

Significato clinico degli autoanticorpi anti-nucleo in pazienti con epatite cronica C

Valentina Grossi, Umberto Basile

Laboratorio di Immunologia, Istituto di Patologia Generale, Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

ABSTRACT

Clinical significance of antinuclear autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. In recent years, the relationship between hepatitis C virus (HCV) infection and dermatologic, hematologic, endocrinologic, respiratory, rheumatic and autoimmune syndromes has been the subject of intense research and debate. Particularly, the detection of immunological phenomena, like the occurrence of circulating autoantibodies in patients with HCV infection has been extensively studied and characterized. A considerable body of evidence accumulated in favor of the hypothesis that HCV is involved in the breaking of tolerance to self-antigens and, thus, in triggering autoreactivity. A number of extrahepatic manifestations have been described in relationship with chronic HCV infection, most of which possibly mediated by immunological mechanisms. The prevalence of circulating autoantibodies in HCV-related chronic hepatitis ranges from 10% to 21% for antinuclear antibodies (ANA), 10% to 55% for smooth muscle antibodies (SMA) and 0% to 6% for liver/kidney microsomal antibodies type 1 (LKM). Correlations have been shown between autoantibodies and the biochemical and histological activity of liver disease, but it is unclear whether they are directly involved in the progression of the liver damage or whether they simply represent a response to autoantigens released from dying hepatocytes.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, l'associazione tra l'infezione da virus dell'epatite C (HCV) e i disordini autoimmuni, che vanno dalla semplice emergenza di fenomeni di autoreattività (autoanticorpi) alla comparsa di manifestazioni anche clinicamente rilevanti, è stata al centro di dibattiti e ricerche (1-5). In particolare, la comparsa di autoanticorpi circolanti organo e non-organo specifici (NOSA) in pazienti HCV-positivi richiede ancora una definitiva interpretazione in termini di meccanismi responsabili della loro comparsa e del loro significato clinico.

La WHO ha recentemente pubblicato una stima globale dell'incidenza dell'infezione da HCV, dalla quale emerge che il 3% della popolazione mondiale è stato infettato dal virus e che più di 170 milioni di individui sono portatori cronici a rischio di sviluppare epatite cronica, cirrosi e/o cancro del fegato. Le infezioni croniche da HCV rappresentano pertanto un problema socio-sanitario di primaria importanza, per il quale risulta fondamentale lo sviluppo di strategie preventive efficaci e di approcci terapeutici innovativi che possano permettere di migliorare ulteriormente l'efficacia dei trattamenti attualmente disponibili. In questa prospettiva, la conoscenza dei meccanismi patogenetici di danno epatico e di persistenza virale in corso di infezione da HCV rappresenta un requisito essenziale per consentire di disegnare vaccini e terapie razionali. In particolare, un aspetto che merita attenzione rimane la frequente comparsa dei NOSA e di manifestazioni extraepatiche in pazienti HCV-positivi per le implicazioni terapeutiche legate all'uso di interferone o corticosteroidi. Le

conseguenze sono rappresentate da un difficile inquadramento di tale condizione clinica nell'ambito dell'epatite C in tre distinte entità: malattia virale con epifenomeni autoimmuni, malattia virale associata a componente patogenetica autoimmune ed epatite autoimmune con falsa positività agli anticorpi anti-HCV.

