

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO CELULAR DE PROTEÍNAS
REGULADORAS DO COMPLEMENTO E A RESPOSTA CLÍNICA DE
UMA COORTE DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE
TRATADA COM RITUXIMABE**

DANIELA VIECCELI CERVANTES

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, dezembro de 2013.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO CELULAR DE PROTEÍNAS
REGULADORAS DO COMPLEMENTO E A RESPOSTA CLÍNICA DE
UMA COORTE DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE
TRATADA COM RITUXIMABE**

DANIELA VIECCELI CERVANTES

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, dezembro de 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Viecceli Cervantes, Daniela

Correlação entre a expressão celular de proteínas reguladoras do complemento e a resposta clínica de uma coorte de pacientes com artrite reumatoide tratada com rituximabe / Daniela Viecceli Cervantes.

-- 2013.

75 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. rituximabe. 2. artrite reumatoide. 3. biomarcadores. 4. proteínas reguladoras do complemento. I. Machado Xavier, Ricardo, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ricardo Machado Xavier, meu orientador, pelos ensinamentos que influenciaram no meu desenvolvimento acadêmico e profissional e pela confiança em mim depositada, um exemplo de pesquisador e chefe de um dos melhores serviços de Reumatologia do país, do qual tenho orgulho de fazer parte.

Ao Professor João Carlos Tavares Brenol, por sua contribuição na minha formação como médica reumatologista, incentivando a excelência profissional sem detrimento do caráter humano.

Ao Professor Charles Lubianca Kohem, de papel fundamental na minha formação e a quem tenho como um exemplo de profissional e ser humano.

Ao Professor Claiton Viegas Brenol, pela contribuição com este projeto e convívio no Ambulatório de Artrite Reumatoide, onde dividiu seus conhecimentos sobre esta doença e influenciou-me a estudá-la.

Ao Professor Odirlei André Monticielo, que além de participar da minha formação profissional foi um dos grandes incentivadores a dedicar-me à pesquisa.

Aos colegas Rafael Mendonça da Silva Chakr, Penélope Esther Palominos, Markus Bredemeier e Sandra Helena Machado, pelo convívio e valiosos ensinamentos para meu aprimoramento profissional.

Aos médicos reumatologistas Rafael Tesche, Pedro Guilherme Schneider, Andrese Aline Gasparin, Nicole Pamplona Bueno de Andrade e Nizele Aparecida Nilson Calegaro da Silva, antes colegas de residência, hoje grandes amigos.

Aos alunos de iniciação científica do Ambulatório de Artrite Reumatoide, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Serviço de Patologia Clínica, especialmente à Ana Paula Alegretti, Mariana Pires Garcia e Laiana Schneider, pela contribuição significativa desde o início deste projeto, atuando ativamente durante toda sua execução.

Aos funcionários do Hospital Dia e das zonas 15 e 16, especialmente à técnica de enfermagem Lorena Koglin, pela amizade e convívio harmonioso.

Às secretárias Juliana Rios e Sibeli Garcia, pelo importante apoio logístico a este trabalho.

Ao meu irmão, Marcos Viecceli, e à minha irmã e agora colega de profissão, Camila Viecceli, que apesar da distância acompanharam minha trajetória profissional e acadêmica com carinho e palavras de incentivo.

Ao meu esposo e colega, Paulo Henrique Kitayama Cervantes, que foi meu ponto de equilíbrio e conforto durante toda esta trajetória, compreendendo minhas dificuldades e auxiliando com paciência a superá-las.

Aos meus pais, Tarcísio Viecceli e Maria Perera Viecceli, que proporcionaram todas as condições necessárias para o meu crescimento pessoal e incentivaram-me a buscar parte de minha realização no estudos. A eles dedico este trabalho.

RESUMO

OBJETIVOS: Correlacionar o nível de expressão das proteínas reguladoras do complemento (Cregs) CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B em uma coorte de pacientes com artrite reumatoide (AR) iniciando terapia com rituximabe (RTX) com a depleção e tempo de repopulação destas células no sangue periférico, associando, ainda, o nível de expressão destas proteínas à resposta clínica conforme os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR).

MÉTODOS: Dez pacientes com AR receberam duas infusões de RTX 1g separadas por intervalo de 14 dias. Análises imunofenotípicas para detecção de CD19, CD55, CD59, CD35 e CD46 foram realizadas pré-infusão e após 1, 2, 6, 12, 18 e 24 meses ou até recaída clínica. Depleção de linfócitos B no sangue periférico foi definida como valor de CD19 menor que $0,005 \times 10^9/l$ no total de leucócitos. Resposta ACR20 em 6 meses foi considerada positiva e recaída clínica foi definida como perda dessa resposta. A não obtenção de ACR20 em 6 meses foi considerada falha de resposta ao tratamento.

RESULTADOS: Dez mulheres com mediana de 49 anos e DAS28 basal de 5,6; nove delas soropositivas para fator reumatoide foram acompanhadas. Repopulação de linfócitos B ocorreu em 2 meses em cinco pacientes e em 6 meses nas demais. Houve correlação entre o nível de expressão basal de CD46 com o tempo de repopulação (coeficiente de correlação de -0,733, $p=0,016$). Tendência semelhante foi detectada com CD35, porém sem significância estatística (coeficiente de correlação de -0,522, $p=0,12$). Não houve associação entre resposta clínica e expressão das proteínas regulatórias do complemento.

CONCLUSÕES: Expressão aumentada de CD46 foi preditora de repopulação mais precoce de linfócitos B em pacientes com AR tratados com RTX. Estudos com amostras maiores serão necessários para avaliar associação das demais Cregs.

PALAVRAS-CHAVE: rituximabe, artrite reumatoide, biomarcadores, proteínas regulatórias do complemento

ABSTRACT

OBJECTIVES: To correlate the level of expression of the complement regulatory proteins (Cregs) CD55, CD59, CD35, and CD46 on B cells from a cohort of 10 patients with rheumatoid arthritis (RA) initiating treatment with rituximab (RTX) with the depletion and time of repopulation of these cells in peripheral blood, additionally correlating the level of expression of these proteins to clinical response according to the criteria of the American College of Rheumatology (ACR).

METHODS: Ten patients with RA received two 1g RTX infusions within 14 day intervals. Immunophenotype analyses for CD19, CD55, CD59, CD35 and CD46 were performed before the infusion and at 1, 2, 6, 12, 18 and 24 months or until recurrence. Depletion of B cells on peripheral blood was defined as the CD19 count $< 0.005 \times 10^9/l$. ACR20 at 6 months was considered a good clinical response and recurrence was defined as loss of this response.

RESULTS: Ten women with median age of 49 years and basal DAS28 of 5.6 were monitored; 9 were seropositive for rheumatoid factor. Repopulation of B cells occurred within 2 months in 5 patients and within 6 months in the remaining women. There was correlation between the basal level of CD46 expression and the time to achieve repopulation (correlation coefficient -0.733, $p=0.016$). A similar trend was observed with the CD35, but without statistical significance (correlation coefficient -0.522, $p=0.12$). There was no association between clinical response and the complement regulatory proteins.

CONCLUSIONS: Increased CD46 expression predicted earlier repopulation of B cells in RA patients treated with RTX. Studies with larger samples are necessary to assess the association with the other Cregs.

KEYWORDS: rituximab, rheumatoid arthritis, biomarkers, complement regulatory proteins

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário de taxas de resposta em 6 meses em 5 ensaios clínicos randomizados que avaliaram associação de RTX + MTX 22

Tabela 2 - Sumário dos possíveis marcadores de resposta ao tratamento com RTX em pacientes com AR 27

Tabela 3 – Principais funções das proteínas regulatórias do complemento 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma para o tratamento medicamentoso da AR	20
Figura 2 – Cascata de ativação do complemento	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
anti-CCP	Anti-peptídeos citrulinados cíclicos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno
AR	Artrite reumatoide
BAFF	Fator de ativação de linfócitos B
BLyS	Estimulador de linfócitos B
CDAI	Clinical Disease Activity Index
CR1	Receptor do complemento tipo 1
CTLA-4	Antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos
Cregs	Complement Regulatory Proteins
DAF	Decay accelerating factor
DAS 28	Disease Activity Score 28
DMCD	Drogas modificadoras do curso de doença
DP	Desvio padrão
EBV	Epstein Barr vírus
EULAR	The European League Against Rheumatism
FCGR	Fragmento FC da IgG
FR	Fator reumatoide
HLA	Human leukocyte antigen
ICAD	Índice composto de atividade de doença
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
MAC	Membrane attack complex
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i>

MCP	Membrane cofactor protein
MIF	Fator inibitório de migração de macrófagos
MIRL	Membrane inhibitor of reactive lysis
MTX	Metotrexate
NK	Natural Killer
PADI4	Peptidilarginina deaminase tipo 4
PCR	Proteína C reativa
PTPN22	Proteína tirosina fosfatase N22
RTX	Rituximabe
SC	Sistema complemento
SDAI	Simplified Disease Activity Index
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
2 - REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 - Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	14
2.2 - Conceito, Epidemiologia e Diagnóstico da Artrite Reumatoide.....	14
2.3 - Suscetibilidade genética da AR	15
2.4 - Etiopatogênese da AR	16
2.5 - Tratamento da AR	17
2.6 – Rituximabe.....	20
2.7 - Preditores de resposta ao tratamento com rituximabe	23
2.8 - Sistema Complemento.....	28
2.9 - Proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46.....	30
2.10 – Expressão de Cregs e AR.....	32
2.11 - Expressão de Cregs e resposta ao RTX.....	33
3 - JUSTIFICATIVA	35
4 - OBJETIVOS DO ESTUDO.....	36
4.1 - Objetivo principal.....	36
4.2 - Objetivos secundários.....	36
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA	37
6 – ARTIGO EM INGLÊS.....	Erro! Indicador não definido.
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
ANEXOS	71
Anexo 1 - Critérios do American College of Rheumatology 1987 para classificação da artrite reumatoide.....	71
Anexo 2 - Critérios classificatórios para artrite reumatoide 2010 ACR/EULAR	72
Anexo 3 – Critério de resposta ACR20	73
Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	74

1 - INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica inflamatória das articulações que afeta em torno de 1% da população mundial, afetando as mulheres duas vezes mais do que os homens. Sua incidência aumenta com a idade e o pico ocorre entre os 30 e 70 anos (1). A hiperplasia sinovial é uma característica marcante destes pacientes, com membranas proeminentes e projeções de vilosidades na sinóvia, além de edema tecidual. Diversas linhagens celulares compõem o infiltrado inflamatório, sendo os linfócitos TCD4 responsáveis por 70% e os macrófagos por 20%. Embora o papel das células B na imunopatogênese da AR não esteja totalmente estabelecido, mecanismos convincentes têm sido propostos reforçando a importância destas células (2-4). Além disso, estudos clínicos demonstram uma melhora significativa de pacientes portadores de AR tratados com terapia depletiva de linfócitos B (5-8).

O rituximabe (RTX) é um anticorpo quimérico direcionado à molécula CD20 presente na superfície de linfócitos B. O mecanismo de ação deste medicamento baseia-se na morte da célula B por indução da apoptose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo através de células *natural killer* (NK), macrófagos e monócitos e citotoxicidade dependente do complemento (9). Este fármaco tem sido cada vez mais utilizado como um tratamento eficiente e específico, principalmente em linfoproliferações B(10-12) e doenças autoimunes(13-17). A maioria dos pacientes com AR responde bem ao tratamento, contudo, alguns são refratários, e o mecanismo desta ausência de resposta ainda não está esclarecido (18).

As células de mamíferos saudáveis são resistentes à lise autóloga mediada pelo complemento, pois elas possuem um sistema regulador do complemento na membrana celular constituído por proteínas, sendo as principais o CD55, fator acelerador de degradação (DAF – decay accelerating factor); o CD59, inibidor da lise de membrana (MIRL – membrane inhibitor of reactive lysis); o CD46 (MCP - membrane cofactor protein), o qual facilita a inativação de C3b e C4b(19); e o CD35 (também chamado de receptor CR1 – receptor do complemento tipo 1), que é um receptor de C3b e C4b ligados aos complexos imunes e possui função semelhante ao CD55(20). CD55 inibe a clivagem de C3 e C5 por prevenir a formação de novas

C3 e C5 convertases, além de acelerar a degradação destas enzimas pré-formadas(21). A proteína CD59 é o único regulador de membrana que interfere diretamente na estruturação do MAC (*membrane attack complex*) através de sua incorporação física ao complexo em formação, impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8(22).

Tem sido investigado o papel das proteínas CD55 e CD59 e sua expressão aumentada como mecanismo de resistência a fármacos, como o RTX, utilizados na imunoterapia com ação mediada pelo complemento (23-25). Poucos estudos foram encontrados sobre o perfil de expressão de CD55 e CD59 em AR (26-27) e nenhum estudo correlacionou a intensidade de expressão de CD55/CD59/CD35/CD46 em pacientes com AR submetidos ao tratamento com RTX.

O objetivo do presente estudo é correlacionar o nível de expressão de CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B em uma coorte de pacientes iniciando terapia com RTX com a depleção e o tempo de repopulação destas células no sangue periférico. Também será avaliada a correlação entre a expressão destas proteínas reguladoras e a resposta clínica dos pacientes de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR).

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Estratégias para localizar e selecionar as informações

Na revisão da literatura, pretende-se apresentar os principais aspectos relacionados ao uso do rituximabe na artrite reumatoide e os possíveis biomarcadores de resposta a esta terapia, com ênfase no papel das proteínas reguladoras do complemento. Investigou-se, também, a influência destas proteínas na eficácia do rituximabe no tratamento de doenças linfoproliferativas. A estratégia de busca envolveu a base de dados MEDLINE (site PubMed). As referências bibliográficas dos artigos identificados foram revisadas com finalidade de localizar estudos não contemplados na busca. Também foram consultados o banco de teses da CAPES e livros-textos.

Os termos utilizados no site PubMed foram “rheumatoid arthritis”, “rheumatoid arthritis and complement regulatory proteins”, “rheumatoid arthritis and rituximab and complement regulatory proteins” e “rituximab and complement regulatory proteins”. Foram encontrados 118.862 artigos com o termo “rheumatoid arthritis”; 59 artigos com os termos “rheumatoid arthritis and complement regulatory proteins”; 24 artigos citando “rituximab and complement regulatory proteins” e nenhum artigo com os termos “rheumatoid arthritis and rituximab and complement regulatory proteins”.

