



A.I.S.F.

ASSOCIAZIONE ITALIANA PER LO STUDIO DEL FEGATO

**LE MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE
DEL VIRUS DELL'EPATITE C:
INQUADRAMENTO E GESTIONE CLINICA**

A cura della Commissione

**“Manifestazioni Extraepatiche del Virus dell'Epatite C”
dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (A.I.S.F.)**

Finito di stampare Settembre 2003



INDICE

1 - Introduzione.....	5
2 - Il virus dell'epatite C.....	7
3 - Infezione da HCV ed autoreattività anticorpale.....	13
4 - Infezione da HCV e crioglobulinemia mista.....	15
5 - Infezione da HCV e linfoma.....	25
6 - HCV e patologia renale.....	29
7 - Altri disordini extraepatici.....	35
8 - Gestione clinica delle manifestazioni extraepatiche dell'HCV: suggerimenti comportamentali.....	42
9 - Riferimenti bibliografici.....	45



1 - INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite C (HCV) è responsabile sia di danno epatico che extraepatico (manifestazioni extraepatiche dell'HCV= MEE-HCV).

La varietà di patologie extraepatiche potenzialmente associate con l'HCV ha indotto a coniare il termine "malattia da HCV", intendendosi con ciò che tale infezione deve essere interpretata come malattia sistemica, di ampia competenza internistica, piuttosto che come malattia di stretta competenza epatologica (1).

Secondo un recente studio, sarebbe possibile riscontrare almeno una manifestazione extraepatica nel 74% dei pazienti con infezione da HCV (2). Per alcune delle manifestazioni extraepatiche da HCV l'associazione è stretta, per altre è fortemente sospetta, anche se non definitivamente confermata, per altre ancora solo suggestiva.

Nella tavola 1 le MEE-HCV sono suddivise in 4 principali categorie. Di queste la prima (A) comprende manifestazioni la cui associazione con l'infezione è molto stretta, in quanto circostanziata non solo da evidenze epidemiologiche, ma anche da dati di tipo patogenetico. La seconda categoria (B) comprende patologie la cui associazione, significativa dal punto di vista epidemiologico, è oggi dimostrata da una mole sufficientemente ampia di dati. La terza categoria (C) comprende invece associazioni che, nonostante abbiano a loro supporto vari studi, necessitano ancora di conferme e/o di una più dettagliata caratterizzazione rispetto a simili forme idiopatiche o a diversa etiologia riconosciuta. Infine, la quarta categoria (D) comprende osservazioni per il momento solo aneddotiche. Particolare interesse suscita lo studio dei disordini linfoproliferativi (DLP) HCV-correlati ed in modo particolare della crioglobulinemia mista (CM), la quale è in assoluto la patologia extraepatica più strettamente connessa con l'infezione ed è allo stesso tempo un disordine anche autoimmune, rappresentando un modello di studio unico nel suo genere.

Tavola 1: Elenco delle manifestazioni extraepatiche dimostrate o suggerite associate all'infezione da HCV:

A: associazione definita sulla base di due fattori= 1) forte prevalenza; 2) patogenesi.

Crioglobulinemia mista (sindrome clinica completa o incompleta)

B: prevalenze significativamente più elevate rispetto ai controlli

Linfomi non-Hodking a cellule B

Gammopatie monoclonali

Porfiria cutanea tarda

Lichen planus

C: situazioni in attesa di conferma/caratterizzazione

Tireopatie autoimmuni

Carcinoma della tiroide

Sindrome secca

Alveolite-Fibrosi polmonare

Diabete mellito

Nefropatie non crioglobulinemiche

D: osservazioni aneddotiche

Psoriasi

Neuropatie periferiche e centrali non crioglobulinemiche

Poliarterite cronica

Artrite reumatoide

Poliarterite nodosa

M. di Bechet

Poli/dermatomiosite

Fibromialgia

Orticaria cronica

Prurito cronico

Pseudo-sarcoma di Kaposi

Eritema necrotico migrante

Vitiligo

Cardiopatie e miocarditi

Ulcere corneali di Mooren

Disfunzioni erettili

2 - IL VIRUS DELL'EPATITE C (HCV)

MORFOLOGIA

L'HCV è un piccolo virus che è stato classificato come unico membro di un genere distinto chiamato Hepacivirus appartenente alla famiglia dei Flaviviridae. Questi virus hanno in comune una piccola particella sferica, provvista di envelope esterno con proiezioni di superficie ed un nucleocapside. Nel caso del virus C le dimensioni della particella sono di circa 50 nm. L'HCV è costituito da quattro proteine strutturali: due glicoproteine E1 ed E2, che si presume formino insieme un complesso a livello dell'envelope, un piccolo polipeptide p7 dalla funzione ignota; la proteina Core del nucleocapside.

STRUTTURA DEL GENOMA

Il genoma dell'HCV è costituito da un singolo filamento di RNA (ssRNA) a polarità positiva, di lunghezza pari a circa 9600 nucleotidi; in un quarto del genoma all'estremità 5' sono codificate le proteine strutturali ed il resto codifica per le proteine non strutturali. Complessivamente, il genoma virale consiste di una regione 5' non tradotta (5'NTR), un lungo ORF codificante una proteina policistronica che viene successivamente processata in una serie di prodotti distinti, ed una regione 3' non tradotta (3' NTR). L'inizio della trascrizione dell'ORF dell'HCV non richiede una struttura cap all'estremità 5', ma è diretto dal segmento di RNA di 341 nucleotidi che si trova nella 5'NTR. Questa regione funziona come sito interno d'entrata dei ribosomi (IRES) e permette il legame diretto dei ribosomi in prossimità del codone d'inizio dell'ORF (3). La regione 3' non tradotta (3' NTR) ha una struttura tripartita composta da una sequenza variabile di circa 40 nucleotidi a valle del codone di stop dell'ORF, un tratto interno di poliU di lunghezza eterogenea ed una sequenza altamente conservata di 98 nucleotidi essenziale per la replicazione in vivo, in particolare per l'inizio della sintesi del filamento negativo (4).

La proteina policistronica dell'HCV viene processata co- e post-trascrizionalmente in dieci prodotti differenti. La regione C-NS2 è processata da peptidasi dell'ospite, che clivano a livello delle giunzioni C/E1, E1/E2, E2/p7, p7/NS2. La produzione di un intermedio di processamento come la proteina E2-p7-NS2, indica che non tutti i clivaggi all'interno della regione strutturale avvengono co-trascrizionalmente. Per di più, un secondo processamento post-trascrizionale chiude la regione carbossi terminale della proteina core, rimuovendo la sequenza segnale per E1 tramite l'enzima cellulare signal peptidasi. Il processamento tra NS2 e NS3 è una rapida reazione intramolecolare ed è compiuta dalla NS2-3 proteasi. Il processamento della regione NS3-5B è mediata dalla proteasi NS3, che però non segue un ordine preciso di clivaggio: NS3/4A, NS5A/B, NS4A/B, NS4B/5A. Il processamento al sito NS3/4A consiste in una reazione intramolecolare co-trascrizionale, mentre il clivaggio degli altri siti può essere mediato intermolecolarmente. Il primo processamento della poliproteina produce la proteina Core (5). Tale proteina forma il nucleocapside ma sembra svolgere anche altre funzioni come la modulazione di parecchi processi cellulari in cellule di origine epatocitaria e fibroblastica (6, 7), ma non in cellule di linee B linfocitarie (8). Un secondo clivaggio produce le proteine dell'envelope E1 ed E2. Tali proteine sono considerate proteine transmembrana di tipo I glicosilate, con un ectodominio al NH₂-terminale e una regione idrofobica d'ancoraggio al COOH-terminale. E2 interagisce con E1 per formare due tipi di complessi: un eterodimero E1E2 stabilizzato da legami non covalenti, che rappresenta il prebudding complex e aggregati eterogenei con ponti disolfuro, che corrispondono a complessi misfolding (9). La terza proteina che subisce un processamento proteolitico è un piccolo polipeptide conosciuto come p7. La proteina p7 è localizzata

nella regione carbossi-terminale di E2 ed è un polipeptide altamente idrofobico con funzione sconosciuta.

La maggior parte delle proteine non strutturali (NS2-5B) sono richieste per la replicazione dell'RNA virale (10). NS2 e NS3 costituiscono il complesso NS2-3 proteinasico, che catalizza il clivaggio al sito NS2-3 (11, 12). NS3 è una molecola che ha una duplice funzione, poiché gli ultimi 180 nucleotidi della sua regione amino-terminale producono una serina-proteasi, che è responsabile del processamento a livello dei siti NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A e NS5A/B, mentre la rimanente regione carbossi-terminale ha attività di NTPasi/elicasasi, essenziale per la trascrizione e la replicazione del genoma di HCV (11, 13). NS3 sembra avere anche proprietà che la coinvolgono nell'interferenza con delle funzioni della cellula ospite, come ad esempio l'inibizione della proteina chinasi A, che modula il segnale di traduzione o di trasformazione cellulare (14, 15). NS4A è un co-fattore essenziale per la proteasi NS3 ed è inoltre necessaria per l'efficienza del processamento della proteina policistronica virale (13, 16, 17). La funzione della proteina idrofobica NS4B è ancora sconosciuta. NS5A è una proteina altamente fosforilata dove, almeno in alcuni isolati HCV, il livello di fosforilazione è influenzato dall'interazione diretta con NS4A oppure richiede l'espressione di NS5A nel contesto di una NS3-5A poliproteina (18, 19). Se la NS5A abbia un ruolo nella replicazione non è stato ancora scoperto, ma analogie con altri virus ad RNA, dove le fosfoproteine sono importanti regolatori della replicazione, farebbero assumere che NS5A giochi un ruolo simile nell'HCV. NS5B è stata identificata nel ruolo di RNAPolimerasi-RNA dipendente (RdRp) (20, 21).

A causa della mancanza di un comodo modello animale ed un efficiente sistema di coltura cellulare, la comprensione del meccanismo molecolare di replicazione dell'HCV è basato principalmente su analogie con i Flavivirus e Pestivirus e sulla caratterizzazione di proteine ricombinanti dell'HCV.

LA REPLICAZIONE DELL'RNA

Il ciclo di replicazione dell'HCV può essere riassunto come segue:

- Penetrazione nella cellula ospite e liberazione del RNA genomico dalla particella virale nel citoplasma.
- Trascrizione del RNA
- Processamento della poliproteina
- Formazione di un complesso replicasi associato con le membrane intracellulari.
- Utilizzo del filamento positivo di RNA per la sintesi di un filamento negativo, detto intermedio di replicazione.
- Produzione delle nuove molecole ad RNA positivo, che a turno possono essere usate per la sintesi di nuovi filamenti negativi, per l'espressione della poliproteina o per l'impacchettamento all'interno della progenie virale.
- Rilascio del virus dalla cellula infetta.

Molti o tutti i prodotti generati dal clivaggio della poliproteina dell'HCV, in particolare NS3-5B, formano un complesso di replicasi associato con le membrane intracellulari, che contiene anche proteine cellulari (12, 22). La formazione di un complesso di questo genere permette la produzione delle proteine virali ed RNA in compartimenti distinti (23, 24).

I passaggi fondamentali della replicazione sono poco chiari, ma è ovvio che NS5B RdRp giochi un ruolo fondamentale nella catalizzazione della sintesi del filamento negativo e positivo dell'RNA (20, 25). Mentre in vitro NS5B è capace di copiare un genoma completo del virus, è probabile che in vivo siano richiesti fattori addizionali virali o cellulari. I possibili candidati virali sono l'elicasasi NS3, che agirebbe rilassando le strutture stabili dell'RNA stampo e facilitando la replicazione oppure la fosfo-



proteina NS5A, per la quale si sospetta un coinvolgimento nella regolazione della replicazione dell'RNA.

Oltre alle proteine virali, alcuni componenti cellulari sono coinvolti nella sintesi dell'RNA. Il primo candidato è PTB, che interagisce specificatamente con la sequenza all'estremità 3'NTR (26). Un altro candidato è la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, che si lega alla sequenza di poli(U) in 3'NTR (27). Inoltre sono state identificate altre due proteine cellulari provvisoriamente chiamate, p87 e p130, che potrebbero essere implicate nella sintesi di RNA virale, ma la natura di queste rimane ancora sconosciuta.

ATTACCO ED ENTRATA

Recentemente la proteina di superficie cellulare CD81 è stato suggerito rappresentare il recettore putativo per l'HCV. Ciò sulla scorta dell'osservazione della sua forte interazione con la glicoproteina E2 in vitro (28). Inoltre, una preincubazione di plasma contenente l'HCV usato per studi di legame con sieri di chimpanzee, che sono protetti da HCV attraverso una vaccinazione con ricombinanti E1 ed E2, blocca in vitro il legame di HCV con CD81 (28). Peraltro, la possibilità che la proteina CD-81 possa servire come porta di ingresso del virus nella cellula è stata successivamente messa in discussione (29, 30). Inoltre, sono stati suggeriti anche altri recettori cellulari per l'HCV, quali il recettore per le LDL (Low-density lipoprotein) (31) ed è stato suggerito che il virus possa utilizzare recettori diversi per l'ingresso negli epatociti e nelle cellule mononucleate del sangue (32).

Mentre il meccanismo di entrata dell'HCV nella cellula ospite rimane attualmente sconosciuto, è quasi certo invece che la glicoproteina virale dell'envelope E2 sia responsabile dell'attacco del virus alla cellula ospite (33-35). Il ruolo dell'E1 è meno chiaro, ma la presenza di un dominio di aminoacidi idrofobici, chiamato provvisoriamente peptide E1 di fusione, mostra somiglianze con i peptidi di fusione dei paramixovirus e dei flavivirus, suggerendo così che E1 sia implicato nella fusione di membrana (36).

ASSEMBLAGGIO E RILASCIO

In assenza di un sistema che permetta la produzione di un notevole quantitativo biochimico di particelle virali, l'assemblaggio dell'HCV non può essere studiato in dettaglio.

Un primo potenziale approccio per superare questa limitazione è la produzione di particelle "virus-like" (VLPs) attraverso l'espressione delle proteine strutturali in sistemi eterologhi. (37, 38). Sebbene questi sistemi modello siano promettenti, l'efficienza della formazione di VLPs sarebbe ancora piuttosto bassa, poiché la maggior parte delle proteine virali forma aggregati e solo una minoranza si assembla per produrre VLPs. Per di più, queste particelle risiedono nelle vescicole delle membrane intracellulari e non sono trasportate fuori dalla cellula.

La formazione della particella virale potrebbe iniziare dall'interazione della proteina core con l'RNA genomico. Sebbene in vitro la proteina core si leghi all'RNA senza particolare specificità, studi recenti hanno indicato un legame preferenziale intracellulare a metà della sequenza 5' del genoma dell'HCV (38). Tale legame potrebbe, non solo completare un impacchettamento selettivo dei genomi a filamento positivo, ma anche reprimere la trascrizione dell'IRES, suggerendo così un potenziale meccanismo per il passaggio dalla trascrizione/replicazione all'assemblaggio (38). Se la proteina core formi un distinto nucleocapside o piuttosto un complesso ribonucleoproteina con l'RNA genomico è del tutto sconosciuto. Certamente essa interagisce con se stessa e le sequenze richieste per questa interazione sono state mappate a livello del residuo amino-terminale 115 (39).

Una caratteristica tipica delle proteine envelope dell'HCV, E1 ed E2, è la loro ritenzione nel reticolo endoplasmatico ER (40). La ritenzione si verifica per mezzo di segnali nei domini transmembra-

na di E1 ed E2, ciò che suggerisce che i nucleocapsidi virali acquisiscano i loro envelope dalla gemmazione attraverso le membrane del reticolo. In questo caso il virus potrebbe essere esportato attraverso la via secretoria costitutiva. In accordo con questa teoria, sono stati trovati complessi "N-linked glycos" sulla superficie di particelle virali parzialmente purificate, ipotizzando che il virus passi attraverso l'apparato del Golgi (41).

SISTEMI MODELLO PER LO STUDIO DELLA REPLICAZIONE VIRALE

Infezione di Colture cellulari con HCV

Negli ultimi anni sono stati descritti parecchi sistemi di coltura cellulare per la propagazione del virus C, basati sia sull'infezione di colture cellulari primarie o di linee cellulari che sulla coltura di cellule primarie da pazienti infetti cronicamente da HCV. Questi sistemi, però, sono scarsamente riproducibili e i bassi livelli di replicazione dell'HCV possono essere misurati solo con tecniche altamente sensibili. In molti casi il filamento negativo, chiamato intermedio di replicazione (IR), che si forma nella replicazione produttiva, viene misurato per mezzo di una RT-PCR filamento-specifica. In aggiunta alla rilevazione di RNA a filamento negativo sono stati usati parecchi altri indicatori come: la rilevazione di un aumento dei filamenti di RNA positivi durante il periodo di coltura, determinato da saggi b-DNA o da RT-PCR quantitativa; l'inibizione della replicazione incubando le cellule con IFN- α o oligonucleotidi antisense; l'analisi di sequenza dei genomi HCV o frammenti di genoma per dimostrare la variabilità genomica e la selezione di varianti nell'infezione e in coltura; il rilevamento di antigeni virali per mezzo dell'immunofluorescenza o della citofluorimetria.

L'infezione degli epatociti primari nell'uomo o nello chimpanzee con sieri ad alto titolo di HCV è stata descritta da parecchi gruppi di ricerca (42-44). Risulta possibile anche l'infezione di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC), indicando che l'HCV può replicare anche in cellule extraepatiche (45, 46). Secondo vari studi l'HCV potrebbe infettare preferenzialmente cellule della linea B (47-49). È stato suggerito che il virus C possa infettare anche altri tipi cellulari. Il linfotropismo del virus è stato molto indagato sia in vivo che in vitro o nell'animale da esperimento (vedi anche oltre), i dati indicanti la capacità dell'HCV di infettare altri tipi di cellule sono ancora limitati.

Dal momento che non sono disponibili in maniera ordinaria colture cellulari primarie, la maggior parte dei tentativi per mantenere la replicazione virale in coltura sono stati intrapresi con l'ausilio di linee cellulari di origine umana. Per quanto riguarda le linee epatiche, sono stati ottenuti risultati con la linea cellulare non neoplastica PH5CH (50). La conferma della presenza di replicazione di HCV in queste cellule è basata sul rilevamento di HCV RNA oltre i 100 giorni dopo l'infezione, grazie a tecniche di RT-PCR, sulla perdita di filamenti positivi di RNA durante l'incubazione con IFN- α delle cellule infettate e sulla forte selezione per le varianti HCV nella regione ipervariabile 1 (HVR1) della proteina E2. Questi risultati farebbero pensare che solo certe varianti possano legarsi a queste cellule o replicarsi in esse. Come già accennato, sebbene gli epatociti siano ritenuti il bersaglio naturale per l'infezione, la replicazione e la moltiplicazione del virus C, studi recenti confermerebbero che parecchie linee cellulari di linfociti umani siano suscettibili all'infezione e quindi utilizzabili come sistemi di coltura in vitro e in vivo. Tra queste sono state selezionate cellule T e B con alti livelli di replicazione HCV derivate da linee cellulari T, MT-2 e MOLT-4, HPB-Ma e da linee cellulari B Daudi. Per esempio è stato osservato, attraverso un'analisi di RT-PCR, che un clone cellulare MT-2 può mantenere la replicazione di HCV per più di 198 giorni dopo l'infezione (51). Dopo aver comparato la sequenza completa del genoma HCV in replicazione in queste cellule con le sequenze presenti nell'inoculo, è stato scoperto che solo una limitata popolazione virale replica in cellule MT-2



(52). Questo fa ipotizzare che ci sia una selezione di certe varianti particolarmente adatte a queste cellule. Una propagazione a lungo termine dell'HCV per oltre un anno dopo l'inoculo è stata vista in linee cellulari umane T e B, HPB-Ma 10-2 e Daudi (53), e in questo caso il virus può essere trasmesso alle cellule figlie per co-coltivazione (54). HPB-Ma è una linea cellulare di linfociti T umani infettata da un retrovirus di topo. I livelli intracellulari di HCV RNA nella linea cellulare non infettata con retrovirus murino sono considerevolmente bassi rispetto alla buona efficienza di replicazione osservata nelle cellule infettate dal retrovirus. Non è ancora chiaro come il retrovirus possa favorire l'efficienza di replicazione dell'HCV.

Per dimostrare l'infettività di cellule in coltura cresciute con HCV in un animale (55) è stato inoculato uno chimpanzee con circa 10^3 equivalenti genomici presenti nel supernatante di cellule Daudi in coltura, che erano state precedentemente infettate con HCV per 58 giorni. Dopo circa 5 settimane si è incominciato a rilevare HCV RNA nel siero di questi animali. La sequenza HVR1 presente in maggioranza nel siero degli animali corrispondeva alla variante predominante nel siero dei pazienti usato per l'infezione delle cellule Daudi. Nelle PBMC di chimpanzee la maggiore variante corrispondeva alla variante dominante trovata nelle cellule Daudi, ma questa variante non è stata trovata nel siero dei pazienti utilizzati per l'inoculo. Tutti questi risultati suggerirebbero che ci sia una selezione di varianti linfotropiche di HCV durante il passaggio in cellule in coltura.