Alcuni autori considerano i corticosteroidi come terapia di elezione per tutti i pazienti, ritenendoli appartenenti ad un gruppo omogeneo caratterizzato da patogenesi autoimmune (6). Altri definiscono questa sindrome "autoantibody-associated chronic hepatitis" senza ulteriori specificazioni patogenetiche, sottolineando la scarsa conoscenza dei meccanismi di insorgenza (7). Più verosimilmente si tratta di un gruppo eterogeneo che Czaja ha proposto di suddividere in "autoimmune dominant" e "viral dominant" (8) sulla base di criteri addizionali, alcuni dei quali già standardizzati dall'"International Autoimmune Hepatitis Group" (IAHG) (9-12). È ormai noto che nei soggetti con infezione cronica da HCV la presenza di autoanticorpi non determina generalmente un profilo clinico di tipo autoimmune e non influisce sulla risposta alla terapia con interferone (13-18). Tale entità si può pertanto configurare come una "false chronic hepatitis C/autoimmune hepatitis overlap syndrome" nella quale gli autoanticorpi rappresentano semplici epifenomeni autoimmunitari. La presenza di una reale componente patogenetica autoimmune caratterizzerebbe invece la "true chronic hepatitis C/autoimmune hepatitis overlap syndrome". Un ulteriore elemento di confusione deriva peraltro da una possibile falsa positività agli anticorpi anti-HCV nella epatite autoimmune classica.

La rilevanza clinica dell'infezione da HCV non è semplicemente legata alla dimensione epidemiologica che essa riveste nei paesi occidentali, ma anche alla varietà e complessità delle sue manifestazioni cliniche. A seguito dello sviluppo di metodiche di diagnosi sierologica per l'HCV a partire dalla fine degli anni '80, l'elenco delle patologie extraepatiche correlate a questa infezione si è andato sempre più ampliando per comprendere alcune associazioni di comprovata evidenza clinico-epidemiologica ed altre di carattere semplicemente speculativo. Sulla base dell'esperienza clinica e delle evidenze riportate dalla letteratura è stato possibile documentare soprattutto la presenza di autoanticorpi e le loro implicazioni cliniche nel corso di una infezione da HCV.

AUTOIMMUNITÀ E VIRUS DELL'EPATITE C

L'infezione da HCV diventa persistente nel 80% dei pazienti e conduce ad epatopatia cronica nella maggior parte dei casi. Diversi dati riportati dalla letteratura affermano che esiste una correlazione tra la presenza dei NOSA, in particolare autoanticorpi anti-muscolo liscio (SMA) e autoanticorpi anti-nucleo (ANA), e l'insorgenza di danno epatico cronico in soggetti HCV positivi (19). Ogni organismo è caratterizzato da un pool di cellule potenzialmente autoreattive che possono indurre fenomeni autoimmuni. Il nesso tra l'autoimmunità e la positività HCV deriva dal mimetismo molecolare e dall'indiretta attivazione dei linfociti B e T autoreattivi nel corso di un'infezione. La tolleranza centrale nei confronti dei linfociti B autoreattivi avviene nel midollo osseo e si verifica attraverso una delezione dei linfociti B immaturi dotati di recettori ad elevata affinità per autoantigeni presenti nel microambiente midollare, mentre la tolleranza centrale nei confronti dei linfociti T autoreattivi si verifica nel timo ed è classicamente conosciuta con il termine di selezione negativa, in cui i linfociti T immaturi doppio-positivi (CD4+CD8+) con recettore "T cell" (TCR) ad elevata affinità per il complesso maggiore di istocompatibilità vanno incontro ad un processo di morte programmata o apoptosi, designata delezione clonale. La tolleranza immunologica rappresenta la perdita della capacità del sistema immunitario di rispondere ad un determinato antigene ed è indotta da un precedente incontro con lo stesso. Il mimetismo molecolare tra gli antigeni virali e "self" dell'ospite conduce a reazioni crociate contro gli stessi antigeni "self". Pazienti affetti da HCV esprimono una grande varietà di autoanticorpi di solito a basso titolo (20,21). E' noto che la positività agli ANA viene ritrovata nel 10-33% dei pazienti affetti da epatite cronica HCV-correlata (22,23). Sebbene non esista una definitiva interpretazione dei meccanismi responsabili della loro comparsa e del loro significato clinico, il mimetismo molecolare potrebbe contribuire in buona parte a spiegare tale fenomeno. Infatti, esiste una omologia di sequenza tra alcuni antigeni di HCV e componenti nucleari dell'ospite. Sono state rilevate tre proteine nucleari umane con un alto grado di similarità di sequenza amminoacidica con la poliproteina di HCV:

l'istone H2A (24), la proteina matrin 3 presente nella matrice nucleare (25) e la proteina A coinvolta nella replicazione del DNA (26). L'autoreattività verso queste tre componenti nucleari omologhe agli antigeni virali si è rivelata essere molto più comune in pazienti HCV positivi rispetto a pazienti con altri disordini epatici cronici; questo dato rivela che gli ANA potrebbero essere generati come una specifica risposta all'infezione.