2.2 - Conceito, Epidemiologia e Diagnóstico da Artrite Reumatoide

A AR é uma doença inflamatória sistêmica de caráter autoimune que se caracteriza pelo curso crônico e progressivo, afetando principalmente as membranas sinoviais das articulações periféricas, podendo acarretar dano ósseo e cartilaginoso (28). É a artrite inflamatória mais comum, afetando entre 0,5 a 1% da população mundial, com prevalência semelhante na população brasileira(29). Tem predomínio duas vezes superior em mulheres e sua incidência aumenta com a idade, com pico entre os 30 e 50 anos(30).

O principal alvo da AR são as pequenas articulações, especialmente das mãos e pés, onde a proliferação sinovial leva ao aumento do volume articular, dor,

rigidez e impotência funcional(31). 80% dos pacientes com AR apresentam fator reumatoide (FR) positivo, uma imunoglobulina que se liga à porção Fc da molécula IgG (31). Embora seu principal alvo seja a articulação, a resposta imune alterada na AR pode levar a uma variedade de outras manifestações extra-articulares. Em alguns casos, a produção de FR com formação de imunocomplexos pode contribuir com achados como nódulos reumatoides, vasculite de pequenos e médios vasos, esclerite, entre outros(32).

O diagnóstico da AR é realizado através do conjunto de manifestações clínicas, laboratoriais e radiológicas. Durante muito tempo utilizou-se predominantemente os critérios diagnósticos propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (revisados em 1987) (Anexo 1) (1). Estes critérios foram desenvolvidos com base em indivíduos com AR de longa duração, apresentando bom retrospecto para o diagnóstico da AR estabelecida (sensibilidade de 91-94% e especificidade de 89%), porém baixa sensibilidade (40-90%) nos pacientes com AR de início recente(33). Com a finalidade de diagnosticar mais precocemente os pacientes com AR, em 2010 o ACR/EULAR propôs novos critérios classificatórios que se baseiam em um sistema de pontuação que leva em consideração manifestações articulares, sorologias, provas inflamatórias e tempo de duração dos sintomas (Anexo 2) (34).

2.3 - Suscetibilidade genética da AR

Fatores ambientais e genéticos parecem estar envolvidos na origem e patogênese da doença (35). O risco de desenvolver AR em parentes de um paciente portador da enfermidade é 1,5 vezes superior à população em geral, com uma concordância entre gêmeos monozigóticos de 12-15% (36). O antígeno leucocitário humano (HLA – human leukocyte antigen) é o principal fator genético envolvido na patogênese da AR. Diversos alelos de HLA-DRB1 são associados à AR: DRB1*0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001, *1402 (37). Os alelos citados compartilham uma seqüência de aminoácidos QK/RRAA (glutamina-leucina ou arginina-arginina-alanina) nas posições 70-74 da terceira região hipervariável da cadeia DR β 1. Estes epítomos compartilhados permitiriam a

apresentação de peptídeos artritogênicos às células efectoras, determinando suscetibilidade e maior gravidade à doença (36).

O sistema relacionado ao HLA parece ser responsável por cerca de 50% do componente genético da AR. Outros genes e polimorfismos têm sido estudados, dentre eles, os genes da proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22), do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) e peptidilarginina deaminase tipo 4 (PADI4) (38).

2.4 - Etiopatogênese da AR

A etiologia da AR ainda não está completamente esclarecida. Acredita-se que estímulos artritogênicos causem alterações teciduais em indivíduos geneticamente predispostos. O estímulo inicial pode ser determinado por fatores hormonais, traumas ou infecções (36).

Mulheres desenvolvem AR duas a três vezes mais do que os homens (30), o que sugere a possibilidade de que fatores hormonais como estrógeno e progesterona possam explicar parte deste efeito relacionado ao gênero. O estrógeno parece ter efeitos prejudiciais através de sua capacidade de diminuir a apoptose de células B, permitindo a seleção de clones autorreativos. A precisa explicação para a prevalência superior de AR em mulheres, porém, permanece incerta (36).

O tabagismo é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de AR. No contexto da presença de epítipo compartilhado dos genes HLA-DR, a inalação da fumaça do cigarro pode levar à inflamação e ativação da imunidade inata nas vias respiratórias, induzindo a formação de peptídeos citrulinados e o desenvolvimento de anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) (39).

O anticorpo anti-CCP tem sido estudado como fator de risco para o desenvolvimento de AR, havendo evidências de preceder o início dos sintomas e associar-se à doença de maior gravidade (40-41). A presença de peptídeos citrulinados na sinóvia de pacientes com AR permite a possibilidade de que haja um papel patogênico deste anticorpo (42).

Agentes infecciosos têm sido apontados como possível estímulo para o desenvolvimento de AR há décadas. Dentre estes, o vírus Epstein-Barr (EBV) frequentemente é relacionado à patogênese da AR por sua associação à ativação policlonal de linfócitos B e aumento da produção de FR. Pacientes portadores de AR tem níveis elevados de anticorpos contra EBV em comparação aos controles (43), porém o papel exato do EBV na patogênese ainda não é conclusivo.

O evento inicial da AR parece ser a apresentação de antígenos artritogênicos pela célula apresentadora de antígeno (APC) à célula T CD4. Linfócitos T ativados produzem citocinas que ativam macrófagos e outras células da membrana sinovial articular, iniciando uma cascata em que predominam citocinas pró-inflamatórias, particularmente TNF- α (fator de necrose tumoral) e IL-1 (interleucina 1) (35). Ocorre hiperplasia sinovial, com membranas proeminentes e projeções de vilosidades na sinóvia além de edema tecidual, que levam à formação do pannus. Este é um tecido inflamatório proveniente da sinóvia que atinge a cartilagem articular e o osso subcondral, levando à destruição e erosão (36). Diversas linhagens celulares vão se aderir ao infiltrado inflamatório, sendo os linfócitos TCD4 responsáveis por 70% e os macrófagos por 20%. Embora o papel das células B na imunopatogênese da AR não esteja totalmente estabelecido, mecanismos convincentes têm sido propostos reforçando a importância destas células (2-4). A produção aumentada de interleucina-6 e 10 (IL-6 e IL-10), que estimulam linfócitos B, a migração de células T e B com formação de agregados com estrutura de folículos terciários e a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD154) reforçam a ideia da hiperatividade das células B na AR (44). Além da atuação na produção de autoanticorpos, as células B podem contribuir com a patogênese da AR através de seu papel de apresentação de antígenos, gênese de linfócitos e liberação de citocinas (45).

2.5 - Tratamento da AR

O diagnóstico e tratamento precoce da AR devem ser buscados com o objetivo de mudar o curso da doença e permitir remissão sustentada (46). O período inicial da doença, especialmente seus primeiros 12 meses, a chamada AR inicial, é considerada uma janela de oportunidade terapêutica, ou seja, um momento em que

a intervenção farmacológica rápida e efetiva pode mudar o curso da doença em longo prazo (47). O não controle da atividade da doença pode resultar em incapacidade funcional, com impacto econômico significativo individual e para a sociedade (48).

As drogas modificadoras do curso de doença (DMCD) devem ser indicadas para todo o paciente a partir da definição do diagnóstico de AR (49), podendo ser iniciadas em pacientes com artrite indiferenciada e biomarcadores preditores de AR, como anti-CCP e/ou FR positivos (50).

O objetivo principal do tratamento da AR é atingir remissão, que pode ser aferida por um dos índices compostos de atividade de doença (ICAD). Os principais índices são baseados na contagem de 28 articulações (DAS 28 - *Disease Activity Score 28*), o índice simplificado de atividade de doença (SDAI - *Simplified Disease Activity Index*) e o índice clínico de atividade de doença (CDAI - *Clinical Disease Activity Index*) (47).

O fármaco de primeira linha no tratamento da AR é o metotrexate (MTX), cuja eficácia em reduzir sinais e sintomas de atividade de doença, melhorar o estado funcional e reduzir a progressão das lesões radiográficas está bem estabelecida (51).

Na falha em atingir remissão com as doses máximas toleradas de MTX ou na presença de eventos adversos, recomenda-se a sua troca ou a combinação de DMCDs. As combinações mais utilizadas são MTX com cloroquina, com sulfassalazina ou a associação destas três drogas e a associação de MTX com leflunomida (47).

Na falha do controle da atividade da AR com o tratamento com pelo menos dois esquemas de DMCD sintéticas (pelo menos um deles sendo combinação de DMCD), há indicação de uso de agentes imunobiológicos. Atualmente, encontram-se aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil as seguintes DMCD biológicas:

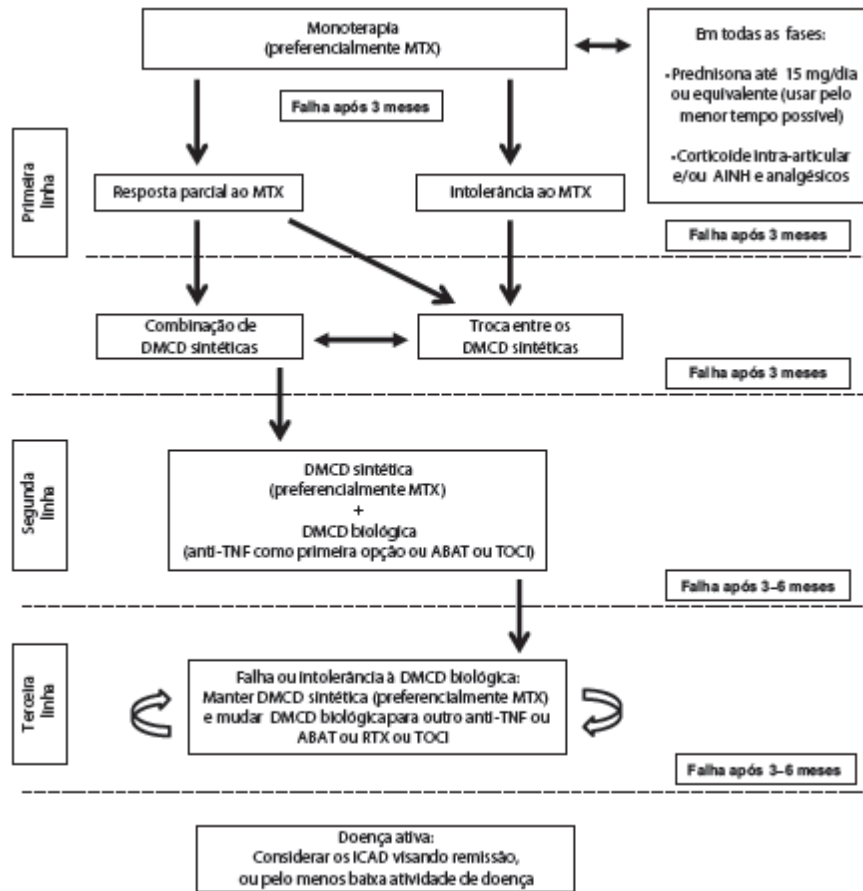
- Bloqueadores do TNF-alfa: adalimumabe, certolizumabe, etanercepte, infliximabe e golimumabe;

- Depletor de linfócito B: rituximabe;
- Bloqueador da co-estimulação: abatacepte;
- Bloqueador do receptor da interleucina-6 (IL-6): tocilizumabe.

As DMCD biológicas recomendadas como primeira linha após falha à DMCD sintéticos são os bloqueadores do TNF-alfa, abatacepte ou tocilizumabe. Na falha à obtenção de remissão após 3-6 meses de tratamento, pode-se trocar para um segundo bloqueador do TNF-alfa ou modificar para uma DMCD com outro mecanismo de ação, incluindo o rituximabe.

A figura 1 traz o fluxograma para tratamento medicamentoso da AR recomendado pela Sociedade Brasileira de Reumatologia.

Figura 1 – Fluxograma para o tratamento medicamentoso da AR



Fonte: Mota et al. 2013 (47)

2.6 – Rituximabe

O rituximabe (RTX) é um anticorpo monoclonal quimérico (camundongo/humano) direcionado à molécula CD20 que se expressa na superfície dos linfócitos pré-B até os linfócitos B maduros. Após a ligação à molécula CD20, leva à depleção transitória quase completa das células B no sangue e parcial na medula óssea e tecido sinovial (18, 52-56). Seu mecanismo de ação baseia-se na morte da célula B por indução da apoptose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo através de células *natural killer* (NK), macrófagos e monócitos e citotoxicidade dependente do complemento (9, 57). A resposta clínica parece

correlacionar-se ao nível de depleção de células B na sinóvia e no sangue periférico (52).

Este medicamento tem sido cada vez mais utilizado como um tratamento eficiente e específico, principalmente em linfoproliferações B (10-12) e doenças autoimunes (13-17).

O RTX está indicado para pacientes com AR em atividade moderada à grave que tiveram falha terapêutica ou intolerância ao bloqueador anti-TNF. É administrado na dose de 1g em duas infusões intravenosas em intervalo de 14 dias. Cada infusão é precedida pela utilização de 100mg de metilprednisolona, paracetamol e anti-histamínicos para reduzir a gravidade e frequência de reações infusionais (6, 8).

A eficácia e duração do efeito como monoterapia é menor em relação à combinação com MTX, devendo preferencialmente ser utilizado em associação a esta droga (8). Estudos observacionais e de registro sugerem que o RTX possa ser prescrito em associação a outras DMCD (58).

Após a infusão do RTX, pode haver retardo de 3-4 meses para que seja observada melhora sintomática (6, 8). Nos pacientes respondedores, a duração da resposta a um curso único de RTX geralmente dura mais de 6 meses (59). Caso haja reativação da doença em tempo não inferior a 6 meses, poderá ser realizada nova infusão da droga (60).

O tratamento da AR com RTX demonstrou eficácia significativa no controle de sinais e sintomas, melhora da função física além de benefícios na prevenção do dano radiológico (5-6, 8, 61-64). A tabela 1 traz um sumário das taxas de resposta ao tratamento com RTX em 5 ensaios clínicos randomizados.