3 - INFEZIONE DA HCV ED AUTOREATTIVITÀ ANTICORPALE

La letteratura nazionale ed internazionale riporta la comparsa di autoanticorpi non organo-specifici sierici con una prevalenza che si aggira intorno al 20-40% dei casi di infezione cronica da HCV. La prevalenza del sesso femminile e i valori di ALT sono significativamente più elevati nei soggetti con autoreattività anticorpale. In termini di specificità del target antigenico gli autoanticorpi HCV-correlati presentano differenze soltanto quantitative rispetto agli autoanticorpi che si associano all'epatite autoimmune "primaria" (titolo e prevalenza di ANA "diffuso", di SMA anti microfilamenti e di anti-LKM1 diretto contro i residui aminoacidici 257-279 del CYP 2D6 significativamente più bassi nei casi HCV-correlati) (56). Non esistono dati certi che associno la presenza di crioglobuline sieriche alla positività di autoanticorpi.

Da un punto di vista patogenetico, è stata prodotta evidenza sperimentale che i linfociti B dei pazienti con infezione da HCV sono stimolati e producono immunoglobuline attraverso l'interazione di varie molecole linfocitarie e virali (28). Sulla base di questi dati è comprensibile l'attivazione policlonale B, con produzione di autoanticorpi diretti contro autoepitopi tessutali ed immunoglobulinici (come si verifica in caso di crioglobulinemia di tipo III, HCV-correlata); rimane da interpretare la comparsa di autoanticorpi monoclonali (come nella crioglobulinemia di tipo II e nei casi di comparsa di IgG ed IgM sieriche monoclonali).

GESTIONE CLINICA: SUGGERIMENTI COMPORTAMENTALI

Si riferiscono essenzialmente alla decisione terapeutica. I potenziali problemi sono ovviamente legati all'uso dell'IFN. Sono riportati in letteratura gli effetti deleteri della somministrazione di IFN a soggetti con epatite autoimmune. Sono stati altresì occasionalmente osservati picchi importanti di transaminasi, peraltro transitori, corretti dalla somministrazione di steroidi e non associati a deterioramento della funzione epatica, in soggetti HCV/anti-LKM1 positivi trattati con IFN (57, 58). In termini operativi, la ricerca di autoanticorpi sierici è da riservare ai casi in cui si decida che il paziente debba essere trattato con IFN. Unica eccezione può essere rappresentata dai casi in cui la clinica (sesso femminile, giovane età) e l'elevata attività biochimica (transaminasi, γ globuline) ed istologica (epatite dell'interfaccia) della malattia pongano il sospetto di epatite autoimmune con sovrapposta infezione da HCV. L'indicazione al trattamento iniziale con steroidi è data da alcuni autori sulla base del riscontro di un elevato titolo anticorpale ($\geq 1:320$), elevati livelli di γ globuline, riscontro di anti-LKM1 anti-CYP 2D6 257-279 e di epatite dell'interfaccia con numerose plasmacellule (59). Un'alternativa decisionale è rappresentata dal calcolo dello score cumulativo dell'epatite autoimmune: in caso di raggiungimento della soglia indicativa di epatite autoimmune probabile o definita (come si verifica nel 10% circa dei casi con epatite cronica HCV-correlata ed autoreattività) si suggerisce di iniziare con steroidi (60). In caso di trattamento iniziale con IFN si suggerisce infine uno stretto monitoraggio delle transaminasi, in particolare nei casi anti-LKM1 positivi.



4 - INFEZIONE DA HCV E CRIOGLOBULINEMIA MISTA (CM)

La CM è la manifestazione extraepatica da HCV più documentata ed accertata (61-63).

Si tratta di una malattia da immunocomplessi circolanti, la cui produzione è secondaria ad un processo linfoproliferativo B-cellulare. La definizione di crioglobulinemia è basata su un dato di laboratorio: la presenza nel siero di una o più immunoglobuline (Ig) caratterizzate dal fatto di precipitare a temperature al di sotto dei 37°C e di redissolversi dopo il riscaldamento del siero.

La crioglobulinemia può essere distinta in tre sottogruppi secondo la classificazione di Brouet et al. (64): tipo I, composto da una Ig monoclonale, tipo II e III (CMII e CMIII), caratterizzati da IgG policlonali ed IgM ad attività di fattore reumatoide, rispettivamente monoclonali e policlonali.

La crioglobulinemia di tipo I si trova tipicamente in pazienti con malignità ematologiche.

La CM di tipo II o III può essere associata a malattie infettive, neoplastiche o sistemiche varie, ovvero può trovarsi al di fuori di tali condizioni, configurando la cosiddetta CM essenziale (CME). Dopo la scoperta della connessione epidemiologica strettissima fra CME ed infezione da HCV, tale termine ha perso il suo significato. L'esistenza di tale connessione è emersa in modo molto chiaro da studi sia sierologici che molecolari. Fra questi la determinazione nei pazienti con CM di:

- prevalenze estremamente elevate di marcatori HCV (anti-HCV e/o sequenze HCV) con valori associativi che, a seconda delle casistiche, variano da 43% a più del 90%; un'associazione con l'infezione cronica da HBV sarebbe invece rintracciabile in solo il 5% circa dei casi (61, 63);

- concentrazione di anticorpi anti-HCV e/o sequenze HCVRNA nei crioprecipitati, ovvero nel siero completo rispetto al sopranatante ottenuto dopo crioprecipitazione (65).

Studi effettuati in popolazioni non selezionate di pazienti con epatite cronica di tipo C, riportano un'alta percentuale di pazienti con crioglobuline (CG) nel siero (dal 19% a più del 50% in studi differenti) (66, 67). Le CG sono di solito a bassi livelli e, nella maggior parte dei casi i sintomi sono assenti o molto limitati (66, 68). Di fatto, nella maggior parte dei casi la determinazione nel siero di crioglobuline non avrebbe un particolare significato clinico. Solo una minore proporzione di soggetti HCV-positivi avrebbe una CM clinicamente franca ovvero CG associate a sintomi propri della sindrome crioglobulinemica (dal 10-15 al 30% dei soggetti con crioglobulinemia, a seconda delle casistiche e nel 5% del totale dei pazienti con infezione da HCV). Comunque, queste percentuali sono solo indicative in quanto non confermate su casistiche sufficientemente ampie.

Fra i sintomi i più comuni troviamo: stanchezza, artralgie e porpora. I casi più gravi sono associati con un'importante compromissione dei reni e dei nervi periferici e centrali. Della compromissione renale sarà detto più diffusamente oltre. Per quanto concerne le neuropatie periferiche, queste sono una complicanza frequente delle crioglobulinemie miste con un'incidenza che varia dal 7 fino all'80-90% (69). Si tratta di neuropatie miste, prevalentemente sensitive, assonali, che possono manifestarsi come neuropatie distali simmetriche, mononeuriti multiple, o mononeuropatie. I dati anatomo-patologici evidenziano danno assonale con infiltrati vasculitici epineurali e microangiopatia endoneurale.

E' stato molto discusso a proposito dell'associazione, supposta causale, fra CM ed epatopatia avanzata. Osservazioni quali la rarità con cui la CM è osservabile in pazienti con epatopatie severe non correlate al virus C o la frequenza con cui una CM si osserva in soggetti senza evidenza di danno epatico (dal 25 ad oltre il 50% dei casi secondo taluni studi) fanno oggi ritenere che tale associazione non sia valida (13, 15, 70, 71). Ipotesi più recenti tenderebbero piuttosto ad associare la presenza di CM con forme più lievi di epatopatia (72). L'argomento è peraltro ancora oggetto di discussione.

Alla luce di quanto detto è importante tenere distinta la condizione caratterizzata unicamente dalla

presenza di CG nel siero (crioglobulinemia in senso lato) e la sindrome crioglobulinemica o (MCS: mixed cryoglobulinaemia syndrome). La metanalisi dei dati esistenti in letteratura è spesso complicata dall'assenza di una chiara distinzione in tal senso.

Osservazioni quali l'espansione clonale di cellule B IgMK-positivo nel sangue periferico, nonché gli aspetti istopatologici degli infiltrati linfoidi a livello osteo-midollare ed epatico (vedi oltre) sono una conferma del carattere linfoproliferativo della CM. Fra le conferme del disordine linfoproliferativo che sta alla base della CM troviamo anche gli studi sulla clonalità B cellulare, l'associazione con il riarrangiamento bcl-2/JH (vedi oltre) nonché la possibile evoluzione della CMII in un franco linfoma non-Hodgkin (LNH) a cellule B. Tale evoluzione si avrebbe in circa il 10% dei casi e generalmente dopo lunghi periodi di tempo (73)

HCV E CM: ASPETTI ISTOPATOLOGICI

In corso di infezione da HCV possono osservarsi due tipi di proliferazioni linfocitarie, le linfoproliferazioni monoclonali di incerto significato (cosiddette MLDUS - monoclonal lymphoproliferations of uncertain significance) ed i linfomi, con implicazioni clinico-prognostiche e terapeutiche diverse (74).

Le MLDUS occorrono prevalentemente in soggetti con un quadro clinico-laboratoristico di crioglobulinemia mista (tipo II) (61, 65, 75-80) e rappresentano proliferazioni oligoclonali di piccoli linfociti B a prevalente localizzazione osteo-midollare ed epatica. In questi organi, le MLDUS interessano il tessuto formando noduli para- ed intertrabecolari nel midollo osseo e negli spazi porto-biliari nel fegato, con aspetti istologici e fenotipici del tutto sovrapponibili a quelli di un linfoma B indolente ovvero a basso grado di malignità. In particolare, dalla loro analisi immunomorfologica ne possono venire identificate due varietà delle quali una, la più frequente, appare sovrapponibile ad una leucemia linfatica cronica B/linfoma a piccoli linfociti (LLCB/LPL) e l'altra, più rara, ad un immunocitoma (IC) (81). L'incidenza di questi tipi istologici varia nelle diverse casistiche riportate (82-88).

Le forme simil-LLCB si compongono citologicamente di piccoli linfociti, prolinfociti e paraimmunoblasti; questi ultimi due citotipi possono localmente divenire più abbondanti e dare luogo ad aree otticamente chiare indicate quali pseudofollicoli o centri chiari di proliferazione, nei quali l'attività proliferativa delle cellule appare maggiore. Il fenotipo, affidabilmente rilevabile mediante immunocitochimica anche su tessuto fissato secondo tecniche istopatologiche di routine e su tessuto decalcificato (quale è il prelievo osteomidollare) (89), è analogo a quello osservato nella tipica LLCB/LPL (81, 90, 91). con positività della linfoproliferazione per antigeni associati alla linea B-linfocitaria (CD79a, CD20, CD19, CD22), per le molecole CD5 (antigene associato alla linea T-linfocitaria ed espresso in maniera aberrante in alcuni linfomi B) e CD23 (antigene associato alla linea B-linfocitaria ed espresso anche dalle cellule follicolari dendritiche). In molti di tali casi è possibile rilevare una restrizione monotipica di tipo IgM/Kappa nell'espressione delle catene delle immunoglobuline. Analogamente, le forme simil-IC ricordano il linfoma immunocitico (81). essendo composte da una commistione di piccoli linfociti, linfociti plasmocitoidi e plasmacellule mature e non si osservano pseudofollicoli. Sotto il profilo fenotipico, la popolazione linfocitaria esprime le molecole B-associate sopra menzionate con pressochè costante evidenza di una restrizione monotipica delle immunoglobuline di superficie e citoplasmatiche del tipo IgM/Kappa; diversamente dalla varietà simil-LLCB, questo tipo di proliferazione linfoide risulta negativa per il CD5 e, spesso, anche per il CD23. In considerazione del fatto che le MLDUS assumono sembianze immunocitologiche pressochè identiche a quelle di alcuni linfomi B indolenti, sia che essi occorran in soggetti HCV-positivi che HCV-negativi, diviene indispensabile che il dato immunomorfologico venga correlato con quello cli-



nico e, laddove possibile, con il reperto molecolare, al fine di evitare incaute diagnosi di linfoma in assenza di evidenze clinico-laboristiche e quindi, di conseguenza, trattamenti chemioterapici senza reale indicazione.

Relativamente all'assetto genotipico i dati disponibili sono a tutt'oggi scarsi. Studi molecolari condotti sugli aggregati linfoidi epatici di soggetti HCV positivi con MLDUS simil-LLCB sembrano evidenziare due o più bande di riarrangiamento clonale delle catene pesanti delle immunoglobuline con differenti dimensioni delle bande amplificate: tale dato, a dispetto del possibile rilievo fenotipico di monotipicità, porta ad ipotizzare un processo linfoproliferativo non monoclonale (come per definizione è quello dei linfomi propriamente detti), ma oligoclonale (92). La globalità dei dati disponibili fa ipotizzare che l'HCV possa svolgere un ruolo patogenetico nel fungere da "trigger" per una risposta immunitaria B-linfocitaria, inizialmente "a largo spettro" o policlonale, nel contesto della quale, perdurando lo stimolo, si selezionano alcune sottopopolazioni B-linfocitarie con assetto genetico favorevole e/o dominante, la cui sopravvivenza è però ancora antigene-dipendente, per cui l'allontanamento dello stimolo può portare ad una riconversione verso una fase di policlonalità e poi alla risoluzione del processo. Mutatis mutandis, questa ipotesi patogenetica si ispira a quanto oggi noto circa la correlazione tra l'*Helicobacter Pylori* ed il linfoma B della zona marginale o linfoma MALT dello stomaco (93, 94), nella quale il meccanismo di linfomagenesi prevede fasi evolutive che passano da una risposta immunitaria policlonale (vale a dire francamente flogistica/reattiva) ad una oligoclonale e quindi monoclonale con l'acquisizione di mutazioni degli assetti genetici che via via rendono la linfoproliferazione sempre meno antigene-dipendente. Ciononostante, sotto il profilo clinico-prognostico, le MLDUS rappresentano linfoproliferazioni benigne non progressive le quali possono, semmai, mostrare modulazioni temporali legate all'evoluitività dell'epatite e/o alla terapia. In uno studio è stato infatti osservato (79) che, a livello epatico, l'evoluzione cirrotica si associava ad una riduzione dell'infiltrato B-linfocitario monotipico con, viceversa, possibile aumento di un infiltrato flogistico; inoltre, sono riportati studi nei quali ripetute biopsie osteomidollari non hanno mostrato espansioni dell'infiltrato linfoide (78, 95) o addirittura hanno evidenziato una significativa regressione dei noduli linfoidi dopo somministrazione di terapia interferonica (95, 96).

La percentuale dei pazienti con MLDUS che sviluppano nel tempo un vero e proprio linfoma è intorno al 10%. I dati disponibili relativamente a possibili correlazioni molecolari tra le MLDUS epatico-midollari e il linfoma nodale che si può successivamente sviluppare sono ancora troppo scarsi per consentire una valutazione chiara della potenzialità evolutiva delle MLDUS.

DIAGNOSI DI SINDROME CRIOGLOBULINEMICA (MCS: MIXED CRYOGLOBULINAEMIA SYNDROME)

Non esistono criteri diagnostici validati per la diagnosi di MCS. Dopo esclusione, secondo i criteri già descritti, dei casi di crioglobulinemia secondaria a disordini noti al momento della diagnosi (infettivi non-HCV o HBV, immunologici o neoplastici), i malati con MCS possono essere classificati sulla base dei criteri illustrati nella tavola 2.

In presenza di chiari dati clinici e sierologici (porpora, crioglobulinemia mista, C4 ridotto, impegno d'organo) la diagnosi di MCS è relativamente semplice.

Molti pazienti HCV+ possono presentare una o più alterazioni di laboratorio (Reuma-test + e/o crioglobulinemia mista e/o ridotto C4) in assenza o con modeste manifestazioni cliniche (artralgie e/o astenia); in questi casi è utile un monitoraggio più attento del paziente (comparsa di porpora e/o di altri impegni d'organo, es. neuropatia periferica, nefropatia, ecc.).

Inoltre, alcuni pazienti HCV+ possono presentare una MCS clinicamente evidente, ma incompleta dal punto di vista sierologico, soprattutto in transitoria assenza di crioglobuline in circolo (la quota

degli immuno-complessi crioprecipitabili, responsabili nella CM del danno vasculitico, varia ampiamente nel tempo fra pazienti e nello stesso paziente dallo 0% al 100%); in questi casi sarebbe opportuno ripetere la ricerca delle crioglobuline ad intervalli regolari (1-2 volte all'anno in pazienti con manifestazioni lievi di malattia; ogni 1-2 mesi in presenza di manifestazioni gravi, es. nefropatia); in ogni caso è bene trattare questi casi come MCS classiche.

La ricerca delle crioglobuline nel siero deve rispettare modalità di esecuzione standard:

- prelievo di 20 ml di sangue intero a caldo
- 1-2 ore a 37°C
- centrifugazione a 37°C per 2-3 min
- rapida aspirazione del siero (evitare i GR)
- siero a +4°C per 7 giorni
- lettura crio presenti/assenti 7° giorno
- isolamento e lavaggio crio con soluzione PBS tamponata a +4°C
- caratterizzazione Ig presenti e monoclonalità IgM (immunofissazione)

Tavola 2. Sindrome crioglobulinemica (MCS): criteri classificativi

<i>criteri</i>	<i>maggiori</i>	<i>minori</i>
serologici	crioglobulinemia mista ridotto C4	fattore reumatoide HCV o HBV
Anatomopatologici	vasculite leucocitoclastica	Infiltrati mono-oligoclonali linfociti B (fegato e/o midollo osseo)
clinici	porpora	glomerulonefrite membrano-proliferativa neuropatia periferica ulcere cutanee

MCS:

- a) CG miste sieriche (\pm basso C4) + porpora + vasculite leucocitoclastica
- b) CG miste (\pm basso C4) + 2 sintomi minori + 2 dati sierologici/anatomopatologici minori

MCS 'incompleta' o 'possibile' :

- a) CG miste o basso C4 + 1 sintomo minore + 1 dato sierologico minore \pm dati anatomopatologici
- b) porpora e/o vasculite leucocitoclastica + 1 sintomo minore + 1 dato minore sierologico \pm anatomopatologico
- c) 2 sintomi minori + 2 dati sierologici \pm anatomopatologici minori

da Ferri, Zignego, Pileri *J Clin Pathol* 2002, modif.(97)

TERAPIA DELLA MCS

Tavola 3: principali strategie terapeutiche nella MCS

RAZIONALE	STRATEGIA TERAPEUTICA
Contrastare l'agente etiologico	Interferone o Interferone + Ribavirina
Combattere l'effetto infiammatorio	Colchicina, steroidi
Migliorare la clearance degli immunocomplessi (crioglobuline)	Dieta ipoantigenica
Rimuovere gli immunocomplessi circolanti	Plasmaferesi
Inibire la sintesi delle immunoglobuline (crioglobuline) da parte dei linfociti B	Immunosoppressori

Prima di introdurre l'importante capitolo della terapia della MCS, è doveroso premettere talune considerazioni. Fra queste, in primo luogo, il carattere di "fase intermedia" dell'epoca storica in cui ci troviamo. In altre parole, dopo una fase di MCS come sindrome "essenziale", senza cause conosciute, e di approcci terapeutici relativi, ci troviamo oggi nel pieno di una fase iniziata con la scoperta della connessione causale fra tale sindrome ed un agente infettivo, l'HCV. E' così molto verosimile che i dati e gli orientamenti oggi prevalenti in tale settore siano destinati, in un futuro più o meno prossimo, ad essere ridimensionati e integrati con pratiche dell'era pre-HCV in una definizione sempre più precisa di categorie patologiche differenziate dal punto di vista terapeutico. Oggetto della trattazione seguente sarà, su tale falsariga, la descrizione sintetica di tali due fasi e dei principali dati oggi disponibili, mentre sarà necessariamente limitata la trattazione dedicata all'indicazione precisa sul comportamento da tenere nei singoli casi, nell'attesa di dati scientifici più sicuri deducibili da studi randomizzati più ampi, confermati e prolungati nel follow-up di quelli attualmente disponibili.

LA TERAPIA ETIOLOGICA (ANTIVIRALE)

Come già accennato, conseguenza naturale delle acquisizioni sull'etiologia della MCS è stato il tentativo di privilegiare il trattamento etiologico rispetto alle terapie del passato. A tal proposito è interessante ricordare come, grazie proprio alle sue proprietà anti-proliferative, l'IFN sia stato usato con successo nella MCS ancora prima della scoperta del virus. Bonomo e collaboratori trattarono infatti sette pazienti con MCS riportando ottimi risultati clinici e riduzione delle crioglobuline circolanti (98). Oltre che per l'effetto antiproliferativo, anche l'effetto immunomodulante dell'IFN potrebbe giocare un ruolo, pur non essendo chiaro in quale misura e con quale delle sue proprietà biologiche tale sostanza possa contribuire alla riduzione delle crioglobuline circolanti

A parte lo studio pionieristico di Bonomo e coll., dopo la scoperta del virus si sono succedute svariate indagini allo scopo di valutare l'effetto dell'IFN sulla MCS ed oggi l'uso dell'IFN si può ritenere ampiamente consolidato. Peraltro, come sarà meglio detto oltre, l'approccio antivirale sembra insufficiente, nella maggior parte dei casi, a raggiungere lo scopo ultimo, cioè la clearance virale e la risposta clinica sostenuta nel tempo, anche se tuttora non sono disponibili studi controllati utili per



un giudizio definitivo. Per quanto riguarda dosi e durata del trattamento, solitamente sono stati somministrati 3-6 milioni di U.I. sottocute 3 volte alla settimana per 6-12 mesi o più a lungo (70, 99-102).

