

Crioglobulinemia mista ... e dintorni

Mixed cryoglobulinemia ... and related conditions

G. Pasero

Professore Ordinario di Reumatologia dell'Università degli Studi di Pisa

Nella primavera 1973 si ricoverò nel nostro reparto una donna sulla cinquantina, in cui, per la contemporanea presenza di artralgie, aumento degli indici di flogosi e fattore reumatoide, era stata sospettata un'artrite reumatoide. Non fu difficile escludere tale sospetto: le artralgie erano limitate agli arti inferiori e non vi erano segni obiettivi di flogosi articolare, mentre dai ginocchi in giù si notava una discromia giallo-brunastra, esito di ripetuti episodi di porpora ortostatica. Queste reperto ci richiamò alla mente la crioglobulinemia mista (CM), un'affezione descritta da pochi anni (1), ancora poco nota e ritenuta piuttosto rara. Il riscontro di un precipitato nel siero conservato a bassa temperatura confermò questa ipotesi. Ricordo ancora quel senso di curiosità e di compiacimento che si prova quando si fa per la prima volta una diagnosi non banale. Nessuno di noi poteva però immaginare che quella diagnosi l'avremmo formulata tante altre volte - la nostra casistica supera ormai le 300 osservazioni - e che la CM sarebbe stata per tanti anni al centro dei nostri interessi di ricerca.

Quando il rapido aumento delle osservazioni ci indusse ad occuparci di questa malattia, definita allora "essenziale" in quanto l'eziologia era sconosciuta, volemmo conoscerne meglio le manifestazioni cliniche. La nostra attenzione fu attratta da due pubblicazioni: una, di Jori e Buonanno (2) segnalava la particolare frequenza di un interessamento epatico, l'altra, di Realdi et al. (3) la presenza in 1/3 dei casi dei segni di una pregressa esposizione al virus B dell'epatite (HBV), in particolare di anticorpi contro il suo antigene di superficie Bombardieri (4) ed il gruppo di Franklin (5, 6) confermarono entrambi i reperti. Essi, tuttavia, non erano correlati tra loro, onde ipotizzammo

che il danno epatico fosse la conseguenza della saturazione funzionale delle cellule di Kupffer. Il sistema reticolo-endoteliale (SRE), infatti, ha un ruolo importante nella "clearance" degli immunocomplessi (IC) circolanti (ICC) ed era logico ritenere che la reazione infiammatoria del fegato conseguisse allo "spillover" locale degli IC, una volta saturata la riserva funzionale delle cellule di Kupffer (7). Questo peculiare meccanismo patogenetico configurava la possibile esistenza di un'epatite crioglobulinemica, distinta dalle altre epatopatie croniche. Potemmo poi confermare questa ipotesi, dimostrando che la plasmateresi (PF), cioè la rimozione degli ICC, induceva un netto miglioramento degli indici funzionali epatici nella CM, ma non nelle altre epatiti croniche (8).

Nel frattempo, Bombardieri aveva evidenziato anche il frequente impegno polmonare nella CM (9). Lo spunto lo offrì l'osservazione di una malata in cui, insieme alla porpora, era comparsa una sindrome asmatica, anche se, in realtà, l'impegno polmonare è quasi sempre asintomatico. Come in altre malattie sistemiche, si tratta di una fibrosi interstiziale con aumento della trama polmonare (dimostrato allora con pellicole ad alta sensibilità, ma oggi meglio evidente con la tomografia computerizzata) e con riduzione della DLCO e aumento delle resistenze a livello delle piccole vie aeree.

All'inizio non ci interessammo del rene, essendo già noto l'impegno renale della CM (10). Dimostrammo, comunque, che, oltre all'impegno glomerulare, è presente in molti casi un'acidosi tubulare distale incompleta (11), analoga a quella che si osserva in alcune connettiviti e paraproteinemie. L'interesse per l'impegno renale è più recente: Migliorini, durante un soggiorno negli USA, aveva dimostrato che nel LES spontaneo del topo sono presenti nel siero auto-anticorpi che reagiscono con antigeni glomerulari a formare IC "in situ" (12). Tornata in Italia ha potuto dimostrare che ciò si ve-

Indirizzo per la corrispondenza:

Giampiero Pasero, Via Collodi 18, 56123 Pisa, Tel. 050.558623.

rifica anche nella CM (13); in seguito ha identificato uno degli antigeni glomerulari nell' α -enolasi (14), enzima glicolitico molto diffuso, che talora e con un meccanismo ancora sconosciuto, può divenire auto-antigene e di recente ha confermato la presenza nel siero dei malati di CM - ma anche in quello di malati di LES - di anticorpi anti- α -enolasi (15).

