



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

FLORE

Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

Strategie terapeutiche nella crioglobulinemia mista: recenti acquisizioni

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:

Strategie terapeutiche nella crioglobulinemia mista: recenti acquisizioni / A.L. Zignego. - In: REUMATISMO. - ISSN 0048-7449. - STAMPA. - 63:(2011), pp. 229-234.

Availability:

The webpage <https://hdl.handle.net/2158/649056> of the repository was last updated on

Terms of use:

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

Publisher copyright claim:

La data sopra indicata si riferisce all'ultimo aggiornamento della scheda del Repository FloRe - The above-mentioned date refers to the last update of the record in the Institutional Repository FloRe

(Article begins on next page)

STRATEGIE TERAPEUTICHE NELLA CRIOGLOBULINEMIA MISTA: RECENTI ACQUISIZIONI

A.L. ZIGNEGO

Dipartimento di Medicina Interna, Centro Manifestazioni Sistemiche da Virus Epatitici MASVE e Centro di ricerca, trasferimento e alta formazione DENOthe, Università degli Studi di Firenze

INTRODUZIONE

È noto che la crioglobulinemia mista (CM) un tempo definita "essenziale" è oggi considerata una patologia essenzialmente secondaria all'infezione cronica da virus dell'epatite C (HCV), con prevalenze associative che in Italia arrivano a superare il 90% dei casi. Solo in una minoranza di pazienti la forma appare secondaria all'infezione da virus B dell'epatite (HBV) o a cause diverse (forme essenziali propriamente dette) (1-3). Per tale ragione è soprattutto a partire dalla scoperta dell'HCV, nel 1989, che si sono registrati importanti progressi nella comprensione della fisiopatologia della forma, con conseguenti novità nell'approccio terapeutico.

Nonostante una sostanziale riduzione della sua incidenza nell'ultimo ventennio, l'infezione da HCV rimane un'epidemia globale con un'alta prevalenza mondiale (3%) ed è oggi la più comune infezione parenterale cronica nel mondo occidentale. Per quanto concerne la patologia epatica, poiché approssimativamente il 20% dei pazienti infetti va incontro ad una cirrosi, numerose proiezioni suggeriscono che la morbilità e mortalità da epatite C continuerà a salire nel corso dei prossimi 12-20 anni. La malattia epatica terminale è di fatto oggi la più comune indicazione al trapianto di fegato negli adulti, ed il carcinoma epatocellulare (HCC) sta aumentando di frequenza in modo allarmante.

A parte le conseguenze epatiche, molto precocemente dopo la scoperta del virus, la sorprendente associazione rilevata fra tale infezione e patologie piuttosto attinenti al sistema immunitario, oltre che le caratteristiche virologiche dell'agente, indussero a valutare e mostrare la possibilità di un duplice tropismo virale - epatico e linfatico - dell'HCV (4). È emerso quindi il concetto di un virus ad un tempo epatotropico - responsabile di epatopatie di vario grado di severità fino alla neoplasia epatica - e linfotropico - ritenuto a capo di varie manifestazioni extraepatiche per lo più di tipo autoimmune e/o linfoproliferativo - (5).

In modo particolare, prendendo le mosse dalle prime osservazioni effettuate agli inizi degli anni '90 (6, 7), si è andata sviluppando una ricca letteratura incentrata sull'associazione strettissima fra HCV e crioglobulinemia mista (CM) definita "essenziale" (1-3). La sua definizione si riferisce alla presenza, nel sangue dei pazienti, di immunocomplessi caratterizzati dal fatto di precipitare a temperature sotto i 37°C e ridissolversi al riscaldamento e composti da IgG policlonali ed IgM con attività FR che sono mono-oligoclonali nel tipo II e policlonali nel tipo III.