La maggior parte degli studi condotti, nonostante un'ampia variabilità di protocolli messi in atto, mostra risultati favorevoli nel 50-70% dei casi al termine del trattamento e dimostra che il miglioramento della MCS generalmente correla con la riduzione dei titoli di HCV-RNA. Tale parallelismo fra miglioramento clinico e virologico pone l'accento sulla valenza dell'IFN come farmaco antivirale. Parimenti comune è peraltro, come già accennato, l'osservazione di una bassa percentuale di risposta a lungo termine, in genere intorno al 10% dei casi. Inoltre, l'interruzione dell'IFN è generalmente seguita dalla ripetizione e talora addirittura dall'esacerbazione della malattia clinica e dall'innalzamento dei livelli di crioglobuline con ricomparsa dell'HCV RNA nel siero. Peraltro, nei pazienti in cui l'HCV scompare e rimane assente, la risposta clinica sembrerebbe essere duratura. Nello studio di Dammacco e collaboratori, in cui veniva comparata l'efficacia dell'IFN alfa da solo con quello di una combinazione di IFN alfa e 6 metil prednisolone, è stato osservato che le percentuali di risposta virologica e clinica erano simili nei due gruppi, anche se le ricadute sopravvenivano da 3 a 6 mesi più tardi nei pazienti che ricevevano la combinazione (103). Reciprocamente, in altri studi, si è potuto osservare che i pazienti che venivano trattati con cortisonici a basse dosi miglioravano significativamente nei parametri clinici e virologici all'aggiunta di IFN alfa (70).

Come premesso, negli studi effettuati, le risposte immunologica e clinica sono risultate strettamente correlate con quella virologica, suggerendo che l'efficacia dell'interferone sulla MCS HCV-positiva sia correlata con la sua attività antivirale, oltre che sull'effetto antiproliferativo. In taluni studi è stato osservata la scomparsa dell'infiltrato monoclonale B linfocitico a livello midollare e dell'espansione B cellulare a livello periferico a seguito di terapia con IFN (96). Inoltre è stato mostrato che la risposta antivirale correlava significativamente con la scomparsa di cloni B alberganti la traslocazione t(14;18) (104-106); tale riarrangiamento cromosomico è stato associato significativamente all'infezione cronica da HCV, ed in modo particolare alla MCS HCV-correlata (107-109). Osservazioni quali la ricomparsa in circolo di cellule alberganti la t(14;18) dopo ricaduta virologica all'interruzione del trattamento e la persistente determinabilità delle cellule traslocate nei soggetti in cui la replicazione virale non si modificava, nonostante la somministrazione di simili dosi di IFN (106), possono essere considerate riprove della dipendenza dell'espansione clonale dalle modificazioni della replicazione virale indotte dalla terapia. Infine, in un recente studio, veniva osservata l'evoluzione verso un franco linfoma in taluni pazienti con t(14;18) che non erano stati trattati con IFN, ma in nessuno dei pazienti che erano stati trattati ed avevano risposto alla terapia (104). Nel complesso, tali dati suggeriscono la possibilità che il trattamento etiologico, quando efficace, possa assumere anche valore preventivo nei confronti dell'evoluzione del disordine linfoproliferativo HCV-correlato.

Da un punto di vista pratico, il trattamento con IFN appare, in tale categoria di pazienti, molto più problematico che nella semplice epatopatia da HCV. Devono infatti essere considerati vari elementi clinici e laboratoristici che non sempre presentano risposte concordi. Ad esempio, anche se in genere associate, la risposta valutata sui valori del criocrito, del fattore reumatoide o della complementemia può variare in modo più indipendente dalla risposta virologica di quanto non si osservi nella terapia dell'epatite cronica, dove in genere l'andamento clinico, unicamente rappresentato dai valori delle transaminasi (impropriamente chiamati "sintomo"), tende a seguire la risposta virologica. Ciò conferma l'importanza, nella patogenesi della MCS, di meccanismi complessi plurifasici e quindi a più variabili e difficilmente valutabili individualmente e suggerisce la necessità di un più

attento monitoraggio di tale tipo di pazienti e di ulteriori marcatori indicativi di fasi patogenetiche chiave idealmente posizionate fra l'agente etiologico virale e la manifestazione clinica della sindrome. Uno di tali potenziali marcatori potrebbe essere rappresentato dalla valutazione delle modificazioni dell'espansione clonale B in campioni di cellule mononucleate periferiche, di cui si è detto sopra (96, 104-106), ma saranno necessari ulteriori studi per confermare o meno la valenza clinica di tale determinazione.

Occorre inoltre tener presente che la mancanza di linee guida universalmente accettate per l'impostazione di piani terapeutici ed il follow-up dei pazienti trattati, rende difficile la comparazione fra i molti lavori sino ad oggi pubblicati sull'argomento.

Per quanto concerne l'approccio clinico al paziente, è osservazione comune che mentre il soggetto con epatite cronica, solitamente asintomatico, tende ad avvertire solo i disagi causati dalla somministrazione di IFN, al contrario il paziente con sindrome crioglobulinemica arriva al trattamento con una sintomatologia che riduce spesso in modo significativo la sua qualità di vita e, qualora ne trovi giovamento, tende a sottovalutare gli effetti collaterali del farmaco ed a richiederne personalmente la somministrazione.

Peraltro, nel caso dei pazienti crioglobulinemici trattati con interferone, occorre tener presente l'eventualità di un peggioramento o comparsa "de novo" di forme di neuropatia sensitivo/motoria, spesso pre-esistente a livello subclinico, come suggerito anche da osservazioni aneddotiche (110). Tale argomento merita un cenno particolare per le possibili ripercussioni sui criteri di ingresso in un trattamento antivirale che, a differenza di quanto esistente per le epatopatie da HCV, non sono stati ancora stabiliti universalmente. In realtà, l'utilizzo dell'IFN α nelle neuropatie crioglobulinemiche HCV-correlate è ancora oggi molto discusso. In mancanza di sufficienti studi controllati, il suo utilizzo va quindi considerato con cautela. Negli studi esistenti talora viene riferita una risposta lenta e solo parziale all'IFN α nel ridurre i sintomi dovuti alla neuropatia; altre volte sono riferiti casi di un suo miglioramento significativo ed altre ancora, come già accennato, un peggioramento di neuropatie preesistenti ovvero una loro comparsa de novo. La potenziale neurotossicità dell'IFN α dipenderebbe dalla durata e dose del farmaco, manifestandosi essenzialmente dopo trattamenti prolungati con dosi elevate. I sintomi, inoltre, sarebbero dose-dipendenti e reversibili, interessando essenzialmente il sistema nervoso centrale. Non può essere peraltro esclusa la possibilità che il suo uso possa favorire la comparsa di disordini immunomediati anche a carico del sistema nervoso periferico.

La problematicità del trattamento con IFN di pazienti con MCS è giustificata anche dal fatto che tali pazienti, rispetto a quelli con solo epatite cronica, sono frequentemente di età avanzata, al di sopra della canonica soglia dei 65 anni, e spesso sono normotransaminasemici o, al contrario, affetti da forme avanzate di cirrosi epatica.

Recentemente sono stati riportati dati a favore dell'utilità dell'introduzione delle ribavirina (RBV) nel trattamento della CM HCV-correlata., in analogia a quanto visto per la semplice epatopatia cronica. Infatti, la molto frequente recidiva della sindrome alla sospensione della terapia con IFN fa supporre che, come per le epatiti croniche HCV correlate, combinazioni con altri farmaci antivirali, quali appunto la ribavirina, possano costituire un'opzione terapeutica valida. La combinazione IFN più ribavirina è stata utilizzata con successo da alcuni gruppi (111, 112). Occorrerà peraltro usare cautela in caso di soggetti con danno renale significativo (vedi oltre). Analogo discorso va fatto per l'efficacia della terapia con interferoni peghilati: il loro utilizzo, che ha fatto registrare percentuali più elevate di risposte sostenute in caso di epatopatia da HCV, potrebbe tornare utile nel trattamento della MCS, incrementando la percentuale, tipicamente ridotta, di risposte stabili nel tempo.



TRATTAMENTO NON ETIOLOGICO DELLA MCS

Il trattamento che potremmo definire “tradizionale” della MCS, ciò quello in uso anche prima della scoperta del virus C, include i corticosteroidi, i farmaci citotossici, i farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS), la plasmaferesi e la dieta ipoantigenica (Lac-diet) (113). Tale tipo di terapia, utilizzata comunemente anche oggi, soprattutto in caso di impossibilità ad effettuare la terapia etiologica, deve mirare al trattamento della(e) manifestazione(i) prevalente(i) in una determinata fase di malattia; inoltre, tale trattamento deve essere limitato al tempo necessario (settimane o mesi) ad ottenere la scomparsa o la remissione della manifestazione(i) in atto.

I corticosteroidi (CS) rappresentano i farmaci più frequentemente utilizzati nell'era pre-HCV, dato l'inquadramento tradizionale della MCS fra le manifestazioni autoimmuni. Viene sfruttata prevalentemente la loro attività anti-infiammatoria (vasculite da immuno-complessi) o anche immuno-soppressiva a dosaggi elevati (1mg/Kg/die o boli da 0.5-1g) per le complicanze più gravi (nefrite acuta, vasculite diffusa, ecc.). Le ragioni della diffusione del loro uso consistono essenzialmente nel fatto che i CS si dimostrano in grado di poter controllare, anche a bassi dosaggi, gran parte della sintomatologia. Peraltro, sul piano patogenetico, hanno lo svantaggio di favorire l'agente etiologico, cioè la replicazione del virus C (che potremmo definire come la patogenesi “remota” del disordine) e d'altro canto non sembrerebbero incidere significativamente sulla patogenesi più prossima e cioè sulla crioglobulinemia. Di fatto, in taluni studi i CS non risulterebbero modificare significativamente i livelli del criocrito né inciderebbero significativamente sulla storia naturale della malattia. Risultano interessanti studi già citati in cui l'uso del cortisonico da solo non mostrava reali vantaggi rispetto al non trattamento, mentre la combinazione con l'IFN α era in grado di indurre una risposta più precoce con più tardiva ripresa della malattia rispetto alla monoterapia con IFN, nonostante la non significativa differenza della risposta clinica in sé (103). Secondo gli stessi autori l'associazione dell'IFN con il CS ridurrebbe l'effetto sulla replicazione virale indotta dai corticosteroidi. Va inoltre preso in considerazione il limite rappresentato dagli effetti collaterali legati ad una somministrazione prolungata CS includenti il diabete, l'ulcera e l'osteoporosi. In breve, la loro efficacia sarebbe essenzialmente secondaria agli effetti antinfiammatori.

Sempre per un effetto antiflogistico sono utilizzati i FANS, ed in particolare per contrastare la sintomatologia articolare, nonostante le limitazioni al loro uso nei pazienti con grave danno epatico e renale

I farmaci citostatici-immunosoppressori, sono stati più comunemente usati nei casi di mancata risposta ai cortisonici. Il razionale del loro uso nella crioglobulinemia di tipo I (cioè con evidente patologia linfoproliferativa di tipo monoclonale) e II consisterebbe nella loro azione citolitica sui cloni B linfocitari. Vengono oggi consigliati essenzialmente nelle fasi acute della MCS (es. in caso di nefrite acuta che evolve verso l'uremia, di sindrome da iperviscosità in associazione alla plasmaferesi o nei LNH in fase conclamata). I farmaci citostatici più comunemente usati sono la ciclofosfamide, il clorambucil e l'azatioprina. Generalmente anche il loro uso è gravato da non trascurabili effetti collaterali, ivi compreso una progressione della malattia secondaria al rilevante effetto immunosoppressivo. Caso a parte è rappresentato dalla ciclosporina che è stata da taluni autori utilizzata in forme particolarmente resistenti alla terapia (114). La reale efficacia della ciclosporina e le modalità della sua somministrazione rimangono peraltro molto discusse (115).

Fra le altre pratiche terapeutiche utilizzate si trovano quelle atte a ridurre l'elemento patogenetico “prossimo” della sindrome crioglobulinemica e cioè le crioglobuline: questo può essere ottenuto in modo più rapido ed efficace, con pratiche quali la plasmaferesi, ovvero con una modalità più indiretta e moderata quale la dieta a basso tenore antigenico (Lac diet).

La plasmateresi rappresenta, nelle diverse varietà tecniche con cui può essere effettuata, la rimozione aferetica delle crioglobuline e degli altri immunocomplessi circolanti (ICC). Le modalità tecniche fondamentali sono rappresentate dalla plasmateresi tradizionale o PE, in cui si ha solo la sostituzione del plasma con albumina in soluzione polisalina, e la plasmateresi selettiva o DFPP che, rispetto alla prima, offre la possibilità di recuperare l'albumina ed altre proteine, incluse le frazioni complementari. Negli attuali schemi terapeutici la plasmateresi è associata a farmaci citotossici quali la ciclofosfamide, da soli o con CS, al fine di potenziarne l'efficacia e la durata d'azione. Per la rapidità d'azione ed efficacia la plasmateresi viene soprattutto suggerita in presenza di manifestazioni ad esordio acuto (es. nefrite crioglobulinemica, neuropatia periferica sensitivo-motoria grave, ulcere cutanee, la sindrome da iperviscosità) e suscettibili di rapido recupero (es. nefrite con prevalenti lesioni istologiche attive); trova un impiego limitato nel tempo (poche settimane o mesi). L'associazione con ciclofosfamide (50-100 mg/die per os, per 4-8 settimane) nella fase di graduale riduzione delle sedute aferetiche risulta efficace nell'evitare il fenomeno di rebound alla sospensione dell'aferesi.

La Lac diet consiste invece in una dieta a basso contenuto di macromolecole alimentari con spiccata attività antigenica al fine di consentire una più efficace rimozione delle crioglobuline e degli altri ICC da parte del sistema reticolo endoteliale. Ciò può migliorare le manifestazioni minori di malattia (porpora, artralgie, parestesie). Il problema principale in tal caso è rappresentato dalla scarsa compliance dei pazienti dovuta alla monotonia delle diete consigliate. Viene a tutt'oggi prescritta negli stadi più precoci della sindrome, prima di passare a terapie più impegnative.

Infine, un cenno a parte va riservato ai promettenti risultati di nuove terapie non anti-virali, utilizzando un anticorpo chimerico che si lega all'antigene di superficie delle cellule B CD20 (rituximab). La sua infusione non sembrerebbe gravata da importanti effetti collaterali e, negli studi effettuati sino ad oggi, risulterebbe efficace nella maggior parte dei pazienti con MCS, con possibile risoluzione dei sintomi e regressione dei cloni B-cellulari espansi. Anche tale terapia avrebbe peraltro l'effetto di incrementare in modo significativo la replicazione virale, ciò che suggerisce l'opportunità di futuri protocolli terapeutici combinati con antivirali (116-118).

Come regola generale, nei casi in cui non sia possibile o sia inefficace una terapia etiologica della MCS, occorre soprattutto considerare che questa ha in genere un andamento benigno, mono-oligo-sintomatico, dove i parametri sierologici, quali i livelli di criocrito e l'ipocomplementemia (basso C4), non correlano con le manifestazioni cliniche, ad eccezione della sindrome da iperviscosità, raramente osservabile in presenza di elevati livelli di crioglobuline circolanti. E' pertanto inutile e spesso dannoso ogni tentativo terapeutico mirante a normalizzare o migliorare i parametri sierologici in pazienti clinicamente asintomatici. La terapia dovrà essere sempre ritagliata sul singolo paziente, proporzionatamente alla gravità ed al grado di attività della complicanza(e) in atto e dopo attenta valutazione di altre variabili (età, co-morbidità, ecc.).

In linea generale, nel caso di manifestazioni cliniche lievi (es. porpora, astenia, artralgie/artrite, parestesie arti, sindrome sicca) può essere sufficiente una terapia sintomatica (dieta ipoantigenica, analgesici, basse dosi di steroidi, ecc.) per periodi di tempo limitati. L'astenia e la porpora risultano molto sensibili a dosaggi medio-bassi di steroide (6-MP 2-8 mg in dose unica al mattino). Alcune manifestazioni gravi della CM (es. glomerulonefrite acuta, neuropatia periferica motoria, grave vasculite cutanea o diffusa) presentano un esordio improvviso e possono, se trattate tempestivamente, rispondere positivamente alla terapia con steroidi \pm immunosoppressori \pm plasmateresi, impiegata per periodi di tempo relativamente brevi (1-3 mesi). Tale strategia terapeutica è generalmente ben tollerata, nonostante i noti effetti potenzianti la replicazione virale ad opera degli steroidi.

5 - INFEZIONE DA HCV E LINFOMA

Si possono distinguere fondamentalmente due categorie di neoplasie linfoidi HCV-associate: quelle osservate nel corso dell'evoluzione di una CM e quelle idiopatiche. Peraltro, in una buona parte degli studi associativi effettuati sino ad oggi, le due categorie non vengono sempre così diversificate.

Per quanto concerne la prima categoria, la percentuale di CM di tipo II che evolvono in un franco linfoma è di circa l'8-10% (83, 119); tale evoluzione si avrebbe dopo un lungo periodo dalla diagnosi di CM ed a seguito di un'infezione di lunga durata, come dimostrerebbe l'età avanzata dei pazienti che si ammalano di linfoma.

Per quanto concerne le neoplasie linfoidi di tipo idiopatico, il ruolo causale svolto dall'HCV è ancora oggi oggetto di indagine e discussione (120-127), nonostante che le prime osservazioni di un'associazione statisticamente significativa fra linfomi "idiopatici" ed infezione da HCV in pazienti italiani (86, 128-133) sia stata successivamente confortata dalla maggioranza degli studi nazionale ed esteri (134, 135). Un dato che emerge chiaramente è l'esistenza di ampie variazioni nelle prevalenze, nonché vari dati discordanti provenienti soprattutto da regioni del nord Europa e nord America (122, 136). Tale chiaro gradiente sud/nord nelle prevalenze ricorda quello già osservato negli studi indaganti l'associazione fra HCV ed epatite autoimmune (137, 138) e suggerisce fortemente l'importanza condizionante di fattori di tipo costituzional/genetico o ambientale.

ASPETTI ISTOPATOLOGICI DELLE NEOPLASIE LINFATICHE HCV-ASSOCIATE

Sebbene si possano riscontrare tutti i tipi istologici, certamente i linfomi di derivazione dai B-linfociti periferici ne rappresentano la stragrande maggioranza. Vale la pena ribadire come solo una quota minoritaria di pazienti HCV-positivi con linfoma abbiano un pregresso reperto di MLDUS: ciò ad ulteriore conferma del fatto che l'insorgenza di un linfoma franco non rappresenta necessariamente un'evoluzione della MLDUS pre-esistente, potendo evidentemente il virus agire sulla linfomagenesi per vie alternative (130-132, 135, 139-142).

Le casistiche descritte in letteratura riportano differenti incidenze dei vari istotipi (88, 91, 142): al di là delle diversità, che possono riflettere diversi approcci diagnostico-classificativi, si può asserire che le varietà più diffuse sono certamente quelle dei linfomi di derivazione dai B-linfociti periferici con carattere indolente. Tra questi ultimi, facendo riferimento alla classificazione R.E.A.L. sui linfomi (90) e alla versione sostanzialmente immodificata recentemente redatta dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (81), si ricordano quelli di maggiore riscontro: il linfoma centrollicolare (LCF), la leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti (LLC), l'immunocitoma (IC), il linfoma della zona marginale (LZM).

Il linfoma centrollicolare rappresenta la varietà di più frequente riscontro, insorge usualmente nella linfoghiandola e deriva dalle cellule del centro germinativo del follicolo linfoide: istologicamente forma follicoli neoplastici, omogenei per dimensioni e forma con centri germinativi scarsamente polarizzati, composti da centrociti e da centroblasti. La relativa proporzione della quota di grandi cellule (centroblasti) espressa in percentuale secondo la R.E.A.L. (90) o in numero per campo a forte ingrandimento secondo la OMS (81), consente di effettuare un grading del tumore identificandone tre gradi a crescente aggressività. Dallo studio di validazione della classificazione R.E.A.L. condotto dal National Cancer Institute (143) emerge la raccomandazione alla distinzione tra i gradi I (quota centroblastica entro il 25%) e II (quota centroblastica dal 25 al 50%) da un lato, ed il grado III dall'altro (quota centroblastica superiore al 50%), mostrando questi due sottogruppi significatività prognostica.

Relativamente al fenotipo, le cellule del LCF esprimono antigeni B-associati (CD19, CD20, CD22, CD79a), unitamente alla molecola CD10 ed al prodotto del gene *bcl-6*. Oltre il 95% dei LCF (soprattutto i gradi I e II), esprime intensamente il prodotto dell'oncogene *bcl-2*. La quota di cellule in ciclo mitotico (rilevata mediante l'uso di anticorpi diretti contro l'antigene nucleare di proliferazione Ki-67) è variabile da caso a caso, per quanto usualmente elevata nei casi a grado citologico III.

Relativamente al genotipo, circa il 70% dei casi mostra una traslocazione genica tra i cromosomi 14 e 18 [t(14;18)](81), con sovratrascrizione del gene *bcl-2* e sovraespressione del prodotto, fenomeno che si traduce in una potenziata azione anti-apoptotica. Nella popolazione neoplastica risultano regolarmente riarrangiati i geni che codificano per le catene pesanti delle immunoglobuline.

Con il termine di linfoma della zona marginale (LZM) si raggruppano tre varietà di linfoma (81): ad insorgenza nodale (più raro), ad insorgenza splenica ed extranodale (noto anche come linfoma MALT originando dal cosiddetto tessuto linfoide associato alla mucosa - MALT) (144). Il LZM è una delle forme più comunemente riscontrate nei pazienti HCV-positivi, soprattutto nella varietà MALT (142, 145, 146). Quest'ultimo è tessuto linfoide organizzato in follicoli congenitamente presente nell'intestino come placche del Payer, il quale si acquisisce negli organi mucosi/epiteliali a seguito di infezioni e/o processi autoimmuni. La più frequente sede di un LZM-tipo MALT è lo stomaco, dove è nota una correlazione con l'infezione da *Helicobacter Pylorii* (HP). Seguendo l'ipotesi fisiopatologica oggi suggerita per i LZM-tipo MALT gastrici (93, 143), si è prospettato per l'HCV (105, 142, 145, 146) un analogo ruolo quale possibile trigger di una risposta immunologica inizialmente policlonale (corrispondente istologicamente all'acquisizione del tessuto MALT), sulla quale successivamente si inserirebbero alterazioni genomiche dei linfociti B con progressiva restrizione clonale (fase intermedia di oligoclonalità) fino al raggiungimento di uno stato monoclonale francamente linfomatoso. Va comunque sottolineato come l'HCV e l'HP non siano agenti infettivi necessariamente esclusivi l'uno dell'altro, essendo stata riportata in letteratura anche la loro coesistenza in casi di LZM (105, 146).

