decenni fa da neonati, bambini o giovani di allora, si manifestano oggi come epatiti croniche spesso complicate da cirrosi epatica e epatocarcinoma. Quest'ultima patologia in particolare ha una prognosi molto spesso infausta nel breve periodo.

Il ruolo oncogeno del virus dell'epatite B è noto da tempo ed è stato studiato molto a fondo negli ultimi decenni, ma l'avanzamento tecnologico nel campo del sequenziamento di nuova generazione ha permesso notevoli progressi soprattutto nella comprensione dei meccanismi di oncogenesi inserzionale. Rimane ancora molto da studiare per comprendere appieno altri potenziali meccanismi oncogeni del virus, in particolare quello mediato dal metabolismo delle proteine mutate/aberranti che questo virus, sottoposto ad una forte pressione selettiva del sistema immunitario, può produrre in grande quantità durante la storia naturale dell'infezione cronica. Questa tesi si propone quindi di studiare con tecnica di sequenziamento di nuova generazione una piccola casistica di pazienti con epatocarcinoma in corso di infezione cronica da

HBV. Lo scopo è analizzare nel dettaglio la variabilità genetica del virus isolato dal tessuto tumorale, confrontandola con quella del virus isolato dal tessuto epatico circostante. Nei due compartimenti il virus potrebbe compiere percorsi evolutivi differenti, in quanto sottoposto a pressioni selettive diverse. Ad esempio nelle cellule poco differenziate del tumore il virus potrebbe avere una ridotta capacità replicativa, in funzione dei programmi trascrizionali del tumore stesso, oppure il sistema immunitario potrebbe compiere una diversa azione contro le cellule carcinomatose rispetto a quella compiuta nei confronti degli epatociti differenziati. Questi importanti fattori selettivi differenziali potrebbero lasciare tracce nelle rispettive quasispecie virali dello stesso paziente, e queste tracce potrebbero fornire informazioni indirette per la comprensione di alcuni meccanismi molecolari necessari per l'omeostasi del tumore. Potenzialmente alcune di queste tracce potrebbero anche rappresentare marcatori molecolari utili per la stadiazione del tumore e per un approccio razionale alle opzioni terapeutiche, al pari dei marcatori genetici o proteomici del tumore stesso, di cui da poco si sta cominciando a scoprire il ruolo

PAZIENTI MATERIALI E METODI

2.1 PAZIENTI

Sono stati arruolati 6 pazienti con infezione attiva da HBV portatori di Epatocarcinoma, afferenti consecutivamente al reparto di Chirurgia dei Trapianti degli Ospedali Riuniti di Ancona per la resezione chirurgica del nodulo epatico.

Dopo tale operazione, un frustolo del tessuto tumorale (T) ed un frustolo del tessuto non tumorale circostante (N) sono stati prelevati in camera operatoria ed immediatamente portati in fresco presso il laboratorio di virologia. Qui sono stati ulteriormente sezionati in modo da ottenere frammenti di circa 10-20µg, idonei all'estrazione del DNA e congelati immediatamente fino al loro utilizzo.

2.2 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI INTRAEPATICI E PURIFICAZIONE ANNESSA

L' estrazione è stata effettuata utilizzando un Kit commerciale (*QIAGEN, QIAamp DNA Mini Kit)*

Trattandosi di tessuto solido, è stato effettuato un pretrattamento meccanico del campione clinico.

In dettaglio la metodica prevedeva i seguenti passaggi:

1. Tagliare, sminuzzare o macinare il campione mediante l'uso di un bisturi monouso in una piastra Petri con diametro di 5 cm, previo scongelamento del campione, con l'aggiunta di 180 µl di ATL contenente SDS per la lisi dei tessuti e l'inibizione delle nucleasi. Prelevare con una pipetta tutto il contenuto presente nella piastra e porre in una provetta da 1,5 ml
2. Aggiungere 20 µl di Proteinasi K per liberare il DNA dalle proteine istoniche ed effettuare una lunga agitazione con vortex, e incubare a 56°C finchè il campione non si è completamente dissolto in soluzione.
3. Centrifugare brevemente la provetta da 1,5 µl per rimuovere le gocce dall'interno del tappo, aggiungere 4µl di Rnasi A per digerire l'RNA presente nel campione e lasciar incubare per 8 minuti a temperatura ambiente.
4. Effettuare nuovamente una centrifugazione e aggiungere 200µl del tampone AL per garantire una lisi migliore, inoltre è essenziale la miscelazione quindi effettuare un'agitazione con il vortex e dopo una breve centrifugata.
5. Introdurre 200 µl di Etanolo 100% per permettere la precipitazione dell'acido nucleico, successivamente effettuare una miscelazione e una breve centrifugazione.

6. Trasferire l'intero contenuto della provetta nella colonnina, chiudere il tappo e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto, in questo modo sulla membrana in silice della colonnina si lega il DNA.

   Da ciò riportare la colonnina in un'altra provetta di raccolta e introdurre 500 µl di tampone AW1, un tampone di lavaggio stringente con un'elevata concentrazione di sale caotropico che permette di rafforzare il legame fra il DNA e la membrana, centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.
7. Riportare la colonnina in una nuova tube da 2 ml, aggiungere 500 µl di tampone AW2 ossia una soluzione di etanolo a base di tris per rimuovere i sali cautropici, centrifugando a 14000 rpm per 3 minuti.
8. Infine, per l'eluizione, inserire la colonnina in una provetta da 1,5 ml e aggiungere 100 µl di tampone AE, lasciare incubare per 5 minuti e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.

I campioni (non-tumorale) N e (tumorale) T di ciascun paziente sono stati processati, estratti e amplificati nello stesso giorno.

Inoltre tutte le operazioni manuali sono state effettuate sotto cappa a flusso laminare, mantenendo le condizioni di sterilità per evitare l'inquinamento dei campioni e per garantire la sicurezza dell'operatore.

2.3 METODICA DI AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE PRE-S, PRE-C, CORE DI HBV

Le regioni PRE-S, PRE-C e CORE di HBV sono state amplificate mediante l'utilizzo della reazione a catena della polimerasi, comunemente conosciuta con la sigla PCR *Polymerase Chain Reaction.*

Questa tecnica permette l'amplificazione di frammenti di DNA,

I passaggi prevedono una prima fase di denaturazione a 95°C, in questo modo si ha la separazione dei due filamenti della doppia elica a DNA, in seguito, mediante l'aggiunta dei primers, corte sequenze di 20 oligonucleotidi a sequenza nota che fungono da innesco per la reazione di polimerizzazione, si ha l'appaiamento (annealing) a 40-55°C, infine con l'aggiunta dell'enzima Taq polimerasi e i dideossinucleotidi si ha la fase di allungamento a 65-72°C.

Il ciclo descritto viene ripetuto per circa 40 volte

La mix per la reazione di amplificazione è stata preparata utilizzando il kit *Thermo Scientific Dream Taq DNA Polymerase* della *Thermo Fisher Scientific*

REAGENTI	QUANTITA'	
10X Dream Taq Tampone	5µl	94°C 5min
dNTP	1µl	95°C 20 sec
primer senso 10µM	2,5µl	58°C 30 sec
primer antisenso10µM	2,5µl	72°C 1 min e 30sec
Dream Taq DNA Polymerase	0,2µl	72°C 10 min
H_2O	33,8µl	
DNA estratto	5 µl	
	50 µl tot	

40 cicli

Tabella 2 *Protocollo di amplificazione utilizzando il kit Thermo Scientific Dream Taq DNA Polymerase*

Primer utilizzati:

GENE	NOME PRIMERS	SEQUENZA DAL 5' AL 3'	LUNGHEZZA	SENSO
PRE-S	PRES-S	CGCCTCATTTTGYGGGTCAC	20 nt	F
	PRES-AS	GAGAAGTCCACCACGAG	17 nt	R
PRE-C	PREC-CS	GGAGGCTGTAGGCATAAATTG	21 nt	F
	PREC-AS	GCTTGCCTGAGTGCRGTATG	20 nt	R
CORE	CS1	GAGTTACTCTCKTTTTTGCCT	21nt	F
	HBVT-AS	TGAGTCCAAGGAATACTAACAT	22nt	R

Tabella 3 *Primers utilizzati per amplificare i geni PRE-S, PRE-C e CORE*

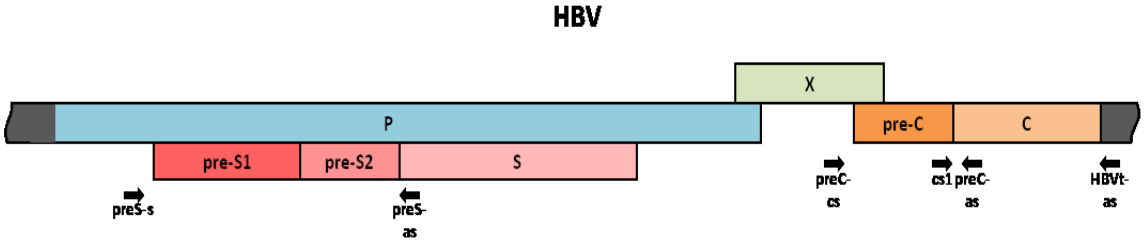


Figura 10 *Rappresentazione grafica del genoma di HBV e dei primers utilizzati per la reazione di amplificazione*

I prodotti di amplificazione sono stati controllati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 10% valutando la lunghezza del prodotto di amplificazione mediante l'utilizzo di un DNA marker: pGEM® della ditta PROMEGA.

2.4 CORSA ELETTROFORETICA PER CAPILLARITA' SU QIAxcel

Il sistema QIAxcel esegue la separazione completamente automatizzata di frammenti di DNA e RNA secondo il loro peso molecolare e può elaborare fino a 96 campioni per corsa.

Il sistema QIAxcel è costituito dallo strumento QIAxcel, un QIAxcel Kit (contenente una cartuccia di gel QIAxcel e reagenti), un computer e un software BioCalculator ™, Quest' ultimo fornisce sia elettroferogrammi che immagini gel della separazione degli acidi nucleici e può essere utilizzato per eseguire le seguenti tipi di analisi:

1)Determinazione della dimensione e concentrazione dei frammenti di DNA

2)Determinazione del rapporto, concentrazione e qualità di RNA totale e la qualità di cRNA / cDNA e frammenti di RNA / DNA.

Lo strumento utilizza cartucce monouso usa e getta per l'analisi di un massimo di 96 campioni in meno di 40 minuti.

La separazione degli acidi nucleici è ottenuta grazie alla presenza dei seguenti reagenti:

- *QX DNA o RNA Separation Tampone* abilita la separazione delle molecole di DNA o di RNA
- *QX Wash Tampone* utilizzata per il lavaggio delle punte dei capillari in modo da eliminare la possibilità di contaminazioni crociate
- *QX DNA o RNA Dilution Tampone* per ottimizzare la concentrazione del campione
- *Mineral Oil* per prevenire l'evaporazione dei campioni

Inoltre nel Kit è presente una cartuccia di gel che è composta da una matrice con un colorante intercalante come il bromuro di etidio e differenti QX Alignment Marker richiesti per la determinazione della taglia del frammento dell'acido nucleico.

Avviata la corsa, i prodotti dell'amplificazione, migrando, vengono rilevati in prossimità dell'estremità d' uscita del capillare e il segnale, giunto al detector, viene inviato ad un sistema di elaborazione dati e visualizzato sotto forma di elettroferogramma che riporta il segnale (picco) di rilevazione della molecola in funzione del tempo.