Fegato e rene sono gli organi più colpiti nella CM, ma di regola un grave impegno dei due organi è mutuamente esclusivo. Ciò dipende dal fatto che gli IC di maggiori dimensioni sono allontanati più rapidamente dal circolo ad opera del SRE e pertanto, una volta saturata la riserva funzionale delle cellule di Kupffer, inducono un danno epatico. Gli IC e gli auto-anticorpi più piccoli sfuggono alla "clearance" epatica, ricircolano e finiscono per depositarsi a livello renale. Nella CM gli ICC sono di regola di grosse dimensioni, onde un grave impegno epatico è tre volte più frequente di un grave impegno renale (16).

Man mano che cresceva il nostro interesse per la CM abbiamo voluto caratterizzare anche le altre manifestazioni della malattia: le manifestazioni cutanee (17), neurologiche (18), audio-vestibolari (19) e le alterazioni della viscosità ematica (20). Un'osservazione curiosa, ma di un certo interesse clinico, è stato il riscontro di variazioni circadiane del criocrito, con valori massimi nelle ore pomeridiane (21), il che fa ritenere che l'abituale comparsa serale delle "poussées" purpuriche non dipenda solo dal protrarsi dell'ortostatismo.

Una volta definito lo spettro delle manifestazioni cliniche, il nostro interesse si spostò sugli aspetti terapeutici. Quando iniziammo ad occuparci della CM il suo trattamento si basava sull'uso dei glicocorticoidi o in alternativa, degli immunodepressori. In effetti, i glicocorticoidi sono efficaci nelle manifestazioni più lievi della CM come la porpora, ma in presenza di un impegno viscerale di una certa entità la loro efficacia si riduce, a meno di ricorrere a dosi troppo elevate. Una prima alternativa ai glicocorticoidi pensammo di trovarla nella PF, che alla fine degli anni '70 aveva raggiunto una diffusa praticabilità. La PF si dimostrò efficace, sia a breve che a lungo termine e in alcuni casi riuscimmo a tenere sotto controllo la malattia per molti mesi, in assenza di ogni terapia farmacologica (22). La PF è efficace sul danno renale, su quello epatico, sulla rara sindrome da iperviscosità, un po' meno sul danno neurologico (23). Nei confronti del danno renale, tuttavia, l'efficacia è evidente se il danno è evolutivo, scarsa o nulla se è sta-

bilizzato (24). La PF tradizionale ha il problema del liquido di sostituzione: sotto questo profilo abbiamo sempre preferito l'albumina umana concentrata, più costosa, ma più sicura del plasma totale. La crioferesi, cioè la reinfusione del sovratante del crioprecipitato, suggerita da Maggiore (25), non è una soluzione adeguata, perché la crioprecipitabilità degli ICC è assai variabile da caso a caso (26). Invece, la PF a doppia filtrazione è altrettanto efficace, nella CM, di quella tradizionale (27), a differenza dal LES, in cui gli ICC sono di minori dimensioni e superano in parte il secondo filtro. Il meccanismo d'azione della PF è soprattutto la rimozione degli ICC, ma Vitali ha dimostrato anche un effetto di ristoro sul SRE, che può così contribuire all'allontanamento degli ICC (28).

Un effetto di ristoro sul SRE lo ha anche una terapia dietetica che Ferri ha proposto, in alternativa alla PF, quando prevale l'impegno epatico. Le cellule di Kupffer sono la prima stazione del SRE a valle dell'assorbimento intestinale e uno dei loro compiti è quello di rimuovere dal sangue portale le sostanze ancora antigenicamente attive, prima di immetterle nel circolo generale. Di conseguenza una dieta a basso contenuto in antigeni, come la dieta-base utilizzata nella diagnostica delle allergie alimentari, riduce il lavoro delle cellule di Kupffer e nella CM si è dimostrata capace di ridurre il criocrito, le transaminasi e le "poussées" purpuriche (29).

