

## LAVORO ORIGINALE

# Polimorfismi del gene della fibronectina e manifestazioni cliniche della sindrome crioglobulinemica: aumentato rischio di linfoma legato ai genotipi MspI DD e HaeIII AA\*

## *Fibronectin gene polymorphisms and clinical manifestations of mixed cryoglobulinemic syndrome: increased risk of lymphoma associated to MspI DD and HaeIII AA genotypes*

M. Fabris<sup>1</sup>, L. Quartuccio<sup>1</sup>, V. De Re<sup>2</sup>, G. Pozzato<sup>3</sup>, C. Mazzaro<sup>4</sup>, A. Tavoni<sup>5</sup>, C. Ferri<sup>6</sup>, S. Salvin<sup>1</sup>,  
A. Lerussi<sup>1</sup>, C. Fabro<sup>1</sup>, S. Bombardieri<sup>5</sup>, S. De Vita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica di Reumatologia, DPMSC, Università di Udine;

<sup>2</sup>Centro di Riferimento Oncologico, Aviano, Pordenone;

<sup>3</sup>Divisione di Medicina Interna, U.C.O., Università di Trieste;

<sup>4</sup>Divisione di Medicina Interna 2, Ospedale S. Maria degli Angeli, Pordenone;

<sup>5</sup>Clinica di Reumatologia, Università di Pisa;

<sup>6</sup>Clinica di Reumatologia, Università di Modena

### SUMMARY

**Objective:** To analyse FN gene polymorphisms in type II mixed cryoglobulinemic syndrome (MCsn), an immune-complex mediated systemic vasculitis linked to hepatitis C virus (HCV) infection and characterized by rheumatoid factor (RF) positive B-cell proliferation at high risk for the progression into non Hodgkin's lymphoma (NHL).

**Methods:** Samples from eighty-one patients, with MCsn (type II serum cryoglobulins and clinical signs of vasculitis) were studied. Sixty-five (65/81, 80.3%) patients were HCV-positive. Twenty-one (25.9%) patients had developed a B-cell NHL during the course of MCsn. Seventy-two patients with HCV-negative and MC-unrelated NHL and 110 healthy blood donors (HBDs) were taken as controls. HaeIIIb and MspI FN gene polymorphisms were analysed by PCR and specific restriction enzyme digestions, following reported procedures. Plasma FN levels were analysed by ELISA, whenever possible.

**Results:** HaeIIIb and MspI allele and genotype frequencies did not differ between MCsn patients and HBDs. Of note, the DD-MspI (OR=5.56; CI=1.67-18.51, p=0.0046) and the AA-HaeIIIb (OR=5.54; CI=1.64-18.76, p=0.0066) homozygosity appeared significantly and independently associated with the development of B-cell NHL in MCsn patients, with the HaeIIIb A allele possibly conferring an increased risk of NHL in the general population (OR=1.72, CI=1.128-2.635, p=0.0133). In contrast, the major vasculitic manifestations, such as peripheral neuropathy, skin ulcers and glomerulonephritis tended to be associated with the counterpart MspI C allele. No association between FN plasma levels and FN genotypes was found.

**Conclusion:** Genotyping for MspI and HaeIIIb FN gene polymorphisms may be clinically relevant to define the predisposition to the major clinical manifestations in MCsn.

Reumatismo, 2008; 60(1):28-34

\*Lavoro premiato al XLIII Congresso SIR, Palermo 2006.

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Martina Fabris

Cattedra di Reumatologia, DPMSC,

Università di Udine

33100 Udine, Italia

E-mail: martina.fabris@uniud.it

### INTRODUZIONE

Con il termine crioglobulinemia mista si intende la presenza nel siero di crioglobuline, immunocomplessi circolanti costituiti da IgM ad attività di fattore reumatoide leganti IgG policlonali (tipo III) o monoclonali (tipo II), che precipitano a tempera-