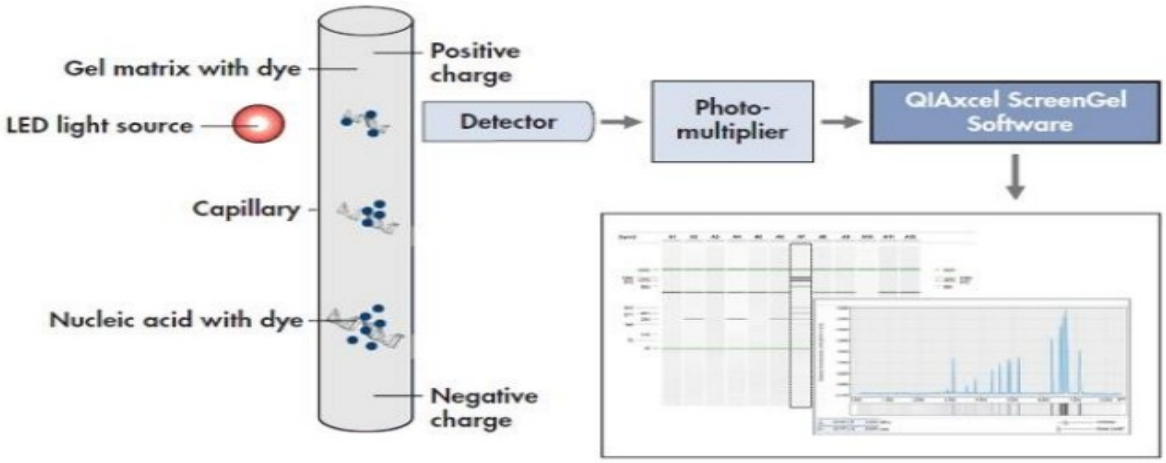


Figura 11 *Rappresentazione dell'elettroforesi capillare*

2.5 DILUIZIONE DEI CAMPIONI AMPLIFICATI

Dalla valutazione della qualità del segnale, visualizzata mediante gli RFU dei picchi dei prodotti di amplificazione, è stato possibile effettuare una diluizione dei medesimi, al fine di ottenere delle sequenze chiare e leggibili con il metodo enzimatico di Sanger che richiede prodotti non superiori a 500 RFU.

Prima del sequenziamento, i campioni sono stati purificati dall' eccesso dei nucleotidi non incorporati utilizzando il kit *Clean up* dell'*Abbott* con il seguente protocollo riportato in tabella:

REAGENTI	QUANTITA'	TEMPERATURA E TEMPO
Amplificato	9,5µl	37 °C 15 min
Clean up	9,5µl	80°C 15 min
	10µl tot	

Tabella 4 *Protocollo di purificazione dei prodotti di amplificazione con il* kit *Clean up* dell'*Abbott*

2.6 SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento nucleotidico è stato utilizzato per verificare le adeguate dimensioni dei prodotti di amplificazione ottenuti e la presenza di mutazioni nucleotidiche e aminoacidiche.

È stato utilizzato il sequenziatore automatico a raggio laser ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem – HITACHI), che si basa sul principio dell'elettroforesi capillare.

La metodologia utilizzata è conosciuta anche come metodo enzimatico di Sanger.

Per ogni campione sono state allestite 2 reazioni di sequenza, una per il filamento senso e una per l'antisenso;

la reazione di sequenza è stata eseguita in un volume finale di 10 µl, costituita da 1 µl del prodotto di amplificazione e 9 µl di mix:

REAGENTI	QUANTITA'	TEMPERATURA E TEMPO
Big Dye	6µl	96°C 10 sec 50°C 5 min 60°C 2 min 25 cicli
H_2O	2µl	
Primer 100 µM	1µl	
Prodotto di amplificazione purificato	1µl	
	10µl tot	

Tabella 5 *Protocollo della reazione di sequenza per ogni singolo filamento di DNA*

Al termine della sintesi dei prodotti marcati è stata effettuata un ulteriore purificazione dai sali e dai terminatori di catena non incorporati in una piastra da 96 well con il kit Big Dye XTerminator® Purification Kit.

La piastra successivamente è stata inserita nel sequenziatore automatico a 16 capillari dove è stata eseguita l'elettroforesi capillare.

Infine i dati della corsa sono stati analizzati attraverso il *Sequencing Analysis 5.3.1 Software.*

Successivamente elaborati con *Seq-Scape2.0 software* e *BioEdit Sequence Alignment 7.2*

2.7 SEQUENZIAMENTO NEXT GENERATION SEQUENCING

Per avere una migliore definizione nell' analisi delle quasispecie virali nei campioni processati è stato effettuato un sequenziamento di nuova generazione con il sistema *Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM*)

La prima parte del processo si divide in quattro fasi:

- ***Preparazione del campione***
- ***Amplificazione mediante PCR in emulsione***
- ***Arricchimento e Purificazione***
- ***Sequenziamento***

Preparazione del campione

I prodotti di amplificazione sono stati concentrati e purificati utilizzando il kit Centricon Merck-Millipore Darmstadt Germania e controllati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 10%.

Successivamente i prodotti di amplificazione *Pre-S, Pre-C, Core* di ciascun campione sono stati mescolati ottenendo un volume finale di 20 µl.

1) Analisi ScreenTape

Per assicurarsi che le librerie da costruire siano efficaci e pronte all' utilizzo è stata eseguita un'elettroforesi capillare con il sistema *Agilent Tape Station 2200* seguendo il manuale *High Sensitivity D1000*:

REAGENTI	QUANTITA'		REAGENTI	QUANTITA'
Sample Tampone	4µl		Sample Tampone	4µl
Ladder D 1000	2µl		campione	2µl

Tabelle 6 *Reagenti utilizzati per l'elettroforesi capillare con il sistema Agilent Tape Station 2200*

Ciò ha permesso di conoscere la concentrazione dei campioni espressa in ng/µl.

In seguito sono state preparate le librerie utilizzando il *Prepare Amplicon Libraries without Fragmentation Using the Ion Plus Fragment Library Kit* della *Thermo Fisher* seguendo tale procedura:

1)Riparazione della regione terminale

Conoscendo la concentrazione dei prodotti di amplificazione sono stati preparati 10-100 ng del pool di ampliconi in un volume totale di 79 µl di

Nuclease-free Water, in seguito è stato mescolato con i seguenti reagenti in un volume totale di 100 µl e incubato per 20 minuti a temperatura ambiente.

COMPONENTI	QUANTITA'
Pool di ampliconi 10-100 ng	79µl
End Repair Tampone 5X	20µl
Enzima End Repair	1µl
	100µl tot

Tabella 7 *Componenti utilizzati per la riparazione delle regioni terminali dei prodotti di amplificazione*

2) Purificazione del pool di ampliconi

La purificazione è stata eseguita utilizzando l'*Agencourt™ AMPure™ XP Kit:*

1. Aggiungere 180 µl di *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* al campione, pipettare su e giù cinque volte per mescolare accuratamente la sospensione di sferette con il DNA, quindi fare una breve centrifuga ed incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.

2. Centrifugare nuovamente e posizionare le provette del campione in un supporto magnetico come il DynaMag ™ -2magnet per 3 minuti. Rimuovere ed eliminare il surnatante.
3. Trasferire 500 µL di etanolo al 70% nelle provette senza rimuoverle dal supporto magnetico.
4. Incubare per 30 secondi, ruotando le provette intorno al doppio magnete per spostare le sferette da una parte all' altra. Dopo rimuovere ed eliminare il supernatante
5. Ripetere i passaggi 3 e 4 per un secondo lavaggio.
6. Per rimuovere l'etanolo residuo si utilizza una pipetta da 20µl facendo attenzione al pellet
7. Mantenendo le provette sul supporto magnete, asciugare all'aria le sferette a temperatura ambiente per 3-5 minuti.
8. Rimuovere le provette dal magnete e aggiungere 25 µL di Low TE al campione. Dispensare la miscela su e giù per cinque volte, quindi agitare tramite vortex il campione per 10 secondi.
9. Centrifugare e posizionare i campioni nel supporto magnetico per almeno 1 minuto, trasferire il surnatante contenente il DNA eluito nelle nuove provette LoBind ™ da 1,5 ml.

3) Ligazione degli adattatori, riparazione del taglio, purificazione

In una provetta da 0,2 ml si aggiungono i reagenti come indicato nella seguente tabella, appropriata, per la costruzione di librerie con barcode.

LIBRERIE BARCODATE	
COMPONENTI	**QUANTITA'**
DNA	25µl
Ligase Tampone 10X	10µl
Ion P1 Adaptor	2µl
Ion Xpress ™ Barcode X [1]	2µl
dNTP Mix	2µl
H2O Nuclease-free	49µl
DNA Ligase	2µl
Nick Repair Polymer	8µl
	100µl tot

Tabella 8 *Reagenti utilizzati per la costruzione di librerie barcodate (I barcode utilizzati non sono stati diluiti, ma sono state utilizzate soluzioni pure).*

Posizionare la provetta in un termociclatore ed eseguire il seguente programma.

STAGE	TEMPERATURA	TEMPO
Hold	25°C	15 min
Hold	72° C	5min
Hold	4°C	max 1h

Tabella 9 *Protocollo utilizzato per la costruzione di librerie barcodate.*

Seconda purificazione

1. Aggiungere ai campioni 100µl di Agencourt ™ AMPure ™ XP Reagent, pipettare su e giù cinque volte per mescolare accuratamente la sospensione di sferette con il DNA, spinnare e incubare la miscela per 5 minuti a temperatura ambiente.
2. Posizionare i campioni e ruotarli più volte nel rack magnetico per 3 minuti. Scartare il surnatante senza disturbare il pellet.
3. Aggiungere 500 µl di etanolo al 70%
4. Incubare per 30 secondi, ruotando le provette intorno al doppio magnete per spostare le sferette da una parte all'altra. Rimuovere e scartare il supernatante.
5. Ripetere i passaggi 3 e 4 per un secondo lavaggio.

6. Per rimuovere l'etanolo residuo utilizzare una pipetta da 20µl
7. Mantenendo le provette sul supporto magnetico, asciugare all'aria a temperatura ambiente per 3-5 minuti.
8. Rimuovere le provette dal supporto magnetico e aggiungere 20 µl di Low TE direttamente al pellet per disperdere le sferette. Pipettare la miscela su e giù per cinque volte, quindi agitare i campioni con il vortex per 10 secondi.

Per essere sicuri che la libreria sia stata marcata con i codici molecorari, è stata eseguita una Real-Time PCR utilizzando l'*Ion Library TaqMan® Quantitation Kit* secondo tale protocollo:

diluizioni seriali

1.Preparare le diluizioni seriali della libreria del controllo ossia il plasmide dell'HBV

2. Per allestire la curva di calibrazione dei controlli, preparare un volume che sia sufficiente per poter eseguire l'analisi in doppio.

Effettuare le diluizioni degli standars come riportato in tabella:

STANDARD	LIBRARY INPUT	H_2O	FOLD DILUTION	CONCENTRAZIONE
1	5 µl (non diluiti)	45µl	0.1	6.8 pM
2	5 µl Std 1	45µl	0.01	0.68 pM
3	5 µl Std 2	45µl	0.001	0.068 pM
4	5 µl Std 3	45µl	0.001	0.0068 pM
5	5 µl Std 4	45µl	0.00001	0.00068 pM

Tabella 10 *Diluizioni seriali degli standards*

2.Preparare in doppio una diluizione 1:1000 della libreria, prelevando 2µl di campione e mescolandoli con 98 µl di acqua ultrapura

3.Preparare la master mix in ghiaccio per i diversi campioni secondo tale tabella:

COMPONENTI	VOLUME
Ion Library TaqMan qPCR Mix 2X	10µl
IOn Library TaqMan Quantitation Assay20X	1µl
H_2O Nuclease-free	15µl

Tabella 11 *Reagenti utilizzati per la reazione di quantizzazione dei prodotti di amplificazione*

Per ciascuna reazione, aggiungere 15 µl della master mix in ciascun pozzetto della piastra PCR.