Fra i LZM tipo-MALT, esistono dati relativi a possibili correlazioni tra il virus dell'epatite C nei soggetti con sindrome secca (vedi oltre), complicati da linfoma (147) e tra linfomi ad insorgenza primitiva cutanea in soggetti con infezione da HCV (148, 149).

Sotto il profilo morfologico, il LZM deriva dai linfociti della zona marginale, più periferica, del follicolo e come tale si accresce inizialmente espandendo tale porzione del follicolo. Esso si compone di piccoli linfociti con citoplasma relativamente ampio e chiaro con nucleo ovalare o lievemente inciso, con variabili di differenziazione in senso plasmacellulare (81). E' possibile il rilievo di un minoritaria quota di grandi cellule che, laddove numericamente abbondanti e in aggregati di più di 10-15 elementi, indicano un'evoluzione verso linfomi aggressivi a grandi cellule. Nella varietà extranodale MALT (81) è utile sottolineare, per l'impatto clinico, la multifocalità. Della varietà nodale va ricordata la rarità e la conseguente necessità di escludere che si tratti in realtà di un interessamento nodale da parte di una forma extranodale. Della varietà splenica si rammenta il frequente e subdolo interessamento del midollo osseo con diffusione quasi esclusivamente intravascolare, la cui presenza, pur ponendo la malattia in uno stadio IV, non incide significativamente sull'esito della splenectomia quale approccio terapeutico. Riguardo alla variante splenica, nell'ottica di sottolineare il possibile ruolo patogenetico dell'HCV nella linfomagenesi, sono degne di nota alcune recenti pubblicazioni sulla regressione di casi di linfoma marginale splenico a seguito del trattamento con antivirali (150-153). E' stata anche descritta la regressione di tale linfoma e la scomparsa di cellule B periferiche alberganti la traslocazione t(14;18) a seguito di terapia antivirale nonostante l'inefficacia di un precedente trattamento chemioterapico (154).

Sotto il profilo fenotipico il LZM esprime gli antigeni B-associati (CD19, CD20, CD22, CD79a), mostra restrizione monotipica delle immunoglobuline citoplasmatiche e di superficie e variabile positività per gli antigeni CD68, CD43, DBA.44 e Ki-B3/CD45R, con esclusiva coespressione di IgM ed IgD nella forma splenica. La proteina bcl-2 è variabilmente e debolmente espressa e la frazione di crescita è usualmente bassa. Negative le molecole CD5 e CD10.

Relativamente al genotipo, la maggior parte dei dati a disposizione riguarda i LZM extranodali, ed in special modo quelli gastrici in virtù della frequente associazione con l'infezione da HP e la favorevole risposta delle forme in stadio precoce all'antibiotico-terapia. Nei LZM MALT sono state riportate anomalie cromosomiche, quali la trisomia del cromosoma 3, la traslocazione t(1;14), la traslocazione t(11;18) e mutazioni del gene bcl-10. Relativamente alla t(11;18) è stato recentemente riportato (94, 155) che sia associata agli stadi più avanzati e alle forme che, pur essendo in stadio precoce, non sono responsive alla terapia eradicante. Mutazioni del gene BCL10 sono invece descritte nei casi più avanzati (156, 157).

Il linfoma a piccoli linfociti/leucemia linfatica cronica e l'immunocitoma sono linfomi B a decorso clinico indolente che possono occorrere in corso di infezione da HCV, seppur infrequentemente, per quanto la loro reale incidenza vari a seconda delle casistiche analizzate (91, 142). Il profilo morfologico e fenotipico di questi due istotipi è analogo a quello descritto per le MLDUS, a cui pertanto si rimanda. Ovviamente, in presenza di un linfoma, lo studio molecolare dei geni che codificano per le catene pesanti delle immunoglobuline evidenzia un riarrangiamento monoclonale.

Sebbene raramente, alcuni dei pazienti HCV-positivi con gammopatia monoclonale sono inquadrabili per caratteristiche clinico-patologiche in un mieloma plasmacellulare (81). Sotto il punto di vista anatomo-patologico si tratta usualmente di plasmocitomi a basso grado citologico, in stadio I: ciò significa che la proliferazione plasmacellulare consta di elementi ad abito maturo che si distribuiscono nell'interstizio a singole cellule od in microaggregati, quantitativamente occupanti una percentuale variabile dal 10 al 20% degli spazi intertrabecolari (158, 159).

Tra i linfomi di derivazione B-linfocitaria quelli a decorso aggressivo, citologicamente composti da grandi cellule ad elevata frazione mitotica e genericamente indicati come linfomi a grandi cellule di tipo diffuso, sono di rara osservazione (81). Quando la composizione cellulare appaia discretamente uniforme se ne possono identificare alcune sottovarietà che comunque non sembrano incidere significativamente sul decorso della malattia. Il fenotipo è quello di elementi B-linfocitari che pertanto esprimono i marcatori di linea B (CD19, CD20, CD22, CD79a), con incostante espressione delle immunoglobuline di superficie e citoplasmatiche ed elevata frazione di cellule in ciclo (positive per l'antigene nucleare associato alla proliferazione Ki-67). Altre molecole relative a prodotti di geni coinvolti nella regolazione dell'apoptosi e/o differenziazione della linea B-linfocitaria, quali la proteina bcl-2 o bcl-6, possono essere espressi senza che peraltro questo implichi necessariamente la corrispondente presenza di riarrangiamenti dei suddetti geni a livello molecolare (90, 91).

A livello genotipico, gli studi in letteratura sono abbondanti, ma non uniformi quanto a risultati e ad omogeneità di casistiche: circa il 30% dei casi di linfoma B a grandi cellule risulta portare il riarrangiamento dell'oncogene bcl-2, dato che può essere indicativo di derivazione centrofollicolare e possibilmente associato ad una peggiore prognosi (160). In un altro 40% dei casi risulta riarrangiato il gene bcl-6 che risulterebbe, invece, associato ad una buona risposta alle terapie convenzionali (160). In ogni caso, analogamente a quanto osservato parlando del genotipo dei linfomi della zona marginale, studi molecolari sui linfomi B a grandi cellule in pazienti HCV+ non sono stati condotti e pertanto non è possibile confermare né tali incidenze né il loro eventuale impatto prognostico.

GAMMAPATIE MONOCLONALI

Rimanendo in ambito ematologico, tra le manifestazioni extraepatiche in corso di infezione da HCV è stata segnalata con discreta frequenza una gammopatia monoclonale (GM) sierica più spesso del tipo IgM/Kappa e per lo più associata ad un genotipo 2a/c (161). Nell'ampia casistica studiata una GM si rinviene nell'11% dei pazienti HCV positivi senza crioglobulinemia associata, con una differenza significativa rispetto ai pazienti HCV negativi nei quali l'incidenza rimane intorno all'1%. Nella maggior parte dei pazienti HCV positivi tali GM si inquadrano nell'ambito delle GM ad incerto significato (c.d. monoclonal gammopathies of uncertain significance /M-GUS) e come tali vanno monitorate nel tempo per escludere l'eventualità (peraltro remota) di un'evoluzione in mieloma multiplo.

ASPETTI ISTOPATOLOGICI

La valutazione istopatologica di biopsie osteomidollari mostra la presenza di un infiltrato di tipiche plasmacellule che si distribuiscono nell'interstizio stromale occupando comunque una percentuale variabile dal 5 al 10% degli spazi intertrabecolari. La caratterizzazione fenotipica di tale infiltrato mediante l'uso di anticorpi diretti contro le catene leggere kappa e lambda delle immunoglobuline consente usualmente di confermare la natura monotipica delle plasmacellule mostrando alterazione del normale rapporto tra kappa e lambda (pari a circa 2-3:1). In alcuni casi, quest'ultimo non appare chiaramente modificato all'indagine immunoistochimica e ciò è verosimilmente imputabile al fatto che il clone plasmacellulare non è sufficientemente grande da modificare sensibilmente il rapporto kappa/lambda, a maggior ragione se tale aberrazione si inserisce in un contesto osteomidollare in cui esista un'esuberante reazione plasmacellulare politipica, reperto di non raro riscontro

TERAPIA DELLE NEOPLASIE LINFATICHE HCV-ASSOCIATE

Alla luce delle osservazioni sopra riportate per la CM, appare oggi razionale l'inclusione dell' IFN (con o senza RBV) negli schemi terapeutici utilizzati anche in corso di LNH idiopatico, non crioglobulinemico HCV-positivo, nonostante che non siano ancora disponibili i risultati, in termini di risposta virologica ed epatologica, di trials sufficientemente completi. Studi del tutto recenti, effettuati su categorie particolari di linfomi HCV-associati, risultano peraltro in pieno accordo con tale impostazione di pensiero (150).

6 - HCV e PATOLOGIA RENALE

L'associazione tra infezione cronica da HCV e glomerulonefrite è riconosciuta da tempo. Le alterazioni glomerulari correlate all'infezione da HCV possono manifestarsi tanto nel rene nativo quanto nel rene trapiantato (162, 163).

Al momento attuale tre malattie renali sono state riconosciute in associazione all'HCV (65, 164, 165) :

- Crioglobulinemia mista (nefropatia crioglobulinemica)
- Glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP)
- Nefropatia membranosa (NM)

Negli adulti la forma più frequente di coinvolgimento renale in corso di infezione HCV è la nefropatia crioglobulinemica. Nel Registro Italiano delle biopsie renali viene riportata una prevalenza del 2% circa di tutte le biopsie effettuate in Italia (Gruppo di Immunopatologia Renale. Registro Italiano delle Biopsie Renali. Accessibile al sito <http://www.sined.net/sin/ipr/news.htm>. Accesso verifica Maggio 2002).

CRIOGLOBULINEMIA MISTA (NEFROPATIA CRIOGLOBULINEMICA)

La malattia renale associata alla CM si manifesta con ematuria, proteinuria (talvolta in range nefrosico, cioè con valori maggiori di 3 g/24 ore), edemi declivi, insufficienza renale di grado variabile. Le manifestazioni istologiche della malattia renale associata alla CM sono simili a quelle della glomerulonefrite membranoproliferativa idiopatica, da cui si distinguono per la presenza di trombi capillari alla microscopia ottica. L'esame istologico mette in evidenza un ispessimento della membrana basale dei glomeruli, proliferazione cellulare e infiltrazione di macrofagi circolanti.

Caratteristiche lesioni della nefropatia crioglobulinemica:

- Trombi intraluminari formati da crioglobuline precipitate
- Depositi diffusi di IgM nelle anse capillari
- Depositi subendoteliali che appaiono alla microscopia elettronica come strutture complesse che assomigliano ad impronte digitali. I depositi subepiteliali sono invece rari.

Mediante tecniche di immunoistochimica è stato possibile dimostrare la presenza di HCV nei glomeruli, lungo le anse capillari e nel mesangio. La presenza di HCV in immunocomplessi depositati nei glomeruli è ritenuta evidenza del coinvolgimento del virus nella patogenesi della malattia (166). Una malattia renale è presente nel 20 % dei pazienti con CM al momento della diagnosi. Nel corso della malattia la comparsa di un coinvolgimento renale è documentabile nel 35-60 % dei casi con CM di tipo II e i sintomi possono apparire anche a distanza di anni dalla diagnosi di CM (163). Nella storia naturale della CM, la presenza di impegno renale costituisce uno dei principali indici prognostici negativi (73).

GLOMERULONEFRITE MEMBRANOPROLIFERATIVA

Alcuni pazienti con HCV hanno una malattia renale che all'esame istologico viene classificata come glomerulonefrite membranoproliferativa senza che sia dimostrabile la contemporanea presenza di crioglobuline (164). Questa forma di malattia renale fino agli anni 80 era relativamente comune, mentre ora è assai rara. E' stato ipotizzato che l'apparente scomparsa della malattia possa essere dovuta ad una minore frequenza dell'infezione da HCV. Questa tesi non è provata; inoltre l'associazione tra HCV e glomerulonefrite membranoproliferativa di tipo I varia significativamente nelle casistiche: per esempio in una serie di casi francesi l'associazione era assai rara, mentre in uno studio giapponese era presente in sei casi su dieci.

NEFROPATIA MEMBRANOSA

La nefropatia membranosa è un'altra malattia glomerulare che è stata riportata in associazione con un'infezione da HCV (165). In questa malattia glomerulare sono assenti l'ipocomplementemia ed il fattore reumatoide. Sul piano istologico, la nefropatia membranosa si caratterizza per l'ispessimento delle membrane basali glomerulari, che contengono depositi immuni all'esame in microscopia elettronica, ma sono assenti gli aspetti proliferativi. Sul piano clinico la nefropatia membranosa si manifesta con sindrome nefrosica.

DIAGNOSI DEL COINVOLGIMENTO RENALE IN PAZIENTI HCV

Ogni paziente che presenta una nefropatia con le caratteristiche delle tre condizioni cliniche descritte di seguito dovrebbe essere studiato per valutare se sia affetto da HCV, se già non è noto per essere HCV positivo. Sebbene molti pazienti abbiano un aumento delle transaminasi quando viene scoperta la nefropatia, spesso non è nota una storia di epatopatia e le transaminasi sono normali. Per converso, è utile che nell'ambito dei periodici controlli di follow up dei pazienti HCV positivi sia incluso regolarmente un esame delle urine e la determinazione della creatininemia. Quando questi esami sono normali, non è necessario altro approfondimento, mentre è indicato un parere nefrologico nel caso siano presenti alterazioni urinarie e/o insufficienza renale espressa da un aumento della creatininemia.

Gli esami di screening nefrologico successivi comprendono, tra l'altro: clearance della creatinina, azotemia, elettroliti, elettroforesi plasmatica, complementemia, dosaggio delle proteine urinarie di 24 ore; ecografia renale.

La diagnosi differenziale tra le tre forme citate richiede un accertamento istologico. Le indicazioni ad eseguire la biopsia renale in un paziente con HCV e segni di danno renale non sono standardizzate. La presenza di proteinuria superiore ad 1-2 gr/24 ore, di insufficienza renale acuta, di sedimentazione urinario "attivo" (caratterizzato da ematuria e cilindruria), in associazione tra loro, ma anche da soli, sono nella maggior parte dei centri nefrologici indicazioni sufficienti all'esecuzione della biopsia. Sono al contrario controindicazioni alla biopsia la presenza di rene unico, reni di dimensioni ridotte, alterazioni dell'emostasi o piastrinopenia, mancanza di comprensione del consenso informato.

MANIFESTAZIONI CLINICHE DEL DANNO RENALE DA CM

Dato che la nefropatia associata a CM è la forma più frequente di danno renale in associazione ad infezione HCV, dedicheremo a questo argomento maggiore spazio.

Frequentemente i pazienti con CM hanno uno o più segni subclinici di coinvolgimento renale, rappresentati da

- ematuria asintomatica
- proteinuria di grado non nefrosico (<3 g/24 ore)
- funzione renale normale o solo moderatamente ridotta (creatinina < 1,5 mg%)

Nel 30% dei casi la manifestazione clinica della CM può essere una sindrome nefritica acuta (61) caratterizzata da

- proteinuria severa
- ematuria microscopica o macroscopica, con sedimentazione urinario attivo (cilindri)
- insufficienza renale acuta (oligurica nel 5% dei casi)

Nel 20% dei casi la manifestazione clinica della CM è una sindrome nefrosica

- proteinuria severa
- ipoalbuminemia
- edemi

Nell'80% dei pazienti con coinvolgimento renale in corso di CM è presente ipertensione arteriosa (167).

La gravità della malattia può essere molto variabile (167). Le manifestazioni renali possono rappresentare un evento clinico che indica una prognosi sfavorevole della CM, anche se il decorso può essere assai variabile. Una remissione clinica è osservabile in percentuali che raggiungono il 10-15% dei pazienti in cui l'esordio della malattia renale è stata una sindrome nefritica. Nel 30% dei casi l'andamento clinico invece è lento e la funzione renale viene mantenuta per molti anni, anche in presenza di persistenti alterazioni urinarie o di iniziale insufficienza renale. Infine un 20% circa dei pazienti ha episodi di riaccensione acuta della malattia con sindrome nefritica.

A lungo termine la nefropatia da CM può progredire verso l'insufficienza renale cronica terminale che richiede la dialisi. Tuttavia questo avviene in una percentuale relativamente modesta di pazienti (meno del 15%), anche perché la mortalità per altre cause è relativamente elevata. In una casistica di pazienti con nefropatia e CM, seguiti in media per più di 10 anni, 42 pazienti su 105 sono deceduti per complicanze extrarenali e 15 hanno cominciato la dialisi per uremia terminale (168). Nello stesso gruppo di pazienti, un aumentato rischio di uremia terminale si associava ad età avanzata, maggiore grado di insufficienza renale alla diagnosi, splenomegalia, porpora, ipocomplementemia (168).

TERAPIA

Nelle forme in cui il danno renale si manifesta come glomerulonefrite membranoproliferativa o glomerulonefrite membranosa, la decisione di trattare con una terapia specifica (steroidi associati a immunosoppressori) è affidata alla gravità del quadro clinico ed all'attitudine del centro di Nefrologia. Infatti la terapia di queste due forme istologiche nella loro variante idiopatica è molto controversa. Inoltre le evidenze di efficacia di terapie immunosoppressive non sono affatto robuste. Pertanto in questi casi si può procedere con un trattamento conservativo volto a controllare la ritenzione idrica con diuretici e dieta iposodica, ridurre la proteinuria con ACE inibitori, migliorare l'assetto lipidico con dieta e statine.

Quindi la terapia delle manifestazioni renali associate all'infezione HCV è essenzialmente la terapia della MCS. Questa si compone di una *terapia della fase acuta* della nefropatia crioglobulinemica, quando la malattia si manifesta con porpora, insufficienza renale, manifestazioni sistemiche e una *terapia della fase cronica*.

Nella *fase acuta* della malattia renale è in genere consigliato che il trattamento antivirale venga sospeso od evitato. A prescindere dai limiti esposti sopra, di fatto in queste fasi la maggior parte dei Nefrologi impiega abitualmente una terapia combinata così articolata :

- Steroidi: boli di 500-1000 mg di metilprednisolone al giorno per 3 giorni consecutivi seguita da prednisone per 6 mesi (inizialmente 0,5 mg/kg, da ridurre nel corso di poche settimane fino ad una dose minima di mantenimento - in genere non più di 10 mg)
- Ciclofosfamide (2-3 mg/kg) per 3-4 mesi, nei casi con grave insufficienza renale
- Plasmaferesi: scambi di 3 litri di plasma per 3 volte alla settimana per 2 o 3 settimane o fino alla remissione

Il razionale è quello di ridurre l'attività infiammatoria delle lesioni renali con lo steroide, di rimuovere le crioglobuline circolanti con la plasmaferesi e ridurre la formazione di nuovi anticorpi con la

ciclofosfamide (167, 169). La maggior parte delle esperienze cliniche riportate in letteratura limita l'impiego della plasmateresi per brevi periodi durante la fase di acuzie della malattia, ma sono descritte anche casistiche in cui l'impiego della plasmateresi è stato protratto con sedute ad intervalli regolari fino a 24 mesi (170, 171).

Lo schema di terapia della fase acuta della CM non è stato formalmente testato con studi clinici controllati, che sono difficili da attuare data la gravità del quadro clinico, mentre sono disponibili numerosi resoconti aneddotici che dimostrano la sua efficacia a breve e lungo termine, tanto che è diventata prassi clinica accettata. Questo nonostante steroidi e ciclofosfamide possano essere dannosi in quanto possono aumentare la carica virale e peggiorare la malattia del fegato. Tuttavia, in un gruppo di più di 50 pazienti trattati con questo schema non sono state riportate significative variazioni della malattia epatica (103). Merita infine di essere segnalato che in letteratura sono stati riportati casi aneddotici di pazienti con CM e severo coinvolgimento renale, refrattari alla terapia tradizionale, trattati in un caso con micofenolato mofetile (116) e nell'altro con l'anticorpo anti-CD20 rituximab (172).

Più complesso è il problema del *trattamento a lungo termine* delle forme acute che siano state controllate con la terapia sopra descritta e la terapia delle forme con modesti segni di danno renale. In genere un mantenimento di piccole dosi di steroidi è seguito da molti centri, ma c'è la preoccupazione che una terapia prolungata attivi la replicazione virale (173). Nelle forme con segni di attività molto modesti (per esempio microematuria senza insufficienza renale, e senza sintomi sistemici) può essere raccomandata una terapia conservativa senza farmaci attivi sul sistema immune, basata su un rigoroso controllo della pressione arteriosa con ACE inibitori e diuretici, dieta iposodica e a moderato contenuto di proteine.