Un'altra alternativa, proposta da Bonomo (30) è rappresentata dall' α -interferone, di cui era nota l'azione immuno-modulatrice. I risultati favorevoli indussero Ferri a confermarli in uno studio a doppio cieco (31). Mentre era in corso questa indagine si verificò la scoperta del ruolo eziologico del virus C dell'epatite (HCV) nella CM e poiché l'interferone ha anche proprietà antivirali, poteva essere questo il suo meccanismo d'azione, come potemmo documentare attraverso lo studio dei "markers" dell'infezione (32).

Le indagini, già citate, sul possibile ruolo eziologico dell'HBV erano infatti giunte ad un punto morto: la percentuale dei malati in cui si poteva documentare una pregressa esposizione all'HBV era relativamente bassa e in alcune casistiche poco lontana da quella riscontrata nella popolazione generale. In ogni caso tale evidenza era limitata al reperto di anticorpi anti-HBV, mentre quello dei relativi antigeni era del tutto eccezionale. Per tale motivo, quando fu identificato l'HCV come agente di quella che era nota in precedenza come epatite non-A non-B (33), a chi si interessava di CM

venne spontaneo chiedersi se il nuovo virus poteva avere un qualche ruolo nella sua eziologia. I primi dati positivi furono riportati da Pascual (34), ma sia questi dati, sia quelli del primo studio di Ferri (35) - tra l'altro segnalati ad un congresso prima della pubblicazione di Pascual - si riferivano al reperto di anticorpi anti-HCV in una percentuale di casi non superiore a quella in cui 15 anni prima erano stati repertati gli anticorpi anti-HBV. Fu poi Ferri che in una rapida successione di indagini dimostrò: che con i tests di seconda generazione gli anticorpi anti-HCV erano dimostrabili in oltre il 90% dei casi (36); che con la "polimerase chain reaction" era dimostrabile nel siero anche l'RNA-HCV (37); e che in molti casi erano presenti anche anticorpi anti-GOR rivolti contro una proteina elaborata dall'epatocita infettato dall'HCV e ritenuti un vero e proprio "marker" dell'infezione (38). Questo insieme di dati dimostra in modo assai convincente che la CM, ormai, non si può più definirla "essenziale", ma "HCV-correlata".

L'HCV, peraltro, non infetta solo gli epatociti, ma anche i linfociti (39) e in collaborazione con Zingnego, abbiamo potuto dimostrare che ciò si verifica anche nei linfociti circolanti della CM (40). A questo punto era sostenibile l'ipotesi che, mentre l'infezione degli epatociti è responsabile dell'epatite acuta o cronica da HCV - tra l'altro, l'HCV, a differenza dall'HBV, è dotato di effetti citolesivi diretti - responsabile della CM poteva essere l'infezione dei linfociti, cellule implicate nella risposta immune. I motivi per cui l'HCV infetta preferenzialmente talora gli epatociti, talaltra i linfociti non sono ancora ben chiari: nelle diverse malattie HCV-correlate abbiamo evidenziato differenze nella distribuzione dei genotipi dell'HCV (41) e nella risposta immune ad un epitopo di una proteina strutturale del virus (42), ma non nella distribuzione degli antigeni HLA (43).

I nostri contributi relativi alla CM sono, al momento, questi. Ma, come spesso accade, un filone di indagini può avere sviluppi collaterali che possono portare anche molto lontano dall'obiettivo di partenza. Ed è quello che si è verificato nel nostro caso.

Un primo esempio si riferisce alla dieta a basso contenuto in antigeni. Quando si siamo resi conto della sua efficacia nella CM, ci siamo chiesti se poteva avere qualche altra indicazione ed abbiamo pensato a una malattia immuno-mediata, la cui "noxa" fosse di origine alimentare o venisse comunque a contatto con l'organismo attraverso la mucosa intestinale. Questa situazione poteva esse-

re esemplificata dalla nefrite da IgA (44) e una sperimentazione condotta in collaborazione con i nefrologi ha dato risultati molto soddisfacenti con riduzione della proteinuria e dell'ematuria, aumento della "clearances" renali e quando abbiamo potuto eseguire una seconda biopsia, riduzione dei depositi mesangiali di IgA (45). La sperimentazione potrebbe essere estesa al pemfigo a IgA (46) o alla dermatite a IgA lineari (47), in cui la risposta IgA fa sospettare un meccanismo immuno-mediato analogo e che in singoli casi si possono associare alla nefrite a IgA (48).