ture inferiori a 37°C. Con sindrome crioglobulinemica si intende il quadro clinico secondario al processo vasculitico che si sviluppa in una parte dei pazienti crioglobulinemici e comprende classicamente la triade di Meltzer e Franklin (astenia, artralgia/artrite e porpora) e manifestazioni più gravi rappresentate soprattutto da neuropatia periferica, glomerulonefrite membranosa-proliferativa, ulcere agli arti inferiori (1, 2). Dal punto di vista biologico la SC si caratterizza per la presenza di una proliferazione B-cellulare fattore reumatoide (FR)-positiva, non neoplastica, antigen-driven, con un forte rischio di evoluzione in linfoma non-Hodgkin (LNH) (5-10% dei casi) (3). Il virus dell'epatite C (HCV) è stato identificato come il principale agente etiologico, essendo presente nel 75-80% dei casi (4, 5). Negli altri casi virus come l'epatite B e i virus erpetici, o altre malattie autoimmuni come la sindrome di Sjögren, sono alla base dello sviluppo della patologia (1). La persistente stimolazione antigenica da parte dell'HCV sostiene la proliferazione B-cellulare FR-positiva (6, 7). Visto l'elevato rischio di progressione linfomatosa, l'individuazione di possibili fattori di rischio per la progressione linfomatosa appare uno dei temi di maggiore rilevanza clinica nell'ambito della SC.

La FN è una glicoproteina multifunzionale di 250 kDa, composta da 2 catene polipeptidiche simili ma non identiche. È presente sottoforma di dimero solubile nel plasma, legata tramite ponti disolfuro agli epatociti, ed espressa come complesso multimerico insolubile, dai fibroblasti, dai macrofagi e dalle cellule epiteliali e mesangiali (8-11). Ogni catena è composta da 6 domini globulari flessibili e sensibili alle proteasi; questa struttura permette alla FN di creare ponti con la matrice extracellulare (ECM) e di legare proteine (eparina, fibrina, fattori del complemento), collagene, recettori di membrana (VLA-4), DNA, citochine (TNF-alfa) e batteri (*S. aureus*) (12). La FN interagisce con gli immunocomplessi (13-16) ed è stato recentemente dimostrato un legame ad alta affinità con il FR monoclonale, in genere IgMk, del crioprecipitato: questa interazione potrebbe contribuire allo sviluppo della glomerulonefrite mediata da immunocomplessi tipica della SC di tipo II (17). Il gene della FN, lungo più di 75 kb e composto da 50 esoni, mappa sul cromosoma 2, tra il 2q34 e il 2q36. All'interno del gene sono stati individuati numerosi polimorfismi, alcuni dei quali sono risultati associati allo sviluppo di fibrosi polmonare in corso di sclerodermia (18).

Nel presente lavoro sono stati analizzati i polimorfismi MspI e HaeIIIb della FN in un gruppo di 81

pazienti affetti da SC, evidenziando significative associazioni tra alcuni assetti genotipici e le maggiori manifestazioni cliniche della malattia, in particolare con lo sviluppo del linfoma.

## MATERIALI E METODI

### *Pazienti*

Sono stati analizzati 81 pazienti affetti da SC diagnostica secondo criteri precedentemente riportati (20): crioglobuline sieriche ripetutamente positive e composte da IgM monoclonali con attività di FR e IgG policlonali (tipo II in tutti i casi) e segni clinici di vasculite (porpora, artralgia/artrite, astenia, ulcere cutanee, neuropatia periferica, glomerulonefrite). I pazienti sono stati reclutati presso 5 diversi centri reumatologici del Nord Italia: 58 pazienti afferenti alla Clinica di Reumatologia dell'Ospedale Universitario di Udine, 8 pazienti afferenti alla Clinica Medica dell'Università di Trieste, 7 pazienti afferenti alla II Medicina dell'Ospedale Civile di Pordenone, 4 pazienti afferenti alla Clinica Reumatologica dell'Università di Pisa e 4 pazienti provenienti dalla Clinica Reumatologica dell'Università di Modena. Come popolazioni di controllo sono stati analizzati 72 pazienti con LNH HCV negativi (reclutati presso il Centro di Riferimento Oncologico di Aviano e la Clinica Medica dell'Università di Trieste) e 110 donatori sani confrontabili per età e sesso. Lo studio è stato compiuto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico Locale. L'80.2% dei pazienti con SC (65/81) era positivo per anticorpi anti-HCV (test ELISA antigene-specifico Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ) e HCV-RNA, testato mediante *nested* PCR.

Tra i restanti 16 casi HCV negativi, 9 erano affetti da sindrome di Sjögren (SS) primaria e 2 erano risultati positivi all'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg). La concentrazione del FR è stata analizzata mediante test nefelometrico secondo procedure standard (positivo per valori  $\geq 20$  UI/mL). Le crioglobuline sono state ottenute dal siero mediante precipitazione a freddo (4°C per 72-96 ore) seguita da 4 lavaggi in tampone PBS (phosphate buffered saline, pH 7,4) e tipizzate mediante immunofissazione. Le caratteristiche demografiche, biochimiche e cliniche dei pazienti analizzati sono riportate in tabella I. In tutti i pazienti affetti da glomerulonefrite la diagnosi è stata confermata dall'esame istologico della biopsia renale, mentre la diagnosi di neuropatia periferica è stata coadiuvata

**Tabella 1** - Caratteristiche demografiche e cliniche degli 81 pazienti con sindrome crioglobulinemica. I valori numerici sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard. FR: fattore reumatoide; LNH: linfoma non Hodgkin.