La reattività contro specifici antigeni del virus identificerebbe dunque dall'altro lato l'autoreattività verso regioni di omologia nucleari. Secondo quanto riportato da uno studio su soggetti affetti da danno epatico cronico HCV-correlato, 80% di essi mostrava un'elevata reattività verso la regione 1479-1498 della poliproteina di HCV, una sequenza amminoacidica che corrisponde alla proteina non strutturale NS3; questa regione presenta un alto grado di omologia di sequenza con la regione 11-30 della proteina istonica H2A (27). Il 39% dei pazienti mostrava invece una reattività verso la componente E2 dell'"envelope" e il 69% contro la proteina NS4B (regione 1859-1878 della poliproteina). Queste componenti virali identificano omologhi nucleari nella regione 722-741 della proteina matrin nella matrice nucleare e nella regione 133-152 della proteina A di replicazione (27).

Negli ultimi anni, numerosi studi sono stati condotti su ampie casistiche al fine di dimostrare se la positività autoanticorpale possa influenzare gli aspetti clinici dell'epatite cronica C. Recenti evidenze sperimentali indicano che il doppio contatto della proteina E2 (ricombinante) di HCV e di un anticorpo monoclonale anti CD81 col complesso B linfocitario di costimolazione (CD81/CD19/CD21) induce un'espansione clonale di cellule B naïve (CD27-) (28). Queste osservazioni suggeriscono da un lato una via di attivazione B che è indipendente dal "B cell receptor", dall'altro che il legame HCV-CD81 in vivo è determinante per l'attivazione policlonale B presente in molti casi di infezione da HCV. Questo rappresenterebbe dunque un importante cofattore per lo sviluppo di disordini autoimmuni che vanno dalla semplice emergenza di fenomeni di autoreattività (autoanticorpi) alla comparsa di manifestazioni anche clinicamente rilevanti. E' evidente quindi che la regione E2 di HCV lega il CD81, promuovendo non solo la proliferazione dei linfociti B e la loro espansione clonale, ma anche la loro attivazione (28).

Recentemente, è stato dimostrato che il polimorfismo di un singolo nucleotide in posizione 874 del gene dell'interferone γ è un fattore indipendente associato alla cirrosi in pazienti con epatite C cronica (29). È noto che il passaggio dallo stato di sieronegatività allo stato di sieropositività si verifica successivamente alla viremia e l'inizio del danno epatico; il grado e il "pattern" di risposta anticorpale è altamente variabile e la sieroconversione anticorpale non previene l'infezione cronica. L'infezione HCV e la risposta anticorpale possono indurre la formazione e la deposizione di immunocomplessi, costituiti da antigeni virali, anticorpi, fattore reumatoide e la componente C3 del sistema del complemento (30). Nel

parenchima epatico di pazienti HCV-positivi sono stati rilevati linfociti T citotossici specifici e aggregati linfocitari negli spazi portal. Questi infiltrati sono costituiti da una parte centrale di linfociti B mescolati con linfociti T CD4+ e da un anello esterno di linfociti T citotossici. La presenza di questi aggregati linfoidi è risultata essere inversamente correlata con il grado di fibrosi epatica e non sembra esistere nessuna correlazione tra la presenza di questi infiltrati e la comparsa di autoanticorpi (31).