In seguito aggiungere in doppio, 5 µl di libreria diluita in un pozzetto per un volume totale di 20 µl.

Gli altri pozzetti contenenti 15 µl ciascuno della master mix vengono utilizzati per la libreria del controllo positivo e sue diluizioni e per i controlli negativi caratterizzati da acqua ultra pura.

4. Sigillare la piastra, centrifugare brevemente la piastra.

5.Posizionare la piastra nello strumento qPCR Real-time, eseguire le reazioni, quindi raccogliere i dati.

Il software dello strumento calcola la concentrazione della libreria diluita.

Successivamente si calcola la concentrazione di ciascun campione non diluito:

1. Scegliere il ciclo soglia dalla diluizione della libreria appropriata.
2. Calcolare la concentrazione della libreria non diluita:

Concentrazione della libreria non diluita = (concentrazione determinata da qPCR) × (Diluizione della libreria)

Amplificazione mediante PCR in emulsione

Prima di eseguire direttamente la PCR in emulsione le librerie sono state diluite e portate alla concentrazione precisa di 100 pM.

Dopo ciò è stato creato un pool di tutte le librerie mescolando 5µl di ciascun campione opportunamente diluito.

Come ultimo allestimento sono stati prelevati 6,5µl di pool e mescolati con 18,5µl di H_2O per un volume totale di 25 µl del kit Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 in una provetta da 0,5 ml con su scritto OT2 pool.

Seguendo il protocollo del kit è stata preparata la seguente mix con reagenti e pool:

ORDINE	COMPONENTI	VOLUME
1	H_2O	25µl
2	Ion PGM ™ Hi-Q ™ View Enzyme Mix	50 µl
3	Libreria diluita	25 µl
4	IOn PGM ™ Hi-Q ™ View ISPs	100 µl
		200 µl tot

Tabella 12 *Reagenti utilizzati per la PCR in emulsione*

La soluzione è stata caricata su un filter con l'aggiunta di 850 µl di Reaction Oil e infine, quest' ultimo, è stato disposto sullo strumento *Ion One Touch 2* ed è stata avviata la PCR in emulsione.

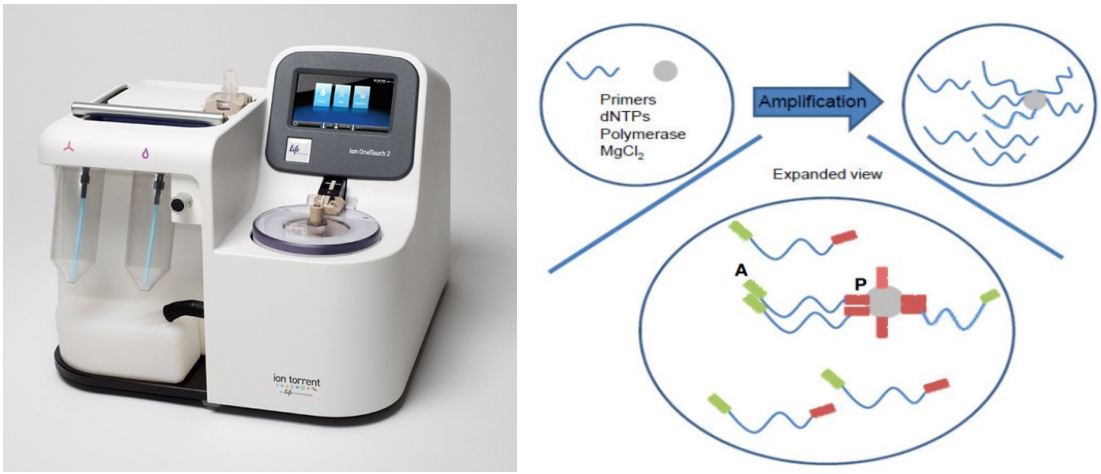


Figura 12 *Rappresentazione dello strumento* OT2

Arricchimento e purificazione

Terminata l'amplificazione, nelle due provette da 0,5 ml è stato eliminato il surnatante lasciandone 100 µl in ogni provetta ed è stato risospeso il pellet. Successivamente sono stati aggiunti 500µl di Ion Touch Wash e infine è stato tutto ricongiunto in un'unica provetta da 1,5ml.

Per l'arricchimento e la purificazione sono stati ricostituiti i seguenti reagenti:

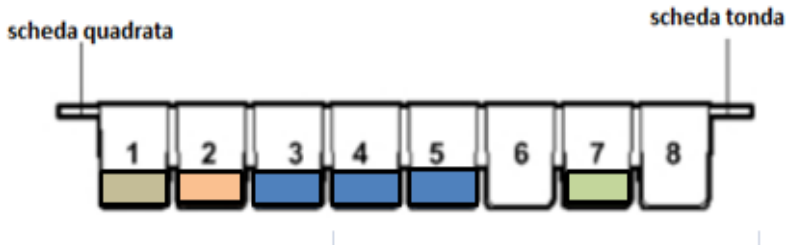
1 *Melt off solution* preparata con 280 µl di Tween e 40µl NaOH 1M appartenenti al kit *ISP Enrichment and IONTorrent sequencing* per un totale 320µl.

2 *Dynal MyOne Streptavidine beads*: sono stati prelevati 13 µl di tale resina e

sono stati posti in una provetta collocata in un supporto magnetico, dopo che le biglie si sono collocate sul fondo è stato eliminato il surnatante ed è stato effettuato un lavaggio con 130µl MyOne Wash Buffer.

Dopo agitazione con il vortex e dopo centrifugazione è stato rimosso il surnatante lasciandone 100µl e risospeso il pellet.

In seguito è stata predisposta la striscia secondo tale schema:



POZZETTI	REAGENTI
1	Campione
2	Dynal MyOne Streptavidine beads
3	300µl di One Touch Wash solution
4	300µl di One Touch Wash solution
5	300µl di One Touch Wash solution
6	vuoto
7	300µl di Melt Off Solution
8	vuoto

Figura 13 *Protocollo di arricchimento e purificazione con il kit ISP Enrichment and IONTorrent sequencing*

Infine la striscia è stata collocata nell' apposito strumento *Ion One Touch ES* ed avviata la corsa per una durata di 35 minuti.

Sequenziamento

A termine dell'arricchimento e della purificazione il campione è stato conservato a 4°C e nel frattempo è stata avviata sullo strumento *Ion Torrent* la procedura di lavaggio:

- Lavaggio con Ipoclorito e apposito chip
- Lavaggio con H_2O e apposito chip
- Risciacquo automatico dello strumento

Successivamente sono stati ricostituiti i reagenti del kit *Ion PGM™ Hi-Q ™ View Sequencing*:

RECIPIENTI	**REAGENTI**
Wash 1	125 ml di W1
	350 ml di NaOH 100mM
Wash2	2L di H_2O 18Ω
	125 ml di W2
	70 µl NaOH 100mM
Wash 3	50 ml di W3

Tabella 13 *Reagenti utilizzati per il sequenziamento*

In seguito è stata effettuata la fase di inizializzazione e dopo aver collocato i recipienti nello strumento é stata avviata la procedura di Auto-PH in cui lo strumento mediante 6 iterazione deve raggiungere un PH pari a 7,5.

A seguire sono stati preparati i nucleotidi e infine è stato caricato l'Ion 318™ Chip v2 BC secondo la procedura riportata nel *Sequencing Protocol Ion 318 Chip*:

- Si recupera il campione conservato a 4°C e se ne prelevano 100µl e si inseriscono in una provetta da 0,5 ml.
- Si aggiungono 5µl di Control Ion Sfere si mescola e si centrifuga per 2 minuti a 15.500 × g
- Si elimina il surnatante lasciandone 15 µl, si mescola e si centrifuga.
- Si aggiungono 12µl di Sequencing Primer
- Si procede con un ciclo termico secondo tali condizioni:

TEMPERATURA	**TEMPO**
95°C	2 min
37°C	2 min

Tabella 14 *Protocollo termico utilizzato per la preparazione al sequenziamento*

Al termine, ai 27µl di campione si sono introdotti 3µl di Bind Sequencing Polymerase e si è lasciato incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.

Per il caricamento è stato effettuato un riconoscimento del chip dallo strumento tramite barcode, dopo di che si è prelevato il liquido di conservazione presente nel chip e successivamente sono stati iniettati con molta cautela 30µl di campione.

Grazie a una serie di agitazioni e centrifughe, è stato possibile distribuire in maniera omogenea la cascata delle biglie contenenti i prodotti di amplificazione nelle apposite celle del chip e infine il surnatante è stato eliminato.

Il chip è stato inserito nell' *Ion Torrent* ed è stato avviato il sequenziamento.

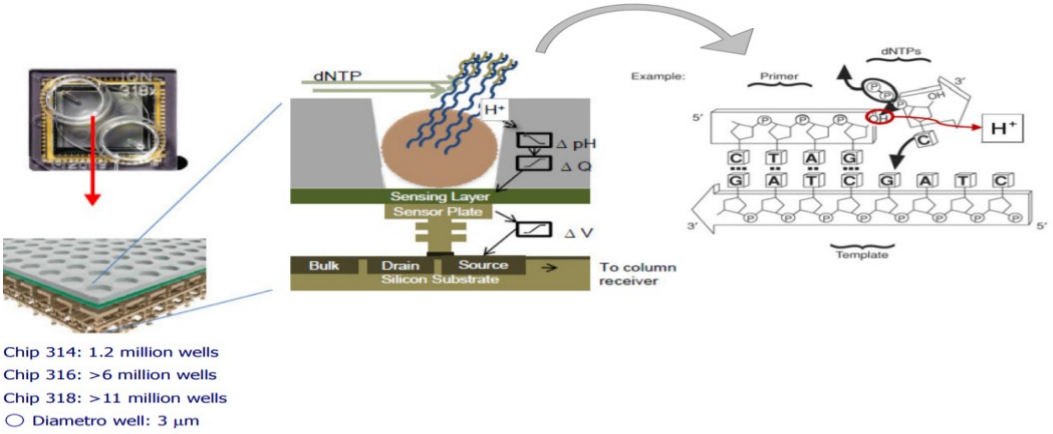


Figura 14 *Rappresentazione grafica del sequenziatore NGS Ion Torrent e caricamento del Chip*

2.8 ANALISI BIOINFORMATICA

Dopo il sequenziamento è stato possibile osservare sul computer collegato allo strumento lo stato della corsa.

Questo ha permesso di comprendere se il flusso ionico applicato dallo strumento è stato efficace o meno e se il sequenziamento è avvenuto correttamente.

Dopo l'elaborazione dati il computer ha rilasciato un file in formato Bam che è stato importato nel software *Integrative Genomics Viewer* (IGV) cioè un programma di visualizzazione ad alte prestazioni per l'esplorazione interattiva di grandi set di dati genomici.

Questo ha permesso di osservare l'allineamento dell'insieme di segmenti di DNA sovrapposti, definiti *conting*, in modo tale da avere una mappa fisica del

genoma.

Inoltre, il sequenziatore ha rilasciato anche un file in formato *FastQ* che grazie al database *Galaxy* è stato convertito in formato *FASTA*.

Questo file, successivamente è stato importato ed elaborato utilizzando il software *Geneious,* un programma che fornisce l'allineamento del genoma e permette la modifica e l'assemblaggio delle sequenze NGS.