La CM è un disordine ad un tempo autoimmune e linfoproliferativo che, sebbene benigno, è ritenuto prelinfomatoso, potendo evolvere in un linfoma non-Hodgkin a cellule B in circa l'8-10% dei casi (8, 9). Le manifestazioni cliniche della CM, presenti solo in una minoranza di tali pazienti, configurano la cosiddetta sindrome crioglobulinemica e sono attribuibili allo sviluppo di una vasculite sistemica interessante vasi di piccolo calibro. Tale vasculite è essenzialmente secondaria alla precipitazione e deposito di immunocomplessi circolanti, soprattutto crioglobuline e complemento, a livello dell'endotelio vascolare, con il possibile contributo di fattori emoreologici e locali (10). Caratterizzata dalla classica triade di porpora, artralgia ed astenia, la sindrome prevede una combinazione varia di sintomi e segni secondari al coinvolgimento di vari organi ed apparati, fra cui risultano di particolare rilievo - oltre alla cute ed alle articolazioni - il rene, il sistema nervoso, le ghiandole salivari e lacrimali.

Le peculiarità di tale complessa patologia sistemica ha da sempre giustificato l'interessamento di specialisti di varia estrazione (es. reumatologi, nefrologi, neurologi, dermatologi, ematologi) cui, in modo crescente, si sono aggiunti gli epatologi (internisti o gastroenterologi) e gli infettivologi. Risulta quindi molto importante una proficua circolazione di informazioni e scambio multidisciplinare di esperienze.

L'approccio antivirale nella terapia della CM

In tema di trattamento della CM, il progressivo incremento delle evidenze a favore di una connessione non solo epidemiologica, ma etiopatogenetica fra infezione cronica da HCV e CM, ha ovviamente condizionato il tradizionale approccio clinico-terapeutico, innestando su una terapia conservativa, finemente modulata "ad personam" sulle manifestazioni patologiche e fundamentalmente incentrata su provvedimenti immunosoppressori, antiflogistici e sintomatici, la speranza di una guarigione secondaria all'eradicazione dell'agente causale (per una sintesi aggiornata, vedi (11).

A partire dai primi lavori effettuati nel 1993 (12, 13), la terapia "etiologica" o anti-virale della CM HCV-correlata ha seguito, pur con una giustificabile latenza e con una maggiore o minore modificazione dei protocolli, le evoluzioni della terapia dell'infezione cronica da HCV registrate in ambito epatologico. Si sono così succeduti, in tempi diversi, studi impieganti l'interferone (IFN) ricombinante in monoterapia, quindi l'IFN con l'aggiunta della ribavirina (RBV) ed infine l'IFN peghilato (Peg-IFN) con RBV, attuale standard della terapia dell'infezione (3, 14). Fra tali modifiche si annoverano, fra l'altro, la contemporanea somministrazione di cortisonici o altri agenti ad effetto immunosoppressore - noti per la potenzialità di in-

crementare la replicazione dell'HCV - ed il prolungamento o la riduzione dei tempi di trattamento rispetto agli standard, con punti di riferimento decisionali riferiti alla patologia (la sindrome crioglobulinemica) piuttosto che alla risposta virologica. Questo atteggiamento prudentiale è stato ampiamente giustificato dalle incertezze riguardo all'effetto di tale nuovo approccio su pazienti con una patologia così differenziata e complessa rispetto a quella (l'epatopatia cronica) per la quale esistevano abbondanti evidenze e definiti criteri decisionali basati essenzialmente sulla risposta virologica e le sue caratteristiche.

La chiave di volta poteva essere rappresentata solo dalla dimostrazione di una stretta correlazione esistente fra eventi virologici e fattori sia patogenetici che clinici. Gli ostacoli maggiori per ottenere rapidamente tale obiettivo, sono stati la relativa rarità della sindrome - e quindi la scarsità delle casistiche - ed i possibili effetti negativi della terapia su particolari manifestazioni della sindrome che potevano essere bersaglio di effetti collaterali dei farmaci usati. Basti citare, a tal proposito, la possibile neurotossicità dell'IFN (vedi possibili esacerbazioni di una neuropatia crioglobulinemica), l'emolisi da RBV con secondario rischio di ipossia tissutale (vedi le ulcere cutanee etc.), oltre al possibile effetto mieloinibitorio dell'IFN.

Tabella I - Monoterapia IFN in pazienti con crioglobulinemia mista HCV-correlata.