Sulla base delle sequenze genomiche, HCV può essere classificato in 6 principali genotipi; i genotipi 1a, 1b, 2a, 2b, 2c e 3a sono responsabili di più del 80% delle infezioni presenti nel mondo industrializzato. Dalla letteratura emerge che non c'è una forte associazione tra la presenza di autoanticorpi e il genotipo di HCV, nonostante il genotipo 1b sia risultato molto meno frequente dei genotipi 2c e 3a in pazienti positivi agli autoanticorpi (32).

Czaja et al. hanno riportato che la differente risposta immunitaria a HCV dipende dal sistema di istocompatibilità (HLA) (33). Pazienti con la sottoregione HLA-DR3 con epatite cronica mostrano alte concentrazioni di immunoglobuline sieriche e una probabilità maggiore di sviluppare danno epatico rispetto ai pazienti con epatite cronica e sottoregione HLA-DR4 (33). In contrapposizione, pazienti con epatite C cronica e con genotipo HLA-DR4 hanno mostrato una maggiore predisposizione a presentare fenomeni di disordine immunologico rispetto ai pazienti HLA-DR3 (33).

SIGNIFICATO CLINICO DEGLI ANTICORPI ANTI-NUCLEO

Nonostante numerose siano le manifestazioni extraepatiche di tipo prevalentemente autoimmunitario segnalate in pazienti affetti da infezione HCV, la validità delle associazioni riportate è molte volte controversa e basata su pochi casi riferiti. Alcuni studi sono limitati da bias di selezione, in particolar modo in aree endemiche per l'infezione HCV, nelle quali alcune manifestazioni extraepatiche a carattere autoimmunitario potrebbero corrispondere a patologie concomitanti indipendenti dal virus. Nonostante la mancanza di studi su pazienti non selezionati, è evidente la presenza di ANA anche in assenza di chiare manifestazioni cliniche di autoimmunità. Diversi sono stati i risultati ottenuti circa la comparsa degli ANA e il grado di viremia HCV. Tuttavia, non esiste un'interpretazione univoca del fenomeno e numerosi lavori affermano che non c'è nessuna correlazione tra la positività agli ANA e il virus (11). Nello studio effettuato da Yee et al. è emerso che solo nelle pazienti di sesso femminile esiste una correlazione tra il virus e gli ANA (34). Il meccanismo alla base della comparsa di questo gruppo di autoanticorpi nei soggetti di sesso femminile non è stato ben chiarito: sembrerebbe che un ruolo importante sia svolto dal sistema endocrino ed in particolare dagli estrogeni. In contrapposizione, studi effettuati da Luo et al. sottolineano che non c'è nessuna associazione tra la

comparsa di autoanticorpi e le caratteristiche cliniche dei pazienti HCV-positivi in termini di età, sesso, genotipo e livelli di RNA virale nel siero (35). In uno studio effettuato da Wasmuth et al. sono stati analizzati 36 pazienti con epatite C cronica, i quali hanno manifestato la comparsa di autoanticorpi correlata ad un'alta carica virale, rispetto ai rimanenti 42 pazienti HCV-positivi analizzati con assenza di autoanticorpi (36). Secondo quanto riportato da Hsieh et al. (37) la positività agli ANA è significativamente associata con minori livelli di RNA virale. Questo studio dimostra che uno stadio avanzato di fibrosi epatica è associato con la positività agli ANA, indicando che questa classe di autoanticorpi può essere considerata come un indicatore di intenso danno epatico in progressione verso la fibrosi (37).

È opinione corrente che la presenza di ANA sia dipendente da una varietà di fattori che includono l'età avanzata, la predisposizione genetica, i fattori ambientali e la cronicità dell'infezione (38). Pazienti con ANA presentano un numero maggiore di plasmacellule, marcatore di intensa attività dei linfociti B. La manifestazione clinica secondaria legata all'aumento delle immunoglobuline sieriche con o senza produzione di autoanticorpi indica un'associazione tra gli ANA e il sistema immunitario dell'ospite. Tuttavia, il meccanismo autoimmunitario di danno epatico è ancora poco conosciuto.