Tabela 1 – Sumário de taxas de resposta em 6 meses em 5 ensaios clínicos randomizados que avaliaram associação de RTX + MTX

Estudo	Critério de resposta	Placebo + MTX (%)	RTX (2X 1000mg) + MTX (%)
Virgens de MTX			
IMAGE (N=755) (62)	ACR 20	64,3	80,0
	ACR 50	41,8	64,8
	ACR 70	24,9	46,8
Falha à MTX			
Fase IIa (n=80) (5)	ACR 20	38,0	73,0
	ACR 50	13,0	43,0
	ACR 70	5,0	23,0
SERENE (n=512) (63)	ACR 20	23,3	50,6
	ACR 50	9,3	25,9
	ACR 70	5,2	10,0
Falha à anti-TNF			
DANCER (n=465) (6)	ACR 20	28,0	54,0
	ACR 50	13,0	34,0
	ACR 70	5,0	20,0
REFLEX (8)	ACR 20	18,0	51,0
	ACR 50	5,0	27,0
	ACR 70	1,0	12,0

Adaptado de Buch, M.H. ET al (65)

Os eventos adversos mais frequentes são reações infusionais (35% na primeira infusão e 10% na segunda). Há também um aumento na frequência de infecções em geral, porém infecções severas levando à descontinuação são raras (6, 8). Estudos de registros sugerem que as infecções graves tendem a ocorrer nos primeiros meses após o início do tratamento com RTX, sendo fatores

predisponentes a idade, comorbidades, envolvimento extra-articular e baixos níveis de IgG antes do tratamento(66).

2.7 - Preditores de resposta ao tratamento com rituximabe

Embora um grande número de pacientes com AR apresente resposta satisfatória ao tratamento com RTX, atingindo remissão clínica e inibição da progressão radiológica da doença, cerca de 40 a 50% são refratários e o mecanismo desta falha ainda não está completamente esclarecido (6, 8, 18). Neste contexto, a busca de biomarcadores que possam prever quais os subgrupos de pacientes com maior potencial de beneficiar-se desta terapia tem sido um dos objetivos dos estudos mais atuais relacionados à droga. Esta estratégia, além de reduzir custos, poderia minimizar períodos de atividade de doença e a exposição a possíveis efeitos colaterais de um tratamento ineficaz (67).

Após a infusão do RTX, a depleção dos linfócitos B séricos e da sinóvia e as alterações específicas desencadeadas pela droga parecem influenciar a resposta ao tratamento. O RTX causa um rápido decréscimo no número de células B no sítio primário da inflamação, a sinóvia, porém esta resposta é variável, em contraste com a marcada depleção de células B no sangue periférico que ocorre em praticamente a totalidade dos pacientes (54). Não há correlação entre a resposta clínica e o nível de depleção no sangue periférico (68), porém a ausência da depleção completa das células B séricas após a primeira infusão do RTX está associada a piores desfechos (52). Parece haver, no entanto, correlação entre a maior redução das células B na sinóvia com melhor resposta ao tratamento (56). A repopulação, que acontece em média 8 meses após a infusão, ocorre principalmente com formação de células B naive com expressão aumentada de CD38 e CD5, havendo ainda um aumento do número de células B imaturas. Entre os pacientes com recaída da AR, há uma tendência de repopulação com maior número de células B de memória (18). A depleção na sinóvia, particularmente de células CD22 se correlaciona à boa resposta clínica ao RTX (56). Esta depleção afeta também outras populações celulares, como linfócitos T e macrófagos, indicando um importante papel das células B na manutenção do infiltrado inflamatório da AR.

Entre os candidatos a biomarcadores de resposta ao tratamento com rituximabe, talvez os mais estudados e com maiores evidências na literatura sejam a presença do FR e dos anticorpos anti-CCP (69), cuja positividade para um ou ambos parece aumentar a probabilidade de resposta clínica ao tratamento (8, 62-63, 70-72). Sellam et al demonstraram que pacientes com positividade de FR e/ou anti-CCP e níveis elevados de IgG têm 85% de chance de responder à terapia com rituximabe, sugerindo, ainda, um sinergismo entre estas variáveis (73). Uma metanálise de quatro grandes ensaios clínicos (REFLEX, SERENE, DANCER E IMAGE) envolvendo 2177 pacientes evidenciou uma diferença modesta de resposta, porém favorável em pacientes soropositivos, especialmente naqueles com falha a pelo menos uma droga anti-TNF alfa (69). Ferracioli et al associaram à boa resposta EULAR em 24 semanas ausência de corticoterapia, contagem de linfócitos baixa, altos níveis de FR-IgG e níveis de fator de ativação de linfócitos B (BAAF) menores do que 1011pg/ml (74). Estudos de registros também associaram a soropositividade de FR e/ou anti-CCP com melhor resposta ao tratamento com rituximabe. O registro da British Society for Rheumatology correlacionou presença de FR e DAS 28 elevado inicial com melhores desfechos (75). Já um pool de 10 registros europeus envolvendo dados de 2019 pacientes encontrou maior frequência de boa resposta EULAR em 6 meses em pacientes com positividade de anti-CCP (OR = 2,86), menor número de DMARDs prévios (OR = 0,84), menor ou igual a 1 agente biológico prévio (OR = 1,89), níveis maiores de DAS 28 basal (OR = 0,74) (76).

Os mecanismos que envolvem a presença do FR e o anti-CCP à maior eficácia ao tratamento com RTX ainda precisam ser esclarecidos. Não está bem estabelecido se há um fator específico patogênico dos autoanticorpos, cujos níveis caem com a terapia, ou se sua presença reflete um indicador não específico de que a doença nestes pacientes é mais dependente dos linfócitos B (55). Esta segunda teoria é favorecida por resultados de estudos que sugerem que níveis menores de BAFF (também conhecido como estimulador de linfócitos B- BlyS) se correlacionam a melhores desfechos em pacientes com AR tratados com RTX (74, 77).

Outros possíveis biomarcadores de resposta à terapia com RTX em pacientes com AR são os polimorfismos do fragmento Fc da IgG (FCGR) tipo 3A. O polimorfismo 158 V/F, em que há uma substituição da valina por fenilalanina na posição 158 parece afetar a expressão de FcγRIIIa (CD16), onde se liga o

rituximabe para mediação de citotoxicidade. Ruysen-Witrand et al estudaram uma coorte de 111 pacientes com AR tratados com RTX e encontraram que a presença do genótipo FCGR3A-158V é um fator independentemente associado à resposta a um primeiro curso de RTX em pacientes com resposta inadequada ou falha a anti-TNF. Concluíram que a presença de um ou dois alelos V correlaciona-se à melhor resposta porque há maior afinidade de ligação à IgG (78). Kastbom et al avaliaram 177 pacientes e verificaram esta correlação somente entre os pacientes heterozigotos (FCGR3A 158VF), que atingiram respostas favoráveis em 83% dos casos contra 68% e 56% nos portadores de 158FF e 158VV, respectivamente (79). Já em estudos mais recentes não houve confirmação desta associação, havendo melhores desfechos nos pacientes com genótipo homozigoto (80) ou ausência de associação (81). Na análise multivariada do estudo de Quartuccio et al, a combinação da presença de pelo menos 2 de 3 preditores (FCGR3A 158VV, soropositividade e tratamento prévio com um ou menos anti-TNF) elevou em 8 vezes a probabilidade de resposta ao RTX (80). Os resultados ainda discordantes da associação dos genótipos de FCGR3A indicam que ainda há necessidade de maior compreensão do assunto.

A expressão de genes relacionados à atividade do interferon tipo 1 também tem sido estudada como fator de predisposição à resposta ao RTX. Vosslamber et al evidenciaram que pacientes com melhor resposta ao tratamento parecem ter menor expressão basal destes genes, com maior elevação de sua presença após um primeiro curso de RTX (82).

Outros polimorfismos têm sido estudados como possíveis biomarcadores. Fabris et al evidenciaram que a homozigose em CC do polimorfismo da IL-6 -174G>C parece ser um fator independente de não resposta ao tratamento com RTX em pacientes com AR (83). Já a presença do polimorfismo de um único nucleotídeo de TGF beta 1 aumenta a resposta ao tratamento com odds ratio de 1,6 para o códon 10 C/T e 1,6 para o códon 25 G/C, com duas vezes mais chances de resposta clínica na presença de ambos (84). Outros candidatos a preditores associados positivamente foram o polimorfismo do gene do BAFF -871C>T (85), presença do alelo *2 do polimorfismo do HS1,2A (86) e o haplótipo TTTT promotor do estimulador de linfócitos (BLyS) (87).

Estudos mais recentes associaram a expressão de certos tipos celulares e quimiocinas à resposta ao tratamento com RTX. Entre estes, Lurati et al associaram a ativação de células natural killer (NK) 3 meses após a infusão de RTX com a resposta clínica em 6 meses e 1 ano (88). Gremese detectou um percentual basal menor de células CD19+/ZAP-70+ em pacientes bons respondedores à terapia (89) e Sellam et al correlacionaram positivamente níveis séricos de CC19 (uma quimiocina associada à migração de células B) com resposta EULAR superior (90). Este mesmo grupo associou a menor frequência de linfócitos CD27+ de memória como preditor de resposta ao RTX, sugerindo que o decréscimo destas células na periferia poderia estar correlacionado a sua migração e ativação na sinóvia, definindo uma subpopulação de pacientes com AR cujo mecanismo seria mais dependente das células B (91).

Entre os fatores ambientais, o tabagismo e o vírus Epstein Barr (EBV) têm sido estudados. Um estudo britânico mostrou que pacientes que nunca fumaram apresentaram alterações superiores no DAS28, havendo uma interação positiva quando da presença simultânea de FR ou anti-CCP. Já entre pacientes tabagistas prévios ou atuais, as taxas de resposta ao tratamento atingiram até 50% apenas na presença dos autoanticorpos (positivo/negativo 50% VS 3%) (92). Em um estudo que analisou amostras de sangue periférico e medula óssea de 35 pacientes com AR, a presença de genoma de EBV se associou a melhor resposta clínica do RTX (93).

A tabela 2 resume os principais possíveis fatores preditores de resposta ao tratamento com RTX em pacientes com AR.

Tabela 2 – Sumário dos possíveis marcadores de resposta ao tratamento com RTX em pacientes com AR

Associados à boa resposta	Associados à pior resposta
<ul style="list-style-type: none"> • Depleção de células B na sinóvia, especialmente CD22 (56) • Fator reumatoide e anti-CCP (7, 62-63, 69-74, 76) • Falha prévia a pelo menos um anti-TNF (69) • Níveis basais elevados de IgG (74) • Ausência de corticoterapia (74) • Níveis menores de BAAF (74, 77) • Menor número de DMARDs prévios (76) • DAS28 basal elevado (75-76) • PCR elevado basal (72) • Polimorfismos do fragmento Fc da IgG (FCGR) tipo 3A (78-81) • Menor expressão de genes relacionados à atividade do interferon tipo 1 (82) • Polimorfismo de TGF beta 1 (84) • Polimorfismo do gene do BAFF -871C>T (85) • Presença do alelo *2 do polimorfismo do HS1,2A (86) • Haplótipo TTTT promotor do estimulador de linfócitos (BLyS) (87) • Ativação das células NK (88) • Nível basal menor de células CD19+/ZAP-70+ (89) • Níveis séricos de CC19 (90) • Menor frequência linfócitos CD27+ (91) • EBV (93) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de depleção completa das células B periféricas (52) • Repopulação com maior número de células B de memória (18) • Homozigose em CC do polimorfismo da IL-G -174G>C (83) • Tabagismo (92)

2.8 - Sistema Complemento

A evidência de que um dos mecanismos relacionados à ação do RTX seria a citotoxicidade mediada pelo complemento (9) gerou a hipótese de que poderia haver algum tipo de influência das proteínas regulatórias do complemento (Cregs, do inglês *complement regulatory proteins*) sobre o grau de lise celular e consequente resposta ao tratamento com RTX.

O sistema complemento (SC) é constituído de uma cascata de proteínas séricas solúveis ativadas sequencialmente, levando à morte celular através da lise direta e/ou ativação de fagócitos. É constituído de mais de 30 proteínas séricas e de membrana celular sintetizadas principalmente pelo fígado, podendo alguns componentes ser produzidos em outros tipos celulares, como monócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (94). O SC desempenha função imunorregulatória importante através do seu papel na imunidade humoral, modulação da imunidade de células T e regulação de tolerância para antígenos próprios (95).

A cascata do complemento pode ser dividida em quatro fases principais: ativação inicial do complemento, ativação e amplificação da C3 convertase, ativação da C5 convertase e formação do complexo de ataque à membrana celular (MAC – do inglês, *membrane attack complex*) (94).

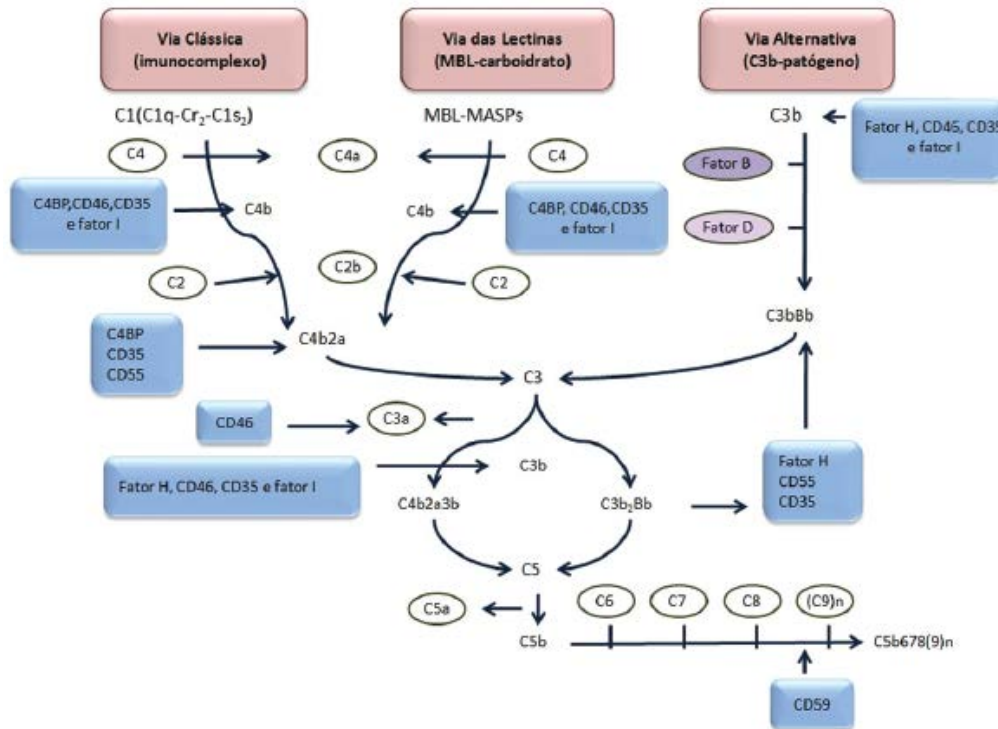
A ativação da cascata do complemento pode ocorrer por 3 vias diferentes: a via clássica (dependente de um anticorpo ligado ao antígeno alvo), via alternativa (espontânea) ou via da lectina (mediada pela ligação da lectina ligadora de manose com carboidratos presentes na superfície do microorganismo alvo).