Autore	Anno	No. pazienti	Trattamento	CS	Durata trattamento (mesi)	Risposta EOT	Risposta sostenuta
Ferri	1993	15	2 MIU IFN/d (1m) - 2 MIU IFNx3/w (5m)	Si	6	80%	
Ferri	1993	26	2 MIU IFN/d (1m) - 2 MIU IFNx3/w (5m)	Si	6	100%	0
Marcellin	1993	2	3 MIU IFNx3/w		6	50%	
Johnson	1993	4	1-10 MIU IFN	No	2-12	75%*	
Misiani	1994	27	1.5 MIU IFNx3/w (1w) - 3 MIU IFNx3/w (23w)	No	6	60%	0
Dammacco	1994	15	3 MIU IFNx3/w	No	12	53.3%	25%
		16	3 MIU IFNx3/w	Si	12	52.9%	33.3%
Johnson	1994	14	Variable IFN	No		0*	
Mazzaro	1994	18	3 MIU IFNx3/w	No		28%	
Mazzaro	1995	18	3 MIU IFNx3/w	No	6	28%	11%
		18	3 MIU IFNx3/w	No	12	39%	22%
Casari	1996	25	6 MIU IFNx3/w	No	6	52%**	
Cohen	1996	20	3 MIU IFNx3/w			60%§	9%§
Akriviadis	1997	20	3-5 MIU IFNx3/w	No	6-12	65%**	33%**
Casato	1997	31	3 MIU IFN/d (3m.) - 3 MIU IFNx3/w (>9m.)	No	>12	62%	n/a
Mazzaro	1997	42	3 MIU IFNx3/w		12	*31%/	14% (*100% miglioramento)

CS: corticosteroidi; MIU: Milioni di unità internazionali; EOT: fine trattamento; NR: non responders; RBV: ribavirina; Rel: relapsers; w: settimana. *Miglioramento della funzionalità renale; **scomparsa Crioglobuline, §risposta sia completa che parziale della sindrome crioglobulinemica.

Nonostante le problematiche sopra esposte, negli ultimi 20 anni si sono accumulate evidenze a favore dell'effettiva esistenza di una stretta correlazione fra definitiva eradicazione dell'infezione (possibile per le caratteristiche virali) e risoluzione della sindrome e, all'inverso, fra palese od occulta persistenza dell'infezione e suo mantenimento ed evoluzione (9, 15, 16). Sono stati preziosi, per ottenere tali evidenze, dati ricavati da pazienti con forme da moderato a lieve della sindrome clinica ed in cui è stato pertanto possibile effettuare una terapia eradicante efficace e completa ed in più con analisi approfondita dell'effettiva eradicazione virale.

In un'ampia analisi della letteratura che abbiamo potuto effettuare abbastanza recentemente (Tabelle I e II), su un totale di oltre 50 studi considerati valutabili (inclusi case report di almeno 3 pazienti), 28 studi (inclusenti 3 RCT ed un numero totale di 555 pazienti) mostravano un miglioramento - vuoi transitorio, vuoi persistente - della sindrome MC con una stretta correlazione fra risposta virologica e clinica; fra questi, in 15 studi (per un totale di 200 pazienti) si mostrava l'ottenimento di una risposta clinica sostenuta in pazienti con risposta virologica sostenuta (SVR); addirittura in 4 studi (per un totale di 189 pazienti) si mostrava un "sorpasso" della risposta clinica rispetto alla virologica, nel senso che la risposta clinica, nel periodo limitato del follow-up, veniva registrata anche in taluni pazienti in cui non si era ottenuta l'eradicazione virale completa (nessun riferimento a dati nel lungo follow-up). A tali dati si contrapponeva-

no esperienze di segno negativo: in 6 studi (per un totale di 8 pazienti) si osservava un peggioramento o la comparsa di una crioglobulinemia a seguito dell'uso della terapia basata sull'interferone ed in 4 studi (per un totale di 20 pazienti) veniva riportata la persistenza di crioglobuline circolanti o di una sindrome crioglobulinemica nonostante la risposta virologica.