I fattori dell'ospite sembrano svolgere un importante ruolo nell'espressione dell'autoimmunità e ciò potrebbe essere una delle cause alla base della variabilità sierologica. Pazienti con epatite C cronica e ANA positivi presentano elevate concentrazioni di alanina aminotransferasi (ALT) e una severa infiammazione portale e periportale quando comparati con pazienti HCV-positivi e ANA negativi. Inoltre, questi pazienti, oltre ad avere alte concentrazioni di ALT, presentano elevate concentrazioni di IgG e maggiore predisposizione al danno epatico (39). La capacità di HCV di rimanere associato alla cellula e prevenire la morte della cellula ospite consente l'instaurarsi di una infezione persistente e la risposta immunitaria cellulo-mediata e umorale gioca un ruolo importante nell'immunopatogenesi dell'infezione cronica HCV-correlata (40). Tuttavia, la comprensione della comparsa degli ANA come fenomeno di autoimmunità indotta da HCV o come precoce manifestazione di un'epatite autoimmune, conseguente all'infezione del virus, richiede ancora ulteriori chiarimenti.

Oltre agli aspetti istologici comuni alle altre forme di epatite cronica (necrosi della lamina limitante epatocitaria, flogosi degli spazi portal, infiammazione intra-acinare con necrosi e degenerazione epatocitaria, fibrosi periportale o a ponte), vi sono alcune caratteristiche morfologiche che sono state riportate con frequenza significativamente maggiore nelle epatiti croniche causate da HCV con presenza di autoanticorpi (11,39,41). Tali caratteristiche comprendono la presenza di aggregati/follicoli linfoidi all'interno degli spazi portal infiammati (50-80% dei casi) la presenza di steatosi microvescicolare o macrovescicolare (70% dei casi) e le

lesioni dei dotti biliari (50-90% dei casi), che vanno da una degenerazione dell'epitelio duttulare ad una progressiva e severa degenerazione con scomparsa dei dotti. Meno frequentemente si osserva anche la presenza di materiale eosinofilo, corpuscolato, simile ai corpi di Mallory e l'attivazione delle cellule infiammatorie nei sinusoidi epatici.

Czaja et al. riportano che pazienti con epatite C cronica che presentano autoanticorpi hanno un alto indice di attività istologica rispetto ai pazienti negativi per gli autoanticorpi (41). I pazienti HCV e ANA positivi hanno un quadro istologico più grave e un grado di infiammazione con necrosi più severa rispetto ai pazienti HCV-positivi e ANA negativi (11,39). Secondo quanto riportato da Peng et al. (42) non c'è una differenza significativa in termini di concentrazioni di ALT in pazienti HCV e ANA positivi quando paragonati a pazienti HCV-positivi ma con ANA negativi; risulta invece significativa la differenza delle concentrazioni di aspartato aminotransferasi (AST) in questi due gruppi di pazienti. Lo studio di Peng sottolinea inoltre l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di fosfatasi alcalina nei pazienti HCV e ANA positivi, indice di ostruzione biliare (colestasi) (42). Questo studio riporta anche che i pazienti HCV-positivi con un alto titolo di ANA presentano alte concentrazioni di α -fetoproteina nel siero rispetto ai pazienti ANA negativi.

Risultati controversi derivano da uno studio italiano condotto su 160 pazienti affetti da epatite cronica C (43). Questo studio, in contrasto con quanto prevalentemente osservato e riportato in letteratura (11,32), afferma che i pazienti con autoanticorpi, e in particolare quelli con ANA, presentano un danno epatico meno grave rispetto ai pazienti HCV-positivi ma negativi agli autoanticorpi. In questo studio, più del 50% dei pazienti positivi agli autoanticorpi hanno concentrazioni fisiologiche di ALT, con riduzione del rischio di progressione verso la cirrosi e l'epatocarcinoma. Inoltre, gli autoanticorpi non sembrerebbero essere coinvolti nei meccanismi di danno epatico indotti da HCV. Paradossalmente, la produzione di autoanticorpi sembrerebbe assumere il significato di fenomeno protettivo in termini di maggiore produzione di linfociti B esprimenti la glicoproteina CD5, molecola costimolatoria accessoria, tramite la quale viene esercitata una modulazione del segnale trasdotto dai complessi TCR e "B cell receptor" (BCR) ed in termini di differenziazione funzionale dei linfociti T verso il tipo 2 (Th2).