Età (anni)	63,8 $\pm$ 10,5
Sesso: F/M	57/24
HCV-positivi	65/81 (80,2%)
Crioglobulinemia (mg/dl)	1615,1 $\pm$ 2554,4
FR (UI/ml)	1051,7 $\pm$ 2526,5
Porpora	74/81 (91,4%)
Neuropatia periferica	44/81 (54,3%)
Astenia	44/81 (54,3%)
Artrite/artralgie	37/81 (45,7%)
LNH B-cellulare	21/81 (25,9%)
Glomerulonefrite	21/81 (25,9%)
Ulcere	17/81 (20,9%)
Sindrome di Sjögren	10/81 (12,3%)

dall'esame elettromiografico. I 21 pazienti con LNH B-cellulare erano così rappresentati: 14 immunocitomi, 4 linfomi B-cellulari del tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) delle ghiandole salivari, 2 linfomi nodali tipo *marginal zone*, 1 linfoma linfocitico. Il follow-up medio dei pazienti considerati nello studio è di 8,1 $\pm$ 6,3 anni, (range 1-26).

#### Analisi molecolari

Il DNA è stato estratto a partire da 10 mL di sangue intero in EDTA (5%) utilizzando il kit FlexiGene, QIAGEN. I polimorfismi HaeIIIb e MspI del gene della FN sono stati analizzati secondo metodiche precedentemente descritte (18). In breve, il polimorfismo HaeIIIb è stato analizzato utilizzando i primer forward H1: 5'-AGCTCTATTC-CACCTTACAACACCG-3' e reverse H2: 5'-CTCCAGGAGACTGTGAGCAC-3' e le seguenti condizioni di amplificazione: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56.5°C, 2 minuti a 72°C (40 cicli); mentre il polimorfismo MspI è stato analizzato utilizzando i primer forward M1: 5'-GCCTGGTACA-GAATATGTAGTG-3' e reverse M2: 5'-TGCCAT-TAAGAGCAACGATGC-3', e le seguenti condizioni di amplificazione: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, 2 minuti a 72°C (38 cicli). I genotipi sono stati identificati dopo digestione a 37°C con gli specifici enzimi di restrizione HaeIII (allele B tagliato) e MspI (allele D tagliato) tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% in TBE (TRIS borato-EDTA, pH 7,4).

#### Analisi dei livelli plasmatici della FN

I livelli plasmatici di FN sono stati analizzati me-

dante kit ELISA (DRG diagnostics) su tutti i campioni di plasma disponibili, 21 donatori sani e 25 pazienti con SC.

#### Analisi statistiche

Per le analisi statistiche sono stati utilizzati i programmi GraphPad Prism (Science inc. San Diego, USA) e MedCalc.

Le tabelle di contingenza sono state analizzate utilizzando il test del chi-quadrato (se 3x2) o il test esatto di Fisher con l'approssimazione di Woolf (se 2x2). Sui dati demografici, clinici e di laboratorio sono state calcolate media, mediana e deviazione standard e le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante il Test non parametrico di Mann-Whitney. In tutti i casi è stata considerata significativa una  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

#### Frequenza genotipica e allelica dei polimorfismi HaeIIIb e MspI in pazienti e controlli

I pazienti con SC non mostrano differenze significative nelle frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi HaeIIIb e MspI della FN rispetto alla popolazione sana di controllo. HaeIIIb: AA 17,3%, AB 58%, BB 24,7% nei pazienti con SC versus AA 18,2%, AB 43,6%, BB 38,2% nei controlli ( $p=ns$ ); MspI: DD 53,1%, CD 40,7%, CC 6,2% nei pazienti con SC versus DD 52,7%, CD 40%, CC 7,3% nei controlli ( $p=ns$ ).