TERAPIA ANTI-VIRALE

Sebbene ci siano delle preoccupazioni che una terapia anti-virale possa comportare qualche rischio nel caso sia presente un danno renale, si considera che tale rischio non superi i potenziali effetti favorevoli della terapia antivirale, che in alcuni centri viene associata a piccole dosi di steroidi per controllare i sintomi sistemici. Sfortunatamente il numero degli studi controllati specificamente rivolti a valutare i risultati delle terapie anti-virali nelle forme di HCV con coinvolgimento renale sono relativamente pochi ed includono pochi pazienti. Inoltre i risultati di questi studi sono contraddittori.

INTERFERONE ALFA

Alcuni di questi studi documentano l'efficacia della terapia antivirale con interferone alfa in pazienti con malattia renale HCV correlata. Uno studio ha dimostrato che un periodo di terapia dai 6 ai 12 mesi con questo farmaco in 14 pazienti con glomerulonefrite membranoproliferativa (con o senza crioglobuline) induceva una scomparsa dell'RNA virale nel 50% dei casi (164). Contemporaneamente la proteinuria diminuiva da 6,1 a 1,3 gr/24 ore. Nella metà dei casi in cui non si aveva scomparsa dell'RNA si notava comunque una riduzione della proteinuria, sebbene non significativa (da 6,1 a 4,2 gr/24 ore). La funzione renale invece non si modificava.

Uno studio con un numero maggiore di pazienti (n=53), randomizzati a ricevere interferone alfa o terapia convenzionale, ha documentato una scomparsa della carica virale nel 60 % dei casi di pazienti con crioglobulinemia da HCV. Solo tra questi pazienti si riportava una riduzione della creatinemia, e un miglioramento delle lesioni cutanee vasculitiche, mentre nei pazienti la cui carica virale rimaneva elevata la funzione renale non migliorava (174). In un altro studio è stato condotto un con-



fronto diretto tra terapia steroidea e interferone alfa in un gruppo di pazienti con CM, insufficienza renale lieve e proteinuria (164). Nel gruppo trattato con steroidi si ottenevano una remissione parziale (riduzione della proteinuria >50%, diminuzione della creatinina, scomparsa dei sintomi, riduzione del criocrito > 50%) in 4 su 6 pazienti, mentre nel gruppo trattato con interferone si avevano 4 casi di remissione parziale e uno di remissione completa (scomparsa della proteinuria, dei sintomi e normalizzazione della creatinina).

In questo come in tutti gli altri studi però, la cessazione della terapia con l'antivirale si associava ad una ricaduta della malattia renale. La dose ideale di interferone non è stata stabilita con certezza. Nello studio sopra citato (175) sono state impiegate dosi di 3 milioni di unità per 3 volte alla settimana per 1 anno (se dopo 6 mesi la carica virale non si era abbattuta il trattamento poteva essere sospeso), e gli effetti collaterali riportati sono stati relativamente pochi e non severi. È stato anche proposto un trattamento con alte dosi di interferone (10 milioni al giorno per 2 settimane, seguito da 10 milioni 3 volte alla settimana per 6 mesi), tuttavia la casistica riportata in letteratura è di poche unità di pazienti (176).

RIBAVIRINA

L'associazione della ribavirina (0.8-1 g die) all'interferone alfa è stata sperimentata con successo nei pazienti con CM, ma non sono stati ancora pubblicati sufficienti studi specificamente disegnati per valutare la sua efficacia nelle forme di HCV con malattia renale. In letteratura sono stati riportati casi di riduzione della proteinuria e/o di miglioramento della funzione renale in pazienti trattati con l'associazione di ribavirina e interferone (112, 177).

Uno studio condotto in Israele su 9 pazienti affetti da crioglobulinemia mista HCV correlata che si erano mostrati refrattari al trattamento con interferone soltanto, ha dimostrato che l'associazione della ribavirina all'interferone normalizzava le transaminasi in 4 pazienti, riduceva il criocrito a livelli non misurabili in 7 pazienti e riduceva la proteinuria in due dei tre pazienti che avevano questa anomalia urinaria prima del trattamento (178).

Emerge comunque da questa brevissima revisione delle evidenze dalla letteratura, la mancanza di dati provenienti da studi controllati con adeguata potenza statistica che possano suggerire quale sia oggi la terapia di prima scelta da seguire. Data la potenzialità dell'associazione di interferone e ribavirina di ottenere e mantenere una risposta virologica più sostenuta -come dimostrato in pazienti HCV-positivi senza crioglobulinemia o malattia renale- dovrebbero essere disegnati studi clinici per rispondere al quesito se sia indicata anche nelle forme con malattia renale.

In conclusione si può proporre questo possibile algoritmo di trattamento:

- CM con funzione renale normale, minime alterazioni urinarie, senza proteinuria: possibile attuazione di terapia antivirale con interferone e ribavirina, nel caso sia indicata dalle altre manifestazioni dell'infezione (vedi anche trattamento della CM)
- CM con sindrome nefrosica, funzione renale normale o stabile: possibile attuazione di terapia antivirale con interferone e ribavirina (vedi anche trattamento della CM)
- CM con gravi sintomi sistemici, sindrome nefritica, insufficienza renale acuta o rapidamente progressiva: sconsigliata terapia antivirale

TOSSICITÀ DEI FARMACI ANTIVIRALI E NEFROPATIA

L'impiego dei farmaci antivirali potrebbe essere limitato dalla loro tossicità nell'insufficienza renale.

(A) Interferone.

Sono stati riportati casi di danno glomerulare indotto o esacerbato dalla somministrazione di interferone. In una serie di 23 pazienti con infezione cronica da HCV è stata descritta la comparsa o l'incremento della proteinuria dopo l'inizio della terapia con interferone, in media dopo 12 giorni (179). L'esame istologico documentava una glomerulonefrite mesangioproliferativa in 9 pazienti, membranoproliferativa in 1 e sclerosi glomerulare in 1. La proteinuria scompariva dopo la sospensione del trattamento anti-virale. La possibilità che il farmaco induca una malattia glomerulare è stato suggerita anche da report di casi in cui l'interferone era impiegato per curare tumori o altre malattie non epatiche (180), così come sono stati descritti casi di malattie glomerulari migliorate dalla somministrazione dell'antivirale (180). Pertanto, al momento non ci sono sufficienti evidenze per affermare che il trattamento con interferone sia controindicato in presenza di malattia renale.

(B) Ribavirina.

La clearance della ribavirina è ridotta nei pazienti con insufficienza renale e la dialisi non rimuove il farmaco. L'impiego di questo farmaco antivirale non è perciò raccomandato in soggetti che abbiano meno di 50 ml/min di clearance della creatinina.

7 - ALTRI DISORDINI EXTRAEPATICI

A parte i DLP già considerati, esiste tutta una serie di patologie extraepatiche per le quali è stata suggerita un'associazione con l'infezione da HCV. Questi includono la fibrosi polmonare idiopatica, il lichen planus, la sindrome di Sjogren, le tiroiditi autoimmuni e la porfiria cutanea tarda. In taluni casi, una possibile associazione è solo suggerita da isolate osservazioni aneddotiche (vedi tavola 1). L'esistenza di un nesso patogenetico fra l'HCV ed alcuni di tali disordini è stata talora suggerita dall'osservazione della risposta alla terapia antivirale. Peraltro esistono anche casi in cui lo stesso trattamento antivirale con interferone è stato reputato il vero responsabile dell'associazione rilevata (1).

HCV E TIROIDE

In pazienti con infezione cronica da HCV è stata riportata un'alta prevalenza di disordini della tiroide (181-187). In generale nell'epatite C cronica si possono osservare tutte le forme di disordini tiroidei, cioè l'ipo- o l'ipertiroidismo, la tiroidite di Hashimoto, o la presenza autoanticorpi in assenza di altre manifestazioni (181-184, 187). Di fatto la prevalenza di varie disfunzioni tiroidee e di anticorpi antitiroide circolanti è generalmente alta nei pazienti con epatite C se paragonati con pazienti affetti da epatite B o D (184, 188, 189) o con soggetti sani controllo (185, 187). La frequenza di alti livelli di anticorpi antitiroide circolanti nei pazienti HCV-positivi varia dal 2 al 48% (181-186, 187). In certi studi non si è riusciti a dimostrare una più alta prevalenza di infezione nei pazienti con tiroidite di Hashimoto, ovvero una prevalenza più elevata di anticorpi anti-tiroide in donatori di sangue con infezione da HCV rispetto ai controlli (190). Un ruolo importante nello sviluppo di disordini tiroidei autoimmuni può essere giocato da differenze geografiche (137), variabilità genetica delle popolazioni studiate (191), cofattori ambientali come l'apporto di iodio con la dieta o la presenza di altri agenti infettivi (192, 193).

Un'alta prevalenza di infezione da HCV è stata inoltre riportata in pazienti con tireopatie autoimmuni da alcuni autori (194-196), ma non confermata in altri studi (182, 188, 197-199). Oltre ai fattori sopra menzionati, differenti approcci metodologici, tra cui diversi criteri di selezione dei pazienti, possono rendere conto di osservazioni tanto discordanti. Tuttavia un'attenta analisi degli studi pubblicati dimostra che il disordine tiroideo più frequentemente osservato nei pazienti con infezione cronica da HCV è rappresentato dalla presenza di anticorpi circolanti antiperossidasi tiroidea in soggetti di sesso femminile (184). Recentemente è stata descritta in pazienti con infezione da HCV una prevalenza del 40% di crioglobuline circolanti; questi pazienti presentavano frequentemente bassi livelli di T4 (2).

Un ipotiroidismo subclinico è stato osservato con prevalenza variabile dal 2% al 9% in pazienti con infezione cronica da HCV ed in particolare in quelli con sindrome crioglobulinemica (183, 188). E' stato anche suggerito che tali pazienti possano essere particolarmente suscettibili allo sviluppo di una tiroidite di Hashimoto o di un morbo di Graves a seguito della terapia con α -IFN e che detto farmaco sia in grado di ridurre direttamente l'organificazione intratiroidea dello ioduro. Di fatto, la terapia con alfa interferone è associata con lo sviluppo di autoimmunità e/o disfunzione tiroidea nel 5-12% dei pazienti con infezione da HCV (183, 184, 186, 200). Questi disordini si risolvono in più del 50% dei casi dopo almeno 6 mesi dall'interruzione della terapia con α -IFN (183, 184). E' da tener presente, a tal riguardo, che una disfunzione tiroidea è osservabile non raramente in pazienti sottoposti a terapia con α -IFN per un'epatopatia da cause diverse (non correlate all'HCV) e che la terapia con interferone alfa può indurre, rivelare o esacerbare vari disordini autoimmuni. Alla luce di tali dati è possibile che nella patogenesi di tali forme sia importante l'instaurarsi di una cooperazione fra α -IFN e HCV.

E' infine da notare il recente rilievo di un'elevata prevalenza di carcinoma papillare della tiroide in pazienti con epatite C (200, 201). Tale dato è stato successivamente confermato in uno studio caso controllo in una zona con elevata prevalenza di infezione da HCV nel sud Italia (202).

Complessivamente, I dati disponibili indicano un'elevata prevalenza di disordini tiroidei nei pazienti con infezione da HCV. L'importanza clinica di alcuni di tali disordini tiroidei, rendono necessario un attento monitoraggio della tiroide in tali pazienti.

ITER DIAGNOSTICO DELLE TIREOPATIE IN PAZIENTI CON INFEZIONE DA HCV

La diagnosi dei disordini tiroidei comprende un'accurata anamnesi volta al riconoscimento di fattori di rischio per tireopatia (familiarità, residenza in zone di carenza iodica, radioterapia, farmaci, etc) (203) e di sintomi di disfunzione tiroidea (ipo- o ipertiroidismo). L'esame obiettivo del collo può dimostrare la presenza di un gozzo, di una tiroidite (consistenza aumentata, superficie lobulata), o di noduli tiroidei. L'ecografia tiroidea e' in grado di precisare la volumetria della tiroide, la presenza di un pattern ipoecogeno indicativo di una tiroidite, o di noduli tiroidei (204-206). Il dosaggio degli ormoni tiroidei liberi e del TSH ci permette di porre diagnosi di ipo- o ipertiroidismo (205), mentre il dosaggio degli anticorpi circolanti (antitireoglobulina, antiperossidasi tiroidea, anti recettore del TSH) conferma la presenza di autoimmunità tiroidea (206). La scintigrafia tiroidea e il dosaggio dello iodio urinario sono utili per la diagnosi di noduli iperfunzionanti, tiroiditi distruttive o sindromi da eccesso di iodio. L'agoaspirato tiroideo è il metodo di scelta per precisare la natura (benigna, maligna, etc) dei noduli tiroidei (204).

TIROIDE E TRATTAMENTO CON α -IFN

Per quanto concerne l'ambito tiroideo, il trattamento interferonico è controindicato nei pazienti con malattie tiroidee non controllate con la terapia e costituiscono controindicazioni relative la presenza di tireopatie, in particolare se con ipertiroidismo, e la positività significativa per autoanticorpi organo o non organo specifici, senza segni clinici di malattia autoimmune attiva. La possibilità di un buon controllo farmacologico della tireopatia consente di regola la prosecuzione del trattamento antivirale.

Nei pazienti candidati al trattamento è indicato effettuare, prima dell'inizio della terapia, uno screening per anticorpi anti-tiroide (anti-TPO), l'assetto ormonale tiroideo ed il dosaggio del TSH. E' opportuno inoltre effettuare regolari controlli del TSH nel corso del trattamento e, qualora i valori siano alterati, la decisione di continuare la terapia o di sospendere il trattamento dovrà essere considerata individualmente, in base al profilo di risposta e alle caratteristiche del paziente.

HCV E SINDROME DI SJÖGREN

La sindrome di Sjögren è una malattia autoimmune che colpisce le ghiandole esocrine e si presenta solitamente con xerostomia e xeroftalmia (sindrome secca) dovute ad un coinvolgimento delle ghiandole salivari e lacrimali in presenza di alterazioni immunologiche rappresentate dal riscontro di autoanticorpi antinucleari ed anti-ENA (SSA/Ro, SSB/La) (Tavola.4).

In assenza di una malattia autoimmune sistemica associata, i pazienti con simili manifestazioni possono essere definiti come affetti da sindrome di Sjögren primaria. Lo spettro clinico della sindrome varia da una malattia autoimmune organo-specifica (esocrinopatia autoimmune) ad un processo sistemico con diverse manifestazioni extraghiandolari.

Vari virus, fra cui gli herpes e i retrovirus, sono stati sospettati giocare un ruolo nell'innescare il disordine linfoproliferativo che è alla base della sindrome di Sjögren, malattia la quale, analogamente alla CM, può culminare nello sviluppo di un linfoma maligno.



Una correlazione tra la sindrome di Sjögren e l'infezione da HCV è stata postulata per la prima volta da Haddad et al nel 1992. Successivamente, numerosi studi hanno dimostrato che una sindrome di Sjögren, con le stesse caratteristiche clinico-istologiche osservate nella Sjögren primaria, può essere presente in pazienti con infezione cronica da HCV. Studi epidemiologici hanno mostrato l'esistenza di una stretta correlazione fra la SS e l'HCV ed è stata suggerita la presenza di CM nei pazienti con SS HCV-associata. Inoltre, è da notare che topi transgenici portatori dei geni del rivestimento esterno del virus sono stati recentemente dimostrati sviluppare un'esocrinopatia coinvolgente le ghiandole salivari e lacrimali, e che assomiglia alla SS umana (207). In considerazione della frequente associazione fra SS e CM nei pazienti HCV-positivi, così come della possibile evoluzione della SS in un LNH a cellule B (140), la sindrome osservata nei pazienti infetti può essere interpretata come una delle possibili manifestazioni cliniche del disordine linfoproliferativo HCV-correlato. Tuttavia, il ruolo patogenetico dell'infezione da HCV nello sviluppo della SS, come pure le caratteristiche che distinguono la SS classica dalla sindrome HCV-associata, sono oggetto di discussione (208). In effetti, è generalmente ammesso che nei pazienti HCV-positivi con o senza CM è frequentemente riscontrabile una sindrome secca, peraltro generalmente senza il tipico pattern autoanticorpale (209); l'HCV sarebbe, in pratica, responsabile di un complesso sintomatologico Sjögren-like. In sintesi è possibile affermare che qualora sia presente un simile disordine autoimmune è opportuno ricercare attentamente un'infezione da HCV, ma soprattutto che l'infezione da HCV potrebbe essere considerata un criterio di esclusione per la diagnosi di sindrome di Sjögren primaria, in particolare se sono presenti crioglobuline, ipocomplementemia ed una bassa prevalenza di anticorpi anti-SSA/Ro.

Tavola 4 - SINDROME DI SJÖGREN

(Criteri diagnostici dell'European Group)

- I. SINTOMI OCULARI: risposta positiva ad almeno uno dei seguenti quesiti:
 - 1) Secchezza e fastidio oculare quotidiani e persistenti per un periodo superiore a tre mesi
 - 2) Sensazione ricorrente di sabbia e corpo estraneo
 - 3) Utilizzo di lacrime artificiali più di tre volte al giorno
- II. SINTOMI ORALI: risposta positiva ad almeno uno dei seguenti quesiti:
 - 1) Sensazione di secchezza orale quotidiana per un periodo superiore a tre mesi
 - 2) Tumefazioni parotidiche ricorrenti e persistenti
 - 3) Utilizzo di liquido per l'ingestione di cibi secchi
- III. SEGNI OCULARI: positività ad almeno uno dei seguenti test:
 - 1) Test di Shirmer (< 5 mm in 5 minuti)
 - 2) Test al rosa Bengala (score > 4 secondo van Bijsterveld)
- IV. ESAME ISTOPATOLOGICO: biopsia delle ghiandole salivari minori: *focus score* > 1 (il *focus score* è dato dal numero di foci osservato in 4 mm² di tessuto ghiandolare; per *focus* si intende un agglomerato di almeno 50 cellule mononucleate attorno al dotto centrolobulare)
- V. GHIANDOLE SALIVARI: interessamento delle ghiandole salivari documentato dalla positività di almeno uno dei seguenti test:
 - 1) Scintigrafia delle ghiandole salivari
 - 2) Scialografia delle parotidi
 - 3) Misura del flusso salivare (non stimolato) (< 1.5 ml in 15 minuti)
- VI. AUTOANTICORPI: presenza di almeno una delle seguenti specificità:
 - 1) Anticorpi anti-Ro (SSA) o La (SSB)
 - 2) Anticorpi antinucleari (ANA)
 - 3) Fattore reumatoide

Criteri di esclusione: precedente diagnosi di linfoma, AIDS, sarcoidosi, GVHD*
[*suggerita aggiunta di: "precedente diagnosi di infezione HCV"]

SS PRIMARIA: presenza di almeno 4 criteri
SS SECONDARIA: presenza dei criteri I o II e di almeno 2 dei criteri III, IV, V



HCV E FIBROSI POLMONARE IDIOPATICA (FPI)

L'esistenza di un legame patogenetico fra infezione HCV e FPI è stata suggerita sulla base della frequenza più elevata di marcatori HCV nei pazienti con FPI che nei controlli normali (210, 211) e dall'osservazione di casi di epatite cronica HCV-correlata trattati con interferone alfa che sviluppavano una FPI. Inoltre, esiste l'osservazione di un aumento della conta dei linfociti e neutrofili nel lavaggio broncoalveolare dei pazienti con infezione cronica da HCV (212), ciò che suggerisce che l'infezione da HCV possa innescare un'alveolite (213).

Tuttavia esistono dati epidemiologici contrastanti, provenienti soprattutto dal Regno Unito e tale associazione rimane a tutt'oggi discussa (1). Il fatto che la CM possa essere complicata da un coinvolgimento dell'interstizio polmonare suggerisce che l'associazione fra HCV e FPI possa essere indiretta, almeno in alcuni casi, e dovuta alla sottostante CM HCV-correlata (214).

HCV E MANIFESTAZIONI DERMATOLOGICHE

Per quanto concerne le manifestazioni dermatologiche, se si fa eccezione per la porpora palpabile secondaria alla vasculite leucocitoclastica (la manifestazione più frequentemente osservata in corso di CM) l'infezione da HCV è stata anche associata con una serie di differenti disordini cutanei:

PORFIRIA CUTANEA TARDA (PCT)

Una forte associazione fra la variante sporadica della PCT (disordine metabolico caratterizzato da una ridotta attività epatica dell'uroporfirinogeno decarbossilasi) e l'infezione HCV è stata suggerita dall'osservazione di un'elevata prevalenza (>50%) di marcatori HCV in tali pazienti, soprattutto in studi provenienti dal sud dell'Europa (1, 215-218).

Tuttavia, nei pazienti HCV-positivi senza PCT non è stato possibile evidenziare alcuna alterazione nel metabolismo porfirinico (219, 220), ciò che suggerisce un ruolo indiretto dell'infezione che, verosimilmente, agisce solo come fattore scatenante in soggetti geneticamente predisposti.

In uno studio italiano, la maggior parte dei pazienti con PCT mostrava un'epatite HCV-correlata assieme ad alcuni fenomeni clinico-sierologici autoimmuni innescati dall'infezione stessa (217).

LICHEN PLANUS

Il Lichen è una malattia muco-cutanea caratterizzata da infiltrati infiammatori con prevalenza di cellule CD4 positive, degenerazione vacuolare dell'epitelio basale più profondo e dalla presenza di corpi acidofili che potrebbero essere cheratociti in apoptosi (221). Colpisce circa l'1% della popolazione generale (222). L'eziologia è sconosciuta; il danno sembra essere sostenuto da una risposta immune cellulo-mediata verso antigeni espressi sulle cellule epiteliali della mucosa (223).