Le ricadute extra-reumatologiche delle nostre ricerche sulla CM sono però aumentate criticamente dopo la scoperta dei rapporti tra CM e HCV. Anzitutto, questa scoperta ci ha indotto a riconsiderare i rapporti tra epatite crioglobulinemica e altre epatiti croniche, che oggi riteniamo non più come entità rigidamente separate, ma come un "continuum", in cui solo una parte dei casi si posiziona agli estremi dello spettro di variabilità (49). Un tipico caso di "serendipity" fu, invece, il reperto di una positività per l'HCV in un caso di epatite cronica da porfiria cutanea tarda: la possibilità di attingere alla sieroteca del nostro Centro Trasfusionale ci ha consentito di confermare l'elevata prevalenza dell'infezione da HCV in questa malattia (50), prevalenza che fu segnalata da altri ricercatori mentre era in corso l'elaborazione dei nostri dati (51). Abbiamo poi potuto segnalare una fibrosi polmonare HCV-correlata, isolata o in associazione con altre manifestazioni reumatiche (52, 53). Ma lo sviluppo collaterale più importante di questi studi è quello relativo ai rapporti tra CM e malattie linfoproliferative e tra infezione da HCV e neoplasie. Abbiamo già sottolineato la capacità dell'HCV di infettare sia gli epatociti, che i linfociti. Le conseguenze sono però diverse: a livello degli epatociti l'infezione ha effetti citolesivi e necrotizzanti, a livello dei linfociti rappresenta piuttosto uno stimolo proliferativo, che si traduce in infiltrati linfocitari in vari distretti ed aumento della produzione di immunoglobuline e di formazione di IC. La CM è stata riavvicinata alle malattie linfoproliferative e può occasionalmente complicarsi con un linfoma non Hodgkin (LNH) (54, 55). Ed è proprio partendo dallo studio di un gruppo di LNH complicanti la CM che abbiamo attivato questo filone collaterale di ricerca. A parte la costante presenza di HCV nei linfociti, questi LNH sono abbastanza monomorfi dal punto di vista istologico, trattandosi di regola di linfomi a cellule B a bassa malignità (56). Inoltre, reperto di non facile in-

interpretazione, la comparsa di un LNH nel corso di una CM è spesso accompagnata dalla normalizzazione della complementemia (57). Questi risultati ci hanno indotto a ricercare l'HCV in una casistica di LNH idiopatici, cioè non complicanti una CM e di accertare che in circa 1/3 dei casi essi si associano a un'infezione da HCV (58). Il dato, inizialmente accolto con un certo scetticismo, è stato poi confermato da ematologi italiani (59, 60), giapponesi (61) e statunitensi (62). Solo due gruppi inglesi non hanno confermato i nostri risultati (63, 64), ma ciò si spiega con la rarità delle infezioni da HCV nel Regno Unito (65).

Il LNH non è però la sola neoplasia in cui vi è un rapporto con una infezione da HCV: l'epatite cronica HCV-positiva, infatti, si complica talora con un epatocarcinoma (66) ed anche a livello degli epatociti è stato documentato quella sorta di corto circuito, che avevamo dimostrato a livello dei linfociti, tra infezione della cellule e sviluppo della neoplasia, senza passare attraverso un'affezione intermedia. Infatti, è stata segnalata la possibile comparsa di un epatocarcinoma HCV-positivo in assenza di epatite o cirrosi (67). Ma i rapporti tra HCV, CM, epatiti croniche, LNH ed epatocarcinoma sono ancora più intricati, in quanto abbiamo potuto documentare la comparsa di LNH in corso di epatite cronica HCV-positiva (68) e viceversa, quella di epatocarcinoma in corso di CM (69). Quando abbiamo pubblicato la prima di queste due osservazioni ci ha contattato un anatomo-patologo belga, per segnalarci che 30 anni prima aveva già ipotizzato l'esistenza di rapporti tra cirrosi e linfomi (70).