EVENTI IMMUNOLOGICI IN CORSO DI INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C

Il danno tissutale nelle malattie autoimmuni organo-specifiche è principalmente mediato dai linfociti T di tipo 1 (Th1); in base alla espressione Th1 o Th2, determinata sia dalla quantità di antigene che dal microambiente circostante, si ha spesso un'evoluzione diversa della malattia. Questa base molecolare caratterizza il tessuto infettato dal virus e nelle cui cellule si realizza una più o meno intensa replicazione virale. Uno dei più intriganti

ed affascinanti problemi della immunopatogenesi delle epatiti croniche da HCV è il quadro citochinico, che può condizionare la progressione della malattia epatica. Un "pattern" iniziale energico di tipo Th1 sarebbe maggiormente associato ad una guarigione dell'infezione da HCV, mentre un'iniziale espansione della risposta immune polarizzata in senso Th2 favorirebbe una cronicizzazione della malattia. In corso dell'infezione, il virus libera antigeni virali che attivano sia i linfociti B sia i linfociti T che possono danneggiare il tessuto coinvolto quando il processo infiammatorio diviene prolungato. Questo determina un quadro immunopatologico in cui la malattia può essere sostenuta dalla stessa risposta immune. Ad esempio, l'infezione da HCV attiva una risposta di tipo Th1 che se non riesce ad eliminare il virus ne permette una possibile mutazione, determinando una nuova risposta Th1 e perpetuando il processo infiammatorio e il danno tissutale (fenomeno dell'"escape" immunologico). Studi immunologici su tessuto epatico hanno confermato che una vigorosa risposta Th1 di tipo persistente condiziona l'evoluzione della malattia cronica. La persistente formazione di nuove varianti virali stimola come neoantigeni il sistema immunitario e condiziona un meccanismo immune cronico.

I dati disponibili suggeriscono che un controllo efficace dell'infezione da HCV è strettamente dipendente dall'intensità, dalla multispecificità e dalla qualità delle risposte immunitarie cellulo-mediate precoci. Un controllo efficiente non può realizzarsi senza il concorso di una risposta CD4-mediata intensa e multispecifica, essenziale per rendere possibile un'ottimale attivazione delle cellule T citotossiche (CTL) e per concorrere a produrre nel sito di infezione quantità appropriate di citochine Th1 ad effetto anti-virale. Data la natura eterogenea della popolazione virale che infetta singoli individui, è possibile che HCV abbia sviluppato strategie differenziate di evasione che potrebbero agire simultaneamente interferendo con i meccanismi di difesa dell'ospite a differenti livelli. La potenziale capacità di HCV di influenzare l'effetto anti-virale dell'interferone, attraverso l'interazione di E2 con la proteinchinasi R (44) e di interferire con i meccanismi di apoptosi indotte dal "tumor necrosis factor" (TNF), attraverso il legame della proteina "core" con alcuni componenti della famiglia del recettore per il TNF, rappresentano meccanismi potenzialmente coinvolti nella patogenesi del danno epatico e della persistenza virale (45-47). Inoltre, è stato suggerito che l'alta affinità di E2 per la molecola CD81 potrebbe essere un fattore interferente sull'attività di anticorpi neutralizzanti capaci di inibire il legame di HCV alla cellula ospite (48). La recente scoperta che HCV possa legare la molecola CD81 ha importanti implicazioni terapeutiche: segnali costimolatori possono essere trasmessi ai linfociti B (e probabilmente anche ad altre popolazioni linfocitarie) a seguito del legame alla molecola CD81, che è un componente del complesso molecolare CD21/CD19, coinvolto nell'attivazione B linfocitaria (49). Il legame di HCV a questo complesso molecolare ridurrebbe la soglia di attivazione dei linfociti