L'analisi di simili dati ha recentemente portato un'apposita commissione di esperti, organizzata dalla nostra associazione (A.L.CRI./G.I.S.C.) a concludere che "An attempt at viral eradication using pegylated interferon plus ribavirin should be considered the first-line therapeutic option in patients with mild-moderate HCV-related MCS" (11). L'assenza di dati ricavati da validi studi prospettici controllati, non può consentire di stabilire con rigore scientifico l'identità nella risposta alla terapia antivirale standard di pazienti con infezione da HCV sicuramente con CM rispetto a pazienti sicuramente senza CM. Di fatto, la presenza o meno di crioglobulinemia non può essere definita retrospettivamente e l'erroneo inserimento di pazienti crioglobulinemici fra i controlli negativi può nascondere eventuali differenze. Ciononostante appare oggi giustificato il trattamento del paziente con una forma lieve-moderata di CM HCV+ con gli stessi criteri, oggi ritenuti ottimali utilizzando Peg-IFN e RBV nel caso di un'infezione cronica evoluta in epatopatia (per una sintesi vedi (17, 18). A parte i dati clinici, tale indicazione è stata motivata anche da studi dimostranti un effetto positivo

Tabella II - Terapia combinata IFN (ricombinante or pegilato) + ribavirina in pazienti con crioglobulinemia mista HCV-correlata.

Autore	Anno	No. pazienti	Trattamento	CS	Durata trattamento (mesi)	Risposta EOT	Risposta sostenuta
Durand	1998	5 NR	RBV	No	10-36	100%	0%
Calleja	1999	1	3 MIU IFN \times 3/w \times 8	No	12	55%	28%
		8 NR	3 MIU IFN \times 3/w + RBV	No	12	63%	38%
Zuckerman	2000	9NR	3 MIU IFN \times 3/w + RBV	No	6	78%	
Cacoub	2002	14	Variabile IFN + RBV	variabile	6-56		71%
Mazzaro	2003	27NR or Rel	3MIU \times 3/w + RBV	No	12	85%	
Alric	2004	18	3MIU \times 3/w or Peg-IFN+RBV	No	>18		70%
Cacoub	2005	9	Peg-IFN 1.5ug/Kg/w+RBV		>10		88%
Mazzaro	2005	18	Peg-IFN 1ug/Kg/w + RBV	No	12	89%	44%
Garini	2007	4	IFN 3MIU \times 3/w o Peg-IFN+RBV		6-12	4 (100%)	3 (75%)
Montalbano	2007	1	Peg-IFN +RBV			1	1
Joshi	2007	38	IFN or Peg-IFN +RBV		6-12	n/a	42%
Trebst	2007	1	Peg-IFN +RBV			1	0
Landau	2008	49	Peg-IFN +RBV		> 6	n/a	59%

CS: corticosteroidi; MIU: Milioni di unità internazionali; EOT: fine trattamento; NR: non responders; RBV: ribavirina; Rel: relapsers; w: settimana.

della terapia sull'espansione clonale B-cellulare che sottende la forma patologica, con regressione di cloni di cellule B ritenute svolgere un ruolo patogenetico significativo a seguito di eradicazione virale e possibile riespansione degli identici cloni in casi di risposta transitoria e ricaduta virologica dopo la sospensione della terapia (19, 20)

Una spiegazione dell'azione della terapia antivirale sulla cascata patogenetica a capo della CM e dei suoi effetti non sempre completamente risolutivi, potrebbe risiedere nel fatto che il processo plurifasico innescato dalla stimolazione importante e sostenuta del compartimento B-cellulare da parte dell'infezione, comporti fasi successive di progressivo sganciamento dall'agente etiologico, di cui sarebbero soprattutto responsabili eventi genetici. Questo comporterebbe la possibilità, in soggetti in fase più avanzata della malattia, di una mancata o solo parziale regressione del processo patologico. Il messaggio clinico che sembra logico dedurre da tale impostazione è l'opportunità di un trattamento eradicante effettuato il più precocemente possibile, prima del raggiungimento di punti di non ritorno.