Le infezioni da HCV non sembrano poi limitarsi a favorire la comparsa di LNH e di epatocarcinomi: abbiamo segnalato, infatti, due casi di linfadenosi cronica, pur sempre una neoplasia dei B-linfociti, associati ad infezione da HCV (71) e recentemente, in collaborazione con Antonelli, abbiamo documentato un'elevata prevalenza di infezione da HCV nei malati di carcinoma della tiroide (72). Questa serie di osservazioni sembra dimostrare in modo convincente l'esistenza di rapporti tra HCV e tumori. Il meccanismo con cui l'HCV può indurre la comparsa di una neoplasia resta però tuttora sconosciuta. L'HCV è un RNA-virus e come tale non può integrarsi nel DNA della cellule infettata. Tra le ipotesi alternative quella per la quale esiste un minimo di evidenza è la possibilità che l'infezione da HCV possa indurre o favorire l'espressione di qualche oncogene: la già citata proteina GOR sembra essere un oncogene (73) e nei

linfociti dei soggetti con infezione da HCV abbiamo documentato una ricombinazione dell'oncogene bcl-2 (74).

BIBLIOGRAFIA

- Meltzer M, Franklin EC. Cryoglobulinemia: a study of 29 patients. *Am J Med* 1996; 828-836.
- Jori GF, Buonanno G. Chronic hepatitis and cirrhosis of the liver in cryoglobulinemia. *Gut* 1972; 13: 610-613.
- Realdi G, Alberti A, Rigoli A, Tremolada F. Immune complexes and Australia antigen in cryoglobulinemic sera. *Z Immunol Forsch* 1974; 147: 114-126.
- Bombardieri S, Ferri C, Di Munno O, Pasero G. Liver involvement in mixed cryoglobulinemia. *Ric Clin Lab* 1979; 9: 361-366.
- Levo Y, Gorevic PD, Kassab HJ, Tobias H, Franklin EC. Liver involvement in the syndrome of mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1977; 87: 287-292.
- Levo Y, Gorevic PD, Kassab HJ, Zucker-Franklin D, Franklin EC. Association between hepatitis B virus and essential mixed cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1977; 296: 1501-1504.
- Bradfield JW. Control of spillover. The importance of Kupffer-cell function in clinical medicine. *Lancet* 1974; ii: 883-885.
- Ferri C, Gremignai G, Migliorini P, Vitali C, Fosella PV, Pasero G, Bombardieri S. Treatment of liver involvement in essential mixed cryoglobulinemia with plasma exchange. *Eur J Clin Invest* 1983; 13:S2/II, abs 257.
- Bombardieri S, Paoletti P, Ferri C, Di Munno O, Fornai E, Giuntini C. Lung involvement in essential mixed cryoglobulinemia. *Am J Med* 1979; 66: 748-756.
- Barbiano di Belgioioso G, Civati G, Scatizzi A, Minetti L. La glomerulonefrite della crioglobulinemia mista essenziale. *Minerva Nefrol* 1979; 19: 139-153.
- Moriconi L, Di Munno O, Cioni L, Paleologo G, Bedini F, Fanara G, Maccheroni M, Bombardieri S. Acidosi renale tubulare nella crioglobulinemia mista essenziale. *Minerva Nefrol* 1981; 28: 37-42.
- Madaio MP, Carlson J, Cataldo J, Ucci A, Migliorini P, Pankewics G. Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form immune deposits. *J Immunol* 1986; 139: 2883-2889.
- Dolcher MP, Marchini B, Sabbatini A, Longombardo G, Ferri C, Riente L, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies from mixed cryoglobulinemia bind glomerular antigens. *Clin Exp Immunol* 1997; 56: 312-322.
- Sabbatini A, Dolcher MP, Marchini B, Chimenti D, Moscato S, Pratesi F, Bombardieri S, Migliorini P. Alpha-enolase is a renal specific enzyme associated with kidney involvement in mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15: 655-658.
- Pratesi F, Moscato S, Sabbadini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies specific for

- alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol* 2000; 27: 109-115.
16. Pasero G, Ferri C, La Civita L. La crioglobulinemia mista. *Reumatismo* 1993; 45: 171-179.
 17. Bernacchi E, La Civita L, Caproni M, Zignego AL, Bianchi B, Monti M, Fabbri P, Pasero G, Ferri C. Hepatitis C virus in cryoglobulinemic leukocytoclastic vasculitis. *Exp Dermatol* 1999; 8: 480-486.
 18. Ferri C, La Civita L, Cirafisi C, Siciliano G, Longombardo G, Bombardieri S, Ferri C. Peripheral neuropathy in mixed cryoglobulinemia: clinical and electrophysiological investigations. *J Rheumatol* 1992; 19: 889-895.
 19. Berrettini S, Ferri C, La Civita L, Segnini D, Lombardini F, Bruschini P, Sellari-Franceschini S. Inner ear involvement in mixed cryoglobulinemia. *Brit J Rheumatol* 1995; 34: 370-374.
 20. Ferri C, Mannini M, Bartoli V, Gremignai G, Genovesi-Ebert F, Cristofani R, Albanese B, Pasero G, Bombardieri S. Blood viscosity and filtration in mixed cryoglobulinemia patients. *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8: 271-282.
 21. Bombardieri S, Ferri C. Variazioni circadiane del criocrito nella crioglobulinemia mista essenziale. *Reumatismo* 1975; 31: 373-374.
 22. 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: S1/57-S1/50.
 23. Ferri C, Gremignai I, Bombardieri S, Moriconi L, Pontandolfo A, Vitali C, Fosella PV, Pasero G. Plasma exchange in mixed cryoglobulinemia: effects on renal, liver, and neurologic involvement. *Ric Clin Lab* 16: 1986; 403-411.
 24. Ferri C, Moriconi L, Gremignai G, Migliorini P, Paleologo C, Fosella PV, Bombardieri S. Treatment of renal involvement in essential mixed cryoglobulinemia with prolonged plasma exchange. *Nephron* 1986; 43: 246-253.
 25. Maggiore Q, L'Abbate A, Bartolomeo F, Misefari V, Caccamo A, Barbiano di Belgioioso G, Tarantino A, Colasanti G. Cryopheresis in cryoglobulinemia. *Ric Clin Lab* 1980; 10: 67-72.
 26. Migliorini P, Riente L, Manca F, Celada F, Bombardieri S. Cold precipitable immune complexes in collagen diseases: evidence for the coexistence of multiple types of circulating complexes in the same serum. *Clin Immunol Immunopathol* 1983; 29: 129-140.
 27. Moriconi L, Ferri C, Puccini R, Casto S, Baronti R, Cecchetti R, Gremignai G, Cioni L, Bombardieri S. Double filtration plasmapheresis in the treatment of cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Int J Artif Organs* 1989; 12: S4/83-S4/86.
 28. Vitali C, Tavoni A, Bombardieri S. La fonction réticulo-endothéliale splénique dans les maladies à complexes immuns. *Méd Hyg* 1984; 42: 109-111.
 29. Ferri C, Pietrogrande M, Cecchetti R, Tavoni A, Cefalo A, Buzzetti C, Vitali C, Bombardieri S. Low-antigen-content diet in the treatment of mixed cryoglobulinemia patients. *Am J Med* 1989; 87: 519-524.
 30. Casato M, Laganà B, Antonelli G, Dianzani F, Bonomo L. Long-term results of therapy with interferon-alpha for type II essential mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1991; 78: 3142-3147.
 31. Ferri C, Marzo E, Longombardo G, Lombardini F, La Civita L, Vanacore A, Liberati AM, Gerli R, Greco F, Moretti A, Monti M, Gentilini P, Bombardieri S. Alpha-interferon in mixed cryoglobulinemia patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Blood* 1993; 81: 1132-1136.
 32. Ferri C, Zignego AL, Longombardo G, Monti M, La Civita L, Lombardini F, Greco F, Mazzoni A, Pasero G, Gentilini P, Bombardieri S, Manns M. Effect of alpha-interferon on hepatitis C virus chronic infection in mixed cryoglobulinemia patients. *Infection* 1993; 21: 93-97.
 33. Choo GL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-361.
 34. Pascual M, Perrin L, Giostra E, Schifer JA. Hepatitis C virus in patients with cryoglobulinemia type II. *J Infect Dis* 1990; 162: 569-570.
 35. Ferri C, Marzo E, Longombardo G, Lombardini F, Greco F, Bombardieri S. Alpha-interferon in the treatment of mixed cryoglobulinemia patients. *Proc Int Cancer Update (Cannes, nov 1, 1990)*. *Eur J Cancer* 1991; 27: 581-582.
 36. Ferri C, Greco F, Longombardo G, Palla P, Moretti A, Marzo E, Fosella PV, Pasero G, Bombardieri S. Antibodies against hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia patients. *Infection* 1991; 19: 417-420.
 37. Ferri C, Greco F, Longombardo G, Palla P, Moretti A, Marzo E, Mazzoni A, Pasero G, Bombardieri S, Highfield P, Corbishley T. Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 621-624.
 38. Ferri C, Longombardo G, La Civita L, Lombardini F, Giuggioli D, Cecchetti R, Cagianelli MA, Marchi S, Costa A, Mazzoni A, Greco F, Manns M. Liver involvement in mixed cryoglobulinemia and autoimmune liver diseases: relation to hepatitis C virus. *Immunology and Liver, Basel, oct 18-20, abs 70, 1992*.
 39. Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, Foschi M, Maggi E, Romagnani S, Gentilini P, Brechot C. Infection of peripheral mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 1992; 15: 382-386.
 40. 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: 3601-3704.
 41. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, Monti M, La Civita L, Careccia G, Longombardo G, Lombardini F, Bombardieri S, Gentilini P. Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1996; 124: 31-34.
 42. Longombardo G, Ferri C, Marchi S, Costa F, Lombardini F, Vacrì L, Bombardieri S, Migliorini P. Immune response to an epitope of the NSA protein of hepatitis