A via clássica é ativada através da interação do componente C1 do complemento com o complexo antígeno-anticorpo. O C1 é formado por três proteínas (C1q, C1r e C1s). Após esta ligação, o C1q sofre mudanças conformacionais que geram ativação do C1r e clivagem do C1s, que é capaz de clivar C4 e C2. Os fragmentos C4b e C2a formarão a C3 convertase da via clássica (C4b2a). A via alternativa é ativada na ausência de anticorpo por partículas ricas em

carboidratos presentes na superfície do microorganismo invasor, envolvendo a ligação de C3b e demais componentes da via alternativa (fator B, fator D e properdina). O fator B liga-se ao C3b formando C3bBb (C3 convertase da via alternativa). A via das lectinas é ativada através da ligação da lectina ligante da manose (MBL – do inglês *mannose-binding lectin*) com carboidratos presentes na superfície do microorganismo alvo. A interação da MBL ativada com serino-proteases associadas à MBL leva à clivagem de C4 e C2 gerando a C3 convertase (C4b2a) e C5 convertase (C4b2a3b) (96).

As três vias de ativação do SC convergem para formação da enzima proteolítica C3 convertase, que cliva a proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b gerado se combina com a C3 convertase, formando C5 convertase, que cliva C5 em C5a e C5b. C3a e C5a são potentes anafilatoxinas. C5b recruta os componentes C6, C7, C8 e C9 para a superfície-alvo. A mudança da conformação dessas proteínas e sua agregação induzem a formação do MAC – um poro inserido na bicamada fosfolipídica que interfere na permeabilidade seletiva da membrana, permitindo entrada de íons, água e pequenas moléculas para o citosol, levando à lise celular (97). A figura 2 traz um esquema resumindo a cascata do complemento.

Figura 2 – Cascata de ativação do complemento



Fonte: Piccoli, A. K. et AL (27).

2.9 - Proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46

As células normais, que são resistentes à lise mediada pelo complemento, possuem mecanismos regulatórios constituídos por proteínas solúveis nos líquidos biológicos, como a properdina e fator H, e ancoradas à membrana, como o CD55 (fator acelerador de degradação – DAF, do inglês *decay-accelerating factor*), CD59 (inibidor da lise de membrana ou protectina – MIRL, do inglês *membrane inhibitor of reactive lysis*), CD46 (proteína cofator de membrana – MCP, do inglês *membrane cofactor protein*) e CD35 (receptor do complemento tipo 1 – CR1) (98).

O CD55 é uma glicoproteína expressa em diferentes tipos celulares e encontrada sob forma solúvel na lágrima, saliva, urina, líquido sinovial, líquor e plasma (99). Ele impede a clivagem de C3 e C5 através da inibição da formação de novas convertases de C3 e C5, além de acelerar a degradação destas enzimas já pré-formadas. Também atua como modulador negativo da resposta da célula Th17 e parece proteger as células contra a lise mediada por células NK (100).

O CD59 também é uma glicoproteína expressa na maioria dos tecidos e células circulantes. Interfere diretamente na estruturação do MAC, através de sua incorporação física no complexo, impedindo a ligação de C9 ao complexo C5b-8 (101).

O CD46 é uma proteína transmembrana expressa em todos os tecidos, exceto eritrócitos. Sua função é proteger as células autólogas da lise mediada pelo complemento através da degradação de C3. Liga-se às opsoninas C3b e C4b, agindo como cofator em sua degradação proteolítica através da serina-protease fator I (98). O CD35 também é uma proteína transmembrana que interage com C3b e C4b para promover fagocitose mediada por neutrófilos, além de atuar no processamento e limpeza de imunocomplexos (98).

A tabela 3 lista as principais Cregs e suas funções principais.

Tabela 3 – Principais funções das Cregs

Proteína	Função regulatória da complemento
CD55	Inibe a formação de novas C3 e C5 convertases, impedindo a clivagem de C3 e C5, além de acelerar a degradação das enzimas pré-formadas
CD59	Interfere na formação do MAC, incorporando-se fisicamente ao complexo e impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8
CD46	Liga-se às opsoninas C3b e C4b, agindo como cofator de sua degradação proteolítica através da serina-protease fator I
CD35	Interage com C3b e C4b para promover fagocitose mediada por neutrófilos

Adaptado de Piccoli et al. (27)

Cregs = complement regulatory proteins

2.10 – Expressão de Cregs e AR

A ativação do complemento na AR acontece inicialmente através da via clássica e decorre da presença de autoanticorpos, imunocomplexos e células apoptóticas na articulação. A via alternativa também parece estar envolvida, tornando-se ativa através do FR tipo imunoglobulina A (IgA) e/ou colágeno tipo II, o qual é exposto como resultado da proteólise durante o curso da doença (102-103). Níveis elevados de produtos de ativação do complemento como o MAC, liberação de anafilatoxinas C3a e C5a e o aumento de consumo de C3 e C4 podem ser detectados no líquido sinovial dos pacientes e parecem se correlacionar com a severidade da doença (104-106). A ativação exagerada do SC e a diminuição na expressão de Cregs são fatores que podem, portanto, contribuir para a exacerbação da doença (107).

Há poucos estudos na literatura sobre o perfil de expressão das Cregs CD55, CD59, CD35 e CD46 em pacientes com AR. Estudos envolvendo análise da expressão das Cregs na sinóvia reumatóide evidenciaram um aumento de CD55 e redução de CD59 quando comparada à sinóvia não inflamada (108-110). Já um trabalho envolvendo um modelo murino de artrite induzida por antígeno revelou que camundongos deficientes em CD59 apresentaram uma maior deposição de MAC e maior dano articular quando comparados aos controles CD59+ (111), sugerindo que o CD59 possa ter um papel protetor da membrana sinovial na AR.

Estudos envolvendo a expressão das Cregs no sangue periférico tiveram resultados diversos. Crockard et al investigaram a expressão de CD35 nos granulócitos do sangue periférico e tecido sinovial de pacientes com doenças articulares inflamatórias, incluindo AR, e não encontraram diferença estatística na intensidade média de fluorescência (MFI) entre os pacientes e controles (112). McCarthy et al estudaram a expressão de CD35 no sangue periférico de pacientes com AR e não detectaram aumento significativo na expressão nos granulócitos, porém revelaram um aumento na intensidade nos linfócitos e monócitos (113). Jones et al, em estudo que envolveu um número reduzido de pacientes (n=18) não detectaram diferenças entre o MFI de CD59 nos granulócitos do sangue periférico de pacientes com AR quando comparados aos controles sadios. Quando analisados

CD35, CD55 e CD46, a expressão encontrada foi menor nos doentes (114). Já Piccoli et al avaliaram a expressão das Cregs CD35, CD46, CD55 e CD59 nos monócitos, linfócitos totais e granulócitos do sangue periférico de 30 portadores de AR comparados a 30 controles sadios e encontraram uma expressão de CD59 aumentada em todas as células pesquisadas nos portadores de AR. O MFI nos pacientes com AR e controles, respectivamente foi: nos linfócitos de 36,8 e 27,07 ($p=0,0054$); nos monócitos, 32,0 e 21,37 ($p<0,005$); e nos granulócitos, 84,6 e 66,1 ($p<0,005$). Neste estudo, não se detectou alteração estatisticamente significativa quando analisadas as demais Cregs (115). A expressão das Cregs nos pacientes com AR não foi uniforme: quando analisados os linfócitos totais, a média do MFI do CD55 foi de 353,43 ($\pm 116,42$); do CD59 foi de 36,8 ($\pm 14,78$); do CD46 foi de 69,03 ($\pm 13,23$) e do CD35 foi de 104,13 ($\pm 115,22$) (115).

A variação na expressão das Cregs nos portadores de AR encontrada no trabalho de Piccoli et al (115) possibilita considerar a avaliação destas proteínas como biomarcadores de resposta ao tratamento com RTX, uma vez que este fármaco tem como um dos seus principais mecanismos de ação a citotoxicidade mediada pelo complemento.

2.11 - Expressão de Cregs e resposta ao RTX

Vários estudos pesquisaram a associação entre a expressão aumentada das Cregs e o mecanismo de falha ao tratamento com RTX em pacientes com doenças linfoproliferativas. Golay et al correlacionaram a expressão aumentada de CD55 e CD59 na superfície de células neoplásicas de linfoma com maior resistência à lise mediada pelo complemento (116). Este mesmo grupo, em estudo que envolveu células neoplásicas isoladas de pacientes portadores de leucemia linfocítica crônica (LLC) e linfoma, detectou um incremento na lise celular de 2 a 3 vezes quando utilizados isoladamente anticorpos monoclonais anti-CD55 ou anti-CD59 e de até 10 vezes quando utilizados concomitantemente (10). Outros autores encontraram resultados diversos. Weng e Levy não detectaram associação estatisticamente significativa entre a expressão de CD46, CD55 e CD59 em células tumorais pré-

tratamento com RTX e desfecho clínico (117). Dzietcznia et al encontraram uma expressão basal aumentada de CD46 e CD59 nos pacientes com LNH (linfoma não-Hodgkin) com resposta completa ao RTX (25). Já Bannerji et al, embora não tenham correlacionado a expressão basal de CD55 e CD59 em células de pacientes portadores de LLC com resposta clínica, observaram um aumento da expressão de CD55 e CD59 das células que não foram eliminadas do sangue periférico após o tratamento com RTX, sugerindo a seleção de um clone de células leucêmicas com maior resistência à terapia (118). Outros autores encontraram resistência aumentada à lise mediada pelo complemento desencadeada pelo RTX quando da expressão aumentada de CD55 (24) e CD59 (119).

A possibilidade de uma expressão aumentada das Cregs estar envolvida na falha ao tratamento com RTX levou ao desenvolvimento de anticorpos contra estas proteínas, cujo objetivo seria de neutralizá-las, incrementando a lise de células mediada pelo complemento e, desta forma, a resposta clínica ao tratamento. Ziller et al detectaram um aumento de 2 vezes na citotoxicidade mediada pelo complemento quando da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59 em células de LNH (120), resultado semelhante ao encontrado por Macor et al (121). Outro inibidor de CD59 (rILYd4) aumentou a citotoxicidade mediada pelo complemento in vitro e in vivo em células de linfoma LLC resistentes ao RTX (122). Beyer et al desenvolveram uma proteína recombinante (Ad35K++) que depleta CD46 e demonstraram uma maior sensibilização de células tumorais em um modelo animal (123).

Embora existam achados consistentes de que a expressão de Cregs, particularmente CD55 e CD59, possa ser utilizada como biomarcador de resposta ao tratamento com RTX em doenças linfoproliferativas, não há nenhum estudo na literatura fazendo esta correlação em pacientes portadores de AR.

3 - JUSTIFICATIVA

O RTX é uma nova alternativa de tratamento em pacientes com AR moderada a grave refratária aos DMCDs tradicionais e às drogas anti-TNF. Um de seus mecanismos de ação é a lise mediada pelo complemento. A maioria dos pacientes com AR apresenta resposta favorável à terapia, contudo, alguns são refratários e o mecanismo desta falha ainda não está bem esclarecido. Tem sido investigado o papel das proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 e sua expressão aumentada como mecanismo de resistência ao tratamento com RTX em pacientes portadores de doenças linfoproliferativas. A intensidade de expressão destas moléculas nas células B de pacientes com AR e sua correlação à resistência ao tratamento com RTX ainda não foram estudadas. A busca de biomarcadores que possam prever quais os subgrupos de pacientes com maior potencial de beneficiar-se do tratamento com RTX, além de reduzir custos, poderia minimizar períodos de atividade de doença e a exposição a possíveis efeitos colaterais de um tratamento ineficaz.

4 - OBJETIVOS DO ESTUDO

4.1 - Objetivo principal

Correlacionar o nível de expressão de CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B em uma coorte de pacientes com artrite reumatoide iniciando terapia com Rituximabe com a depleção e o tempo de repopulação destas células no sangue periférico.

4.2 - Objetivos secundários

Correlacionar o nível de expressão de CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B destes pacientes e a resposta clínica de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (Anexo 3).

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315-24.
2. Zhang Z, Bridges SL, Jr. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. Role of B lymphocytes. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001 May;27(2):335-53.
3. Edwards JC, Cambridge G, Abrahams VM. Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology.* 1999 Jun;97(2):188-96.
4. Gause A, Berek C. Role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *BioDrugs.* 2001;15(2):73-9.
5. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 Jun 17;350(25):2572-81.
6. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* 2006 May;54(5):1390-400.
7. Strand V, Balbir-Gurman A, Pavelka K, Emery P, Li N, Yin M, et al. Sustained benefit in rheumatoid arthritis following one course of rituximab: improvements in physical function over 2 years. *Rheumatology (Oxford).* 2006 Dec;45(12):1505-13.
8. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):2793-806.
9. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2009 Jan;9(1):10-25.

10. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3383-9.
11. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res*. 2006 May;30(5):625-31.
12. Fierro MT, Savoia P, Quaglino P, Novelli M, Barberis M, Bernengo MG. Systemic therapy with cyclophosphamide and anti-CD20 antibody (rituximab) in relapsed primary cutaneous B-cell lymphoma: a report of 7 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Aug;49(2):281-7.
13. Thatayatikom A, White AJ. Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2006 Jan;5(1):18-24.
14. Sfrikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN. Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. *Clin Immunol*. 2007 Apr;123(1):66-73.
15. Vigna-Perez M, Hernandez-Castro B, Paredes-Saharopulos O, Portales-Perez D, Baranda L, Abud-Mendoza C, et al. Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R83.
16. Silverman GJ, Boyle DL. Understanding the mechanistic basis in rheumatoid arthritis for clinical response to anti-CD20 therapy: the B-cell roadblock hypothesis. *Immunol Rev*. 2008 Jun;223:175-85.
17. Mease PJ. B cell-targeted therapy in autoimmune disease: rationale, mechanisms, and clinical application. *J Rheumatol*. 2008 Jul;35(7):1245.
18. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb;54(2):613-20.
19. Christmas SE, de la Mata Espinosa CT, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology*. 2006 Dec;119(4):522-8.

20. Liu D, Niu ZX. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009 Sep 23.
21. Choi-Miura NH. [Decay-accelerating factor (DAF; CD55)]. *Nippon Rinsho*. 1999 Nov;57 Suppl:79-81.
22. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Mol Immunol*. 2007 Jan;44(1-3):73-81.
23. Dziętczenia J, Wrobel T, Mazur G, Poreba R, Jazwiec B, Kuliczkowski K. Expression of complement regulatory proteins: CD46, CD55, and CD59 and response to rituximab in patients with CD20(+) non-Hodgkin's lymphoma. *Med Oncol*. 2009 Aug 7.
24. Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, Kojima K, et al. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement-dependent cytotoxicity with rituximab. *Cancer Sci*. 2006 Jan;97(1):72-9.
25. Dziętczenia J, Wrobel T, Mazur G, Poreba R, Jazwiec B, Kuliczkowski K. Expression of complement regulatory proteins: CD46, CD55, and CD59 and response to rituximab in patients with CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Med Oncol*. 2010 Sep;27(3):743-6.
26. Arora M, Kumar A, Das SN, Srivastava LM. Complement-regulatory protein expression and activation of complement cascade on erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 1998 Jan;111(1):102-6.
27. Piccoli AK, Alegretti AP, Schneider L, Lora PS, Xavier RM. Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*. 2011 Sep-Oct;51(5):503-10.
28. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):903-11.
29. Marques Neto JF, Gonsalves, H.T. et al. Estudo Multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do Adulto em amostras da população brasileira. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 1993 1993;33:169-73.
30. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Dec;36(3):182-8.

31. Hochberg MC, Silman, A.J., Smolen, J.S., Weinblatt, M.E., Weisman, M.H. *Rheumatology*. 5 ed: Elsevier; 2010.
32. Firestein GS, Budd, R.C., Harris Jr, E.D. et al. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 8 ed: Elsevier; 2009.
33. Mota LMH, Cruz, B.A., Brenol, C.V., Pereira, I.A., et al. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2013;53:158-83.
34. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69(9):1580-8.
35. Pratt AG, Isaacs JD, Matthey DL. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009 Feb;23(1):37-48.
36. Klippel JH, Stone, J.H., Crofford, L.J., White, P.H. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 13^a ed: Springer; 2008.
37. Barton A, Ollier W. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 May;14(3):260-9.
38. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet*. 2005 Dec;77(6):1044-60.
39. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):38-46.
40. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):380-6.
41. Meyer O, Nicaise-Roland P, Santos MD, Labarre C, Dougados M, Goupille P, et al. Serial determination of cyclic citrullinated peptide autoantibodies predicted five-year radiological outcomes in a prospective cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(2):R40.

42. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):4177-84.
43. Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2004 Jul;3(5):362-7.
44. Dorner T, Burmester GR. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 May;15(3):246-52.
45. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 May;22(3):307-15.
46. Klarenbeek NB, Kerstens PJ, Huizinga TW, Dijkmans BA, Allaart CF. Recent advances in the management of rheumatoid arthritis. *BMJ*. 2010;341:c6942.
47. Mota LMH, Cruz, B.A., Brenol, C.V., Pereira, I.A., et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2013;53:158-83.
48. Kvien TK. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(2 Suppl 1):1-12.
49. Abourazzak F, El Mansouri L, Huchet D, Lozac'hmeur R, Hajjaj-Hassouni N, Ingels A, et al. Long-term effects of therapeutic education for patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2009 Dec;76(6):648-53.
50. Lovisi Neto BE, Jennings F, Barros Ohashi C, Silva PG, Natour J. Evaluation of the efficacy of an educational program for rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Jan-Feb;27(1):28-34.
51. O'Dell JR, Haire CE, Erikson N, Drymalski W, Palmer W, Eckhoff PJ, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications. *N Engl J Med*. 1996 May 16;334(20):1287-91.
52. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Oct;58(10):2993-9.

53. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, Bertias G, Papadimitraki E, Raptopoulou A, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R131.
54. Vos K, Thurlings RM, Wijbrandts CA, van Schaardenburg D, Gerlag DM, Tak PP. Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar;56(3):772-8.
55. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis.* 2008 Jul;67(7):917-25.
56. Kavanaugh A, Rosengren S, Lee SJ, Hammaker D, Firestein GS, Kalunian K, et al. Assessment of rituximab's immunomodulatory synovial effects (ARISE trial). 1: clinical and synovial biomarker results. *Ann Rheum Dis.* 2008 Mar;67(3):402-8.
57. Atzeni F, Doria A, Turiel M, Sarzi-Puttini P. What is the role of rituximab in the treatment of rheumatoid arthritis? *Autoimmun Rev.* 2007 Sep;6(8):553-8.
58. Loveless JE, Olech, E., Pritchard, C. et al. An open-label, prospective study (SUNDIAL) of the safety of rituximab combination with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:660.
59. Keystone E, Fleischmann R, Emery P, Furst DE, van Vollenhoven R, Bathon J, et al. Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum.* 2007 Dec;56(12):3896-908.
60. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC. Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford).* 2007 Apr;46(4):626-30.
61. Tak PP, Rigby W, Rubbert-Roth A, Peterfy C, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Sustained inhibition of progressive joint damage with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: 2-year results from the randomised controlled trial IMAGE. *Ann Rheum Dis.* 2012 Mar;71(3):351-7.

62. Tak PP, Rigby WF, Rubbert-Roth A, Peterfy CG, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):39-46.
63. Emery P, Deodhar A, Rigby WF, Isaacs JD, Combe B, Racewicz AJ, et al. Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: a randomised, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX iNadequate rEsponders (SERENE)). *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69(9):1629-35.
64. Thurlings RM, Vos K, Gerlag DM, Tak PP. Disease activity-guided rituximab therapy in rheumatoid arthritis: the effects of re-treatment in initial nonresponders versus initial responders. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3657-64.
65. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dorner T, et al. Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):909-20.
66. Gottenberg JE, Ravaud P, Bardin T, Cacoub P, Cantagrel A, Combe B, et al. Risk factors for severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in the autoimmunity and rituximab registry. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2625-32.
67. Isaacs JD, Ferraccioli G. The need for personalised medicine for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):4-7.
68. Breedveld F, Agarwal S, Yin M, Ren S, Li NF, Shaw TM, et al. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response. *J Clin Pharmacol*. 2007 Sep;47(9):1119-28.
69. Isaacs JD, Cohen SB, Emery P, Tak PP, Wang J, Lei G, et al. Effect of baseline rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibody serotype on rituximab clinical response: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2013 Mar;72(3):329-36.
70. Narvaez J, Diaz-Torne C, Ruiz JM, Hernandez MV, Torrente-Segarra V, Ros S, et al. Predictors of response to rituximab in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response to anti-TNF agents or traditional DMARDs. *Clin Exp Rheumatol*. 2011 Nov-Dec;29(6):991-7.

71. Couderc M, Mathieu S, Pereira B, Glace B, Soubrier M. Predictive factors of rituximab response in rheumatoid arthritis: results from a French university hospital. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013 Apr;65(4):648-52.
72. Lal P, Su Z, Holweg CT, Silverman GJ, Schwartzman S, Kelman A, et al. Inflammation and autoantibody markers identify rheumatoid arthritis patients with enhanced clinical benefit following rituximab treatment. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3681-91.
73. Sellam J, Hendel-Chavez H, Rouanet S, Abbed K, Combe B, Le Loet X, et al. B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study. *Arthritis Rheum*. 2011 Apr;63(4):933-8.
74. Ferraccioli G, Tolusso B, Bobbio-Pallavicini F, Gremese E, Ravagnani V, Benucci M, et al. Biomarkers of good EULAR response to the B cell depletion therapy in all seropositive rheumatoid arthritis patients: clues for the pathogenesis. *PLoS One*. 2012;7(7):e40362.
75. Soliman MM, Hyrich KL, Lunt M, Watson KD, Symmons DP, Ashcroft DM. Effectiveness of rituximab in patients with rheumatoid arthritis: observational study from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *J Rheumatol*. 2012 Feb;39(2):240-6.
76. Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, Lukina G, Hetland ML, Tarp U, et al. Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Ann Rheum Dis*. 2011 Sep;70(9):1575-80.
77. Fabris MQ, L. Saracco, M. Pellerito, R. Artzeni, F. Sarzi-Puttini, P. et al. BLYS promoter polymorphism and response to rituximab in rheumatoid arthritis patients positive or negative for the rheumatoid factor. *Arthritis Rheum*. 2009;60:S627.
78. Ruysse-Witrand A, Rouanet S, Combe B, Dougados M, Le Loet X, Sibia J, et al. Fcgamma receptor type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):875-7.
79. Kastbom A, Coster L, Arlestig L, Chatzidionysiou A, van Vollenhoven RF, Padyukov L, et al. Influence of FCGR3A genotype on the therapeutic response to rituximab in rheumatoid arthritis: an observational cohort study. *BMJ Open*. 2012;2(5).

80. Quartuccio L, Fabris M, Pontarini E, Salvin S, Zabotti A, Benucci M, et al. The 158VV Fcgamma receptor 3A genotype is associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis: results of an Italian multicentre study. *Ann Rheum Dis*. 2013 Mar 16.
81. Sarsour K, Greenberg J, Johnston JA, Nelson DR, O'Brien LA, Oddoux C, et al. The role of the FcGR3 polymorphism in modifying the association between treatment and outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab versus TNF-alpha antagonist therapies. *Clin Exp Rheumatol*. 2013 Mar-Apr;31(2):189-94.
82. Vosslamber S, Raterman HG, van der Pouw Kraan TC, Schreurs MW, von Blomberg BM, Nurmohamed MT, et al. Pharmacological induction of interferon type I activity following treatment with rituximab determines clinical response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):1153-9.
83. Fabris M, Quartuccio L, Lombardi S, Saracco M, Atzeni F, Carletto A, et al. The CC homozygosity of the -174G>C IL-6 polymorphism predicts a lower efficacy of rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2012 Mar;11(5):315-20.
84. Daien CI, Fabre S, Rittore C, Soler S, Daien V, Tejedor G, et al. TGF beta1 polymorphisms are candidate predictors of the clinical response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2012 Oct;79(5):471-5.
85. Ruysen-Witrand A, Rouanet S, Combe B, Dougados M, Le Loet X, Sibilia J, et al. Association between -871C>T promoter polymorphism in the B-cell activating factor gene and the response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Apr;52(4):636-41.
86. Canestri S, Totaro MC, Serone E, Toluoso B, Frezza D, Gremese E, et al. Association between the response to B cell depletion therapy and the allele*2 of the HS1,2A enhancer in seropositive rheumatoid arthritis patients. *Reumatismo*. 2012;64(6):368-73.
87. Fabris M, Quartuccio L, Vital E, Pontarini E, Salvin S, Fabro C, et al. The TTTT B lymphocyte stimulator promoter haplotype is associated with good response to rituximab therapy in seropositive rheumatoid arthritis resistant to tumor necrosis factor blockers. *Arthritis Rheum*. 2013 Jan;65(1):88-97.
88. Lurati A, Bertani L, Marrazza M, Re KA, Bompane D, Scarpellini M. NK cell count as predictor of clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Biologics*. 2012;6:83-7.

89. Gremese E, Tolusso B, Fedele AL, Canestri S, Alivernini S, Ferraccioli G. ZAP-70+ B cell subset influences response to B cell depletion therapy and early repopulation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2012 Dec;39(12):2276-85.
90. Sellam J, Rouanet S, Hendel-Chavez H, Miceli-Richard C, Combe B, Sibilia J, et al. CCL19, a B-cell chemokine, is related to the decrease of blood memory B-cells and predicts the clinical response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013 Jun 5.
91. Sellam J, Rouanet S, Hendel-Chavez H, Abbed K, Sibilia J, Tebib J, et al. Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3692-701.
92. Khan AS, D.L.; Batley, M. Smoking, rheumatoid factor status and responses to rituximab. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(9):1588-90.
93. Magnusson M, Brisslert M, Zendjanchi K, Lindh M, Bokarewa MI. Epstein-Barr virus in bone marrow of rheumatoid arthritis patients predicts response to rituximab treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Oct;49(10):1911-9.
94. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1058-66.
95. Carroll MC. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol*. 2000;74:61-88.
96. Alegretti AP, Mucenic, T., Brenol, J. C. T., Xavier, R. M. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol*. 2009;49(3):276-87.
97. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J*. 1989 Nov 15;264(1):1-14.
98. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*. 2006 Feb-Mar;118(2-3):127-36.
99. Medof ME, Walter EI, Rutgers JL, Knowles DM, Nussenzweig V. Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med*. 1987 Mar 1;165(3):848-64.

100. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:35-58.
101. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol.* 2002 Mar 1;539(Pt 2):537-45.
102. van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, van der Voort EA, Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis.* 1992 Sep;51(9):1029-35.
103. Hanauske-Abel HM, Pontz BF, Schorlemmer HU. Cartilage specific collagen activates macrophages and the alternative pathway of complement: evidence for an immunopathogenic concept of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1982 Apr;41(2):168-76.
104. Brodeur JP, Ruddy S, Schwartz LB, Moxley G. Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991 Dec;34(12):1531-7.
105. Moxley G, Ruddy S. Elevated C3 anaphylatoxin levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1985 Oct;28(10):1089-95.
106. Jose PJ, Moss IK, Maini RN, Williams TJ. Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase. *Ann Rheum Dis.* 1990 Oct;49(10):747-52.
107. Hoek RM, de Launay D, Kop EN, Yilmaz-Elis AS, Lin F, Reedquist KA, et al. Deletion of either CD55 or CD97 ameliorates arthritis in mouse models. *Arthritis Rheum.* 2010 Apr;62(4):1036-42.
108. Tarkowski A, Trollmo C, Seifert PS, Hansson GK. Expression of decay-accelerating factor on synovial lining cells in inflammatory and degenerative arthritides. *Rheumatol Int.* 1992;12(5):201-5.
109. Hamann J, Wishaupt JO, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP. Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 1999 Apr;42(4):650-8.
110. Konttinen YT, Ceponis A, Meri S, Vuorikoski A, Kortekangas P, Sorsa T, et al. Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. *Ann Rheum Dis.* 1996 Dec;55(12):888-94.

111. Williams AS, Mizuno M, Richards PJ, Holt DS, Morgan BP. Deletion of the gene encoding CD59a in mice increases disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Sep;50(9):3035-44.
112. Crockard AD, Thompson JM, McBride SJ, Edgar JD, McNeill TA, Bell AL. Markers of inflammatory activation: upregulation of complement receptors CR1 and CR3 on synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992 Nov;65(2):135-42.
113. McCarthy D, Taylor MJ, Bernhagen J, Perry JD, Hamblin AS. Leucocyte integrin and CR1 expression on peripheral blood leucocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1992 Mar;51(3):307-12.
114. Jones J, Laffafian I, Cooper AM, Williams BD, Morgan BP. Expression of complement regulatory molecules and other surface markers on neutrophils from synovial fluid and blood of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1994 Aug;33(8):707-12.
115. Piccoli AK. Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59/CD35/CD46 em pacientes com artrite reumatóide [dissertação de mestrado]. 2011.
116. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.* 2000 Jun 15;95(12):3900-8.
117. Weng WK, Levy R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2001 Sep 1;98(5):1352-7.
118. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, Pearson M, Young D, Reed JC, et al. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol.* 2003 Apr 15;21(8):1466-71.
119. Dalle S, Dupire S, Brunet-Manquat S, Reslan L, Plesa A, Dumontet C. In vivo model of follicular lymphoma resistant to rituximab. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1;15(3):851-7.
120. Ziller F, Macor P, Bulla R, Sblattero D, Marzari R, Tedesco F. Controlling complement resistance in cancer by using human monoclonal antibodies that neutralize complement-regulatory proteins CD55 and CD59. *Eur J Immunol.* 2005 Jul;35(7):2175-83.

121. Macor P, Tripodo C, Zorzet S, Piovan E, Bossi F, Marzari R, et al. In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10556-63.
122. Hu W, Ge X, You T, Xu T, Zhang J, Wu G, et al. Human CD59 inhibitor sensitizes rituximab-resistant lymphoma cells to complement-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 2011 Mar 15;71(6):2298-307.
123. Beyer I, Cao H, Persson J, Wang H, Liu Y, Yumul R, et al. Transient removal of CD46 is safe and increases B-cell depletion by rituximab in CD46 transgenic mice and macaques. *Mol Ther.* 2013 Feb;21(2):291-9.
124. Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992 May;35(5):498-502.
125. Stewart CC. Clinical applications of flow cytometry. Immunologic methods for measuring cell membrane and cytoplasmic antigens. *Cancer.* 1992 Mar 15;69(6 Suppl):1543-52.
126. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jun;38(6):727-35.

**CORRELATION BETWEEN COMPLEMENT REGULATORY PROTEIN
EXPRESSION AND THE CLINICAL RESPONSE OF A COHORT OF PATIENTS
WITH RHEUMATOID ARTHRITIS TREATED WITH RITUXIMAB**

Daniela Viecceli Cervantes ⁽¹⁾, Mariana Pires Garcia ⁽¹⁾, Laiana Schneider ⁽¹⁾, Ana Paula Alegretti ⁽²⁾, Júlia Schmid ⁽²⁾, André Lucas Ribeiro ⁽³⁾, Cristiano Köhler Silva ⁽³⁾, Claiton Viegas Brenol ⁽⁴⁾, Ricardo Machado Xavier ⁽⁵⁾.

1. Student of the Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

2. Service of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

3. Undergraduate medical student, UFRGS

4. Professor, Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, UFRGS; Coordinator of the Reference Center in Rheumatoid Arthritis, Hospital de Clínicas de Porto Alegre/SES-RS

5. Professor, Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, UFRGS, Chief of Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Address:

Ricardo Machado Xavier, M.D,PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 645

90.035-003 – Porto Alegre, Brazil

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

OBJECTIVES: To correlate the level of expression of the complement regulatory proteins (Cregs) CD55, CD59, CD35, and CD46 on B cells from a cohort of 10 patients with rheumatoid arthritis (RA) initiating treatment with rituximab (RTX) with the depletion and time of repopulation of these cells in peripheral blood, additionally correlating the level of expression of these proteins to clinical response according to the criteria of the American College of Rheumatology (ACR).

METHODS: Ten patients with RA received two 1g RTX infusions within 14 day intervals. Immunophenotype analyses for CD19, CD55, CD59, CD35 and CD46 were performed before the infusion and at 1, 2, 6, 12, 18 and 24 months or until recurrence. Depletion of B cells on peripheral blood was defined as the CD19 count $< 0.005 \times 10^9/l$. ACR20 at 6 months was considered a good clinical response and recurrence was defined as loss of this response.

RESULTS: Ten women with median age of 49 years and basal DAS28 of 5.6 were monitored; 9 were seropositive for rheumatoid factor. Repopulation of B cells occurred within 2 months in 5 patients and within 6 months in the remaining women. There was correlation between the basal level of CD46 expression and the time to achieve repopulation (correlation coefficient -0.733, $p=0.016$). A similar trend was observed with the CD35, but without statistical significance (correlation coefficient -0.522, $p=0.12$). There was no association between clinical response and the complement regulatory proteins.

CONCLUSIONS: Increased CD46 expression predicted earlier repopulation of B cells in RA patients treated with RTX. Studies with larger samples are necessary to assess the association with the other Cregs.

KEYWORDS: rituximab, rheumatoid arthritis, biomarkers, complement regulatory proteins

INTRODUCTION

Rituximab (RTX) is a chimeric monoclonal antibody directed to CD20 expressed on the surface of B pre-lymphocytes to the mature B lymphocytes that causes almost complete transient depletion of B cells in the peripheral blood and partial depletion in the bone marrow and synovial tissues (1-6). Its mechanism of action is based on death of B cells due to the induction of apoptosis, antibody-dependent cellular cytotoxicity for natural killer (NK) cells, macrophages and monocytes recruited through their Fc γ receptors bound to surface CD20 and complement-dependent cytotoxicity induced by complexed RTX bound to surface CD20 and binding C1q (7-8). Clinical response seems to be related to the level of depletion of B cells in the synovia and peripheral blood (2). RA treatment with RTX showed significant efficacy in the control of signs and symptoms, improvement of physical function and prevention of joint damage (9-15).

Although many patients have satisfactory response to RTX, 40 to 50% are refractory to treatment, and this failure mechanism is not yet well understood (1, 14-15). In this context, the search for biomarkers that could predict which subgroups would benefit most from this treatment is one of the aims of many current studies related to RTX, in order to minimize periods of active disease and the exposure to inefficient treatments, improving disease outcomes and maximizing efficiency of resource utilization (16).

Normal cells are resistant to complement mediated lysis because of regulatory mechanisms formed by soluble proteins such as properdin and factor H and proteins anchored to the membrane, such as the CD55 (decay accelerating factor), CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis), CD46 (membrane cofactor protein) and CD35 (receptor of type 1 complement) (17).

Several authors studied the association between increased expression of the complement regulatory proteins (Cregs) and failure of RTX treatment in patients with lymphoproliferative disorders. Golay et al correlated the increased expression of CD55 and CD59 at the surface of malignant cells with lymphomas highly resistant to complement mediated lysis (18). These authors also studied isolated neoplasm cells in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphoma and detected a two to threefold

increase of cell lysis by RTX when monoclonal antibodies anti-CD55 or anti-CD59 were used singly and up to tenfold when used concomitantly (19). Other authors found increased resistance to complement mediated lysis triggered by RTX when CD55 (20) and CD59 were overexpressed by the malignant cells (21).

There are not many reports in the literature that assessed the Creg expression in peripheral blood of RA patients. Piccoli et al (22) have studied the expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 on granulocytes, monocytes, and total lymphocytes from RA patients and observed that the presence of these proteins is not uniform. However, there are no studies on the expression of Cregs specifically on the surface of B cells from these patients.

Although there are consistent findings demonstrating that Creg expression, especially CD55 and CD59, can be used as biomarkers of the response to the treatment with RTX in lymphoproliferative diseases, no study has explored this correlation in RA patients.

The aim of this study is to correlate the basal expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 on B cells in a cohort of RA patients starting treatment with RTX with the depletion and time of repopulation of these cells in the peripheral blood. Furthermore, correlation of the level of expression of these proteins to the clinical response according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria is also assessed.

MATERIAL AND METHODS

STUDIED POPULATION

Ten consecutive RA patients followed at the Service of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) who had indication for RTX use were included in this study. The indication of RTX was according to the guidelines of the Brazilian Society of Rheumatology (SBR): failure or intolerance to at least 2 traditional drugs modifying the course of the disease (DMCDs) and 1 anti-TNF (23). All patients received medication donated by Roche Laboratories. Inclusion criteria

were: age of 18 years or more; RA diagnosis made at least 6 months prior to the study according to the criteria of the ACR (24); indication for treatment with RTX; Disease Activity Score 28 (DAS28) ≥ 3.2 ; use of adequate contraceptive method for fertile patients; voluntary agreement in participating in the study and capacity to understand and sign the Free and Informed Consent (FIC). Exclusion criteria: patients with another overlapping rheumatic autoimmune disease; lymphoproliferative disease or cancer; presence of active infection; use of cytotoxic drugs; positive serology for HIV, HBV or HCV; active tuberculosis, allergy or hypersensitivity to RTX; pregnant or breastfeeding women; participation in other clinical trials with interventions; functional class IV according to Steinbroker functional classification for RA (25) and previous treatment with RTX.

CLINICAL ASSESSMENT

All patients presented to basal and monthly visits for the first 6 months, after which visits became quarterly. At each visit routine laboratory tests were collected (blood count, transaminases, creatinine, ESR, and C reactive protein). At the screening visit the tests for rheumatoid factor (RF) and antinuclear factor test (ANA), complement, serology for anti-HCV, anti-HIV, anti-HBc and HBsAG, radiography of the chest, hands and feet, and skin tuberculin test were ordered. The following clinical parameters were assessed at each visit: counting of the 28 swollen and/or tender joints (always performed by the same examiner); global disease activity score (0-100 mm in a visual analogical scale [VAS] attributed by the physician and the patient); pain score (0-100 mm); Health Assessment Questionnaire (HAQ) and DAS28 score using ESR.

RTX ADMINISTRATION METHODS

Patients received 2 infusions of 1 g of RTX at 14 days intervals. All patients received as pre-medication 100 mg of methylprednisolone, 1 g of paracetamol, and 2mg of dexchlorpheniramine.

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS

Immunophenotyping of peripheral blood cells was performed before treatment and at 1, 2, 6, 9, 12, 18, and 24 months after starting the treatment with RTX or until

a new cycle of the drug was necessary due to recurrence. In each of these blood tests the CD19 marker cells were quantified. The basal expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 in CD19+ cells was studied before the infusion of RTX. The standard technique for neutrophils was used (26) in less than 24 hours after samples were collected. To analyze leucocytes, 100 μ l of peripheral blood (with optimal dilution to reach 5000 cells/ μ) were transferred to polystyrene tubes and stained with 8 μ l of each monoclonal conjugated fluorochrome targeting CD19, CD55PE, CD59FITC, CD35PE e CD46FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). After 15 minutes of incubation at room temperature, 1.0 ml of FACSlyse (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) was added and lysis was allowed for 10 minutes at room temperature. The samples were washed once and resuspended in 0.5 ml of solution buffered with phosphate (PBS). The acquisition and analysis of sample data was carried out in the CellQuest™ of the flow cytometer FACSCalibur – BD (Becton Dickinson) with simultaneous reading parameters and 3 fluorescence parameters (FL1, FL2, FL3). Results were assessed by a dot-plot at 10^0 , 10^1 , 10^2 , and 10^3 ; those below 10^1 were considered negative for the expression of the markers. The intensity of the fluorescence of CD55, CD59, CD35, and CD46 on the membrane of B lymphocytes CD19+ (proportional to the membrane epitopes of this proteins) was estimated in the subpopulations by the analysis of the histogram of the CD19+ cells (selected using a gate) and by MFI (mean of fluorescence intensity). Positive or negative cells were defined after control staining in order to define the gates and distinguish positive staining from autofluorescence or links to a non-specific antibody. The expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 was measured only in the subpopulations that marked CD19.

DEFINITION OF B CELL DEPLETION

The depletion of B cells of peripheral blood was defined by CD19+ count $< 0.005 \times 10^9/L$ of total leucocytes. Repopulation of B cells was defined by a CD19+ count $> 0.005 \times 10^9/L$ of total leucocytes.

DEFINITION OF CLINICAL RESPONSE

The clinical response to treatment was assessed within 6 months of the infusion of RTX and was considered positive when the patient reached a $>20\%$

response according to the ACR criteria (27). If the improvement was below 20% according to the same basal parameters and criteria, it was considered a failure. Clinical recurrence was defined as a loss of the ACR20 in previously responding subjects.

DURATION OF THE STUDY

The patients were followed up during a maximum period of 24 months. The endpoint of the study was the observation of clinical recurrence, the moment in which a new cycle of RTX infusions was indicated (if recurrence periods were above 6 months) or a new treatment modality to control the disease was selected (when recurrence occurred in less than 6 months) since RTX treatments was considered a failure.

STATISTICAL ANALYSIS

Due to the lack of previous studies the authors decided to study a pilot cohort of 10 patients that would yield necessary information for a more precise calculation of the sample size in future studies to confirm the observations of this work, if there were some association trends.