#### Polimorfismi del gene della FN e manifestazioni cliniche dei pazienti con SC

Suddividendo i pazienti in base alla presenza delle principali manifestazioni cliniche è stato osservato un significativo aumento della prevalenza dell'allele più raro C (genotipi CC e CD) del polimorfismo MspI nei pazienti affetti da neuropatia periferica (CD/CC: 59,1%; DD: 40,9%) rispetto a quelli non affetti (CD/CC: 32,4%; DD: 67,6%, OR=3, IC95%: 1,11-7,51,  $p=0,0251$ ) (Fig. 1A). Anche glomerulonefrite (21 pazienti, CD/CC 61,9% versus 41,7%;  $p=ns$ ) e ulcere recidivanti agli arti inferiori (17 pazienti, CD/CC 58,9% versus 43,7%;  $p=ns$ ) tendono ad associarsi ad una maggiore prevalenza dell'allele C del polimorfismo MspI (Fig. 1A). Per quanto riguarda la glomerulonefrite si osserva anche una differente distribuzione genotipica del polimorfismo HaeIIIb, con un significativo sbilanciamento verso l'eterozigosi AB (80% versus 50%; chi square: 6,2,  $p=0,0451$ ) (Fig. 1B). Nessuna differenza è stata ri-

scontrata tra i pazienti HCV negativi e HCV positivi (dati non riportati).

### Polimorfismi del gene della FN e rischio di LNH nei pazienti con SC

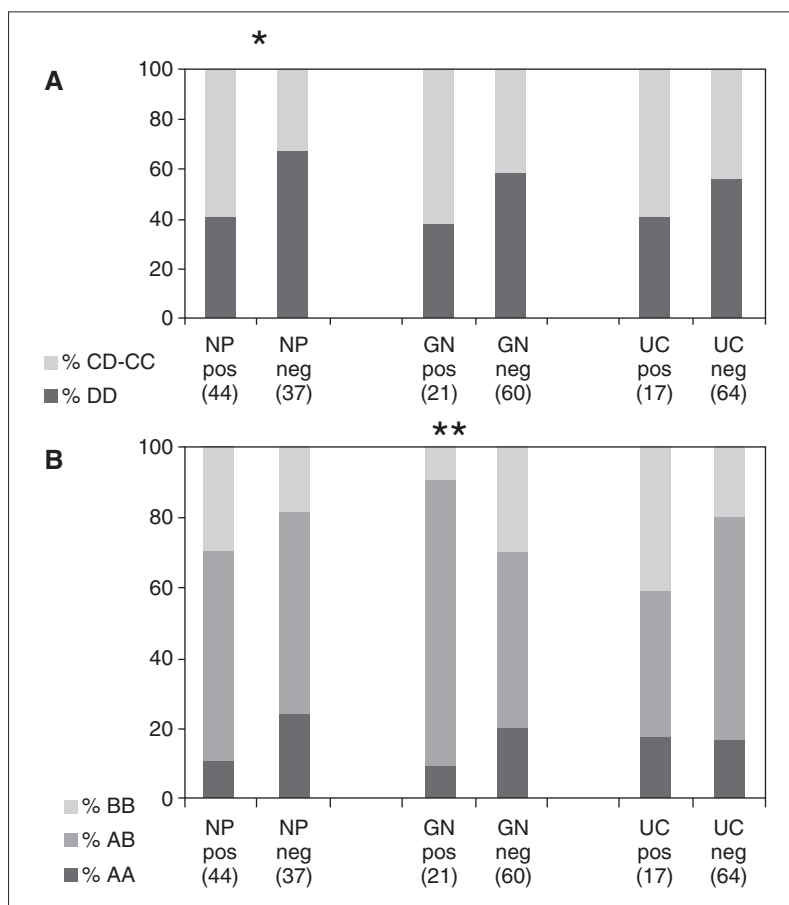
Come illustrato in figura 2, le frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi HaeIIIb e del MspI risultano essere significativamente diverse nei soggetti affetti da SC con o senza LNH. In particolare, la presenza del LNH è associata ad un incremento significativo della prevalenza dell'allele più frequente D del polimorfismo MspI (90,5% versus 67,5% nei pazienti senza LNH; OR=4,57; IC95%=1,52-13,73,  $p=0,004$ ) e dell'allele più raro A del polimorfismo HaeIIIb (59,5% versus 41,7% nei pazienti senza LNH, OR=2,06; IC95%=1,01-4,21,  $p=0,05$ ).