- C virus in HCV related disorders. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87: 124-129.
43. Migliorini P, Bombardieri S, Castellano A, Ferrara GB. HLA antigens in essential mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 1981; 14: 932-936.
 44. Kiyono H, Cooper MD, Kearney JF, Mosteller LM, Michalek SM, Koopman WJ. Isotype specificity of helper T cells clones: Peyer's patch Th cells preferentially collaborate with mature IgA B cells for IgA response. *J Exp Med* 1984; 159: 798-811.
 45. Ferri C, Puccini R, Longombardo G, Paleologo C, Migliorini P, Moriconi L, Pasero G, Cioni L. Low-antigen-content diet in the treatment of patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transpl* 1993; 8: 1193-1198.
 46. Beutner EM, Chorzelski TP, Wilson RM, Kumar V, Michel N, Helm F, Jablonska S. IgA pemphigus foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 89-97.
 47. Bhogal B, Wojnariwska F, Marsden RA, Das A, Black MM, McKee PH. Linear IgA bullous dermatosis of adults and children: an immunoelectron-microscopic study. *Brit J Dermatol* 1987; 117: 289-296.
 48. Perez GL, Agger WA, Abellera RM, Dahlberg P. Pemphigus foliaceus coexisting with IgA nephropathy in a patient with psoriasis vulgaris. *Int J Dermatol* 1995; 34: 794-796.
 49. Ferri C, Longombardo G, La Civita L, Greco F, Lombardini F, Cecchetti R, Cagianelli MA, Marchi S, Monti M, Zignego AL, Manns MP. Hepatitis C virus as common cause of mixed cryoglobulinemia and chronic liver diseases. *J Intern Med* 1994; 236: 31-36.
 50. Ferri C, Baicchi U, La Civita L, Greco F, Longombardo G, Mazzoni A, Careccia A, Bombardieri S, Pasero G, Zignego AL. Hepatitis C virus related autoimmunity in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 851-855.
 51. Fargion S, Piperno A, Cappellini MD, Sampietro M, Fracanzani AI, Romano R, Caldarelli R, Marcelli M, Vecchi L, Fiorelli G. Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence for a strong association. *Hepatology* 1992; 16: 1322-1326.
 52. 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. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1074-1075.
 53. Ferri C, La Civita L, Fazzi P, Solfanelli S, Lombardini F, Begliomini N, Monti M, Longombardo G, Pasero G, Zignego AL. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. *Brit J Rheumatol* 1997; 36: 360-365.
 54. Gorevic PD, Frangione B. Mixed cryoglobulinemia cross-reactive idiotypes: implication for relationship of MC to rheumatic and lymphoproliferative diseases. *Semin Hematol* 1991; 28: 79-94.
 55. Monteverde A, Sabattini E, Poggi S, Ballarè M, Bertocelli MP, De Vivo A. Bone marrow findings further support the hypothesis that essential mixed cryoglobulinemia type II is characterized by a monoclonal B-cell proliferation. *Leukemia Lymphoma* 1995; 20: 119-124.
 56. Ferri C, Monti M, La Civita L, Careccia A, Mazzaro C, Longombardo G, Lombardini F, Greco F, Pasero G, Bombardieri S, Zignego AL. Hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's lymphoma complicating mixed cryoglobulinemia. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 781-784.