B (50), facilitando in questo modo la produzione di autoanticorpi, in modo paragonabile a quanto osservato per il virus di Epstein-Barr, che è stato dimostrato legarsi a CD21 (51). Questo può spiegare il motivo per cui manifestazioni extraepatiche causate da reazioni autoimmunitarie con presenza di autoanticorpi sono frequentemente associate all'infezione da HCV. Inoltre, segnali costimolatori rilasciati a seguito dell'interazione E2/CD81 potrebbero anche contribuire all'attivazione e all'espansione di popolazioni cellulari non-virus specifiche all'interno del fegato infettato, determinando una diluizione dei linfociti T HCV-specifici in tale sede, con conseguente interferenza con l'espressione delle loro funzioni effettrici anti-virali.

BIBLIOGRAFIA

- Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993;328:456-70.
- Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, et al. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994;19:841-8.
- Haddad J, Deny P, Munz-Gothel C, et al. Lymphocytic sialadenitis of Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992;339:321-3.
- Adinolfi LE, Utili R, Attanasio V, et al. Epidemiology, clinical spectrum and prognostic value of mixed cryoglobulinaemia in hepatitis C virus patients: a prospective study. *Ital J Gastroenterol* 1996;28:1-9.
- Wong VS, Egner W, Elsei T, et al. Incidence, character and clinical relevance of mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1996;104:25-31.
- Schiano TD, Te HS, Thomas RM, et al. Results of steroid-based therapy for the hepatitis C-autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2984-91.
- Cainelli F, Vento S. Treatment of autoantibody-associated chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1862-3.
- Czaja AJ. The variant forms of autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1996;125:588-98.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-38.
- Czaja AJ. Autoimmune hepatitis and viral infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1994;23:547-66.
- Cassani F, Cataleta M, Valentini P, et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology* 1997;26:561-6.
- Lunel F, Cacoub P. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1993;31:210-6.
- Fried MW, Dragescu JO, Shindo M, et al. Clinical and serological differentiation of autoimmune and hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci* 1993;38:631-6.
- Todros L, Touscoz G, D'Urso N, et al. Hepatitis C virus-related chronic liver disease with autoantibodies to liver-kidney microsomes (LKM). Clinical characterization from idiopathic LKM-positive disorders. *J Hepatol* 1991;13:128-31.
- Todros L, Saracco G, Durazzo M, et al. Efficacy and safety of interferon alpha therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver-kidney microsomes. *Hepatology* 1995;22:1374-8.
- Magrin S, Craxi A, Fabiano C, et al. Hepatitis C virus replication in "autoimmune" chronic hepatitis. *J Hepatol* 1991;13:364-7.
- Clifford BD, Donahue D, Smith L, et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;21:613-9.
- Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, et al. Evidence against hepatitis viruses as important causes of severe autoimmune hepatitis in the United States. *J Hepatol* 1993;18:342-52.
- Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, et al. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999;45:435-41.
- Buskila D, Sikuler E, Shoenfeld Y. Hepatitis C virus and autoimmunity. In: Shoenfeld Y, ed. *In the decade of autoimmunity*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1999:355-63.
- Buskila D, Sikuler E, Shoenfeld Y. Hepatitis C virus, autoimmunity and rheumatic disease. *Lupus* 1997;6:685-9.
- Pawlotsky JM, Yahia MB, Andre C, et al. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994;19:841-8.
- Lunel F. Hepatitis C virus and autoimmunity: fortuitous association or reality? *Gastroenterology* 1994;107:1550-5.
- Hatch CL, Bonner WM. The human histone H2A.Z gene. Sequence and regulation. *J Biol Chem* 1990;265:15211-8.
- Belgraders P, Dey R, Berezneyg R. Molecular cloning of matrin 3. A 125-kilodalton protein of the nuclear matrix contains an extensive acidic domain. *J Biol Chem* 1991;266:9893-9.
- Erdile LF, World MS, Kelly TJ. The primary structure of the 32-kDa subunit of human replication protein A. *J Biol Chem* 1990;265:3177-82.
- Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, et al. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2003;133:404-13.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to Cd81. *Science* 1998;282:938-41.
- Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, et al. Polymorphism of interferon- γ gene at position 874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. *Transl Res* 2006;148:128-33.
- Szymanski IO, Pullman JM, Underwood JM. Electron microscopic and immunochemical studies in a patient with hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia type 2. *Am J Clin Pathol* 1994;102:278-83.
- Freni MA, Artuso D, Gerken G, et al. Focal lymphocytic aggregates in chronic hepatitis C. Occurrence, immunohistochemical characterization, and relations to markers of autoimmunity. *Hepatology* 1995;22:389-94.
- Muratori P, Muratori L, Stroffolini T, et al. Prevalence of non-organ specific autoantibodies in HCV-infected subjects in general population. *Clin Exp Immunol* 2003;131:118-21.
- Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, et al. Significance of human leukocyte antigens DR3 and DR4 in chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995;40:2098-106.
- Yee LJ, Kelleher P, Goldin RD, et al. Antibodies (ANA) in chronic hepatitis C virus infection: correlates of positivity and clinical relevance. *J Viral Hepat* 2004;11:459-64.
- Luo JC, Hwang SJ, Li CP, et al. Clinical significance of serum autoantibodies in chinese patients with chronic hepatitis C: negative role of serum viral titre and genotype. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:475-9.
- Wasmuth HE, Stolte C, Geier A, et al. The presence of non-organ-specific autoantibodies is associated with a negative response to combination therapy with interferon