Tramite il software *BioEdit Sequence Alignment Editor* sono state eliminate a mano le inserzioni erronee che l'allineamento ha generato.

Successivamente gli allineamenti dei tre geni sono stati ordinatI in modo tale che la posizione numerica dei nucleotidi sia corrispondente nella regione tumorale e non tumorale.

Infine i file allineati sono stati esportati sul programma *Microsoft Excel* e sono state segnalate le inserzioni e le delezioni dei geni PRE-C e PRE-S e le mutazioni senso e non senso dei geni PRE-C, CORE e PRES delle regioni tumorale e non tumorale calcolandone la frequenza.

RISULTATI

3.1 PAZIENTI E CAMPIONI CLINICI

Tutti i 6 pazienti consecutivi selezionati per lo studio erano affetti da carcinoma epatocellulare in corso di infezione cronica da HBV. Tutti erano HBeAg negativi e presentavano un livello alto di HBsAg nel sangue (Tabella 15).

Pz	**HBsAg UI/ml**	**HBVDNA UI/ml**	**HBeAg**	**genotipo**	**Aspetto istologico**
1	5750	10295	neg	E	epatocarcinoma poco differenziato
2	5209	154	neg	D	epatocarcinoma mediamente differenziato in cirrosi
3	5219	6	neg	D	epatocarcinoma poco differenziato
4	1089	654	neg	D	epatocarcinoma mediamente differenziato in cirrosi
5	2997	188	neg	D	epatocarcinoma poco differenziato
6	4371	52914	neg	D	epatocarcinoma mediamente differenziato in cirrosi

Tabella 15 *Pazienti arruolati nello studio e caratteristiche virologiche e istologiche*

Dal punto di vista del trattamento, tutti avevano iniziato una terapia con entecavir da qualche mese e dunque erano in una fase di riduzione viremica, ma ancora positivi per HBV DNA a livelli variabili.
Dal punto di vista istologico tutte lesioni erano classificate come epatocarcinoma, con diverso grado di differenziazione. Nei pazienti 2, 4 e 6 il tessuto non tumorale era cirrotico. Per individuare eventuali differenze biologicamente rilevanti tra il virus nel tumore e il virus nel tessuto circostante, la nostra analisi si è focalizzata su 3 segmenti genici, selezionati perché già descritti in letteratura come particolarmente significativi per conferire al virus particolarità fenotipiche importanti per il rapporto virus-ospite, come descritto nell'introduzione. Nonostante la carica mediamente molto bassa nel plasma, la carica virale intraepatica è stata sufficiente per amplificare in tutti i pazienti i 3 segmenti genici relativi al gene Pre-Core/Core, Core e pres/s, con l'eccezione del paziente 2, in cui è stato possibile amplificare solo il segmento Pre-Core/Core.

3.2 SEQUENZIAMENTO DELLE REGIONI PRE-C CORE E PRE-S TRAMITE LA METODICA SANGER

I prodotti genici ottenuti dalle amplificazioni sono stati inizialmente sequenziati tramite sequenziamento con tecnologia Sanger allo scopo di stabilire le caratteristiche genotipiche del virus del paziente e di stabilire che

relazioni ci fossero tra le quasi-specie virali presenti rispettivamente nel tessuto epatico carcinomatoso e nel tessuto circostante non carcinomatoso. Nella figura 15 è mostrato l'allineamento della regione Pre-Core/Core. Le sequenze dei prodotti di amplificazione Pre-Core/Core e Core, che sono contigui e parzialmente sovrapposti, sono state unite in questa figura per ricostruire la regione genica nella sua interezza.

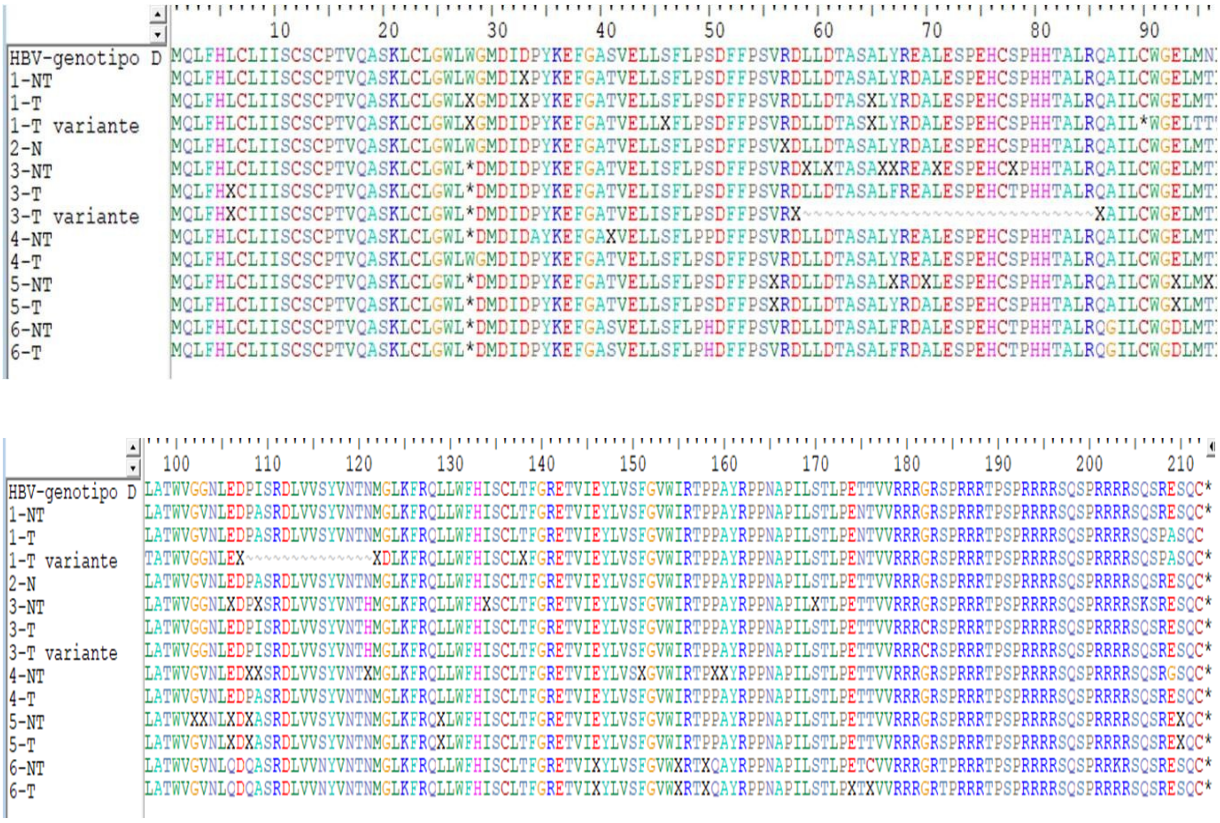


Figura 15 *Allineamento della regione PRE-C e CORE tramite la metodica di Sanger*

Come si può osservare, in alcuni pazienti, in particolare nei pazienti 1, 3 e 4 le quasispecie presenti nel segmento Pre-Core nel tessuto tumorale e quello non

tumorale sono chiaramente diverse, mentre nei pazienti 5 e 6 sembrano apparentemente identiche. Nel dettaglio si evidenza che nel paziente 4 il tessuto non tumorale mostra un virus in cui si è selezionata la mutazione G1896A (che inserisce un codone di stop nel peptide Pre-Core abolendo la produzione dell'antigene e) nel tessuto non tumorale, mentre è rimasta wild-type nel tessuto tumorale. Nel paziente 3 è comparsa una mutazione C1831G (che non modifica l'aminoacido) solo nel tumore. Nel paziente 1, invece, la variante principale solo nel tessuto non tumorale ha selezionato una delezione di diverse basi che elimina il codone di inizio del peptide Pre-Core, abolendo la produzione dell'antigene e.

Nel segmento del gene Core, il paziente l'elettroferogramma fornisce un quadro di potenziale mistura nel paziente 1 che fa sospettare una delezione di 46 basi nel tessuto non tumorale, che porta alla formazione di una proteina Core e un antigene e parzialmente "*missense*", mentre nel paziente 3 un elettroferogramma misto fa sospettare nel tessuto tumorale la presenza di una variante con una delezione di 84 basi che porta ad una delezione di 28 aminoacidi nella proteina Core e nell'antigene e.

Negli altri pazienti si possono evidenziare numerose sostituzioni di basi diverse tra tessuto tumorale e non tumorale, nonchè numerose posizioni

“miste”, segnalate dalla sovrapposizione di picchi diversi nella specifica posizione dell’elettroferogramma.

Anche a carico del segmento del gene pre-s come si può notare nella figura 16 si evidenziano numerose sostituzioni nucleotidiche e, di conseguenza, anche aminoacidiche, diverse tra tessuto tumorale e non tumorale e anche la presenza di numerose posizioni “miste”.

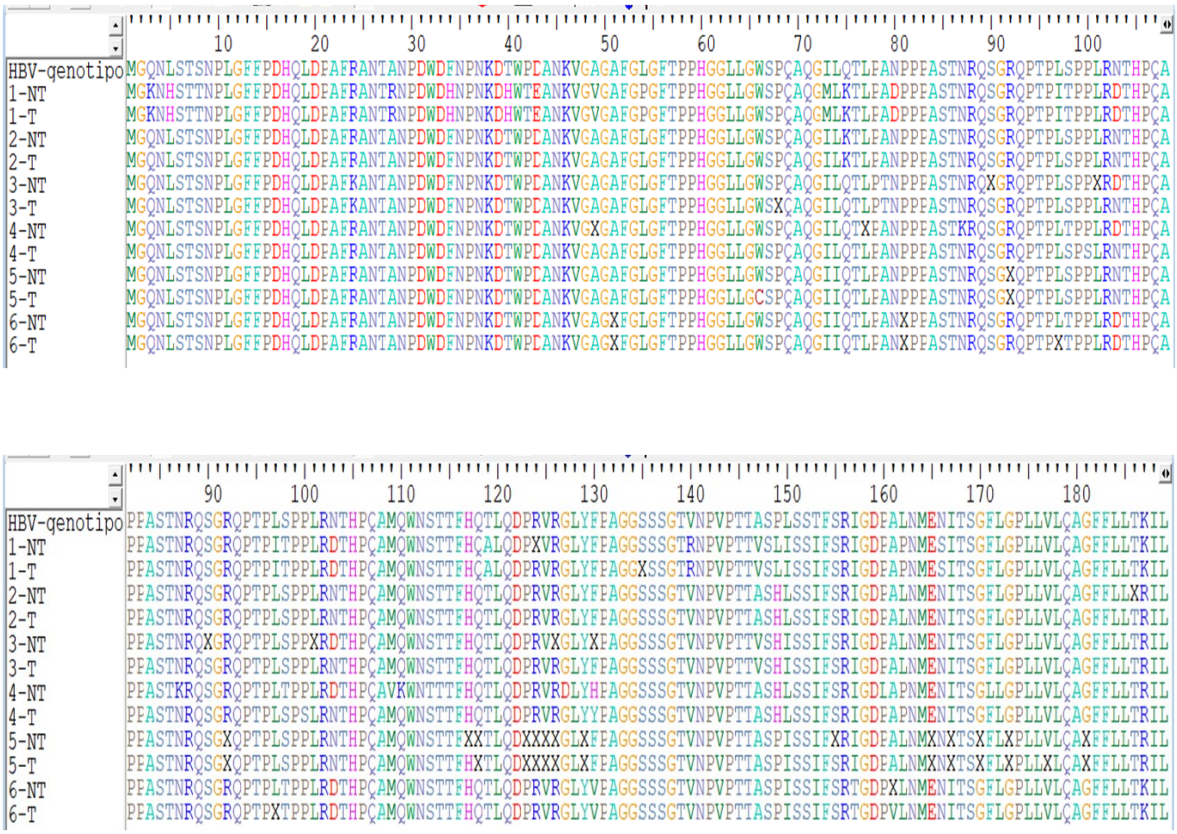


Figura 16 *Allineamento della regione PRE-S tramite la metodica di Sanger*

3.3 ANALISI DI QUASISPECIE TRAMITE SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE

In generale il quadro appena descritto, sebbene con una tecnologia non adeguata per un analisi approfondita, suggerisce che la quasispecie virale nel tessuto tumorale è sostanzialmente diversa da quella del tessuto non tumorale e che quindi nel tumore alberga un virus che non è semplicemente l'espressione della presenza nel sangue circolante dello stesso del virus presente in tutto il fegato. Per approfondire l'analisi di quasispecie e comprendere l'eventuale significato biologico delle differenze tra le varianti virali presenti nei due tessuti, è stata quindi utilizzata una tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS), che fosse in grado di fornire una rappresentazione molto approfondita dell'insieme delle varianti virali presenti nei tessuti analizzati (nella fattispecie sono stati utilizzati la tecnologia e lo strumento Ion Torrent). Tramite questo approccio, è stato possibile ottenere migliaia di sequenze in parallelo per ciascun campione clinico a partire dagli stessi prodotti di amplificazione già analizzati tramite sequenziamento Sanger, quindi perfettamente sovrapponibili come regione analizzata.