In particolare, l'omozigosi DD dell'MspI è presente in 17/21 (81%) pazienti con LNH versus 26/60 (43,3%) pazienti senza LNH (OR=5,56, IC95%=1,67-18,51,  $p=0,0046$ ) (Fig. 2A), mentre l'omozigosi AA dell'HaeIIIb è presente in 8/21 (38,1%) pazienti con LNH versus 6/60 pazienti senza LNH (10%), (OR=5,54, IC95%=1,64-18,76,

$p=0,0066$ ), (Fig. 2B). Tuttavia la presenza contemporanea dei genotipi DD MspI e AA HaeIIIb non mostra un aumento della significatività nell'associazione con il LNH (7/21, 33,3% versus 6/60, 10%; OR=4,5, IC95%=1,303-15,536,  $p=0,0326$ ), cosa che indicherebbe un effetto indipendente dei 2 assetti genetici sul rischio di linfoma in corso di SC.

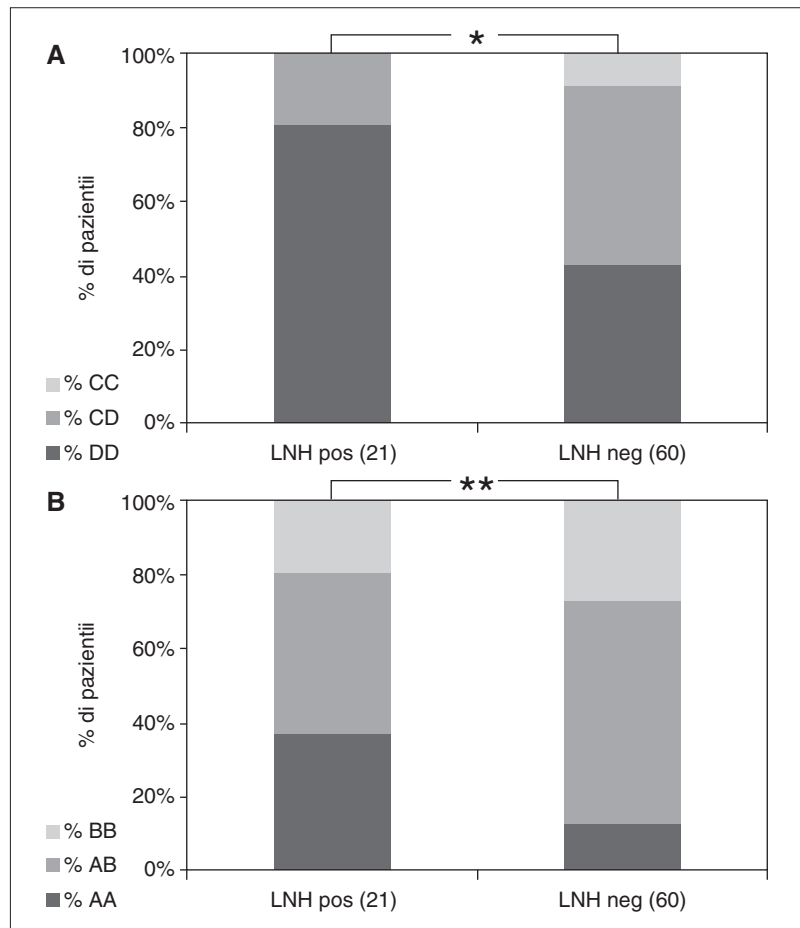
A conferma di questa ultima analisi, lo studio dei polimorfismi HaeIIIb ed MspI della FN su una popolazione composta da 72 soggetti con LNH e con documentata negatività serica sia per crioglobulinemia che per infezione da HCV, ha dimostrato un significativo sbilanciamento verso il genotipo AA del polimorfismo HaeIIIb rispetto alla popolazione sana di controllo (AA 26,4%, AB 54,2%, BB 19,4% nei soggetti con LNH versus AA 18,2%, AB 43,6%, BB 38,2% nei controlli; chi-square, tabella 3x2: 7,34,  $p=0,0254$ ).

L'allele A del polimorfismo HaeIIIb conferisce un incrementato rischio di sviluppo di linfoma (53,5% nei pazienti con LNH versus 40% nei controlli sani; OR=1,72, IC95%=1,128-2,635,  $p=0,0133$ ). Non



**Figura 1** - Distribuzione genotipica dei polimorfismi MspI (A) ed HaeIIIb (B) della FN nei pazienti con SC affetti da neuropatia periferica (NP pos), glomerulonefrite (GN pos) e ulcere cutanee recidivanti (UC pos). A) La presenza di fenomeni vasculitici importanti tende sempre ad associarsi ad una maggiore prevalenza dell'allele più raro C (genotipi CD-CC) rispetto all'omozigosi DD del polimorfismo MspI, ma raggiunge la significatività statistica solo nel caso della NP (\*OR=3, IC95%=1,21-7,51,  $p=0,0251$ ). B) L'eterozigosi AB del polimorfismo HaeIIIb si associa significativamente alla presenza di GN (tabella 3x2; \*\*chi square: 6,2;  $p=0,0451$ ).