L'introduzione dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 (rituximab) nella terapia della CM

Ancora più recentemente dell'introduzione della terapia antivirale, nel novero del trattamento della CM si è aggiunto l'uso del farmaco biologico Rituximab (RTX), un anticorpo monoclonale chimerico anti-CD20 umano. La sua efficacia e la fondamentale sicurezza del suo uso nella CM, sia HCV-correlata che essenziale, sono stati chiaramente mostrati in numerosi studi (per una revisione della letteratura vedi (21)). Questi hanno fondamentalmente incluso pazienti per i quali il trattamento antivirale era controindicato o mal tollerato. È stato possibile mostrare che il RTX era molto efficace nel modificare la dinamica delle cellule B tramite la deplezione di cloni espansi e nel migliorare significativamente la sindrome crioglobulinemica nella maggior parte dei casi (22). Tale miglioramento è generalmente prolungato per oltre 6 mesi. Peraltro, la possibilità che la replicazione virale ed i valori delle transaminasi possano subire un consistente incremento secondario all'immunosoppressione - analogamente a quanto registrato nel caso dell'infezione da virus B dell'epatite, HBV - ha molto limitato il suo uso in pazienti con un grado avanzato di danno epatico. Conseguentemente esistono dati limitati sull'effetto del RTX in pazienti con danno epatico avan-

zato, situazione purtroppo frequentemente riscontrabile in tale tipo di evoluzione dell'infezione cronica virale (23, 24) e verosimilmente correlata al prolungato tempo necessario all'infezione stessa perché la forma si manifesti clinicamente. A tal proposito, in studi recenti abbiamo potuto mostrare l'efficacia e tollerabilità del RTX anche in pazienti con danno epatico severo, inclusi pazienti con cirrosi HCV-correlata in fase di scompenso ascitico (25, 26). Non solo, ma si è potuto mettere in luce un effetto imprevisto del trattamento nella sindrome cirrosi, con suo consistente miglioramento a seguito della deplezione B-linfocitaria indotta dal RTX. Indagini volte a valutare il possibile ruolo in questo svolto da un miglioramento della funzione del sistema reticoloendoteliale epatico - eventualmente secondario a quello del criocrito - non hanno fornito dati a favore, né sono state evinte differenze sostanziali nelle immagini delle sezioni epatiche in microscopia ottica ed elettronica (25). Tali dati, associati alla rapidità dell'effetto, fanno propendere per un ruolo significativo svolto da modificazioni indotte dalla terapia nel network citochinico e sollecitano studi volti a rivalutare il ruolo svolto dalla componente B cellulare del sistema immunitario nell'immunopatogenesi del danno cronico da HCV (25). L'apertura dell'uso del RTX anche a pazienti con CM e danno epatico avanzato consente di recuperare una consistente quota di pazienti a tale importante provvedimento terapeutico. Va sempre tenuto presente, peraltro, che nel caso di danno particolarmente avanzato, come nella situazione limite della cirrosi scompensata, nonostante i risultati confortanti sopra accennati, si dovrà sempre tener in giusta considerazione la fondamentale fragilità del paziente affetto da tale forma terminale, monitorizzandolo con ritmo più serrato che di consueto.

Si è detto che tale terapia si colloca idealmente nel settore dei pazienti affetti da forme di CM gravi e pertanto difficilmente includibili in protocolli utilizzanti farmaci antivirali. È peraltro osservazione diffusa la possibilità, a seguito del trattamento con RTX, del recupero di pazienti inizialmente esclusi, per il miglioramento di aspetti controindicanti, quali una situazione di severa pancitopenia o di ulcere malleolari persistenti, di vasculite diffusa od altro (25). A tal proposito va fatta notare l'efficacia dimostrata dal RTX anche in situazioni di vasculite addominale severa (27). Le modalità di somministrazione del RTX nella CM, per lo più effettuate con i criteri utilizzati nella terapia delle malignità ematologiche (375 mg/m² settimanalmente, per 4

settimane), potrebbero, secondo recenti studi, essere consistentemente ridotte senza sensibili modificazioni dell'efficacia clinica (28, 29). Questo potrebbe consentire una riduzione degli effetti collaterali eventualmente registrati oltre che della spesa sanitaria.