- and ribavirin for chronic hepatitis C. *BMC Infect Dis* 2004;4:4.
37. Hsieh MY, Dai CY, Lee LP, et al. Antinuclear antibody is associated with a more advanced fibrosis and lower RNA levels of hepatitis C virus in chronic hepatitis C patients. *J Clin Pathol* 2008;61:333-37.
38. White RH, Robbins DL. Clinical significance and interpretation of antinuclear antibodies. *West J Med* 1987;147:210-3.
39. Noda K, Endomoto N, Arai K, et al. Induction of antinuclear antibody interferon therapy in patients with type-C chronic hepatitis: its relation to the efficacy of therapy. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:716-22.
40. Boyer N, Marcellini P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32:98-112.
41. Czaja AJ, Carpenter HA. Histological findings in chronic hepatitis C with autoimmune feature. *Hepatology* 1997;26:459-66.
42. Peng YC, Hsieh SC, Yang DY, et al. Expression and clinical significance of antinuclear antibody in hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:402-6.
43. Sereno S, Amendola MA, Toccaceli F, et al. Non-organ-specific autoantibodies in chronic hepatitis C virus infection: a protective phenomenon? *J It Allergol Immunol Clin* 2003;13:142-7.
44. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, et. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-10.
45. Chen CM, You LR, Hwang LH, et al. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-b receptor modulates the signal pathway of lymphotoxin-b receptor. *J Virol* 1997;71:9417-26.
46. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998;72:3691-7.
47. Ray RB, Meyer K, Steele R, et al. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998;273:2256-9.
48. You LR, Chen CM, Lee YHW. Hepatitis C virus core protein enhances NF-kB signal pathway triggering by lymphotoxin-b receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 1999;73:1672-81.
49. Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, et al. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol* 1992;149:2841-50.
50. Fearon DT, Carter, RH. The Cd19/Cr2/Tapa-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:127-49.
51. Cooper NR, Moore MD, Nemerow GR. Immunobiology of CR2, the B lymphocyte receptor for Epstein-Barr virus and the C3d complement fragment. *Annu Rev Immunol* 1988;6:85-113.