 57. Vitali C, Ferri C, Nasti P, La Civita L, Mazzantini M, Longombardo G, Bombardieri S. Hypercomplementaemia as a marker of the evolution from benign to malignant B-cell proliferation in patients with type II mixed cryoglobulinemia. *Brit J Rheumatol* 1994; 33: 791-792.
 58. Ferri C, Caracciolo F, Zignego AL, La Civita L, Monti M, Longombardo G, Lombardini F, Greco F, Capochiani E, Mazzoni A, Mazzaro C, Pasero G. Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Brit J Haematol* 1994; 88: 392-394.
 59. Silvestri F, Pipan C, Barillari G, Zaja F, Fanin R, Infanti L, Russo D, Falasca E, Botta G, Baccarani M. Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 1996; 87: 4296-4301.
 60. Luppi M, Grazia FM, Bonaccorsi G, Longo G, Narni F, Barozzi P et al. Hepatitis C virus infection in a subset of neoplastic lymphoproliferation not associated with cryoglobulinemia. *Leukemia* 1996; 10: 351-355.
 61. Izumi T, Sasaki R, Tsonoda S, Akutsu M, Okamoto H, Miura MT. B-cell malignancy and hepatitis C virus infection. *Leukemia* 1997; 11: S3/516-518.
 62. Zuckerman E, Zuckerman T, Levine AM, Douer D, Gutekuni K, Mizokami M et al. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell nonHodgkin's lymphoma. *Ann Intern Med* 1997; 127: 423-428.
 63. Hanley J, Jarvie L, Simmonds P, Parker A, Ludlam C. HCV and nonHodgkin's lymphoma. *Lancet* 1996; 347: 1339.
 64. McColl MD, Tait RC. Hepatitis C virus in patients with lymphoproliferative disorders. *Brit J Haematol* 1993; 92: 771-773.
 65. Ferri C, La Civita L, Zignego AL. Hepatitis C virus in patients with lymphoproliferative disorders. *Brit J Haematol* 1996; 92: 773.
 66. Tsokuma K, Hyyama T, Tanaka S, Nakau M, F Yabuchi T, Mitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H, Kawashima T. Risk factor for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 1797-1801.
 67. De Mitri MS, Poussin K, Baccarani P, Pontisso P, D'Ercole A, Simon N, Grigioni W, Alberti A, Beaugrand M, Pisi E, Brechot C, Paterlini P. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995; 345: 413-415.
 68. Ferri C, La Civita L, Longombardo G, Cecchetti R, Giannini C, Zignego AL. Type C chronic hepatitis complicated by B-cell lymphoma. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 2071-2071.
 69. Ferri C, La Civita L, Zignego AL, Lombardini F, Longombardo G, Gentilini P, Pasero G. Hepatocellular carcinoma in mixed cryoglobulinemia patients. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 111-112.
 70. Heimann R, Lesmagnard L, Fargent JL, Desmet VJ. Is there a link between viral hepatitis and lymphoproliferative disorders? From the autopsy room to the PCR

- thermal cycler (review). *Curr Diagn Pathol* 1996; 3: 177-181.
71. La Civita L, Zignego AL, Monti M, Longombardo G, Greco F, Pasero G, Ferri C. Type C hepatitis and chronic lymphatic leukemia. *Eur J Clin Invest* 1996; 324: 1819-1820.
72. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P. Thyroid cancer in patients with hepatitis C infection. *JAMA* 1999; 281: 1588.
73. Mishiro S, Takeda A, Hoshi Y, Uoshikama A, Gotanda T, Itoh T. An auto-antibody cross-reactive to hepatitis-C-virus core and a host nuclear antigen. *Autoimmunity* 1991; 10: 269-273.
74. 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. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15: 711-712.