**Figura 2** - Distribuzione genotipica dei polimorfismi MspI e HaeIIIb della FN nei pazienti con SC con e senza LNH. I pazienti con SC e LNH presentano un' aumentata frequenza del genotipo DD del polimorfismo MspI (DD versus CD/CC: \*OR=5,56, IC95% =1,67-18,51, p=0,0046), (A) e del genotipo AA del polimorfismo HaeIIIb (AA versus AB/BB: \*\*OR=5,54, IC95% =1,64-18,76, p=0,0066), (B) rispetto ai pazienti con SC senza LNH.



sono state invece riscontrate differenze per il polimorfismo MspI.

Pertanto l'allele D del polimorfismo MspI risulta associato allo sviluppo di LNH solo nei pazienti con SC, mentre l'allele A del polimorfismo HaeIIIb risulta essere associato alla presenza di LNH nella popolazione generale e anche nella SC. Infine, nei 10 pazienti con SC associata a sindrome di Sjögren si riscontra una prevalenza dell'omozigosi DD del polimorfismo MspI (70% versus 50,7%; p=ns), infatti 6 di questi pazienti sono affetti da LNH, 4 dei quali a carico del tessuto MALT parotideo.

#### **Genotipi e livelli plasmatici della FN**

Sono stati dosati i livelli plasmatici della FN in tutti i campioni disponibili di pazienti con SC (n° 25) e controlli sani (N. 21). I valori della FN plasmatica risultano essere più elevati nei soggetti con SC rispetto ai controlli (372,3±99,6ng/ml versus 244,7±99,5 ng/ml; p=0,0003). Tanto nei pazienti, quanto nei controlli, i diversi sottogruppi genotipici o allelici dei 2 polimorfismi non presentano dif-

ferenti livelli di FN plasmatica. Nessuna tra le maggiori manifestazioni cliniche correlate alla SC si associa a incrementati livelli di FN.

#### **DISCUSSIONE**

In questo lavoro sono stati identificati due polimorfismi del gene della FN come possibili marcatori prognostici nei pazienti affetti da sindrome crioglobulinemica, una vasculite sistemica associata ad una proliferazione B cellulare FR-positiva, ad elevato rischio di evoluzione in linfoma. In particolare un maggior rischio di progressione linfomatosa è associato significativamente agli alleli A del polimorfismo HaeIII e D del polimorfismo MspI. Di rilievo è il fatto che, mentre l'allele A del polimorfismo HaeIIIb risulta essere significativamente associato allo sviluppo di un LNH anche nella popolazione generale, l'allele D del polimorfismo MspI è specificamente e indipendentemente associato allo sviluppo di LNH solo nei pazienti affetti da SC.

All'allele C del polimorfismo MspI si associano invece le maggiori manifestazioni vasculitiche (neuropatia periferica, ulcere recidivanti), mentre la presenza di glomerulonefrite è significativamente associata all'eterozigosi AB del polimorfismo HaeIIIb. Questi nuovi dati, se confermati da ulteriori studi retrospettivi e prospettici su casistiche più numerose, potrebbero migliorare la gestione e il follow-up dei pazienti con SC, utilizzando differenti approcci nei diversi sottogruppi genotipici dei pazienti, in particolare considerando il rischio di evoluzione linfomatosa.

Numerosi precedenti lavori avevano suggerito un possibile ruolo patogenetico della FN nelle SC (13-17), evidenziando la partecipazione di questa pleiotropica proteina nella formazione e nella patogenicità soprattutto renale (18) del crioprecipitato. Non sono note invece in letteratura, possibili implicazioni dirette o indirette della FN nella comparsa di un LNH B cellulare. Uno spunto molto interessante a tale riguardo viene da un recente lavoro di Astier et al. (22), che ha analizzato nuove vie di regolazione della sopravvivenza B-cellulare normale e leucemica, attivate dal reclutamento di specifiche integrine sulla superficie delle cellule B e loro interazione con i rispettivi recettori sulle cellule stromali dei tessuti linfoidei. Il gruppo di Astier ha dimostrato che, coltivando le cellule B leucemiche su un substrato di FN, il reclutamento di specifiche integrine di superficie inibisce l'attivazione delle caspasi 3 e 7 e fa aumentare altri fattori anti-apoptotici, fra cui XIAP e survivina, favorendo la proliferazione cellulare. Sulla base di questi risultati, si può ipotizzare un possibile ruolo della FN nel favorire la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule B neoplastiche nei pazienti con SC.