Questa tecnologia clonale di sequenziamento, a differenza delle tecnologie basate sulla tecnica di Sanger, purtroppo è gravata da un determinato tasso di

errore, che può originarsi in tutte le fasi del processo, dall'amplificazione al sequenziamento stesso (descritto in dettaglio nei materiali e metodi). Al fine quindi di armonizzare i risultati ottenuti e di standardizzarli in funzione dell'errore di sequenziamento standard rilevato per la seduta specifica, oltre al sequenziamento dei prodotti di amplificazione dei campioni clinici sono stati sequenziati in parallelo i prodotti di amplificazione di un plasmide contenente un clone molecolare di HBV, genotipo D. Pertanto, dando per scontato che il plasmide, sintetizzato da batteri, è una struttura genica virtualmente priva di errori e di varianti biologiche (a differenza dei genomi virali), tutte le varianti osservate in seguito al sequenziamento del plasmide sono da considerarsi frutto dell'errore del processo di amplificazione/sequenziamento. Sottraendo quindi la variabilità "standard" rilevata nel plasmide nelle diverse analisi effettuate sui campioni clinici è quindi possibile ottenere la variabilità netta o in altre parole "vera" dei genomi virali studiati. Pertanto tutti i risultati illustrati di seguito sono stati ottenuti al netto della variabilità osservata nel plasmide.

3.4 ANALISI QUANTITATIVE DELLA VARIABILITÀ VIRALE

Questa analisi viene ottenuta calcolando la distanza genetica tra ciascuna delle sequenze di un determinato campione clinico/paziente nei confronti di tutte le altre dello stesso campione/paziente, e calcolando la media generale. L'analisi permette di valutare quindi la correlazione genetica delle varianti virali tra loro, espresse come valore medio, e indica grossolanamente uno "spread" evolutivo tra le stesse. I risultati relativi a campioni analizzati, divisi per frammento genico, sono riportati nella figura 17 (a,b,c)

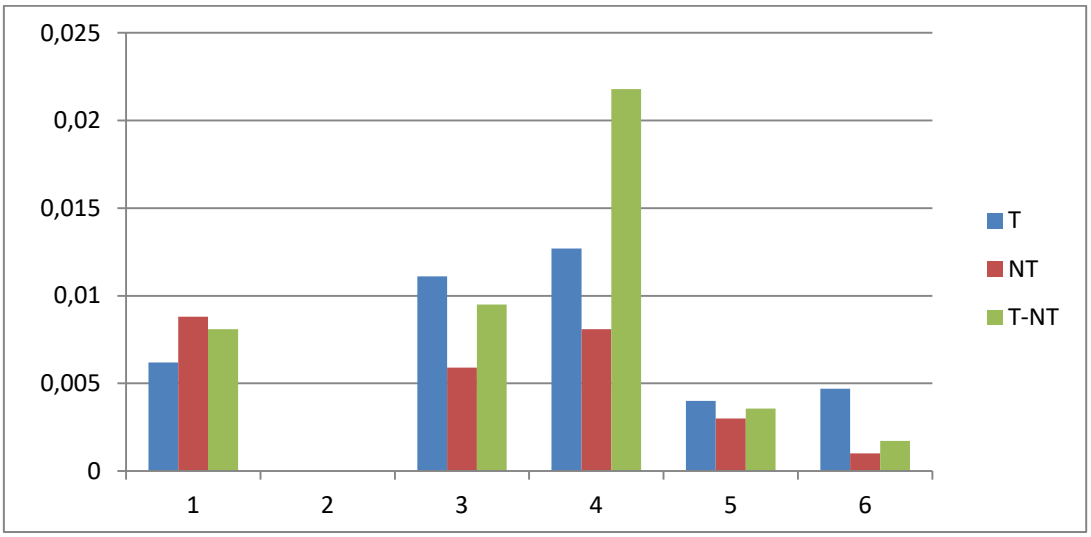


Figura 17 a *Variabilità media della regione PRE-C nei diversi pazienti nel tessuto tumorale e non tumorale circostante.*

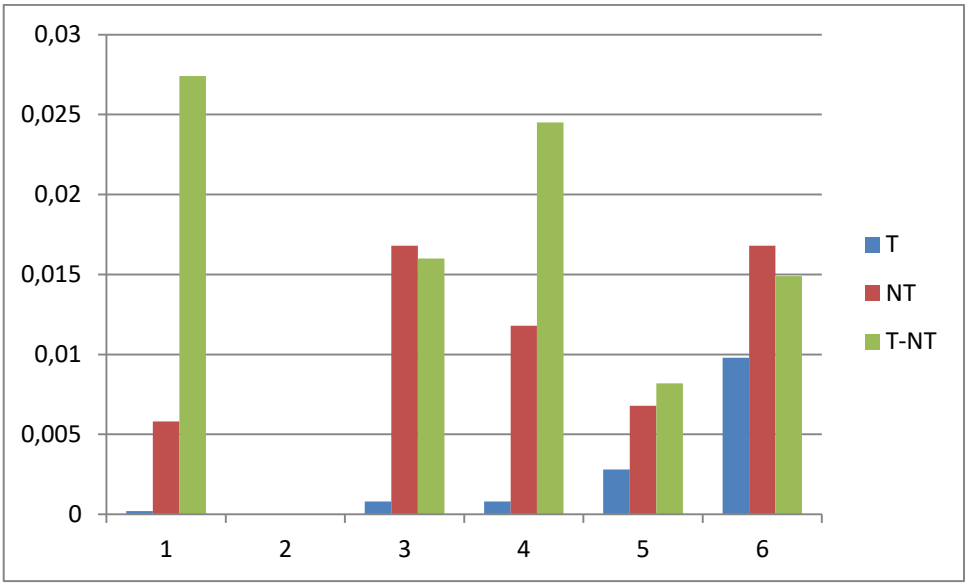


Figura 17 b *Variabilità media della regione CORE nei diversi pazienti nel tessuto tumorale e non tumorale circostante.*

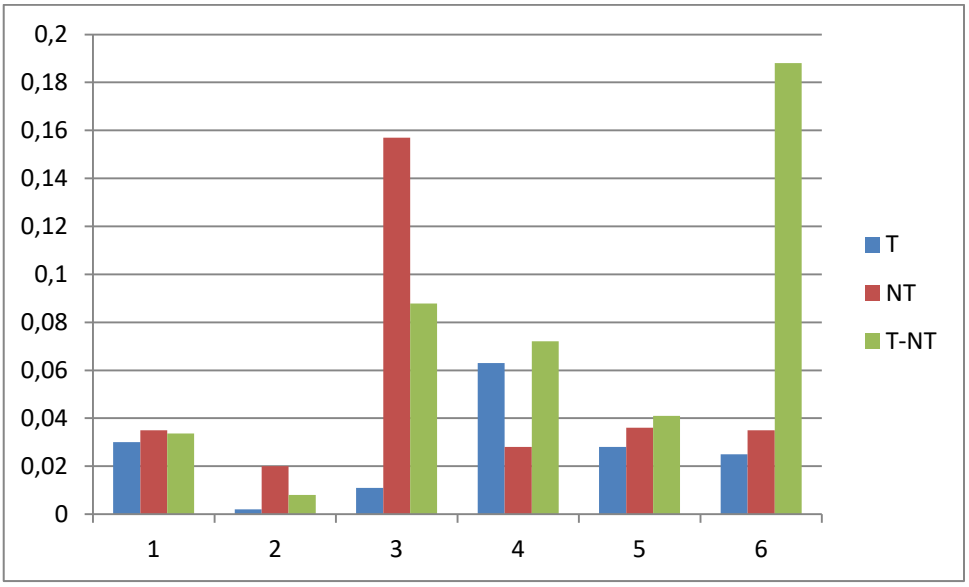


Figura 17 c *Variabilità media della regione PRE-S nei diversi pazienti nel tessuto tumorale e non tumorale circostante.*

Come si può notare, la variabilità media del segmento Pre-s è notevolmente superiore rispetto a quella della regione Pre-Core/Core, dimostrando la notevole flessibilità genica di questo gene. Inoltre, per quanto riguarda le differenze tra i tessuti, la variabilità media delle quasispecie, è superiore nel tessuto tumorale per i frammenti del gene Core e Pre-s, mentre è inferiore per il breve frammento Pre-Core, sebbene queste differenze non risultino statisticamente significative. A questo punto è stata anche presa in considerazione la pressione selettiva agente sugli stessi frammenti genici. Un valore indicativo di questa pressione si può ottenere calcolando separatamente la variabilità nelle posizioni nucleotidiche "non sinonime"o "antonime" (Ka, quelle che variando portano al cambiamento dell'aminoacido) e quelle "sinonime"(Ks, che variando non modificano l'aminoacido). Facendo per ogni coppia di tessuti il rapporto tra il valore di queste variabilità medie, si ottiene un indice (Ka/Ks) che se uguale a 1 significa neutralità selettiva (le mutazione che cambiano gli aminoacidi sono altrettanto probabili di quelle che non li cambiano); maggiore di 1 significa che è più probabile la variazione legata al cambiamento aminoacidico (struttura proteica), suggestivo di una pressione selettiva positiva verso il cambiamento fenotipico; se minore di 1 invece suggerisce pressione selettiva negativa per la conservazione dello status quo fenotipico.

La figura 18 (a,b,c) mostra che in questa analisi i risultati non vanno nella stessa direzione: sebbene generalmente la pressione selettiva sia maggiore nel tessuto non tumorale, ci sono grandi differenze tra i segmenti genici e tra i pazienti.