Data were analyzed using the Windows SPSS 16.0 program. The Student t test for paired samples was used to compare the means of the parametric values and the Mann-Whitney test, for non-parametric data. Correlations were analyzed by the Pearson test for parametric data and the Spearman test, for non-parametric data. A correlation was considered statistically significant when p value <0.05 and clinically significant when the correlation coefficient was > 0.5.

ETHICAL ASPECTS

This study was approved by the Committee of Ethics in Research of the HCPA. All participating patients signed the Informed Consent Form. Adverse reactions were reported to the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA).

This study was totally designed and conducted by the authors. Roche Laboratories only donated the RTX to the 10 patients using protocols written by the researchers.

RESULTS

A total of 10 female patients with median age of 49 years were included in this study. Basal characteristics are depicted in Table 1. The median duration of the disease was 8 years. All patients were using methotrexate (median dose of 25mg/week) and prednisone (median of 10mg/day) and had used at least 1 anti-TNF. Nine patients (90%) were RF positive and 8 (80%) had joint erosions.

When assessing the clinical response, 8 patients (80%) reached the ACR20 in 4 months and 3 (30%) maintained this response at 6 months, but 5 had recurrence before the sixth month. As to the activity rate DAS28, 5 (50%) had low clinically active disease (DAS28 < 3.2) after 4 months and 3 (30%) were in remission (DAS28 < 2.6). In the assessment 6 months after the infusion of RTX only 1 had low clinical activity. Figure 1 shows the DAS28 curve.

Repopulation of B cells in peripheral blood was identified in the analysis done 2 months after the RTX infusion in 5 (50%) patients and at 6 months in the remaining 5 patients. Figure 2 shows the evolution of B cells of each patient.

Table 2 shows the median expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 assessed by the B cell MFI of the total sample and divided by subgroups with repopulation identified at 2 and 6 months. There was correlation between the increased expression of CD46 with earlier repopulation of B lymphocytes in the peripheral blood (correlation coefficient -0.733, $p=0.016$). A similar, but not statistically significant, trend was found for the CD35 (correlation coefficient -0.522, $p=0.12$). No correlations between the expression of CD55 and CD59 on B cells and time of repopulation was found in this sample (correlation coefficient -0.383 and -0.174, respectively). Figure 3 depicts graphically the correlation between the CD46 expression and the time to obtain B cell repopulation.

Although variation in the expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 on B cells of the sample was found (Table 3), there was no correlation between this expression and the clinical response measured by ACR20 in 6 months.

DISCUSSION

Our study demonstrated a correlation between the increased expression of CD46 and earlier repopulation of B cells in the peripheral blood of patients with RA treated with RTX. There was a similar trend for CD35, not statistically significant. This association reinforces the hypothesis that increased expression of CD46 could decrease the complement mediated lysis, one of the mechanisms of action of RTX and, thus, reduce the depletion efficacy of the drug.

Despite the great variability of CD55, CD59, CD35, and CD46 expressions on B cells of the studied cohort, it was not possible to demonstrate any correlation between the expression of these proteins and the clinical response. The MFI of B cells expressing CD55 varied between 29 and 66 (mean 386.4 ± 138.33) and from 430 and 619 for CD59 (mean 41.7 ± 12.47); for CD35, between 289 and 456 (mean 345.1 ± 12.1), and between 59 and 137 for CD46 (mean 62.9 ± 28.81). Few authors studied the expression of Cregs on B cells in the peripheral blood of RA patients. We have previously studied the mean MFI for CD55, CD59, CD35 and CD46 on total lymphocytes from RA patients; the values were, respectively, 353.43 ± 116.42 , 36.8 ± 14.78 , 104.13 ± 115.22 e 69.03 ± 13.23 . (22) However, we have not assessed the expression of Cregs specifically on B cells, and could find any such study published in the literature.

We could not observe a significant correlation between the expression of the Cregs and the clinical response in this small group of patients, probably due to the low power of the study. The lack of previous studies led to the decision to study a cohort of 10 patients that would give information on the sample size to be used in future studies. Another important issue in this study was the low rate of response maintained up to 6 months (30% of ACR20 response). This was lower than previous studies of RA patients that had failed anti-TNF therapy (14-15), with ACR20 response rates of about 50% on average at 6 months. Our sample, when compared to previously studied populations, had slightly lower HAQ scores (1.0 x 1.8-1.9 respectively) and mean disease duration (8 years x 10-12 years) , but used higher doses of metotrexate (25mg x 15mg) and glucocorticoids. All our patients used glucocorticoids, while only 65% used this class of drug in the Cohen et al study (15). However, we do not know if these differences somehow affected our results.

Acknowledging the limitations of the small sample size and the low rate of therapeutic response, this is the first study that attempted to correlate the basal expression of CD55, CD59, CD35 and CD46 on B cells with the time to B cell repopulation and with the clinical response in a cohort of RA patients treated with RTX. Previous studies on lymphoproliferative disorders had already raised the hypothesis that increased Cregs expression could reduce the complement mediated cytotoxicity and have some influence on the treatment with RTX (18, 20-21, 28). These included studies *in vitro*, in animals and with human beings. Dalle et al studied the expression of CD55, CD59, and CD46 in rats implanted with cells derived from follicular lymphoma and observed an increased expression of CD59 in those with lymphoma resistant to RTX (21). Terui et al studied the expression of CD55 in non-Hodgkin lymphoma (NHL) in 30 patients and demonstrated that this protein contributes to the resistance to complement mediated cytotoxicity and resistance to RTX (20). Although there are evidences that Cregs may have a role as biomarker of the response to RTX in lymphoproliferative diseases, this association was never studied for RA patients.

Our findings stress the importance of further studies on the role of the Cregs variation in the depletion of B cells and its impact on the efficacy of RTX, ideally involving larger cohort of RA patients. A bigger sample could allow the study of other markers that have been related to the response to RTX as, for instance, anti-CCP and RF, and verifying if these can influence the expression of Cregs or if there is synergy between these predictive variables. Another issue is to the study the combined treatment with inhibitors of Cregs, such as the recombinant protein Ad35KK++ and the monoclonal antibodies anti-CD55 and anti-CD59, added to the treatment of RA with RTX. This combination has been studied in lymphoproliferative diseases in *in vitro* and in animal studies with favorable responses. The use of anti-CD55 and anti-CD59 increased the complement mediated cytotoxicity and increased the sensitivity of tumor cells to RTX (19, 29-31). In a recent study, Beyer et al studied the use of pretreatment with Ad35K++ (recombinant protein that induces CD46 internalization and degradation) in monkeys and treated with subclinical doses of RTX and observed a complete cell depletion of peripheral B cells (32).

In conclusion, increased expression of CD46 on B cells from RA patients predicted earlier repopulation in the peripheral blood of RA after treatment with RTX.

Further studies are needed to confirm this result and assess if there is any correlation with other Cregs and cell repopulation and clinical response to treatment, thus allowing the use of these proteins as biomarkers of the response to RTX.

Table 1 – Basal Characteristics of the patients*

	Patients with RA (n = 10)
Age (years), median (interval)	49 (37 – 56)
Females, n (%)	10 (100)
Caucasian, n (%)	8 (80)
Positive rheumatoid Factor, n (%)	9 (90)
Duration of disease (years), median (interval)	8 (2 – 18)
Erosions, n (%)	8 (80)
ESR (mm/h), median (interval)	27.5 (8 – 120)
CPR (mg/l), median (interval)	10.8 (4 – 42,2)
HAQ (0-3), median (interval)	1 (0.750 – 2.125)
DAS28-VHS, median (interval)	5.6 (4.4 – 6.82)
Current use of MTX, n (%)	10 (100)
MTX dose(mg/week), median (interval)	25 (20 – 25)
Current use of steroids, n (%)	10 (100)
Prednisone dose (mg/day), median (interval)	10 (5 – 15)
Previous Anti-TNF, n (%)	
1	9 (90)
> 1	1 (10)
Anti-TNF used, n (%)	
Adalimumab	5 (50)
Etanercept	2 (20)
Golimumab	1 (10)
Infliximab	3 (30)

* RA =rheumatoid arthritis; ESR = erythrocyte sedimentation rate; CPR = C - reactive protein; HAQ = Health Assessment Questionnaire; DAS28-VHS = Disease Activity Score in 28 joints using the erythrocyte sedimentation rate; MTX = methotrexate; Interval = minimum and maximum values found

Table2 – Correlation between the expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 in B lymphocytes and the time to repopulate these cells

Antigen	Repopulation of B lymphocytes			Correlation Rate	p value
	Total, n = 10	2 month, n =5	6 months, n = 5		
	Median ¹ (Interval) ²	Median ¹ (Interval) ²	Median ¹ (Interval) ²		
CD59	39.5 (27-66)	40 (29-66)	39 (27-44)	-0.174	0.631
CD55	386.5 (148-619)	430 (148-619)	322 (276-456)	-0.383	0.275
CD35	353.5 (148-557)	444 (240-557)	289 (148-429)	-0.522	0.122
CD46	52.5 (36-137)	72 (49-137)	47 (36-53)	-0.733	0.016*

1 = MFI (mean of fluorescence intensity)

2 = Interval between minimum and maximum values found

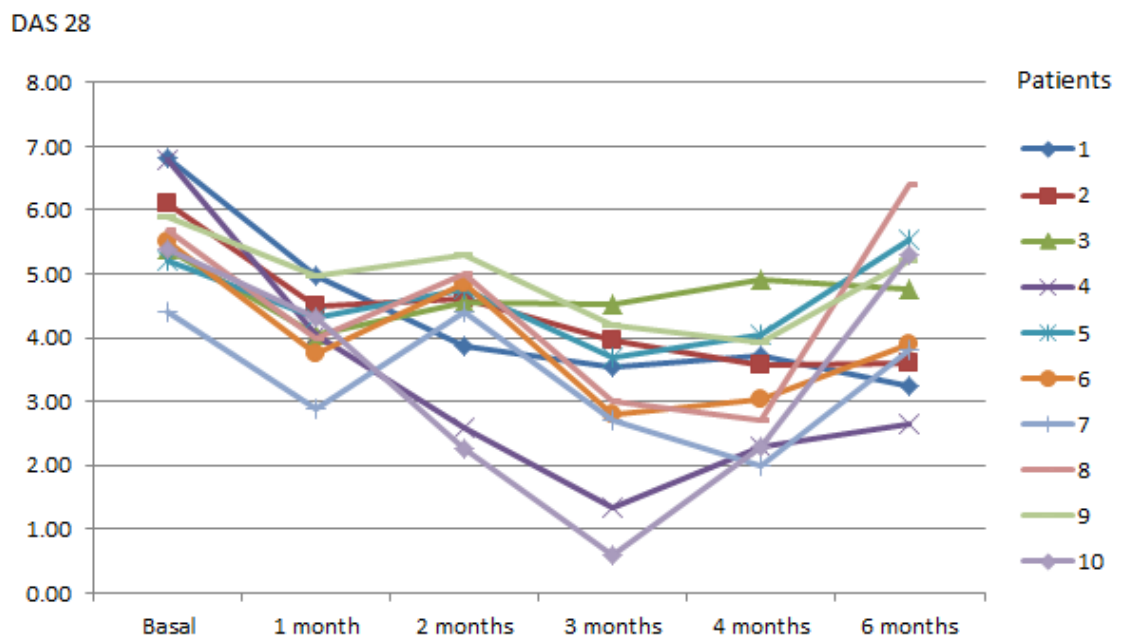
*p < 0.05 = significant

Table 3 – Correlation between the expression of CD55, CD59, CD35, and CD46 in B lymphocytes before treatment with RTX and clinical response in 6 months

Clinical Response in 6 months (ACR20)			
Antigen	Responders, n=3	Non-responders, n=7	p value
	Median ¹ (Interval) ²	Median ¹ (Interval) ²	
CD59	39 (29-66)	40 (27-60)	1.0
CD55	456 (430-619)	322 (148-551)	0.067
CD35	444 (289-456)	346 (148-557)	0.383
CD46	79 (53-137)	49 (36-72)	0.067

1 = MFI (*mean of fluorescence intensity*)