A tal proposito va infatti sottolineato che tale terapia, a differenza di quella etiologica, è di per sé di efficacia transitoria per la progressiva ricostituzione del compartimento B-linfocitario, nonostante la durata soddisfacente degli intervalli di miglioramento o risoluzione del quadro clinico che, in media, risultano superiori ai sei mesi.

La transitorietà negli effetti, associata al lungo decorso di tale patologia linfoproliferativa benigna, accrescono l'interesse per protocolli che vedono il trattamento biologico abbinato in vario modo con la terapia eradicante antivirale. Molto sentita è anche la necessità di migliorare razionalmente la scelta terapeutica con l'ausilio di nuovi marcatori prognostici di risposta, sia nel campo del trattamento con RTX (quali il genotipo di un recettore per le IgG, FcGR3A (30)) che in quello del trattamento antivirale (quali il polimorfismo dell'IL28B).

Prospettive future

È prevedibile che ulteriori importanti sviluppi della terapia della CM si possano ottenere a seguito dell'introduzione, nelle forme HCV-correlate, di nuovi farmaci DAA (Direct Acting Antivirals) dotati di azione antivirale diretta e quindi privi di effetti immunomodulanti/antiproliferativi, nonché dall'evoluzione degli anticorpi monoclonali anti-CD20 o di altri tipi di terapia biologica.

A tale proposito appaiono di interesse dati recenti a favore dell'importanza di una predisposizione genetica allo sviluppo della CM che risulterebbe correlata con particolari genotipi del promotore del BAFF, una citochina specifica per i linfociti B (30, 31).

Simili dati supportano l'ipotesi per cui il reperto di livelli elevati di BAFF nei soggetti con CM rispetto ai controlli sani (32) non rappresenti solo un corollario, ma piuttosto un fattore causale di tale evoluzione e quindi indicano la possibilità di un effetto positivo della somministrazione di un anticorpo monoclonale anti-BAFF, tra l'altro già disponibile (Belimumab) e sperimentato con successo in altre patologie autoimmuni (33).

In sintesi, i dati oggi disponibili relativamente al trattamento della CM indicano che siamo in una fase molto stimolante di ricerca clinica traslazionale in cui l'indagine effettuata al letto del malato ed in

laboratorio fanno sperare di potere, in un futuro non lontano, permettere il chiarimento dell'approccio terapeutico più efficace e duraturo per tale complessa patologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferri C, Zignego AL, Bombardieri S, et al. Etiopathogenic role of hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia, chronic liver diseases and lymphomas. *Clin Exp Rheumatol.* 1995; 13 (Suppl. 13): S135-40.
2. Ferri C, Zignego AL, Giuggioli D, et al. HCV and cryoglobulinemic vasculitis. *Cleve Clin J Med.* 2002; 69 (Suppl. 2): S120-23.
3. Zignego AL, Ferri C, Pileri SA, et al. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: A general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis.* 2007; 39: 2-17.
4. Zignego AL, Macchia D, Monti M, et al. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus [see comments]. *J Hepatol.* 1992; 15: 382-6.
5. Zignego AL, Ferri C, Monti M, et al. Hepatitis C virus as a lymphotropic agent: evidence and pathogenetic implications. *Clin Exp Rheumatol.* 1995; 13: S33-7.
6. Ferri C, Greco F, Longombardo G, et al. Hepatitis C virus antibodies in mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol.* 1991; 9: 95-6.
7. Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol.* 2004; 40: 341-52.
8. Ferri C, La Civita L, Longombardo G, et al. Mixed cryoglobulinaemia: a cross-road between autoimmune and lymphoproliferative disorders. *Lupus.* 1998; 7: 275-9.
9. Zignego AL, Giannini C, Ferri C. Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders: an overview. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 2467-78.
10. Ferri C, Antonelli A, Mascia MT, et al. B-cells and mixed cryoglobulinemia. *Autoimmun Rev.* 2007; 7: 114-20.
11. Pietrogrande M, De Vita S, Zignego AL, et al. Recommendations for the management of mixed cryoglobulinemia syndrome in hepatitis C virus-infected patients. *Autoimmun Rev.* 2011 Feb 15. [Epub ahead of print].
12. Ferri C, Marzo E, Longombardo G, et al. Interferon-alpha in mixed cryoglobulinemia patients: a randomized, crossover-controlled trial. *Blood.* 1993; 81: 1132-6.
13. Marcellin P, Descamps V, Martinot-Peignoux M, et al. Cryoglobulinemia with vasculitis associated with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 1993 Jan; 104: 272-7.
14. Zignego AL, Craxi A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2008 Aug; 12: 611-636, ix.
15. Giannini C, Giannelli F, Linda Zignego A. Association between mixed cryoglobulinemia, translocation (14;18), and persistence of occult HCV lymphoid infection after treatment. *Hepatology.* 2006 Apr 20; 43: 1166-7.