La prevalenza allelica e genotipica dei polimorfismi HaeIIIb ed MspI della FN nella serie di pazienti con SC qui analizzata non differisce da quella riscontrata in una popolazione sana di controllo: questi polimorfismi non influenzano quindi la suscettibilità allo sviluppo della SC. In letteratura non vi sono dati definitivi per quanto attiene al significato biologico-funzionale delle varianti alleliche dei polimorfismi HaeIIIb e MspI del gene della FN. Entrambi i polimorfismi si trovano in regioni introniche e quindi non influenzano direttamente la sequenza amminoacidica della proteina. Ciò nonostante, nel gene della FN ci sono numerosi siti di splicing alternativo, che danno origine a diverse isoforme della proteina per le quali sono state dimostrate peculiari attività e capacità di legame (12). Dal momento che non abbiamo osservato nessuna

particolare associazione tra i livelli plasmatici totali della FN e i genotipi dei 2 polimorfismi, né nei controlli, né nei pazienti, non sembra che l'effetto sulla suscettibilità a sviluppare un linfoma o una delle maggiori manifestazioni vasculitiche sia imputabile a motivi quantitativi, però è possibile ipotizzare che i siti di splicing alternativo siano controllati da fattori di trascrizione che si legano nelle regioni introniche comprendenti i polimorfismi studiati e che la FN prodotta sia qualitativamente diversa. Per poter chiarire questo aspetto è necessario mettere a punto analisi più approfondite, biochimiche e istologiche, che permettano di mettere in rilievo le diverse isoforme della FN. Le metodiche attualmente disponibili in commercio non sono in grado di fornire tali informazioni.

Infine, i siti polimorfici della FN potrebbero essere solamente in linkage con altri siti di mutazione nello stesso gene o in geni vicini codificanti altre molecole, responsabili dirette delle associazioni cliniche osservate nei pazienti con SC. Tuttavia, quale che sia il fondamento biologico di tali varianti alleliche, rimane il loro valore quali marcatori fenotipici potenzialmente utili nel follow-up del paziente con SC.

Resta infine ancora da approfondire il possibile ruolo dell'allele A del polimorfismo HaeIIIb nella suscettibilità allo sviluppo del LNH nella popolazione generale, se sia associato a uno o più istotipi neoplastici e se l'infezione da HCV possa rappresentare un fattore discriminante. Nel gruppo di soggetti presi in esame in questo studio non sono state evidenziate differenze nel confronto tra pazienti HCV-positivi e HCV-negativi, ma la casistica appare ancora limitata per poter ottenere un dato definitivo in proposito e per tale motivo sono in corso ulteriori studi in collaborazione con centri oncologici.

In conclusione, abbiamo identificato i polimorfismi HaeIIIb e MspI del gene della FN come possibili markers prognostici in soggetti con SC, ed in particolare l'associazione tra genotipo MspI DD e linfoma. Si tratta del primo lavoro che individua markers genetici prognostici nei pazienti con SC, utile per organizzare ulteriori studi su più ampie casistiche considerata la potenziale implicazione clinica rilevante dei presenti risultati.

#### *Ringraziamenti*

*Lo studio è stato reso possibile grazie al supporto della Società Italiana di Reumatologia (SIR), del Ministero Italiano della Salute e dell'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC).*

## RIASSUNTO

Sono stati studiati i polimorfismi HaeIIIb ed MspI del gene della fibronectina (FN) in un gruppo di 81 pazienti con sindrome crioglobulinemica (SC), una vasculite sistemica, HCV-correlata nel 75-80% dei casi, caratterizzata da un alto rischio di progressione in linfoma non-Hodgkin (LNH). Un maggior rischio di progressione linfomatosa risulta associato significativamente all'omozigosi AA del polimorfismo HaeIII (OR=5,54, IC95%=1,64-18,76, p=0,0066) e DD (OR=5,56; IC95% =1.67-18,51, p=0,0046) del polimorfismo MspI. Ma, mentre l'allele A del polimorfismo HaeIIIb si associa significativamente allo sviluppo di LNH nella popolazione generale (OR=1,72; IC95% =1,128-2,635, p=0,0133), l'allele D del polimorfismo MspI è associato allo sviluppo di LNH solo nei pazienti affetti da SC. Le maggiori manifestazioni vascolitiche tendono invece ad associarsi all'allele C del polimorfismo MspI.