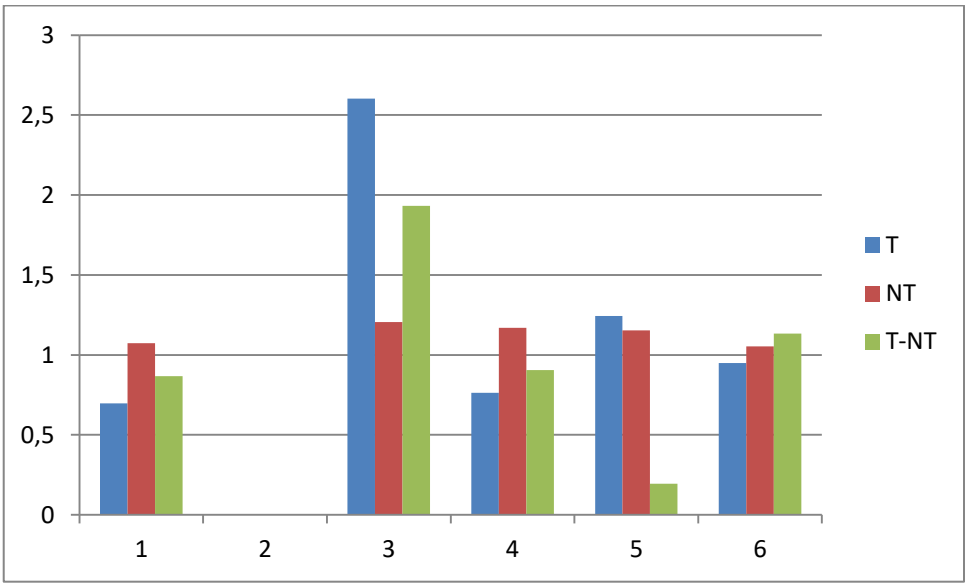


Figura 18 a *Analisi della pressione selettiva della regione PRE-C tra il tessuto tumorale e non tumorale dei diversi pazienti*

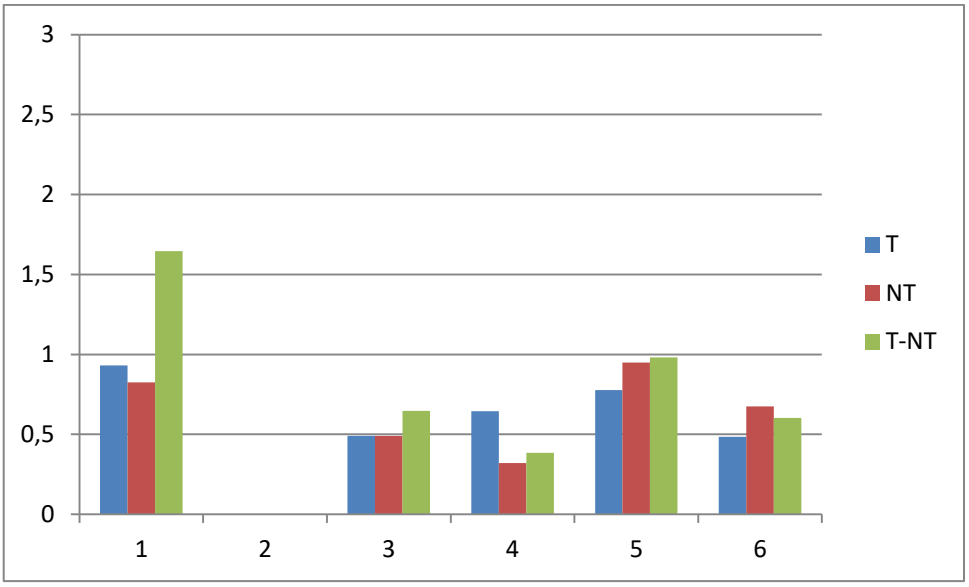


Figura 18 b *Analisi della pressione selettiva della regione CORE tra il tessuto tumorale e non tumorale dei diversi pazienti*

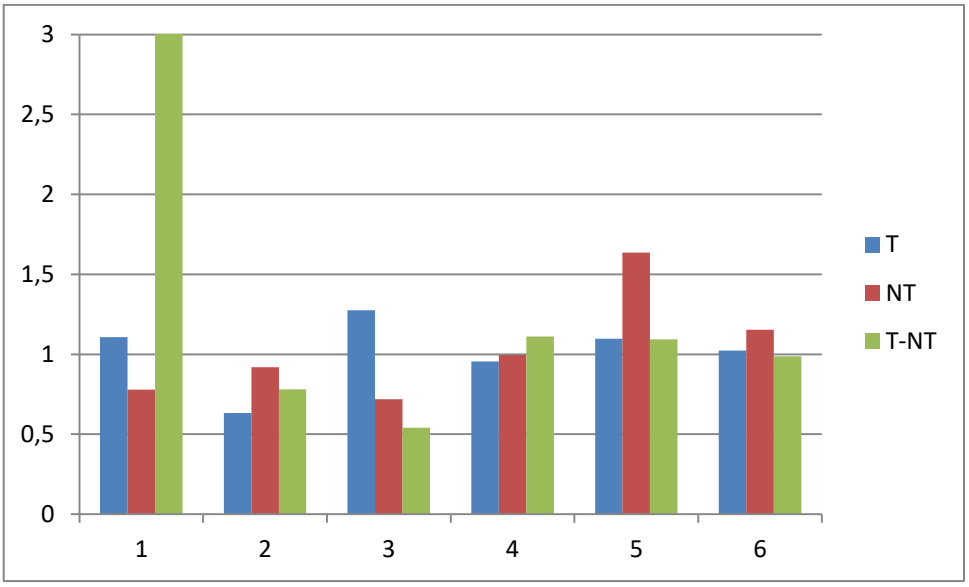


Figura 18 c *Analisi della pressione selettiva della regione PRE-S tra il tessuto tumorale e non tumorale dei diversi pazienti*

3.5 ANALISI QUALITATIVA DELLE MUTAZIONI PUNTIFORMI

L'analisi NGS ha permesso inoltre di calcolare con precisione la frequenza di tutte le varianti nucleotidiche e aminoacidiche presenti nei campioni, e in particolare ci siamo concentrati sulle differenze tra varianti virali presenti nel tumore e quelle del tessuto circostante. Le figure seguenti illustrano le principali differenze aminoacidiche puntiformi a carico del segmento Pre-Core. Si possono notare diverse peculiarità uniche del tessuto tumorale o non tumorale.

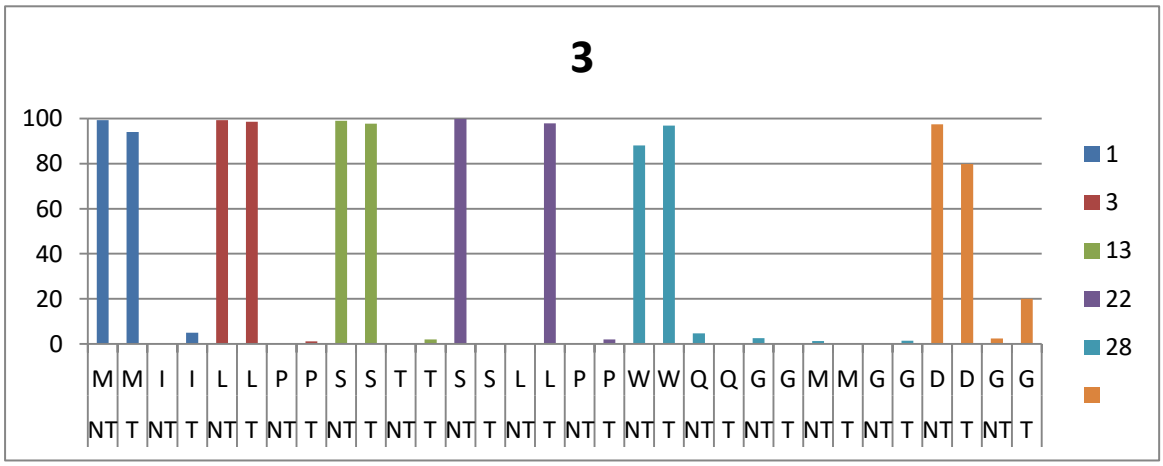


Figura 19 a *Mutazioni aminoacidiche puntiformi a carico della regione PRE-C nel paziente 3*

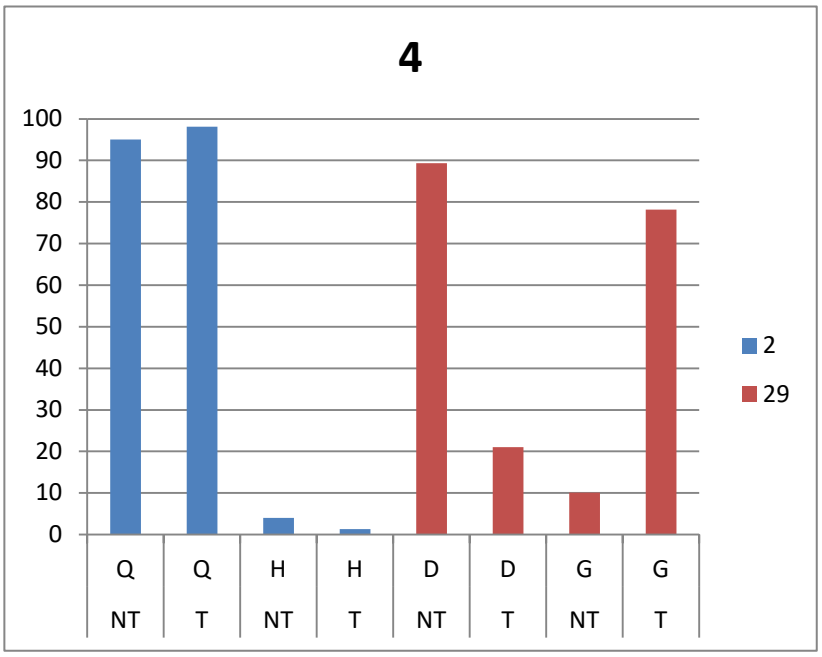


Figura 19 b *Mutazioni aminoacidiche puntiformi a carico della regione PRE-C nel paziente 4*

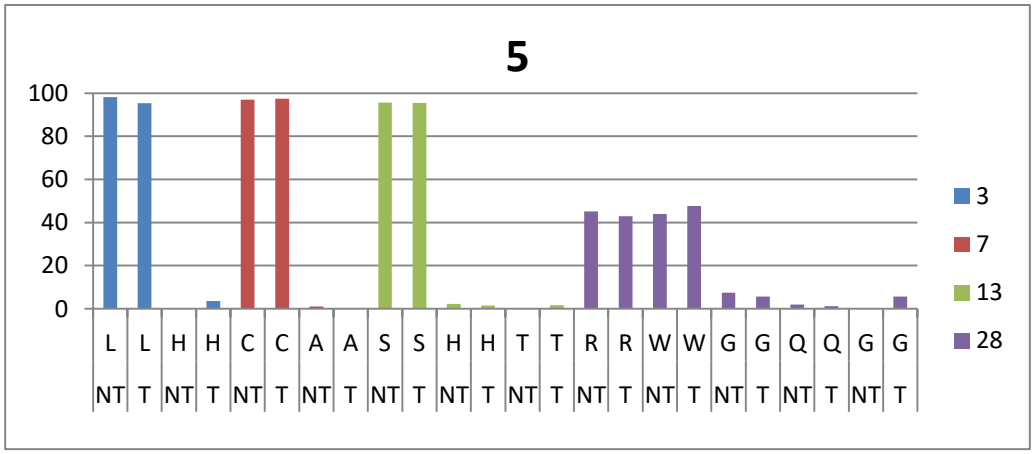


Figura 19 c *Mutazioni aminoacidiche puntiformi a carico della regione PRE-C nel paziente 5*