Studi epidemiologici hanno dimostrato l'esistenza di correlazione tra lichen, soprattutto a localizzazione orale (OLP), ed infezione cronica da HCV (224). La prevalenza di sierologia positiva per infezione da HCV in una vasta popolazione di pazienti con OLP è stata stimata intorno al 27% (225). Risultati a favore dell'esistenza di tale correlazione derivano da studi condotti in aree geografiche quali Giappone (224) e Sud Europa (225-228), ma non sono confermati da altri condotti soprattutto sulla popolazione anglosassone (229-232). Una maggiore frequenza dell'allele HLA-DR6 è stata osservata nei soggetti con OLP ed infezione da HCV rispetto a pazienti anti-HCV negativi (225). A favore della correlazione fra lichen ed infezione da HCV vi è la dimostrazione della presenza di catene di HCV-RNA a polarità positiva e negativa, mediante tecniche di PCR, condotte su prelievi biopsici di mucosa orale in corso di lichen (233). Tuttavia, data l'elevata sensibilità della PCR, questi risultati potrebbero essere conseguenti a contaminazione delle biopsie con sangue infetto. Con tale metodica non è inoltre possibile identificare in quali tipi di cellule si replica il virus, che potreb-

be essere presente solo a livello di cellule linfo-mononucleate dell'infiltrato infiammatorio lesionale, tenuto conto anche del noto linfotropismo del virus C (45, 234). La possibilità che il virus possa replicare nelle cellule epiteliali della mucosa orale dei soggetti HCV-RNA +, indipendentemente dalla presenza o meno di lesioni al cavo orale, è stato comunque suggerito anche da studi di ibridazione in situ (235). La percentuale di cellule epiteliali della mucosa orale positive per HCV-RNA (4.4%-14.3%) è tuttavia risultata nettamente inferiore rispetto al numero di epatociti che generalmente risultano infettati, pur esprimendo, entrambi i tipi di cellule, la molecola CD81, considerata uno dei putativi recettori di membrana per il virus C (28). La concentrazione di HCV-RNA nella mucosa orale non sembra inoltre correlare con il livello di viremia, né con l'entità della lesione. Sono in corso studi mirati all'analisi di sequenze genomiche per stabilire se particolari ceppi virali possano più facilmente di altri infettare l'epitelio orale (236). Anche se non sono obbligatoriamente evidenziati infiltrati linfocitari intorno alle cellule infettate, l'infiltrato linfocitario, riscontrato tipicamente nella sede di comparsa della lesione potrebbe essere il principale responsabile della progressiva distruzione del tessuto epiteliale (237). Resta da stabilire in modo definitivo se la risposta linfocitaria sia diretta verso neoantigeni espressi sulla cellula infettata dal virus C o verso proteine del virus stesso, in grado di determinare una risposta T linfocitaria specifica,

HCV E DIABETE MELLITO

Rimane ancora molto discussa la possibile associazione tra diabete mellito e infezione da HCV. Recentemente, in pazienti con infezione cronica da HCV è stata riportata un'alta prevalenza di diabete mellito tipo II (238-243). In una recente indagine epidemiologica effettuata negli Stati Uniti (240) su 9841 persone, il rischio di diabete mellito tipo II era circa 3 volte più alto nei pazienti con epatite C di età superiore ai 40 anni, rispetto alle persone HCV negative; non veniva invece riscontrata alcuna associazione con il diabete tipo I. Mason e coll. (244) hanno recentemente suggerito che l'HCV (particolarmente il genotipo 2a) agisca come fattore di rischio indipendente dalla patologia epatica. Peraltro, anche se la maggior parte degli studi concorda con i dati soprariportati, alcuni studi riferiscono un'associazione negativa fra infezione da HCV e diabete (245). Possono render conto di osservazioni così discordanti vari fattori, fra cui differenti approcci metodologici quali, ad esempio, l'uso di diversi criteri di selezione dei pazienti. Inoltre, Caronia e coll. (239) hanno rilevato un'associazione che però è significativa solo per i pazienti affetti da cirrosi epatica.

Nei pazienti con infezione da HCV la comparsa di diabete tipo II è associata con una elevata insulino resistenza, ma non con la presenza di anticorpi antiinsule pancreatiche (246). La terapia con alfa interferone (IFN) è invece associata con lo sviluppo di autoimmunità contro le insule pancreatiche e la comparsa di diabete mellito tipo I, talora grave (247-249).

Allo stato attuale delle conoscenze, l'esistenza di simili dati, suggerisce l'opportunità di un attento monitoraggio della glicemia nei pazienti con infezione cronica da HCV.

ITER DIAGNOSTICO DEL DIABETE MELLITO IN PAZIENTI CON INFEZIONE DA HCV

Come è noto, la diagnosi di diabete mellito (American Diabetes Association) si basa sul rilievo di un valore di glicemia a digiuno superiore a 126 mg/dl, o di un valore di glicemia due ore dopo un carico orale di glucosio superiore a 200 mg/dl, o sulla presenza di sintomi di diabete e di un valore di glicemia (random) superiore a 200 mg /dl. I pazienti con diabete tipo I presentano insorgenza della malattia in giovane età, sono magri, necessitano di terapia insulinica e sono soggetti a chetoacidosi. Nel siero sono determinabili anticorpi circolanti anti-decarbossilasi dell'acido glutammico (anti-GAD), anti-tirosin-fosfatasi (IA2) o anti-cellule insulari (ICA). I pazienti con diabete tipo II, pre-



sentano insorgenza della malattia in età adulta (>45 anni), sono obesi, insulino resistenti, frequentemente ipercolesterolemici, con ipertrigliceridemia ed ipertensione arteriosa, e sono soggetti a complicazioni di tipo macroangiopatico. Un sottogruppo di pazienti presenta anticorpi anti-GAD o anti-CD38 (250, 251). Il dosaggio dell'emoglobina A1c può essere utile per valutare l'efficacia del controllo glicemico in pazienti trattati.

HCV E POLIARTRITE CRONICA

La poliartrite cronica HCV-correlata può essere osservata in soggetti HCV-positivi con differenti patterns clinici; sia nell'ambito di una CM che isolata (252).

Un'artrite reumatoide propriamente detta, rispondente ai criteri classici, sembra essere non comune nei soggetti HCV-positivi, mentre un'oligoartrite intermittente, generalmente non erosiva e coinvolgente le articolazioni grandi e medie è frequentemente osservabile.

CARDIOPATIE E MIOCARDITI

Matsumori e coll. hanno recentemente evidenziato la presenza di anti-HCV nel 10.6% di pazienti affetti da cardiomiopatia ipertrofica e nel 6.3% di soggetti affetti da cardiomiopatia dilatativa con differenze statisticamente significative rispetto al tasso di anti-HCV presente nei donatori di sangue (2.4%). Altri Autori, tuttavia, non hanno confermato tale associazione eseguendo studi in Italia e in Grecia. E' degna di nota inoltre la recente determinazione di prevalenze significativamente superiori di aterosclerosi aortica in pazienti con infezione da HCV (253); tale associazione risultava soprattutto evidente in caso di attiva replicazione virale (254).

8 - GESTIONE CLINICA DELLE MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE DA HCV: SUGGERIMENTI COMPORTAMENTALI

Alla luce di quanto detto, è teoricamente auspicabile, nei limiti del possibile, l'effettuazione di uno screening completo del paziente HCV-positivo che si presenta alla prima visita o ricovero.

Questo, per essere veramente completo, dovrebbe prevedere, oltre ad un'accurata anamnesi ed esame obiettivo, l'esecuzione di esami di laboratorio e strumentali al fine di individuare la presenza di una tipica CM o di altre MEE HCV-correlate quali artrite, tireopatia, manifestazioni cutaneo-muscolari, neuropatia, sindrome secca, diabete mellito, nefropatia, pneumopatia, ecc. Uno screening così esaustivo appare peraltro utopistico nella grande maggioranza delle realtà locali. Quando possibile, si può peraltro suggerire l'esecuzione di almeno una determinazione delle crioglobuline circolanti, del fattore reumatoide e del complemento, dopo l'esecuzione di un'accurata anamnesi ed esame obiettivo. Qui di seguito viene riportato uno schema dettagliato che deve ritenersi mandatorio per quanto concerne l'esame anamnestico ed obiettivo, ed invece adattabile a seconda delle realtà locali per quanto concerne gli esami ematici o strumentali

Raccolta accurata dati anamnestici (si/no; data comparsa):

- abitudini di vita (fumo, alcool, droghe, trasfusioni, ecc.)
- eventuale data contatto HCV o altri agenti infettivi
- porpora
- astenia
- artralgie
- artrite (+ no. articolazioni)
- xerostomia/xeroftalmia
- fenomeno di Raynaud
- dermatiti
- ulcere cutanee
- debolezza muscolare/mialgia
- parestesie arti
- disturbi motori arti
- disturbi SNC
- tireopatia
- dispnea
- tosse
- sierositi
- edemi
- proteinuria
- ipertensione arteriosa
- iperglicemia
- febbre
- prurito
- dimagrimento
- sudorazione notturna



esame obiettivo completo:

cute, articolazioni, muscoli, nervi periferici, cuore, polmone, edemi declivi, milza, linfonodi, tiroide, P.A., ecc.

esami ematici (oltre ad enzimi epatici):

emocromo + formula + piastrine
creatininemia
elettroforesi + immunofissazione proteine sieriche
esame urine (\pm proteinuria 24 ore), urinocoltura
ricerca crioglobuline (modalità di esecuzione corrette, vedi dopo)
dosaggio C3, C4
fattore reumatoide
ANA
Anti-ENA (ACLA? ANCA?)
Ab anti-tiroide, TSH, FT3, FT4, (\pm ECO tiroide)

Rx torace

ECG

Come risultato dello screening iniziale (anche nei casi limitati solo all'esecuzione dell'indagine anamnestica e dell'esame obiettivo del paziente), si potranno avere due possibilità fondamentali:

(A) L'indagine ha dato esito positivo per la presenza di manifestazioni extraepatiche dell'infezione. In tal caso, si possono ancora presentare due possibilità:

(i) evidenza clinica di un disordine extraepatico: in tal caso si suggerisce l'approfondimento diagnostico-clinico, possibilmente con il supporto dello specialista relativo (es. reumatologo, ematologo, endocrinologo, pneumologo, cardiologo, neurologo, dermatologo). Esempio tipico: l'evidenza di tireopatia-diabete, suggerisce una consulenza endocrinologica (ECO, agoaspirato tiroide, ecc); l'evidenza di neuropatia periferica, suggerisce la consulenza neurologica (VdC, EMG, ecc.); la rilevazione di picco 'monoclonale', linfadenomegalia, febbre persistente, ecc. suggerisce una consulenza ematologica (BOM, ecc.); il rilievo di alterazioni urinarie (es, proteinuria stabile, microematuria) e/o insufficienza renale espressa da un aumento della creatininemia, consiglia una consulenza nefrologica e via dicendo (vedi anche i singoli paragrafi).

Ovviamente, la diagnosi circostanziata di MEE dovrà essere stabilita in base ai criteri diagnostici/classificativi standard diffusamente accettati per ciascuna manifestazione.

A parte lo specifico avviso dello specialista nei singoli casi, in genere, in presenza di MEE clinicamente lievi e stabilizzate sarà sufficiente seguire il paziente con controlli semestrali e trattamento prevalentemente sintomatico.

(ii) presenza solo di segni biumorali di coinvolgimento extraepatico dell'infezione, ma in assenza di evidenza clinica dello stesso. Esempio più frequente e tipico di ciò, la determinazione isolata di crioglobuline sieriche o elevati livelli di fattore reumatoide o ridotti livelli di C4. In tali casi, può esser suggerito di prendere nota del dato anomalo per la messa in atto di un follow-up più attento riguardo alla possibile comparsa di MEE (es di una sindrome crioglobulinemica).



(B) L'indagine ha dato esito negativo per la presenza di manifestazioni extraepatiche dell'infezione. In tale caso, il monitoraggio clinico-sierologico sopra descritto andrebbe ripetuto almeno alla comparsa di dati suggestivi per la comparsa di una MEE, anche se l'ideale sarebbe ripetere la valutazione con ritmo annuale. A tale proposito, dal punto di vista pratico è consigliabile sensibilizzare il paziente sull'opportunità di comunicare al centro di riferimento l'eventuale comparsa di nuove manifestazioni cliniche che egli annoterà su un questionario clinico comprendente:

- variazioni abitudini di vita
- chiazze emorragiche cute arti inferiori
- stanchezza
- dolore arti
- tumefazione articolare (sede e no. articolazioni)
- secchezza occhi/bocca
- mani bianche dopo esposizione al freddo
- dermatiti
- ulcere cutanee
- debolezza muscolare/dolori muscolari
- formicolii-bruciori arti
- disturbi motori arti
- affanno sforzo/riposo
- tosse
- gonfiore arti
- pressione arteriosa
- peso corporeo
- febbre
- prurito cutaneo
- sudorazione notturna



9 - RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Zignego AL, Brechot C.** Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol.* 1999;31(2):369-76.
2. **Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, Opolon P.** Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis Rheum.* 1999;42(10):2204-12.
3. **Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A.** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 1992;66(3):1476-83.
4. **Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM.** Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol.* 2000;74(4):2046-51.
5. **Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M.** The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1998;72(7):6048-55.
6. **Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC.** Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol.* 1998;72(4):3060-5.
7. **Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH.** Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol.* 1997;71(12):9417-26.
8. **Giannini C CP, Fontana F et al.** HCV core protein expression in human B cells lines does not significantly modify proliferative and apoptosis pathways. *J General Virol.* 2002.
9. **Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J.** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol.* 1997;71(1):697-704.
10. **Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R.** Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol.* 1997;71(11):8416-28.
11. **Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM.** Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol.* 1993;67(5):2832-43.
12. **Hijikata M, Mizushima H, Tanji Y, Komoda Y, Hirowatari Y, Akagi T, Kato N, Kimura K, Shimotohno K.** Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(22):10773-7.
13. **Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H.** Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol.* 1993;67(7):3835-44.
14. **Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T.** Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol.* 1995;69(6):3893-6.
15. **Borowski P, Heiland M, Oehlmann K, Becker B, Kornetzky L, Feucht H, Laufs R.** Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem.* 1996;237(3):611-8.
16. **Lin C, Pragai BM, Grakoui A, Xu J, Rice CM.** Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *J Virol.* 1994;68(12):8147-57.
17. **Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH.** Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med.* 1996;335(9):631-4.
18. **Asabe SI, Tanji Y, Satoh S, Kaneko T, Kimura K, Shimotohno K.** The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol.* 1997;71(1):790-6.
19. **Koch JO, Bartenschlager R.** Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol.* 1999;73(9):7138-46.
20. **Behrens SE, Tomei L, De Francesco R.** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J.* 1996;15(1):12-22.
21. **Lohmann V, Overton H, Bartenschlager R.** Selective stimulation of hepatitis C virus and pestivirus NS5B RNA polymerase activity by GTP. *J Biol Chem.* 1999;274(16):10807-15.

22. **Lin C, Wu JW, Hsiao K, Su MS.** The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol.* 1997;71(9):6465-71.
23. **Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA.** Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol.* 1997;71(9):6650-61.
24. **Bolten R, Egger D, Gosert R, Schaub G, Landmann L, Bienz K.** Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization. *J Virol.* 1998;72(11):8578-85.
25. **Ferrari E, Wright-Minogue J, Fang JW, Baroudy BM, Lau JY, Hong Z.** Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *J Virol.* 1999;73(2):1649-54.
26. **Chung RT, Kaplan LM.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I (hnRNP-I/PTB) selectively binds the conserved 3' terminus of hepatitis C viral RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(2):351-62.
27. **Petrik J, Parker H, Alexander GJ.** Human hepatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds to the poly(U) tract of the 3' non-coding region of hepatitis C virus genomic RNA. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 12):3109-13.
28. **Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S.** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 1998;282(5390):938-41.
29. **Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT.** Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol.* 2000;74(21):10055-62.
30. **Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, Patel A, Kohn LD, Liang TJ.** Interaction of Hepatitis C Virus-Like Particles and Cells: a Model System for Studying Viral Binding and Entry. *J Virol.* 2002;76(18):9335-9344.
31. **Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX.** Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12766-71.
32. **Flint M, Quinn ER, Levy S.** In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clin Liver Dis.* 2001;5(4):873-93.
33. **Zibert A, Schreier E, Roggendorf M.** Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology.* 1995;208(2):653-61.
34. **Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH.** Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15394-9.
35. **Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JY, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S.** A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(5):1759-63.
36. **Flint M, Thomas JM, Maidens CM, Shotton C, Levy S, Barclay WS, McKeating JA.** Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol.* 1999;73(8):6782-90.
37. **Mizuno M, Yamada G, Tanaka T, Shimotohno K, Takatani M, Tsuji T.** Virion-like structures in HeLa G cells transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome. *Gastroenterology.* 1995;109(6):1933-40.
38. **Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ.** Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol.* 1998;72(5):3827-36.
39. **Matsumoto M, Hwang SB, Jeng KS, Zhu N, Lai MM.** Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology.* 1996;218(1):43-51.
40. **Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM.** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol.* 1994;68(10):6147-60.
41. **Sato K, Okamoto H, Aihara S, Hoshi Y, Tanaka T, Mishiro S.** Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology.* 1993;196(1):354-7.
42. **Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR.** Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology.* 1994;202(2):606-14.
43. **Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P.** In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 1998;79 (Pt 10):2367-74.



44. **Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, Kiyosawa K, Traub MA, Bizollon T, Gouillat C, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Inchauspe G, Trepo C.** Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 11):3007-18.
45. **Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, Foschi M, Maggi E, Romagnani S, Gentilini P, Brechot C.** Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus [see comments]. *J Hepatol.* 1992;15(3):382-6.
46. **Lerat H, Berby F, Traub MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G.** Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest.* 1996;97(3):845-51.
47. **Muller HM, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L, Goeser T, Pfaff E.** B-lymphocytes are predominantly involved in viral propagation of hepatitis C virus (HCV). *Arch Virol Suppl.* 1994;9:307-16.
48. **Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Traub MA, Trepo C, Inchauspe G.** In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood.* 1998;91(10):3841-9.
49. **Fornasieri A, Bernasconi P, Ribero ML, Sinico RA, Fasola M, Zhou J, Portera G, Tagger A, Gibelli A, D'Amico G.** Hepatitis C virus (HCV) in lymphocyte subsets and in B lymphocytes expressing rheumatoid factor cross-reacting idiotype in type II mixed cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol.* 2000;122(3):400-3.
50. **Kato N, Ikeda M, Mizutani T, Sugiyama K, Noguchi M, Hirohashi S, Shimotohno K.** Replication of hepatitis C virus in cultured non-neoplastic human hepatocytes. *Jpn J Cancer Res.* 1996;87(8):787-92.
51. **Mizutani T, Kato N, Saito S, Ikeda M, Sugiyama K, Shimotohno K.** Characterization of hepatitis C virus replication in cloned cells obtained from a human T-cell leukemia virus type 1-infected cell line, MT-2. *J Virol.* 1996;70(10):7219-23.
52. **Sugiyama K, Kato N, Mizutani T, Ikeda M, Tanaka T, Shimotohno K.** Genetic analysis of the hepatitis C virus (HCV) genome from HCV-infected human T cells. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 2):329-36.
53. **Nakajima N, Hijikata M, Yoshikura H, Shimizu YK.** Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol.* 1996;70(5):3325-9.
54. **Shimizu YK, Yoshikura H.** Multicycle infection of hepatitis C virus in cell culture and inhibition by alpha and beta interferons. *J Virol.* 1994;68(12):8406-8.
55. **Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Shapiro M, Wong DC, Purcell RH, Yoshikura H.** Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol.* 1998;79 (Pt 6):1383-6.
56. **Cacciarelli TV, Reyes J, Jaffe R, Mazariegos GV, Jain A, Fung JJ, Green M.** Primary tacrolimus (FK506) therapy and the long-term risk of post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 2001;5(5):359-64.
57. **Muratori L, Lenzi M, Cataleta M, Giostra F, Cassani F, Ballardini G, Zauli D, Bianchi FB.** Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1994;21(2):199-203.
58. **Garcia-Buey L, Garcia-Monzon C, Rodriguez S, Borque MJ, Garcia-Sanchez A, Iglesias R, DeCastro M, Mateos FG, Vicario JL, Balas A, et al.** Latent autoimmune hepatitis triggered during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 1995;108(6):1770-7.
59. **Czaja AJ, Carpenter HA.** Autoimmune hepatitis with incidental histologic features of bile duct injury. *Hepatology.* 2001;34(4 Pt 1):659-65.
60. **Bianchi FB, Cassani F, Lenzi M, Ballardini G, Muratori L, Giostra F, Zauli D.** Impact of international autoimmune hepatitis group scoring system in definition of autoimmune hepatitis. An Italian experience. *Dig Dis Sci.* 1996;41(1):166-71.
61. **Misiani R, Bellavita P, Fenili D, Borelli G, Marchesi D, Massazza M, Vendramin G, Comotti B, Tanzi E, Scudeller G, et al.** Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med.* 1992;117(7):573-7.
62. **Ferri C, Monti M, La Civita L, Longombardo G, Greco F, Pasero G, Gentilini P, Bombardieri S, Zignego AL.** Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood.* 1993;82(12):3701-4.
63. **Zignego AL, Ferri C, Giannini C, La Civita L, Careccia G, Longombardo G, Bellesi G, Caracciolo F, Thiers V, Gentilini P.** Hepatitis C virus infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol.* 1997;142(3):545-55.
64. **Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M.** Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med.* 1974;57(5):775-88.