**Parole chiave** - Fibronectina, polimorfismo, crioglobulinemia, linfoma, marcatori genetici.

**Key words** - *Fibronectin, polymorphism, cryoglobulinemia, lymphoma, genetic risk factor.*

## BIBLIOGRAFIA

- Meltzer M, Franklin EC. Cryoglobulinemia: a study of twenty-nine patients. I. IgG and IgM cryoglobulins and factors affecting cryoprecipitability. *Am J Med* 1966; 40: 828-36.
- Ferri C, Mascia MT. Cryoglobulinemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 54-63.
- De Vita S, De Re V, Gasparotto D, Ballare M, Pivetta B, Ferraccioli G, et al. Oligoclonal non-neoplastic B cell expansion is the key feature of type II mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 94-102.
- Ferri C, Monti M, La Civita L, Longombardo G, Greco F, Pasero G, et al. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1993; 82: 3701-4.
- Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327: 1490-5.
- De Re V, De Vita S, Marzotto A, Rupolo M, Gloghinim A, Pivetta B, et al. Sequence analysis of the immunoglobulin antigen receptor of hepatitis C virus-associated non-Hodgkin lymphomas suggests that the malignant cells are derived from the rheumatoid factor-producing cells that occur mainly in type II cryoglobulinemia. *Blood* 2000; 96: 3578-84.
- De Re V, Sansonno D, Simula MP, Caggiari L, Gasparotto D, Fabris M, et al. HCV-NS3 and IgG-Fc crossreactive IgM in patients with type II mixed cryoglobulinemia and B-cell clonal proliferations. *Leukemia* 2006; 20: 1145-54.
- Hynes RH, Yamada KM. Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982; 95: 369-77.
- Voss B, Allah S, Rauterberg J, Ullrich K, Gieselmann V, Von Figura K. Primary cultures of rat hepatocytes synthesize fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90: 1348-354.
- Pearlstein E, Gold LI, Garcia-Pardo A. Fibronectin: a review on its structure and biological activity. *Mol Cell Biochem* 1980; 29: 103-28.
- Furcht L. Structure and function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Mol Cell Biol* 1983; 1: 53-117.
- Barilla ML, Carsons SE. Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29: 252-65.
- Anderson V, Rucker M, Entwistle R, Schmid FR, Woos GW. Plasma fibronectin is a component of cryoglobulins from patients with connective tissue and other disorders. *Ann Rheum Dis* 1981; 40: 50-4.
- Beaulieu AD, Valet JP, Strevey J. The influence of fibronectin on cryoprecipitates formation in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1383-8.
- Srevey J, Beaulieu AD, Menard C, Valet JP, Latulippe L, Hebert J. The role of fibronectin in the cryoprecipitation of monoclonal cryoglobulins. *Clin Exp Immunol* 1984; 55: 340-6.
- Levo Y. Presence of fibronectin in cold precipitates of patients with cryoglobulinemia. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982; 68: 178-85.
- Fornasieri A, Armelloni S, Bernasconi P, Lin M, Pinerolo de Septis C, Sinico RA, et al. High binding of immunoglobulin Mk Rheumatoid factor from type II cryoglobulins to cellular fibronectin: a mechanism for induction of in situ immune complex glomerulonephritis? *Am J Kidney Diseases* 1996; 27: 476-83.
- Avila JJ, Lympny PA, Pantelidis P, Welsh KI, Black CM, du Bois RM. Fibronectin gene polymorphisms associated with fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 106-12.
- Gardella R, Colombi R, Barlati S. Human fibronectin gene (FN1) RFLPs: mapping and linkage disequilibrium analysis. *Human Genet* 1993; 92: 639-41.
- Invernizzi F, Pietrogrande M, Sagramoso B. Classification of the cryoglobulinemic syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1995; S13: 123-8.
- Vitali C. Classification criteria for Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 94-5.
- Stier AL, Xu R, Svoboda M, Hinds E, Munoz O, de Beaumont R, et al. Temporal gene expression profile of human precursor B leukemia cells induced by adhesion receptor: identification of pathways regulating B-cell survival. *Blood* 2003; 101: 1118-27.