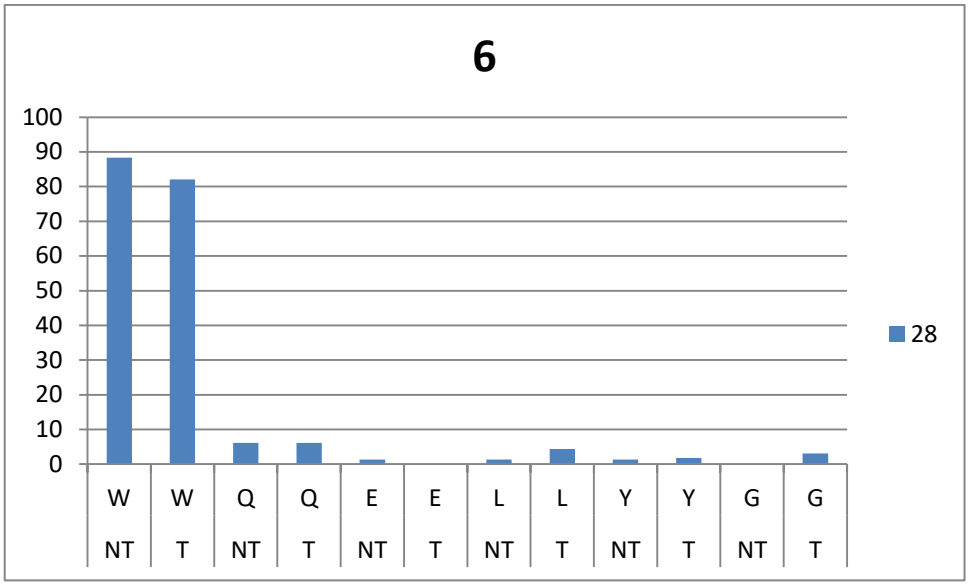


Figura 19 d *Mutazioni aminoacidiche puntiformi a carico della regione PRE-C nel paziente 6*

3.6 *ANALISI QUALITATIVA DELLE MUTAZIONI PER DELEZIONE INSERZIONE*

Sicuramente le mutazioni "indel" rappresentano un fenomeno importante nella storia naturale. E' noto che delezioni o inserzioni nella regione Pre-Core, parimenti al codone di stop (G1896A), sono frequenti nei pazienti con infezione cronica attiva che hanno perso l'HBeAg. Infatti delezioni o inserzioni di un numero di basi diverso da un multiplo di 3 alterano la cornice di lettura portando all'abrogazione della sintesi dell'antigene e alla produzione di brevi peptidi *missense*. Nella casistica analizzata, varianti portatrici di mutazioni di questo tipo nella regione Pre-Core sono state trovate in tutti i pazienti, sebbene con frequenze individuali inferiori all'1% della

quasispecie, sia nel virus isolato dal tumore che in quello isolato dal tessuto non tumorale. Globalmente nei campioni clinici dei pazienti 3, 4 e 6 la frequenza di queste varianti con delezione raggiunge l'1%. Nel solo paziente 5 l'analisi ha mostrato una variante rappresentativa del 2% delle sequenze Pre-Core del virus tumorale (ma assente in quello non tumorale) una delezione di 8 basi in grado di abrogare la produzione dell'antigene e. Nello stesso paziente, un altro 1,5% delle varianti dal tessuto tumorale (quindi in totale 3.5%) globalmente, e l'1.7% delle varianti dal tessuto non tumorale mostrano delezioni in grado di abrogare l'antigene e.

Per quanto riguarda le mutazioni "indel" della regione Core, l'analisi ha confermato le delezioni già descritte tramite sequenziamento sanger, tuttavia con percentuali (nel paziente 3 2%, nel paziente 1 5%) molto diverse rispetto a quanto prevedibile in base al potere discriminante teorico, evidenziando il limite di ottenere informazioni affidabili su varianti con indel dalla tecnologia Sanger.

Infine, a carico del segmento Pre-s, l'analisi ha rivelato che il quadro delle inserzioni, ma soprattutto delle delezioni è molto complesso, e comprende sia inserzioni e delezioni di singole basi (che quindi alterano la cornice di lettura) sia delezioni di multipli di tre basi, che eliminano alcuni segmenti, soprattutto a carico della proteina pres2. Il quadro di queste "indel"nel segmento genico è

molto complesso e comprende sia inserzioni e delezioni di singole basi (che quindi alterano la cornice di lettura) sia delezioni di multipli di tre basi, che eliminano alcuni

segmenti, soprattutto a carico della proteina pres2 (tabella 16). Vale la pena citare alcune delle principali differenze tra tessuto tumorale e non tumorale dello stesso paziente: nel paziente 1 una lunga delezione di 85 aminoacidi è presente nel 6,6% delle sequenze solo nel tessuto non tumorale, mentre solo nel tessuto tumorale compare una delezione di 3 aminoacidi nel 28.2 % delle sequenze. Nel paziente 3 una delezione di 1 aminoacido è presente nel 13.16 delle sequenze solo nel tessuto non tumorale.

REF. GENOTIPO D		TUMORE				NON TUMORE			
PAZIENTE	posizionent	inserzione	freq	delezione	freq	inserzione	freq	delezione	freq
1	52 a 82			TGG- GAT	28.2%				
	86			T	41,05%			T	41,20%
	214			T	7,00%			T	6,80%
	221			C	20,80%			C	20,80%
	299 a 556								6,60%
2	214			T	13,30%			T	11,20%
	270			A	25,70%			A	25,50%
	277			T	8,90%			T	7,20%
	337	C	16.9%			C	92,40%		
	613	G	24.4%						
3	130					G	1%		
	163					G	5.5%		
	223					C	1.8%		
	259					G	1.3%		
	301					C	1%		
	349					G	1.5%		
	397 a 399							ATG	13,16%
	553	G	3%						
4	139	A	1.2%						
	172					G	54,40%		
	187 a 370							TAG a GGC	11,66%
	317	G	0.8%						
	337					C	6.5%		
	352	C	50,56%			C	47,30%		
	376 a 378							AGT	5,40%
	352					C	1.2%		
	406	C	1.3%						
	424					C	1.9%		
5	199					G	1,30%		
	349	C	2,00%			C	0,60%		
	372 a 374			ATG	50,40%			ATG	52,20%
	379	C	10.4%			C	3.1%		
	486					C	1.1%		
	427-437			da GCC a TTC	18,80%			da GCC a TTC	10,97%
6	46 a 330				5,70%			CAG-GTA	9%
	44 a 335				2,50%			ACA a CGC	98%
	404	A	8.8%						
	434			CGT	1,80%				
	526							T	16,50%

Tabella 16 *Analisi delle inserzioni e delezioni del gene PRE-S con corrispettiva frequenza dei nucleotidi di ciascun paziente nel tumore e nella regione non tumorale circostante*

CONCLUSIONI

Lo studio su cui si basa questa tesi ha permesso di utilizzare una tecnologia relativamente nuova per analizzare nei dettagli la quasispecie virale di HBV in pazienti affetti da epatocarcinoma, in particolare ha permesso di caratterizzare in dettaglio le differenze, tra il virus isolato dal tessuto tumorale e il tessuto non tumorale circostante. I risultati hanno indubbiamente permesso di evidenziare che n tutti i pazienti la quasispecie virale del tumore non è sovrapponibile con quella del tessuto non tumorale ma al contrario mostra delle peculiarità proprie in tutti i pazienti, sebbene con differenze di rilievo tra i diversi pazienti. Il grande numero di sequenze ottenute, circa 250000 globalmente per ogni campione di tessuti/paziente, hanno permesso di svolgere studi genetici quantitativi sulla variabilità generale delle quasispecie e sulla pressione selettiva che modula la loro evoluzione da un lato, dall'altro ha permesso di identificare le diverse varianti virali presenti nei tessuti per valutarne eventualmente il fenotipo e il ruolo biologico associato. L'analisi quantitava ha evidenziato una variabilità significativamente maggiore nel tessuto non tumorale per i segmenti Core e Pre-s, che codificano per proteine strutturali del virus, mentre il quadro è più sfumato per il piccolo segmento Pre-Core che codifica per la parte terminale dell'antigene e. L'analisi della pressione selettiva ha mostrato in alcuni pazienti valori più elevati nel tessuto

non tumorale, in altri l'opposto, impedendo al momento la comprensione di quali differenze nei due ambienti possano condizionare l'evoluzione differenziale delle varianti nei 2 compartimenti istologici. Dal punto di vista delle differenze qualitative (mutazioni) riscontrate nelle varianti dei tumori e dei non tumori, possiamo concludere che quelle del tessuto non tumorale hanno accumulato più mutazioni tra quelle tipicamente associate con il proseguire nel tempo dell'infezione sotto la pressione costante del sistema immunitario. Nel tessuto non tumorale sono presenti con frequenza superiore mutazioni in grado di abrogare la produzione dell'antigene e (inserzioni, delezioni oltre alla classica mutazione 1896, comunque presente nella stragrande maggioranza delle varianti di questi pazienti. Inoltre, nella sequenza del gene Pre-s, allo stesso modo, nel tessuto non tumorale si osservano più numerose le varianti portatrici di "indel" in grado di abrogare l'espressione di alcuni epitopi o dell'intera porzione proteica pres1/2. Al contrario, nella regione codificante per il gene Core, sono state trovate delle varianti con delezioni distruttive della cornice di lettura nel tessuto tumorale. Tali varianti naturalmente non possono supportare la replicazione virale tanto meno la produzione di virioni, quindi forse sono da correlare con la presenza più abbondante nel tumore di sequenze residuali difettive, forse integrate. In conclusione, il quadro della dinamica delle varianti virali che emerge da

questo studio (al momento incompleto, viste le complessità dell'analisi della grande mole di dati prodotta), suggerisce che il virus nel tessuto tumorale abbia avuto una storia evolutiva sicuramente diversa rispetto a quello del tessuto non tumorale, forse più "breve", o più semplice e sia stato meno esposto alla pressione selettiva del sistema immunitario. In futuro sarà quindi utile approfondire ulteriormente questo aspetto per comprendere se questa parziale protezione dall'azione immunitaria sia dovuta a peculiari caratteristiche del tessuto tumorale o semplicemente al fatto che il tessuto tumorale, meno differenziato, sia meno idoneo a supportare la replicazione virale e quindi la sua evoluzione.

Bibliografia

1. Ganem D. Prince A. Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences. N Engl J Med 2004; 350: 1118-1129. DOI: 10,1056/ NEJMra031087
2. Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles Curr Top Microbiol Immunol. 1991;168:61-83. DOI: 10.1007/978-3-642-76015-0_4
3. Patient R., Hourioux C., Sizaret P.Y. et al. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. J Virol 2007; 81: 3842-3851. DOI: 10.1128/JVI.02741-06
4. Cao J[1], Zhang J[2], Lu Y[3]and all. Cryo-EM structure of native spherical subviral particles isolated from HBV carriers Virus Research Volume 259, 2 January 2019, Pages 90-96 DOI: 10.1016/j.virusres.2018.10.015.
5. Sibnarayan D. , Soumya C. , Vijay V. , Molecular Biology Of The Hepatitis B Virus For Clinicians Clin Exp Hepatol . 2012 Dicembre; 2 (4): 353-365. Doi: 10.1016/J.Jceh.2012.10.003

6. Willam F., Carman And Howard C. Thomas. Genetic Variation In Hepatitis B Virus Gastroenterology 1992;102:711-719

7. Chen Bf[1] Hepatitis B Virus Pre-S/S Variants In Liver Diseases World J Gastroenterol. 2018 Apr 14;24(14):1507-1520 Doi: 10.3748/Wjg.V24.I14.1507

8. Locarnini S., McMillan J., Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. Seminars in liver disease 2003; 23(1): 5-20 DOI: 10.1055/s-2003-37587

9. Klinkert M., Theilmann L., Praff E., Schaller H. Pre-S1 Antigens And Antibodies Early In The Course Of Acute Hepatitis B Virus Infection. J Virol 1996; 58: 522-525.