65. **Agnello V, Chung RT, Kaplan LM.** A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia [see comments]. *N Engl J Med.* 1992;327(21):1490-5.
66. **Lunel F, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, Cresta P, Perrin M, Grippon P, Hoang C, Valla D, Piette JC, et al.** Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage [published erratum appears in *Gastroenterology* 1995 Feb;108(2):620]. *Gastroenterology.* 1994;106(5):1291-300.
67. **Wong VS, Egner W, Elsey T, Brown D, Alexander GJ.** Incidence, character and clinical relevance of mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol.* 1996;104(1):25-31.
68. **Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, Mellor J, Ben Yahia MB, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Zafrani ES, Duval J, et al.** Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann Intern Med.* 1995;122(3):169-73.
69. **Ferri C, La Civita L, Cirafisi C, Siciliano G, Longombardo G, Bombardieri S, Rossi B.** Peripheral neuropathy in mixed cryoglobulinemia: clinical and electrophysiologic investigations. *J Rheumatol.* 1992;19(6):889-95.
70. **Ferri C, Marzo E, Longombardo G, Lombardini F, La Civita L, Vanacore R, Liberati AM, Gerli R, Greco F, Moretti A, et al.** Interferon-alpha in mixed cryoglobulinemia patients: a randomized, crossover-controlled trial. *Blood.* 1993;81(5):1132-6.
71. **Cacoub P, Fabiani FL, Musset L, Perrin M, Frangeul L, Leger JM, Huraux JM, Piette JC, Godeau P.** Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Am J Med.* 1994;96(2):124-32.
72. **Agnello V.** Hepatitis C virus infection and type II cryoglobulinemia: an immunological perspective [published erratum appears in *Hepatology* 1998 Mar;27(3):889]. *Hepatology.* 1997;26(6):1375-9.
73. **Ferri C, Sebastiani M, Giuggioli D, Cazzato M, Longombardo G, Antonelli A, Puccini R, Michelassi C, Zignego A.L.** Mixed cryoglobulinemia: demographic, clinical, and serological features, and survival in 231 patients. *Sem Arthr Rheumatism.* 2003;in press.
74. **Rabkin CS, Tess BH, Christianson RE, Wright WE, Waters DJ, Alter HJ, Van Den Berg BJ.** Prospective study of hepatitis C viral infection as a risk factor for subsequent B-cell neoplasia. *Blood.* 2002;99(11):4240-2.
75. **Ferri C, Greco F, Longombardo G, Palla P, Moretti A, Marzo E, Mazzoni A, Pasero G, Bombardieri S, Highfield P, et al.** Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia [see comment]. *Clin Exp Rheumatol.* 1991;9(6):621-4.
76. **Monteverde A, Pileri S.** Lymphoproliferative diseases of uncertain classification. *Ann Ital Med Int.* 1991;6(1 Pt 2):162-70.
77. **Monteverde A, Ballare M, Bertonecchi MC, Zigrossi P, Sabattini E, Poggi S, Pileri S.** Lymphoproliferation in type II mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol.* 1995;13 Suppl 13:S141-7.
78. **Monteverde A, Sabattini E, Poggi S, Ballare M, Bertonecchi MC, De Vivo A, Briskomatis A, Roncador G, Falini B, Pileri SA.** Bone marrow findings further support the hypothesis that essential mixed cryoglobulinemia type II is characterized by a monoclonal B-cell proliferation. *Leuk Lymphoma.* 1995;20(1-2):119-24.
79. **Monteverde A, Ballare M, Pileri S.** Hepatic lymphoid aggregates in chronic hepatitis C and mixed cryoglobulinemia. *Springer Semin Immunopathol.* 1997;19(1):99-110.
80. **Monteverde A, Rivano MT, Allegra GC, Monteverde AI, Zigrossi P, Baglioni P, Gobbi M, Falini B, Bordin G, Pileri S.** Essential mixed cryoglobulinemia, type II: a manifestation of a low- grade malignant lymphoma? Clinical-morphological study of 12 cases with special reference to immunohistochemical findings in liver frozen sections. *Acta Haematol.* 1988;79(1):20-5.
81. **Jaffe ES, HJ, Stein H, Vardiman JW.** *Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.* World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2001.
82. **Santini GF, Crovatto M, Modolo ML, Martelli P, Silvia C, Mazzi G, Franzin F, Moretti M, Tulissi P, Pozzato G.** Waldenstrom macroglobulinemia: a role of HCV infection? *Blood.* 1993;82(9):2932.
83. **Pozzato G, Mazzaro C, Crovatto M, Modolo ML, Ceselli S, Mazzi G, Sulfaro S, Franzin F, Tulissi P, Moretti M, et al.** Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection, and mixed cryoglobulinemia. *Blood.* 1994;84(9):3047-53.
84. **Mussini C, Ghini M, Mascia MT, Giovanardi P, Zanni G, Lattuada I, Moreali S, Longo G, Ferrari MG, Torelli G.** Monoclonal gammopathies and hepatitis C virus infection. *Blood.* 1995;85(4):1144-5.
85. **Mangia A, Clemente R, Musto P, Cascavilla I, La Floresta P, Sanpaolo G, Gentile R, Viglotti ML, Facciouso D, Carotenuto M, Rizzetto M, Andriulli A.** Hepatitis C virus infection and monoclonal gammopathies not associated with cryoglobulinemia. *Leukemia.* 1996;10(7):1209-13.
86. **Mazzaro C, Zagonel V, Monfardini S, Tulissi P, Pussini E, Fanni M, Sorio R, Bortolus R, Crovatto M, Santini G, Tiribelli C, Sasso F, Masutti R, Pozzato G.** Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphomas [see comments]. *Br J Haematol.* 1996;94(3):544-50.



87. **Musto P, Dell'Olio M, Carotenuto M, Mangia A, Andriulli A.** Hepatitis C virus infection: a new bridge between hematologists and gastroenterologists? *Blood*. 1996;88(2):752-4.
88. **Silvestri F, Barillari G, Fanin R, Salmaso F, Pipan C, Falasca E, Puglisi F, Mariuzzi L, Zaja F, Infanti L, Patriarca F, Candoni A, Rogato A, Di Loreto C, Botta GA, Baccarani M.** Impact of hepatitis C virus infection on clinical features, quality of life and survival of patients with lymphoplasmacytoid lymphoma/immunocytoma. *Ann Oncol*. 1998;9(5):499-504.
89. **Pileri SA, Sabattini E.** A rational approach to immunohistochemical analysis of malignant lymphomas on paraffin wax sections. *J Clin Pathol*. 1997;50(1):2-4.
90. **Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC.** A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
91. **Trepo C, Berthillon P, Vitvitski L.** HCV and lymphoproliferative diseases. *Ann Oncol*. 1998;9(5):469-70.
92. **Magalini AR, Facchetti F, Salvi L, Fontana L, Puoti M, Scarpa A.** Clonality of B-cells in portal lymphoid infiltrates of HCV-infected livers. *J Pathol*. 1998;185(1):86-90.
93. **Pileri S, Piccaluga PP, De Vivo A, Sabattini E, Poggi S, Melilli G, Falini B, Piccaluga A.** Malignant lymphomas of the gastro-intestinal tract: a reappraisal on the basis of the newly proposed Revised European American Lymphoma Classification. *Ital J Gastroenterol*. 1994;26(8):405-18.
94. **Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestreaux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wundisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Thomas T, Zinzani PL, Neubauer A, Stolte M, Hamoudi RA, Dogan A, Isaacson PG, Du MQ.** T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1286-94.
95. **Lai R, Weiss LM.** Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1998;109(5):508-10.
96. **Mazzaro C, Franzin F, Tulissi P, Pussini E, Crovatto M, Carniello GS, Efremov DG, Burrone O, Santini G, Pozzato G.** Regression of monoclonal B-cell expansion in patients affected by mixed cryoglobulinemia responsive to alpha-interferon therapy. *Cancer*. 1996;77(12):2604-13.
97. **Ferri C, Zignego AL, Pileri SA.** Cryoglobulins. *J Clin Pathol*. 2002;55(1):4-13.
98. **Bonomo L, Casato M, Afeltra A, Caccavo D.** Treatment of idiopathic mixed cryoglobulinemia with alpha interferon. *Am J Med*. 1987;83(4):726-30.
99. **Ferri C, Zignego AL, Longombardo G, Monti M, La Civita L, Lombardini F, Greco F, Mazzoni A, Pasero G, Gentilini P, et al.** Effect of alpha-interferon on hepatitis C virus chronic infection in mixed cryoglobulinemia patients. *Infection*. 1993;21(2):93-7.
100. **Mazzaro C, Lacchin T, Moretti M, Tulissi P, Manazzone O, Colle R, Pozzato G.** Effects of two different alpha-interferon regimens on clinical and virological findings in mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13 Suppl 13:S181-5.
101. **Casari M, Capra F, Gabrielli GB, Bassi A, Squarzone S, Dagradi R, De Maria E, Corrocher R.** Cryoglobulinemia in hepatitis C virus chronic active hepatitis: effects of interferon-alpha therapy. *J Interferon Cytokine Res*. 1996;16(8):585-8.
102. **Adinolfi LE, Utili R, Zampino R, Ragone E, Mormone G, Ruggiero G.** Effects of long-term course of alpha-interferon in patients with chronic hepatitis C associated to mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997;9(11):1067-72.
103. **Dammacco F, Sansonno D, Han JH, Shyamala V, Cornacchiulo V, Iacobelli AR, Lauletta G, Rizzi R.** Natural interferon-alpha versus its combination with 6-methyl- prednisolone in the therapy of type II mixed cryoglobulinemia: a long-term, randomized, controlled study. *Blood*. 1994;84(10):3336-43.
104. **Zuckerman E, Zuckerman T, Sahar D, Streichman S, Attias D, Sabo E, Yeshurun D, Rowe JM.** The effect of antiviral therapy on t(14;18) translocation and immunoglobulin gene rearrangement in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Blood*. 2001;97(6):1555-9.
105. **Zignego AL, Ferri C, Giannelli F, Giannini C, Caini P, Monti M, Marrocchi EM, Di Pietro E, La Villa G, Laffi G, Gentilini P.** Prevalence of bcl-2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or without B-cell lymphomas. *Ann Intern Med*. 2002;137:571-580.
106. **Giannelli F, Moscarella S, Giannini C, Caini P, Monti M, Gragnani L, Romanelli RG, Solazzo V, Laffi G, La Villa G, Gentilini P, Zignego AL.** Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation. *Blood*. 2003.
107. **Zignego AL, Giannelli F, Marrocchi ME, Giannini C, Gentilini P, Innocenti F, Ferri C.** Frequency of bcl-2 rearrangement in patients with mixed cryoglobulinemia and HCV-positive liver diseases [letter]. *Clin Exp Rheumatol*. 1997;15(6):711-2.

108. **Zignego AL, Giannelli F, Marrocchi ME, Mazzocca A, Ferri C, Giannini C, Monti M, Caini P, Villa GL, Laffi G, Gentilini P.** T(14;18) translocation in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2000;31(2):474-9.
109. **Kitay-Cohen Y, Amiel A, Hilzenrat N, Buskila D, Ashur Y, Fejgin M, Gaber E, Safadi R, Tur-Kaspa R, Lishner M.** Bcl-2 rearrangement in patients with chronic hepatitis C associated with essential mixed cryoglobulinemia type II. *Blood*. 2000;96(8):2910-2.
110. **Ferri C, La Civita L, Fazzi P, Pasero G, Zignego AL.** Polymyositis, lung fibrosis, and cranial neuropathy in a patient with hepatitis C virus infection [letter; comment]. *Arthritis Rheum*. 1996;39(6):1074-5.
111. **Calleja JL, Albillos A, Moreno-Otero R, Rossi I, Cacho G, Domper F, Yebra M, Escartin P.** Sustained response to interferon-alpha or to interferon-alpha plus ribavirin in hepatitis C virus-associated symptomatic mixed cryoglobulinaemia. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13(9):1179-86.
112. **Zuckerman E, Keren D, Slobodin G, Rosner I, Rozenbaum M, Toubi E, Sabo E, Tsykounov I, Naschitz JE, Yeshurun D.** Treatment of refractory, symptomatic, hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia with ribavirin and interferon-alpha. *J Rheumatol*. 2000;27(9):2172-8.
113. **Ferri C, Giuggioli, Cazzato M, Sebastiani M, Mascia MT, Zignego AL.** HCV-related cryoglobulinemic vasculitis: update of etiopathogenesis and therapeutic strategies. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;in press.
114. **Ballare M, Bobbio F, Poggi S, Bordin G, Bertoncelli MC, Catania E, Monteverde A.** A pilot study on the effectiveness of cyclosporine in type II mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13 Suppl 13:S201-3.
115. **Horsmans Y, Tennstedt D, Cornu C, Geubel AP.** Failure of cyclosporin therapy in type II mixed cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus infection. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16(4):514-5.
116. **Zaja F, Russo D, Fuga G, Patriarca F, Ermacora A, Baccarani M.** Rituximab for the treatment of type II mixed cryoglobulinemia. *Haematologica*. 1999;84(12):1157-8.
117. **Sansonno D, De Re V, Lauletta G, Tucci FA, Boiocchi M, Dammacco F.** Monoclonal antibody treatment of mixed cryoglobulinemia resistant to interferon alpha with an anti-CD20. *Blood*. 2003;101(10):3818-26.
118. **Zaja F, De Vita S, Mazzaro C, Sacco S, Damiani D, De Marchi G, Michelutti A, Baccarani M, Fanin R, Ferraccioli G.** Efficacy and safety of rituximab in type II mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 2003;101(10):3827-34.
119. **Ferri C, Monti M, La Civita L, Carecchia G, Mazzaro C, Longombardo G, Lombardini F, Greco F, Pasero G, Bombardieri S, et al.** Hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's B-cell lymphoma complicating mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Clin Invest*. 1994;24(11):781-4.
120. **Dammacco F, Gatti P, Sansonno D.** Hepatitis C virus infection, mixed cryoglobulinemia, and non-Hodgkin's lymphoma: an emerging picture. *Leuk Lymphoma*. 1998;31(5-6):463-76.
121. **Bauduer F, Katsahian S, Blanchard Y, Oui B, Capdupuy C, Renoux M.** Descriptive epidemiology of non-Hodgkin lymphomas in a southwestern French hematology center: absence of significant relationship with hepatitis C virus infection. *Hematol Cell Ther*. 1999;41(5):191-3.
122. **Collier JD, Zanke B, Moore M, Kessler G, Krajden M, Shepherd F, Heathcote J.** No association between hepatitis C and B-cell lymphoma [see comments]. *Hepatology*. 1999;29(4):1259-61.
123. **Silvestri F, Sperotto A, Fanin R.** Hepatitis c and lymphoma. *Curr Oncol Rep*. 2000;2(2):172-5.
124. **Musto P.** Hepatitis C Virus Infection and B-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas: More Than a Simple Association. *Clin Lymphoma*. 2002;3(3):150-60.
125. **Pioltelli P, Gargantini L, Cassi E, Santoleri L, Bellati G, Magliano EM, Morra E.** Hepatitis C virus in non-Hodgkin's lymphoma. A reappraisal after a prospective case-control study of 300 patients. Lombard Study Group of HCV-Lymphoma. *Am J Hematol*. 2000;64(2):95-100.
126. **Iannitto E, Barbera V, Gambino R, Ammatuna E, Montalto G, Di Stefano R.** Higher frequency of HCV in patients with non-Hodgkin lymphoma: is it enough to suggest an association with B-cell NHL? *Hepatology*. 2003;37(2):481-2; author reply 482.
127. **Mele A, Pulsoni A, Bianco E, Musto P, Szklo A, Sanpaolo MG, Iannitto E, De Renzo A, Martino B, Liso V, Andrizzi C, Pusterla S, Dore F, Maresca M, Rapicetta M, Marcucci F, Mandelli F, Franceschi S.** Hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphomas: an Italian multicenter case-control study. *Blood*. 2003;102(3):996-9.
128. **Ferri C, Caracciolo F, La Civita L, Monti M, Longombardo G, Greco F, Zignego AL.** Hepatitis C virus infection and B-cell lymphomas [letter]. *Eur J Cancer*. 1994;10(2):1591-2.
129. **Ferri C, La Civita L, Caracciolo F, Zignego AL.** Non-Hodgkin's lymphoma: possible role of hepatitis C virus [letter]. *Jama*. 1994;272(5):355-6.
130. **Ferri C, Caracciolo F, Zignego AL, La Civita L, Monti M, Longombardo G, Lombardini F, Greco F, Capochiani E, Mazzoni A, et al.** Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma [see comments]. *Br J Haematol*. 1994;88(2):392-4.



131. **Luppi M, Grazia Ferrari M, Bonaccorsi G, Longo G, Narni F, Barozzi P, Marasca R, Mussini C, Torelli G.** Hepatitis C virus infection in subsets of neoplastic lymphoproliferations not associated with cryoglobulinemia. *Leukemia*. 1996;10(2):351-5.
132. **Pioltelli P, Zehender G, Monti G, Monteverde A, Galli M.** HCV and non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 1996;347(9001):624-5.
133. **Silvestri F, Pipan C, Barillari G, Zaja F, Fanin R, Infanti L, Russo D, Falasca E, Botta GA, Baccarani M.** Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1996;87(10):4296-301.
134. **Zuckerman E, Zuckerman T, Levine AM, Douer D, Gutekunst K, Mizokami M, Qian DG, Velankar M, Nathwani BN, Fong TL.** Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma [see comments]. *Ann Intern Med*. 1997;127(6):423-8.
135. **Ferri C, Pileri S, Zignego AL.** Hepatitis C virus infection and non-Hodgkin's lymphoma. In: Geodert J, (NIH) NCI, eds. *Infectious causes of cancer. Targets for intervention*. Totowa, New Jersey: The Human Press inc.; 2000:349-68.
136. **Brind AM, Watson JP, Burt A, Kestevan P, Wallis J, Proctor SJ, Bassendine MF.** Non-Hodgkin's lymphoma and hepatitis C virus infection. *Leuk Lymphoma*. 1996;21(1-2):127-30.
137. **Lenzi M, Johnson PJ, McFarlane IG, Ballardini G, Smith HM, McFarlane BM, Bridger C, Vergani D, Bianchi FB, Williams R.** Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *Lancet*. 1991;338(8762):277-80.
138. **Ferri C, La Civita L, Longombardo G, Zignego AL.** Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinaemia [letter; comment]. *Br J Rheumatol*. 1994;33(3):301.
139. **Silvestri F, Baccarani M.** Hepatitis C virus-related lymphomas. *Br J Haematol*. 1997;99(3):475-80.
140. **De Vita S, Sacco C, Sansonno D, Gloghini A, Dammacco F, Crovatto M, Santini G, Dolcetti R, Boiocchi M, Carbone A, Zagonel V.** Characterization of overt B-cell lymphomas in patients with hepatitis C virus infection. *Blood*. 1997;90(2):776-82.
141. **Ascoli V, Lo Coco F, Artini M, Levrero M, Martelli M, Negro F.** Extranodal lymphomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Clin Pathol*. 1998;109(5):600-9.
142. **Luppi M, Longo G, Ferrari MG, Barozzi P, Marasca R, Morselli M, Valenti C, Mascia T, Vandelli L, Vallisa D, Cavanna L, Torelli G.** Clinico-pathological characterization of hepatitis C virus-related B- cell non-Hodgkin's lymphomas without symptomatic cryoglobulinemia [see comments]. *Ann Oncol*. 1998;9(5):495-8.
143. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909-18.
144. **Isaacson P, Wright DH.** Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*. 1983;52(8):1410-6.
145. **De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R, Ferraccioli G, Carbone A, Cornacchiulo V, Santini G, Crovatto M, Gloghini A, Dammacco F, et al.** Hepatitis C virus within a malignant lymphoma lesion in the course of type II mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 1995;86(5):1887-92.
146. **Luppi M, Longo G, Ferrari MG, Ferrara L, Marasca R, Barozzi P, Morselli M, Emilia G, Torelli G.** Additional neoplasms and HCV infection in low-grade lymphoma of MALT type. *Br J Haematol*. 1996;94(2):373-5.
147. **Mariette X.** Lymphomas complicating Sjogren's syndrome and hepatitis C virus infection may share a common pathogenesis: chronic stimulation of rheumatoid factor B cells. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(11):1007-10.
148. **McKiernan S, Pilkington R, Ramsay B, Walsh A, Sweeney E, Kelleher D.** Primary cutaneous B-cell lymphoma: an association of chronic hepatitis C infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(6):669-72.
149. **Viguiet M, Rivet J, Agbalika F, Kerviler E, Brice P, Dubertret L, Bachelez H.** B-cell lymphomas involving the skin associated with hepatitis C virus infection. *Int J Dermatol*. 2002;41(9):577-82.
150. **Hermine O, Lefrere F, Bronowicki JP, Mariette X, Jondeau K, Eclache-Saudreau V, Delmas B, Valensi F, Cacoub P, Brechet C, Varet B, Troussard X.** Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(2):89-94.
151. **Agnello V, Mecucci C, Casato M.** Regression of splenic lymphoma after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(26):2168-70; author reply 2168-70.
152. **Emens LA, Sulkowski MS.** Regression of splenic lymphoma after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(26):2168-70; author reply 2168-70.
153. **Mazzaro C, Little D, Pozzato G.** Regression of splenic lymphoma after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(26):2168-70; author reply 2168-70.