2 = *Interval between minimum and maximum values found*

Figure 1 – Evolution of patients' DAS28

* DAS28 = disease activity score

Figure 2 – Evolution of CD19 expression

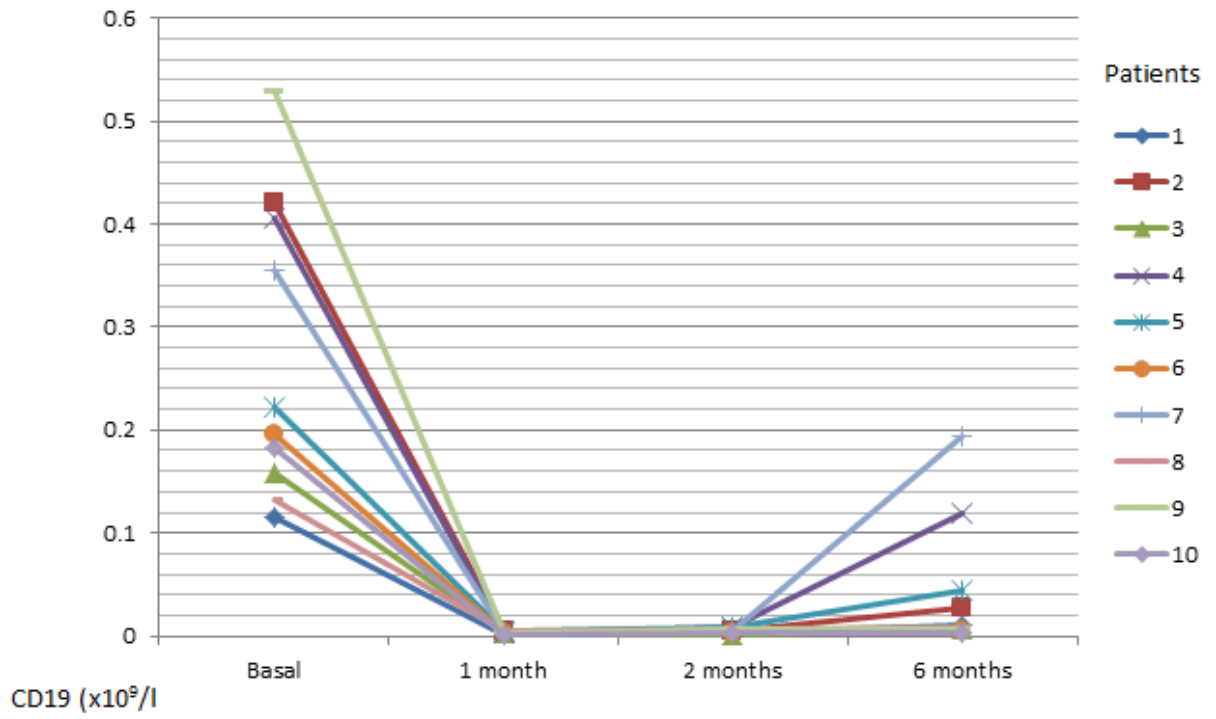
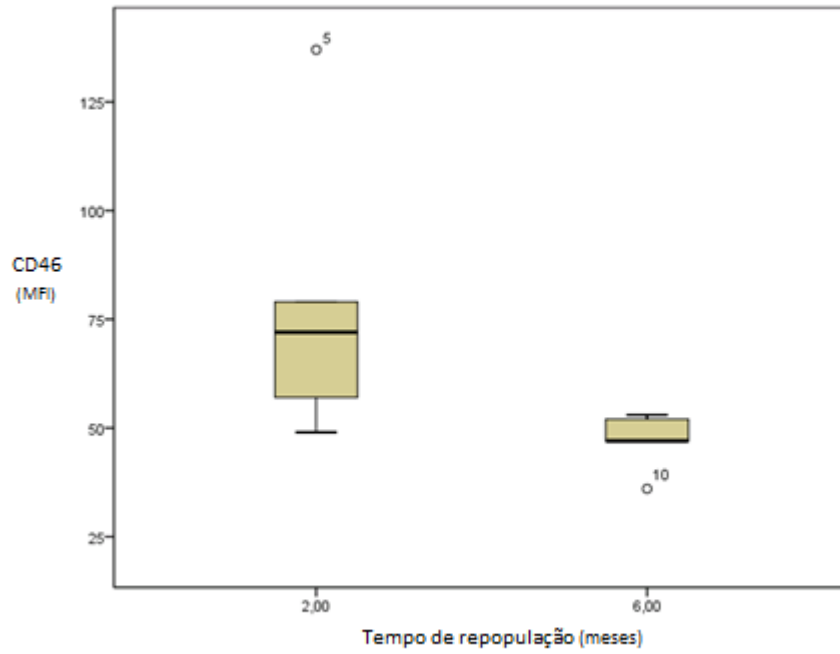


Figure 3 – Basal expression of CD46 x lymphocyte B repopulation time in months



* MFI = mean of fluorescence intensity

REFERENCES

1. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):613-20.
2. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 Oct;58(10):2993-9.
3. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, Bertias G, Papadimitraki E, Raptopoulou A, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R131.
4. Vos K, Thurlings RM, Wijbrandts CA, van Schaardenburg D, Gerlag DM, Tak PP. Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar;56(3):772-8.
5. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis.* 2008 Jul;67(7):917-25.
6. Kavanaugh A, Rosengren S, Lee SJ, Hammaker D, Firestein GS, Kalunian K, et al. Assessment of rituximab's immunomodulatory synovial effects (ARISE trial). 1: clinical and synovial biomarker results. *Ann Rheum Dis.* 2008 Mar;67(3):402-8.
7. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2009 Jan;9(1):10-25.
8. Atzeni F, Doria A, Turiel M, Sarzi-Puttini P. What is the role of rituximab in the treatment of rheumatoid arthritis? *Autoimmun Rev.* 2007 Sep;6(8):553-8.
9. Tak PP, Rigby W, Rubbert-Roth A, Peterfy C, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Sustained inhibition of progressive joint damage with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: 2-year results from the randomised controlled trial IMAGE. *Ann Rheum Dis.* 2012 Mar;71(3):351-7.
10. Tak PP, Rigby WF, Rubbert-Roth A, Peterfy CG, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jan;70(1):39-46.

11. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004 Jun 17;350(25):2572-81.
12. Emery P, Deodhar A, Rigby WF, Isaacs JD, Combe B, Racewicz AJ, et al. Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: a randomised, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX iNadequate rEsponders (SERENE)). *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69(9):1629-35.
13. Thurlings RM, Vos K, Gerlag DM, Tak PP. Disease activity-guided rituximab therapy in rheumatoid arthritis: the effects of re-treatment in initial nonresponders versus initial responders. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3657-64.
14. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum*. 2006 May;54(5):1390-400.
15. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006 Sep;54(9):2793-806.
16. Isaacs JD, Ferraccioli G. The need for personalised medicine for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):4-7.
17. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*. 2006 Feb-Mar;118(2-3):127-36.
18. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3900-8.
19. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3383-9.
20. Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, Kojima K, et al. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement-dependent cytotoxicity with rituximab. *Cancer Sci*. 2006 Jan;97(1):72-9.
21. Dalle S, Dupire S, Brunet-Manquat S, Reslan L, Plesa A, Dumontet C. In vivo model of follicular lymphoma resistant to rituximab. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 1;15(3):851-7.

22. Piccoli AK. Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59/CD35/CD46 em pacientes com artrite reumatóide [dissertação de mestrado]. 2011.
23. Mota LMH, Cruz, B.A., Brenol, C.V., Pereira, I.A., et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2013;53:158-83.
24. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31(3):315-24.
25. Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1992 May;35(5):498-502.
26. Stewart CC. Clinical applications of flow cytometry. Immunologic methods for measuring cell membrane and cytoplasmic antigens. *Cancer*. 1992 Mar 15;69(6 Suppl):1543-52.
27. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Jun;38(6):727-35.
28. Dziętczenia J, Wrobel T, Mazur G, Poreba R, Jazwiec B, Kuliczkowski K. Expression of complement regulatory proteins: CD46, CD55, and CD59 and response to rituximab in patients with CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Med Oncol*. 2010 Sep;27(3):743-6.
29. Macor P, Tripodo C, Zorzet S, Piovan E, Bossi F, Marzari R, et al. In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67(21):10556-63.
30. Hu W, Ge X, You T, Xu T, Zhang J, Wu G, et al. Human CD59 inhibitor sensitizes rituximab-resistant lymphoma cells to complement-mediated cytotoxicity. *Cancer Res*. 2011 Mar 15;71(6):2298-307.
31. Ziller F, Macor P, Bulla R, Sblattero D, Marzari R, Tedesco F. Controlling complement resistance in cancer by using human monoclonal antibodies that neutralize complement-regulatory proteins CD55 and CD59. *Eur J Immunol*. 2005 Jul;35(7):2175-83.
32. Beyer I, Cao H, Persson J, Wang H, Liu Y, Yumul R, et al. Transient removal of CD46 is safe and increases B-cell depletion by rituximab in CD46 transgenic mice and macaques. *Mol Ther*. 2013 Feb;21(2):291-9.

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou uma correlação entre a expressão aumentada de CD46 e repopulação mais precoce de linfócitos B no sangue periférico de pacientes com AR tratados com RTX. Houve uma tendência semelhante com CD35, porém não estatisticamente significativa. Esta associação permite a hipótese de que a expressão aumentada de CD46 poderia diminuir a lise mediada pelo complemento, um dos mecanismos de ação do RTX e, desta forma, reduziria a eficácia da droga. Apesar das diferentes expressões de CD55, CD59, CD35 e CD46 na população estudada, não foi possível demonstrar correlação entre esta expressão e a resposta clínica dos pacientes. Uma possível explicação para isto seja a falta de poder deste estudo para detectar diferença entre os grupos, uma vez que a amostra foi pequena.

Apesar das limitações, reforçamos o caráter inédito das questões estudadas – trata-se do primeiro estudo a correlacionar a expressão das proteínas regulatórias do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 com o tempo de repopulação dos linfócitos B no sangue periférico e resposta clínica em uma coorte de pacientes com AR tratados com RTX. Nossos achados reforçam a importância de se avaliar em coortes mais numerosas o papel da variação da expressão das Cregs na depleção de linfócitos B e eficácia terapêutica do RTX. Um número maior de pacientes poderia, ainda, permitir a avaliação de outros marcadores já relacionados à resposta ao tratamento com RTX (como fator reumatóide e anti-CCP, por exemplo), estudando se há influência destes na expressão das Cregs e possíveis sinergismos entre estas variáveis. Outra possibilidade aberta por este trabalho seria o estudo do tratamento combinado de inibidores das Cregs, como a proteína recombinante Ad35KK++ e anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59 com o RTX para tratamento de pacientes portadores de AR

ANEXOS

Anexo 1 - Critérios do American College of Rheumatology 1987 para classificação da artrite reumatoide

Critério	Definição
1. Rigidez matinal	Rigidez matinal com duração de pelo menos 1 hora até a melhora máxima
2. Artrite de três ou mais áreas articulares	Ao menos 3 áreas articulares simultaneamente afetadas, observadas pelo médico (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarsofalangeanas)
3. Artrite das articulações das mãos	Artrite em punhos ou metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais
4. Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo de áreas de ambos os lados do corpo
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas, superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares
6. Fator reumatoide sérico positivo	Presença de quantidades anormais de fator reumatoide
7. Alterações radiográficas	Radiografias posteroanteriores de mãos e punhos demonstrando rarefação óssea justa-articular ou erosões
<p>Para a classificação como AR, o paciente deve satisfazer pelo menos 4 dos 7 critérios. Os critérios 1-4 devem estar presentes por no mínimo seis semanas</p>	
<p><i>Modificado a partir de Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1988 Mar;31(3):315-24</i></p>	

Anexo 2 - Critérios classificatórios para artrite reumatoide 2010 ACR/EULAR

População alvo (quem deve ser testado?)							
- Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema). * - Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença * Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriásica e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.							
Acometimento articular (0-5)		Sorologia (0-3)		Duração dos sintomas (0-1)		Provas de atividade inflamatória (0-1)	
1 grande articulação	0	FR negativo e ACPA negativo	0	<6 semanas	0	PCR normal E VHS normal	0
2-10 grandes articulações	1	FR positivo ou ACPA positivo em baixos títulos	2	> ou igual a 6 semanas	1	PCR anormal OU VHS anormal	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2	FR positivo ou ACPA positivo em altos títulos	3				
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3						
>10 articulações (pelo menos 1 pequena)	5						
<p>Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente com AR.</p> <p>O domínio “acometimento articular” refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo IFD do pé ou mão, primeira MTF e primeira carpometacarpiana). Evidência adicional obtida por exames de imagem pode ser utilizada para confirmação dos achados clínicos. Considera-se, para fins de classificação, como pequenas articulações as MCF, IFP, MTF (segunda a quinta), primeira interfalangeana e punhos, como grandes articulações ombros, cotovelos, quadril, joelhos, tornozelos. Articulações adicionais (temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, entre outras) podem ser contadas, na avaliação de “mais de 10 articulações”, desde que uma pequena (ao menos) esteja acometida.</p> <p>No domínio “sorologia”, considera-se o resultado de fator reumatóide ou de anticorpos anti-peptídeos/proteínas citrulinadas negativo se o valor encontrado for igual ou menor ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o resultado encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual a três vezes o limite superior da normalidade; e positivo alto quando o valor encontrado for superior a três vezes o limite superior da normalidade.</p> <p>O domínio “duração dos sintomas” refere-se ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação.</p> <p>Já as “provas de atividade inflamatória” (velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa) são consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado.</p> <p><i>Modificado de: Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis. 2010 Sep;69(9):1580-8.</i></p>							

Anexo 3 – Critério de resposta ACR20

Pelo menos 20% de melhora em:

1. Contagem de articulações edemaciadas
 2. Contagem de articulações dolorosas
-

e em três das seguintes cinco variáveis:

3. Atividade global de doença avaliada pelo paciente (VAS)
 4. Atividade global de doença avaliada pelo examinador (VAS)
 5. Avaliação global de dor pelo paciente (VAS)
 6. Incapacidade funcional (HAQ)
 7. Reagentes de fase aguda (VSG ou PCR)
-

Adaptado de: Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1995 Jun;38(6):727-35.

Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Correlação entre expressão celular de proteínas reguladoras do complemento e a resposta clínica de uma coorte de pacientes com artrite reumatoide tratada com Rituximabe

Estamos convidando o Sr (a) a participar de um projeto de pesquisa cujo alvo de estudo é avaliar a correlação entre proteínas das células do sangue e de falha no tratamento com Rituximabe de pacientes com artrite reumatoide.

Objetivo do estudo:

O nosso objetivo de estudo é comparar as mudanças na intensidade de proteínas reguladoras do complemento nas células do sangue de pacientes antes e durante o tratamento com Rituximabe. Essa informação podem ser importantes na escolha de medicações que sejam mais apropriadas para cada paciente.

Vantagens em participar do estudo:

Não podemos assegurar que você se beneficie diretamente com o estudo. Entretanto, as informações obtidas neste estudo poderão contribuir para um maior conhecimento do uso desse tratamento, facilitando a escolha dos pacientes para os quais o rituximabe seria mais eficaz e seguro.

Procedimentos:

Os pesquisadores poderão buscar uma série de informações sobre a sua doença no seu prontuário do hospital. A sua concordância em participar desse estudo inclui a permissão para buscar essas informações. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida. Os testes que serão realizados nesse estudo serão feitos com a mesma amostra de sangue dos seus exames de rotina, solicitados pelo seu médico. Os dados obtidos somente serão utilizados para fins de estudo e seu uso para qualquer outra finalidade é vetado. Asseguramos também que preservaremos sua privacidade e que, em hipótese alguma, sua identidade será revelada, seja no decorrer deste estudo ou após o término deste.

Você poderá ter todas as informações que desejar e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento e acompanhamento ambulatorial, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.

Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone 3359-8304.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Pelo presente Termo de Consentimento, eu _____, abaixo assinado, declaro que fui esclarecido (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos que serei submetido pelo presente projeto de pesquisa.

Fui igualmente informado (a):

- da garantia de receber qualquer esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade.

Nome e assinatura do paciente ou responsável: _____

Nome e assinatura do pesquisador: _____

Local e data: _____

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Telefone para contato: (51)3359-8315