16. Giannini C, Petrarca A, Monti M, et al. Association between persistent lymphatic infection by hepatitis C virus after antiviral treatment and mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 2008 Mar 1; 111: 2943-5.
17. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2011 Aug; 55: 245-64.
18. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009 Apr; 49: 1335-74.
19. Zignego AL, Ferri C, Giannelli F, et al. 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: 571-80.
20. Giannelli F, Moscarella S, Giannini C, et al. Effect of antiviral treatment in patients with chronic HCV infection and t(14;18) translocation. *Blood*. 2003; 102: 1196-201.
21. Ferri C, Cacoub P, Mazzaro C, et al. Treatment with rituximab in patients with mixed cryoglobulinemia syndrome: Results of multicenter cohort study and review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2011 Jul 24.
22. Zaja F, De Vita S, Mazzaro C, et al. Efficacy and safety of rituximab in type II mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 2003; 101: 3827-34.
23. Lunel F, Musset L, Cacoub P, et al. Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. *Gastroenterology*. 1994; 106: 1291-300.
24. Kayali Z, Buckwold VE, Zimmerman B, et al. Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: a meta-analysis. *Hepatology*. 2002 Oct; 36: 978-85.
25. Petrarca A, Rigacci L, Caini P, et al. Safety and efficacy of rituximab in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia and severe liver disease. *Blood*. 2010 Jul 22; 116: 335-42.
26. Petrarca A, Rigacci L, Monti M, et al. Improvement in liver cirrhosis after treatment of HCV-related mixed cryoglobulinemia with rituximab. *Dig Liver Dis*. 2007 Sep; 39 (Suppl. 1): S129-33.
27. Quartuccio L, Petrarca A, Mansutti E, et al. Efficacy of rituximab in severe and mild abdominal vasculitis in the course of mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol*. 2010; 28: 84-7.
28. Visentini M, Granata M, Veneziano ML, et al. Efficacy of low-dose rituximab for mixed cryoglobulinemia. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2007; 125: 30-3.
29. Visentini M, Ludovisi S, Petrarca A, et al. A phase II, single-arm multicenter study of low-dose rituximab for refractory mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection. *Autoimmun Rev*. 2011; 10: 714-9.
30. Gragnani L, Piluso A, Giannini C, et al. Genetic determinants in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia: role of polymorphic variants of BAFF promoter and Fcγ receptors. *Arthritis Rheum*. 2011; 63: 1446-51.
31. Giannini C, Gragnani L, Piluso A, et al. Can BAFF promoter polymorphism be a predisposing condition for HCV-related mixed cryoglobulinemia? *Blood*. 2008; 112: 4353-4.
32. Fabris M, Quartuccio L, Sacco S, et al. B-Lymphocyte stimulator (BLyS) up-regulation in mixed cryoglobulinaemia syndrome and hepatitis-C virus infection. *Rheumatology (Oxford)*. 2007; 46: 37-43.
33. Wallace DJ, Stohl W, Furie RA, et al. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009; 61: 1168-78.