10. Lupberger J[1], Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis World J Gastroenterol . 2007 Jan 7; 13(1): 74–81.
DOI:10.3748/wjg.v13.i1.74

11. Xin Z.,Hui-Guo D. Key role of hepatitis B virus mutation in chronic hepatitis B development to hepatocellular carcinoma World J Hepatol. 2015 May 28; 7(9): 1282–1286.
DOI: 10.4254/wjh.v7.i9.1282

12. Michael A. Purdy Hepatitis B virus S gene escape mutants Asian J Transfus Sci. 2007 Jul-Dec; 1(2): 62–70) DOI: 10.4103/0973-6247.33445

13. Echevarría JM[1], Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity J Med Virol. 2006;78 Suppl 1:S36-42 DOI: 10.1002/jmv.20605

14. Kidd-Ljunggren, K., Miyakawa, Y., & Kidd, A. H. (2002). Genetic variability in hepatitis B viruses. Journal of General Virology, 83(6), 1267–1280. DOI: 10.1099/0022-1317-83-6-1267

15. Maria Homs,[1,2] Maria Buti,[1,3] Josep Quer,[1] Ultra-Deep Pyrosequencing Analysis Of The Hepatitis B Virus Pre-Core Region And Main Catalytic Motif Of The Viral Polymerase In The Same Viral Genome Nucleic Acids Res. 2011 Oct; 39(19): 8457–8471 Doi: 10.1093/Nar/Gkr451

16. Hong K., Seoung-Ae L., Seung Yeon D., And Bum-Joon K. Pre-Core/Core Region Mutations Of Hepatitis B Virus Related To Clinical Severity World J.Gastroenterol. 2016 May 7; 22(17): 4287–4296. Doi: 10.3748/Wjg.V22.I17.4287

17. Nguyen Mh, Keeffe Eb. Are Hepatitis B E Antigen (Hbeag)-Positive Chronic Hepatitis B And Hbeag-Negative Chronic

Hepatitis B Distinct Diseases? Clin Infect Dis. 2008;47:1312–1314 Doi: 10.1086/592571

18. R. Jason L , [1, 2] Sumedha B. , [1] E Michael J. B [1]hepatitis B Virus Molecular Biology And Pathogenesis Hepatoma Res 2016;2:163-86. Doi: 10.20517/2394-5079.2016.05

19. Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E et al. Dating the Origin and Dispersal of Hepatitis B Virus Infection in Humans and Primates Hepatology. 2013; 57 :908916. DOI: 10.1101/cshperspect. a021360

20. Yokosuka O[1], Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. Med Mol Morphol. 2006 Sep;39(3):113-20. DOI:10.1007/s00795-006-0328-5

21. Shuaichen Liu , [1, 2] Samantha SY Koh , [3] e Caroline GL Lee [1, 3, 4, 5,] Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis Int J Mol Sci. 2016 Jun; 17(6): 940. DOI: 10.3390/ijms17060940

22. Xiao-Dong Z , [1] Yuan W , [1] e Li-Hong Y. [2] Hepatitis B virus X protein accelerates the development of hepatoma Cancer Biol Med. 2014 Sep; 11(3): 182–190.
DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.03.004

23. Thomas Tu,[1,*] Magdalena A. Budzinska,[2,3] Nicholas A. Shackel,[2,3,4] and Stephan Urban[1,5] HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications Viruses. 2017 Apr; 9(4): 75. DOI: 10.3390/v9040075

24. Prange R. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress.Med Microbiol Immunol. 2012; 201 :449–461. DOI:10.1007/s00430-012-0267-9

25. Shuping Tong [1, 2] and Peter Revill Overview of viral replication and genetic variability J Hepatol. 2016 Apr; 64(1 Suppl): S4–S16. DOI:10.1016/j.jhep.2016.01.027

26. Ning X, Nguyen D, Mentzer L, Adams C, Lee H, Ashley R, et al. Secretion of genome-free hepatitis B virus--single strand blocking model for virion morphogenesis of pararetrovirus. PLoS Pathog. 2011; 7 :e1002255. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002255

27. Lok, A.S., Heathcote, E.J., and Hoofnagle, J.H. Management of hepatitis B: 2000-Summary . Gastroenterology. 2001; 120: 1828–1853. DOI:10.1053/gast.2001.24839

28. Takako I. [1] and Yasuhito T. [1, 2, *] Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update Microb Cell . 2016 Sep 5; 3(9): 420–437. DOI: 10.15698/mic2016.09.527

29. Eliminating the Public Health Problem of Hepatitis B and C in the United National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Belongia et al., 2008; Heymann, 2014; Sako et al., 2011.

30. Robert P. Myers, Vlad Ratziu, Yves Benhamou et al Infections with Multiple Hepatotropic Viruses Polymicrobial Diseases Brogden KA, Guthmiller JM, editors.Washington (DC): ASM Press; 2002

31. John H.-O. Pettersson Molecular epidemiology of hepatitis B virus infection in Norway BMC Infectious Diseases 2019 19 :236 DOI:10.1186/s12879-019-3868-8

32. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM et al Chronic hepatitis B virus infection. Lancet. 2018;392:2313–24. DOI:10.1016/S0140-6736(18)31865-8

33. Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2018;3:383–403 DOI:10.1016/S2468-1253(18)30056-6

34. Lara C. da Cunha Guimarães, Brunini S. Epidemiology of hepatitis B virus infection in people living in poverty in the central-west region of Brazil BMC Public Health 201919:443 DOI:10.1186/s12889-019-6828-8

35. Qi Z. 1 , Guangwen C. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma Hepat Mon. 2011;11(2):86-91

36. Kostaki E., Karamitros T., Garyfallia S., et al. The history of hepatitis B virus genotypes A and D infection using a full-genome phylogenetic and phylogeographic approach Kostaki et al. eLife 2018;7:e36709

37. Francis V. Chisari , Masanori Isogawa e Stefan F. Wieland Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection 2010 Aug; 58(4): 258–266. DOI:10.1016/j.patbio.2009.11.001

38. Don Ganem, M.D., and Alfred M. Prince, M.DHepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences N Engl J Med 2004;350:1118-29 DOI:10.1056/NEJMra031087

39. Zhao-chun Chi, Quan-jiang Dong and Chang-xin Geng The Pathogenesis of Acute on Chronic Hepatitis B Liver Failure Infection International (Electronic Edition) Vol.3, No.1, 2014 DOI: 10.1515/ii-2017-0070

40. George V. Papatheodoridis, Henry Lik-Yuen Chan, Bettina E. Hansen et al. Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis

B: Assessment and modification with current antiviral therapy J Hepatol. 2015Apr;62(4):956-67 DOI: 10.1016/j.jhep.2015.01.002

41. Shouval D. Is universal vaccination against hepatitis B sufficient for control of HBV infection? Lessons from the immunization campaign in Italy. J Hepatol 2000; 33(6): 1009-1011.
42. Do Young Kim Kwang-Hyub Han Epidemiology and Surveillance of Hepatocellular Carcinoma Liver Cancer 2012; 1:2–14
43. An Tang, Oussama Hallouch,Victoria Chernyak et al Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis Abdom Radiol (2017)
44. Chiesa R. et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000
45. Jacques Belghiti and Reza Kianmanesh Surgical treatment of hepatocellular carcinoma HPB (Oxford). 2005; 7(1): 42–49 DOI: 10.1080/13651820410024067
46. Ding D[1] , Lou X,Hua D et al Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. PLoS Genet. 2012;8(12):e1003065 DOI: 10.1371/journal.pgen.1003065
47. Sung, W.-K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y.,Luk, J. M. (2012). Genome-wide survey of recurrent HBV integration in

hepatocellular Nat Genet. 2012 May 27;44(7):765-9. DOI: 10.1038/ng.2295. Amaddeo G[1], Cao Q[1], Ladeiro Y[1], Imbeaud S[1], et al.Integration of tumour and viral genomic characterizations in HBV-related hepatocellular carcinomas Gut. 2015 May;64(5):82 carcinoma. Nature Genetics, 44(7), 765–769. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306228

49. Tu T. Budzinska M , Shackel N.,Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications Viruses . 2017 Apr; 9(4): 75.
50. Daud M[1], Rana MA[2], Husnain T[1]et al. Modulation of Wnt signaling pathway by hepatitis B virus Arch Virol. 2017 Oct;162(10):2937-2947
51. Daud M[1], Rana MA[2] et al. Modulation of Wnt signaling pathway by hepatitis B virus Arch Virol. 2017 Oct;162(10):2937-2947
52. Shaoli Lin ID and Yan-Jin Zhang ID Interference of Apoptosis by Hepatitis B Virus Viruses 2017, 9, 230
53. Belloni L1, Pollicino T, De Nicola F et al Nuclear HBX binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of CCCDNA fuction Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 24;106(47):19975-9

54. Gao Y 1, Feng J 1, Yang G 1 et al Hepatitis B virus The high protein protein MSL2 of X protein modulates the covalently closed circular DNA of the hepatitis B virus inducing APOBEC3B degradation to potentiate the hepatocarcinogenesis. Hepatology. 2017 Nov; 66 (5): 1413-1429.

55. Nishida N, Goel A. Genetic and Epigenetic Signatures in Human Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. Current Genomics 2011;12:130-137

56. María Mercedes Elizalde et all. HBV subgenotypes F1b and F4 replication induces an incomplete autophagic process in hepatocytes: Role of BCP and Pre-Core mutations PLoS One . 2018; 13(5): e0197109

57. Fangfang Wei , MD, [a] Qiaolan Zheng , MD, [b] Maoyin Li , MD, [c] and Maosheng Wu , MD [a,] The association between hepatitis B mutants and hepatocellular carcinomaMedicine (Baltimore) . 2017 May; 96(19): e6835 Yuehua Huang , [1] Andrew W. Tai , [1, 3] Shuping Tong , [2] and Anna SF Lok [1] HBV Core promoter mutations promote cellular proliferation through E2F1-mediated upregulation of S-phase kinase associated protein 2 transcriptionJ Hepatol. 2013 Jun; 58(6): 1068–1073.

59. Pok Yeung , Danny Ka-Ho Wong , Ching-Lung Lai et al Association of Hepatitis B Virus Pre-S Deletions with the Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis BJ Infect Di s . 2011 Mar 1; 203(5): 646–654

60. Di Carlo D[1], Saccomandi P[1], Mirabelli C[1,4], et all Novel HBsAg mutations correlate with hepatocellular carcinoma, hamper HBsAg secretion and promote cell proliferation in vitro Oncotarget. 2017 Feb 28;8(9):15704-15715

61. Yen TT[1], Yang A[1], Chiu WT[2,3] et al. Hepatitis B virus PreS2-mutant large surface antigen activates store-operated calcium entry and promotes chromosome instabilityOncotarget . 2016 Apr 26; 7(17): 23346–23360

62. Zhang AY[1], Lai CL[1,2], Poon RT[2,3], Huang FY[1] et al . Hepatitis B virus full-length genomic mutations and quasispecies in hepatocellular carcinoma J Gastroenterol Hepatol. 2016 Sep;31(9):1638-45

Sitografia

https://www.epicentro.iss.it/epatite/epidemiologia-mondo

https://www.registritumori.it/cms/pubblicazioni/i-numeri-del-cancro- italia-2018)

https://www.epatiteb.com/patologia/infezione-acuta-cronica

http://www.simit.org/IT/formazione/linee-guida.xhtml