154. **Lefrère F TX, Hermine O.** *N Engl J Med.* 2002;347(26):2169.
155. **Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Muller-Hermelink HK.** The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res.* 1997;57(18):3944-8.
156. **Bertoni F, Cavalli F, Cotter FE, Zucca E.** Genetic alterations underlying the pathogenesis of MALT lymphoma. *Hematol J.* 2002;3(1):10-3.
157. **Liu H, Ye H, Dogan A, Ranaldi R, Hamoudi RA, Bearzi I, Isaacson PG, Du MQ.** T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood.* 2001;98(4):1182-7.
158. **Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, Kettner G, Jaeger K, Sommerfeld W.** Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol.* 1987;87(3):342-55.
159. **Pileri S, Poggi S, Baglioni P, Montanari M, Sabattini E, Galieni P, Tazzari PL, Gobbi M, Cavo M, Falini B, et al.** Histology and immunohistology of bone marrow biopsy in multiple myeloma. *Eur J Haematol Suppl.* 1989;51:52-9.
160. **Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, et al.** Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1994;331(2):74-80.
161. **Andreone P, Zignego AL, Cursaro C, Gramenzi A, Gherlinzoni F, Fiorino S, Giannini C, Boni P, Sabattini E, Pileri S, Tura S, Bernardi M.** Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med.* 1998;129(4):294-8.
162. **Johnson RJ, Willson R, Yamabe H, Couser W, Alpers CE, Wener MH, Davis C, Gretch DR.** Renal manifestations of hepatitis C virus infection. *Kidney Int.* 1994;46(5):1255-63.
163. **Daghestani L, Pomeroy C.** Renal manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med.* 1999;106(3):347-54.
164. **Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell P, Couser WG, Corey L, Wener MH, Alpers CE, et al.** Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection [see comments]. *N Engl J Med.* 1993;328(7):465-70.
165. **Stehman-Breen C, Alpers CE, Couser WG, Willson R, Johnson RJ.** Hepatitis C virus associated membranous glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* 1995;44(3):141-7.
166. **Sansonno D, Gesualdo L, Manno C, Schena FP, Dammacco F.** Hepatitis C virus-related proteins in kidney tissue from hepatitis C virus-infected patients with cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis [see comments]. *Hepatology.* 1997;25(5):1237-44.
167. **D'Amico G.** Renal involvement in hepatitis C infection: cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1998;54(2):650-71.
168. **Tarantino A, Campise M, Banfi G, Confalonieri R, Bucci A, Montoli A, Colasanti G, Damilano I, D'Amico G, Minetti L, et al.** Long-term predictors of survival in essential mixed cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1995;47(2):618-23.
169. **Madore F, Lazarus JM, Brady HR.** Therapeutic plasma exchange in renal diseases. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(3):367-86.
170. **Bombardieri S, Ferri C, Paleologo G, Bibolotti E, Camici M, Fosella PV, Pasero G, Moriconi L.** Prolonged plasma exchange in the treatment of renal involvement in essential mixed cryoglobulinemia. *Int J Artif Organs.* 1983;6 Suppl 1:47-50.
171. **Ferri C, Moriconi L, Gremignai G, Migliorini P, Paleologo G, Fosella PV, Bombardieri S.** Treatment of the renal involvement in mixed cryoglobulinemia with prolonged plasma exchange. *Nephron.* 1986;43(4):246-53.
172. **Ohta S, Yokoyama H, Wada T, Sakai N, Shimizu M, Kato T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Kobayashi K.** Exacerbation of glomerulonephritis in subjects with chronic hepatitis C virus infection after interferon therapy. *Am J Kidney Dis.* 1999;33(6):1040-8.
173. **Misiani R, Bellavita P, Fenili D, Vicari O, Marchesi D, Sironi PL, Zilio P, Vernocchi A, Massazza M, Vendramin G, et al.** Interferon alfa-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus [see comments]. *N Engl J Med.* 1994;330(11):751-6.
174. **Mazzaro C, Panarello G, Carniello S, Faelli A, Mazzi G, Crovatto M, Baracetti S, Nascimben F, Zorat F, Pozzato G, Faccini L, Campanacci L.** Interferon versus steroids in patients with hepatitis C virus-associated cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Dig Liver Dis.* 2000;32(8):708-15.



175. **Diego JM, Roth D.** Treatment of hepatitis C infection in patients with renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 1988;7:557.
176. **Misiani R, Bellavita P, Baio P, Caldara R, Ferruzzi S, Rossi P, Tengattini F.** Successful treatment of HCV-associated cryoglobulinaemic glomerulonephritis with a combination of interferon-alpha and ribavirin. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(6):1558-60.
177. **Jefferson JA, Johnson RJ.** Treatment of hepatitis C-associated glomerular disease. *Semin Nephrol.* 2000;20(3):286-92.
178. **Reed MJ, Alexander GJ, Thiru S, Smith KG.** Hepatitis C-associated glomerulonephritis—a novel therapeutic approach. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(4):869-71.
179. **Tranyor A, Kuzei T, Sinueson T.** Minimal change glomerulopathy and glomerular visceral epithelial hyperplasia associated with alpha-interferon therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Nephron.* 1994;67:94.
180. **Al-Wakeel J, Mitwalli A, Tarif N, Al-Mohaya S, Malik G, Khalil M.** Role of interferon-alpha in the treatment of primary glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 1999;33(6):1142-6.
181. **Pateron D, Hartmann DJ, Duclos-Vallee JC, Jouanolle H, Beaugrand M.** Latent autoimmune thyroid disease in patients with chronic HCV hepatitis. *J Hepatol.* 1992;16(1-2):244-5.
182. **Huang MJ, Wu SS, Liaw YF.** Thyroid abnormalities in patients with chronic viral hepatitis. *Hepatology.* 1994;20(6):1651-2.
183. **Preziati D, La Rosa L, Covini G, Marcelli R, Rescalli S, Persani L, Del Ninno E, Meroni PL, Colombo M, Beck-Peccoz P.** Autoimmunity and thyroid function in patients with chronic active hepatitis treated with recombinant interferon alpha-2a. *Eur J Endocrinol.* 1995;132(5):587-93.
184. **Fernandez-Soto L, Gonzalez A, Escobar-Jimenez F, Vazquez R, Ocete E, Olea N, Salmeron J.** Increased risk of autoimmune thyroid disease in hepatitis C vs hepatitis B before, during, and after discontinuing interferon therapy. *Arch Intern Med.* 1998;158(13):1445-8.
185. **Ganne-Carrie N, Medini A, Coderc E, Seror O, Christidis C, Grimbert S, Trinchet JC, Beaugrand M.** Latent autoimmune thyroiditis in untreated patients with HCV chronic hepatitis: a case-control study. *J Autoimmun.* 2000;14(2):189-93.
186. **Hsieh MC, Yu ML, Chuang WL, Shin SJ, Dai CY, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Liu JF, Wang LY, Chang WY.** Virologic factors related to interferon-alpha-induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Endocrinol.* 2000;142(5):431-7.
187. **Huang MJ, Tsai SL, Huang BY, Sheen IS, Yeh CT, Liaw YF.** Prevalence and significance of thyroid autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: a prospective controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999;50(4):503-9.
188. **Marazuela M, Garcia-Buey L, Gonzalez-Fernandez B, Garcia-Monzon C, Arranz A, Borque MJ, Moreno-Otero R.** Thyroid autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before and during interferon-alpha therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;44(6):635-42.
189. **Deutsch M, Dourakis S, Manesis EK, Gioustozi A, Hess G, Horsch A, Hadziyannis S.** Thyroid abnormalities in chronic viral hepatitis and their relationship to interferon alpha therapy. *Hepatology.* 1997;26(1):206-10.
190. **Wong S, Mehta AE, Faiman C, Berard L, Ibbott T, Minuk GY.** Absence of serologic evidence for hepatitis C virus infection in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Hepatogastroenterology.* 1996;43(8):420-1.
191. **Prentice LM, Phillips DI, Sarsero D, Beever K, McLachlan SM, Smith BR.** Geographical distribution of sub-clinical autoimmune thyroid disease in Britain: a study using highly sensitive direct assays for autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1990;123(5):493-8.
192. **McFarlane IG.** Autoimmunity and hepatotropic viruses. *Semin Liver Dis.* 1991;11(3):223-33.
193. **Minelli R, Braverman LE, Giuberti T, Schianchi C, Gardini E, Salvi M, Fiaccadori F, Ugolotti G, Roti E.** Effects of excess iodine administration on thyroid function in euthyroid patients with a previous episode of thyroid dysfunction induced by interferon-alpha treatment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47(3):357-61.
194. **Quaranta JF, Tran A, Regnier D, Letestu R, Beusnel C, Fuzibet JG, Thiers V, Rampal P.** High prevalence of antibodies to hepatitis C virus (HCV) in patients with anti-thyroid autoantibodies. *J Hepatol.* 1993;18(1):136-8.
195. **Duclos-Vallee JC, Johanet C, Trinchet JC, Deny P, Laurent MF, Duron F, Valensi P, Weil B, Homberg JC, Pateron D, et al.** High prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Bmj.* 1994;309(6958):846-7.
196. **Wagner B, Vierhapper H, Hofmann H.** Prevalence of hepatitis C virus infection in Hashimoto's thyroiditis. *Bmj.* 1996;312(7031):640-1.

197. **Baudin E, Marcellin P, Pouteau M, Colas-Linhart N, Le Floch JP, Lemmonier C, Benhamou JP, Bok B.** Reversibility of thyroid dysfunction induced by recombinant alpha interferon in chronic hepatitis C. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1993;39(6):657-61.
198. **Metcalfe RA, Ball G, Kudesia G, Weetman AP.** Failure to find an association between hepatitis C virus and thyroid autoimmunity. *Thyroid*. 1997;7(3):421-4.
199. **Loviselli A, Oppo A, Velluzzi F, Atzeni F, Mastinu GL, Farci P, Orgiana G, Balestrieri A, Cocco PL, Mariotti S.** Independent expression of serological markers of thyroid autoimmunity and hepatitis virus C infection in the general population: results of a community-based study in north-western Sardinia. *J Endocrinol Invest*. 1999;22(9):660-5.
200. **Antonelli A, Ferri C, Fallahi P.** Thyroid cancer in patients with hepatitis C infection. *Jama*. 1999;281(17):1588.
201. **Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Nesti C, Zignego AL, Maccheroni M.** Thyroid cancer in HCV-related mixed cryoglobulinemia patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(5):693-6.
202. **Montella M, Crispo A, Pezzullo L, Izzo F, Fabbrocini G, Ronga D, Tamburini M.** Is hepatitis C virus infection associated with thyroid cancer? A case-control study. *Int J Cancer*. 2000;87(4):611-2.
203. **Antonelli A, Miccoli P, Derzhitski VE, Panasiuk G, Solovieva N, Baschieri L.** Epidemiologic and clinical evaluation of thyroid cancer in children from the Gomel region (Belarus). *World J Surg*. 1996;20(7):867-71.
204. **Antonelli A, Miccoli P, Ferdeghini M, Di Coscio G, Alberti B, Iaconi P, Baldi V, Fallahi P, Baschieri L.** Role of neck ultrasonography in the follow-up of patients operated on for thyroid cancer. *Thyroid*. 1995;5(1):25-8.
205. **Baschieri L, Antonelli A, Nardi S, Alberti B, Lepri A, Canapicchi R, Fallahi P.** Intravenous immunoglobulin versus corticosteroid in treatment of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*. 1997;7(4):579-85.
206. **Antonelli A, Fallahi P, Nesti C, Pupilli C, Marchetti P, Takasawa S, Okamoto H, Ferrannini E.** Anti-CD38 autoimmunity in patients with chronic autoimmune thyroiditis or Graves' disease. *Clin Exp Immunol*. 2001;126(3):426-31.
207. **Koike K, Moriya K, Ishibashi K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Matsuura Y, Miyamura T.** Sialadenitis histologically resembling Sjogren syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(1):233-6.
208. **Scott CA, Avellini C, Desinan L, Pirisi M, Ferraccioli GF, Bardus P, Fabris C, Casatta L, Bartoli E, Beltrami CA.** Chronic lymphocytic sialadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjogren's syndrome. *Histopathology*. 1997;30(1):41-8.
209. **Ferri C, Longombardo G, La Civita L, Greco F, Lombardini F, Cecchetti R, Cagianelli MA, Marchi S, Monti M, Zignego AL, et al.** Hepatitis C virus chronic infection as a common cause of mixed cryoglobulinaemia and autoimmune liver disease. *J Intern Med*. 1994;236(1):31-6.
210. **Ueda T, Ohta K, Suzuki N, Yamaguchi M, Hirai K, Horiuchi T, Watanabe J, Miyamoto T, Ito K.** Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(1):266-8.
211. **Ohta K, Ueda T, Nagai S, Yamada K, Yamaguchi M, Nakano J, Suzuki N, Ishii A, Hirai K, Izumi T, et al.** [Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis—is hepatitis C virus involved?]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1993;31 Suppl:32-5.
212. **Yamaguchi S, Kubo K, Fujimoto K, Honda T, Sekiguchi M, Sodeyama T.** Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon alpha. *Thorax*. 1997;52(1):33-7.
213. **Kubo K, Yamaguchi S, Fujimoto K, Hanaoka M, Hayasaka M, Honda T, Sodeyama T, Kiyosawa K.** Bronchoalveolar lavage fluid findings in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Thorax*. 1996;51(3):312-4.
214. **Ferri C, La Civita L, Fazzi P, Solfaneli S, Lombardini F, Begliomini E, Monti M, Longombardo G, Pasero G, Zignego AL.** Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. *Br J Rheumatol*. 1997;36(3):360-5.
215. **Piperno A, D'Alba R, Roffi L, Pozzi M, Farina A, Vecchi L, Fiorelli G.** Hepatitis C virus infection in patients with idiopathic hemochromatosis (IH) and porphyria cutanea tarda (PCT). *Arch Virol Suppl*. 1992;4:215-6.
216. **Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, Sampietro M, Fracanzani AL, Romano R, Caldarelli R, Marcelli R, Vecchi L, Fiorelli G.** Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology*. 1992;16(6):1322-6.
217. **Ferri C, Baicchi U, la Civita L, Greco F, Longombardo G, Mazzoni A, Careccia G, Bombardieri S, Pasero G, Zignego AL, et al.** Hepatitis C virus-related autoimmunity in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur J Clin Invest*. 1993;23(12):851-5.



218. **Navas S, Bosch O, Castillo I, Marriott E, Carreno V.** Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: a retrospective study. *Hepatology*. 1995;21(2):279-84.
219. **Hussain I, Hepburn NC, Jones A, O'Rourke K, Hayes PC.** The association of hepatitis C viral infection with porphyria cutanea tarda in the Lothian region of Scotland. *Clin Exp Dermatol*. 1996;21(4):283-5.
220. **O'Reilly FM, Darby C, Fogarty J, O'Moore R, Courtney MG, O'Connor J, Kay EW, Leader M, Fielding JF, Murphy GM.** Porphyrin metabolism in hepatitis C infection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1996;12(1):31-3.
221. **Thornhill MH.** Immune mechanisms in oral lichen planus. *Acta Odontol Scand*. 2001;59(3):174-7.
222. **Salonen L, Axell T, Hellden L.** Occurrence of oral mucosal lesions, the influence of tobacco habits and an estimate of treatment time in an adult Swedish population. *J Oral Pathol Med*. 1990;19(4):170-6.
223. **Savin JA.** Oral lichen planus. *Bmj*. 1991;302(6776):544-5.
224. **Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T.** Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. *Eur J Clin Invest*. 1995;25(12):910-4.
225. **Carrozzo M, Gandolfo S, Carbone M, Colombatto P, Broccoletti R, Garzino-Demo P, Ghisetti V.** Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(10):527-33.
226. **del Olmo JA, Pascual I, Bagan JV, Serra MA, Escudero A, Rodriguez F, Rodrigo JM.** Prevalence of hepatitis C virus in patients with lichen planus of the oral cavity and chronic liver disease. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(5):378-82.
227. **Bagan JV, Ramon C, Gonzalez L, Diago M, Milian MA, Cors R, Lloria E, Cardona F, Jimenez Y.** Preliminary investigation of the association of oral lichen planus and hepatitis C. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(5):532-6.
228. **Mignogna MD, Lo Muzio L, Favia G, Mignogna RE, Carbone R, Bucci E.** Oral lichen planus and HCV infection: a clinical evaluation of 263 cases. *Int J Dermatol*. 1998;37(8):575-8.
229. **Cribrier B, Garnier C, Laustriat D, Heid E.** Lichen planus and hepatitis C virus infection: an epidemiologic study. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31(6):1070-2.
230. **Ingafou M, Porter SR, Scully C, Teo CG.** No evidence of HCV infection or liver disease in British patients with oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998;27(1):65-6.
231. **van der Meij EH, van der Waal I.** Hepatitis C virus infection and oral lichen planus: a report from The Netherlands. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(6):255-8.
232. **Grote M, Reichart PA, Berg T, Hopf U.** Hepatitis C virus (HCV)-infection and oral lichen planus. *J Hepatol*. 1998;29(6):1034-5.
233. **Nagao Y, Kameyama T, Sata M.** Hepatitis C virus RNA detection in oral lichen planus tissue. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(5):850.
234. **Moldvay J, Deny P, Pol S, Brechot C, Lamas E.** Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization. *Blood*. 1994;83(1):269-73.
235. **Arrieta JJ, Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolome inverted question marke J, Manzarbeitia F, Herrero M, Pardo M, Carreno V.** Detection of hepatitis C virus replication by In situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. *Hepatology*. 2000;32(1):97-103.
236. **Carrozzo M, Quadri R, Pentenero M, Gandolfo S, Negro F.** Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa. *J Hepatol*. 2001;34((Supplement 1)):159 (abstract 883).
237. **Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Seno'o T, Kinoshita M, Kameyama T, Ueno T.** Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(6):259-66.
238. **Simo R, Hernandez C, Genesca J, Jordi R, Mesa J.** High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care*. 1996;19(9):998-1000.
239. **Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, O'Rahilly S, Shore S, Tom BD, Alexander GJ.** Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1999;30(4):1059-63.
240. **Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL.** Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med*. 2000;133(8):592-9.
241. **Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, Fenakel G, Schattner A.** Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc*. 2000;75(4):355-9.
242. **Mason A.** Viral induction of type 2 diabetes and autoimmune liver disease. *J Nutr*. 2001;131(10):2805S-2808S.

243. **Ryu JK, Lee SB, Hong SJ, Lee S.** Association of chronic hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in Korean patients. *Korean J Intern Med.* 2001;16(1):18-23.
244. **Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP.** Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 1999;29(2):328-33.
245. **Mangia A, Schiavone G, Lezzi G, Marmo R, Bruno F, Villani MR, Cascavilla I, Fantasia L, Andriulli A.** HCV and diabetes mellitus: evidence for a negative association. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(12):2363-7.
246. **Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, Minello A, Verges B, Guiguet M, Brun JM, Hillon P.** Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001;35(2):279-83.
247. **Betterle C, Fabris P, Zanchetta R, Pedini B, Tositti G, Bosi E, de Lalla F.** Autoimmunity against pancreatic islets and other tissues before and after interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus chronic infection. *Diabetes Care.* 2000;23(8):1177-81.
248. **Piquer S, Hernandez C, Enriquez J, Ross A, Esteban JI, Genesca J, Bonifacio E, Puig-Domingo M, Simo R.** Islet cell and thyroid antibody prevalence in patients with hepatitis C virus infection: effect of treatment with interferon. *J Lab Clin Med.* 2001;137(1):38-42.
249. **Bosi E, Minelli R, Bazzigaluppi E, Salvi M.** Fulminant autoimmune Type 1 diabetes during interferon-alpha therapy: a case of Th1-mediated disease? *Diabet Med.* 2001;18(4):329-32.
250. **Pupilli C, Giannini S, Marchetti P, Lupi R, Antonelli A, Malavasi F, Takasawa S, Okamoto H, Ferrannini E.** Autoantibodies to CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) in Caucasian patients with diabetes: effects on insulin release from human islets. *Diabetes.* 1999;48(12):2309-15.
251. **Antonelli A, Baj G, Marchetti P, Fallahi P, Surico N, Pupilli C, Malavasi F, Ferrannini E.** Human anti-CD38 autoantibodies raise intracellular calcium and stimulate insulin release in human pancreatic islets. *Diabetes.* 2001;50(5):985-91.
252. **Fadda P, La Civita L, Zignego AL, Ferri C.** [Hepatitis C virus infection and arthritis. A clinico-serological investigation of arthritis in patients with or without cryoglobulinemic syndrome]. *Reumatismo.* 2002;54(4):316-23.
253. **Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Tooda E, Hashimoto H, Nagai R, Yamakado M.** Association between hepatitis C virus seropositivity, carotid-artery plaque, and intima-media thickening. *Lancet.* 2002;359(9301):133-5.
254. **Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Toda Ei E, Hashimoto H, Ohno M, Nagai R, Yamakado M.** Increased prevalence of carotid atherosclerosis in hepatitis B virus carriers. *Circulation.* 2002;105(9):1028-30.



A cura della Commissione “Manifestazioni Extraepatiche del Virus dell’Epatite C”
dell’Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (A.I.S.F.)

Redatto da:

Anna Linda Zignego (*coordinatrice*)

Soci A.I.S.F.:*

Francesco Bianco Bianchi

Carlo Ferrari

Tiziana Giuberti

Alessandra Mangia

Cesare Mazzaro

Patrizia Pontisso

Claudio Puoti

Maria Rapicetta

Consulenti Esterni:*

Lorenzo Emmi

Clodoveo Ferri

Stefano Pileri

Gabriele Pozzato

Giuseppe Remuzzi

Sergio Romagnani

Pierluigi Rossi Ferrini

Elena Sabattini

Arrigo Schieppati

*In ordine alfabetico

Il documento è stato realizzato con il contributo del “Gruppo di Cooperazione A.I.S.F.-Industrie”

Bayer S.p.A. - Divisione Diagnostici, GiEnne Pharma S.p.A., Gilead Sciences S.r.l.,
GlaxoSmithKline S.p.A., Industria Farmaceutica Serono S.p.A.,
Ortho-Clinical Diagnostics S.p.A., Roche S.p.A., Schering-Plough S.p.A.