



# REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



## Artigo original

# Correlação entre expressão celular de proteínas reguladoras do complemento com a depleção e repopulação de linfócitos B no sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide tratada com rituximabe



Daniela Viecceli<sup>a,\*</sup>, Mariana Pires Garcia<sup>b</sup>, Laiana Schneider<sup>b</sup>, Ana Paula Alegretti<sup>b</sup>, Cristiano Kohler Silva<sup>a</sup>, André Lucas Ribeiro<sup>a</sup>, Claiton Viegas Brenol<sup>a</sup> e Ricardo Machado Xavier<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Patologia Clínica, Porto Alegre, RS, Brasil

## INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 22 de dezembro de 2015

Aceito em 31 de julho de 2016

On-line em 17 de setembro de 2016

Palavras-chave:

Artrite reumatoide  
Proteínas reguladoras do complemento  
Rituximabe  
Biomarcadores

## R E S U M O

**Objetivos:** Correlacionar a expressão basal das proteínas reguladoras do complemento (PRC) CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B do sangue periférico de uma coorte de 10 pacientes com artrite reumatoide (AR) iniciando tratamento com rituximabe (RTX) com a depleção e tempo de repopulação dessas células.

**Métodos:** Dez pacientes com AR receberam duas infusões de 1g de RTX com intervalo de 14 dias. Análises imunofenotípicas para detecção de CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B foram feitas imediatamente antes da primeira infusão. A população de linfócitos B foi analisada por meio da expressão de CD19 basal e após um, dois e seis meses após a infusão de RTX e então trimestralmente até a recaída clínica. Depleção de linfócitos B no sangue periférico foi definida como expressão de  $CD19 < 0,005 \times 10^9/l$ .

**Resultados:** Dez mulheres com mediana de 49 anos e DAS 28 basal de 5,6 foram avaliadas; nove eram soropositivas para o fator reumatoide. Cinco pacientes apresentaram repopulação de linfócitos B após dois meses e as outras cinco aos seis meses. Houve correlação entre a expressão basal de CD46 e o tempo de repopulação (coeficiente de correlação -0,733,  $p = 0,0016$ ). Tendência semelhante foi observada com CD35, porém sem significância estatística (coeficiente de correção 0,522,  $p = 0,12$ ).

**Conclusão:** Expressão aumentada de CD46 foi preditora de repopulação mais rápida de linfócitos B em pacientes tratados com RTX. Estudos com um número maior de pacientes serão necessários para confirmar a utilidade da expressão basal das PRC como preditora de resposta clínica.

© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondência.

E-mail: [daniviecceli@gmail.com](mailto:daniviecceli@gmail.com) (D. Viecceli).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.07.006>

0482-5004/© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Correlation between cellular expression of complement regulatory proteins with depletion and repopulation of B-lymphocytes in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Rheumatoid arthritis  
Complement regulatory proteins  
Rituximab  
Biomarkers

**Objectives:** To correlate the basal expression of complement regulatory proteins (CRPs) CD55, CD59, CD35, and CD46 in B-lymphocytes from the peripheral blood of a cohort of 10 patients with rheumatoid arthritis (RA) initiating treatment with rituximab (RTX) with depletion and time repopulation of such cells.

**Methods:** Ten patients with RA received two infusions of 1 g of RTX with an interval of 14 days. Immunophenotypic analysis for the detection of CD55, CD59, CD35, and CD46 on B-lymphocytes was carried out immediately before the first infusion. The population of B-lymphocytes was analyzed by means of basal CD19 expression and after 1, 2, and 6 months after the infusion of RTX, and then quarterly until clinical relapse. Depletion of B-lymphocytes in peripheral blood was defined as a CD19 expression  $<0,005 \times 10^9/L$ .

**Results:** Ten women with a median of 49 years and a baseline DAS28=5.6 were evaluated; 9 were seropositive for rheumatoid factor. Five patients showed a repopulation of B-lymphocytes after 2 months, and the other five after 6 months. There was a correlation between the basal expression of CD46 and the time of repopulation (correlation coefficient = -0.733,  $p=0.0016$ ). A similar trend was observed with CD35, but without statistical significance (correlation coefficient = -0.522,  $p=0.12$ ).

**Conclusion:** The increased CD46 expression was predictive of a faster repopulation of B-lymphocytes in patients treated with RTX. Studies involving a larger number of patients will be needed to confirm the utility of basal expression of CRPs as a predictor of clinical response.

© 2016 Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta cerca de 1% da população adulta, com prevalência três vezes superior nas mulheres e causa poliartrite crônica e persistente, principalmente das articulações periféricas.<sup>1</sup> O infiltrado inflamatório composto de macrófagos, células T CD4+, células B, células dendríticas, mastócitos e granulócitos leva à proliferação sinovial, resulta em articulações edemaciadas e dolorosas, com grande limitação funcional.<sup>2</sup> Níveis elevados de produtos de ativação do complemento, como o complexo de ataque à membrana (MAC), liberação de anafilatoxinas C3a e C5a e aumento do consumo de C3 e C4 podem ser detectados no líquido sinovial dos portadores de AR, o que sugere uma superativação do sistema complemento (SC) nesses pacientes.<sup>3</sup> As células normais são resistentes à lise mediada pelo complemento por ter mecanismos regulatórios constituídos por proteínas solúveis nos líquidos biológicos, como a properdina e o 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]).<sup>4</sup>

O rituximabe (RTX) é um anticorpo monoclonal quimérico direcionado ao CD20 que se expressa na superfície dos linfócitos pré-B até os linfócitos B maduros, leva à depleção

transitória quase completa das células B no sangue e parcial na medula óssea e no tecido sinovial.<sup>5-10</sup> Seu mecanismo de ação baseia-se na sinalização e consequente morte da célula B por indução de apoptose, lise mediada pelo complemento ou morte celular mediada por macrófagos.<sup>11,12</sup> A resposta clínica parece correlacionar-se ao nível de depleção de células B na sinóvia e no sangue periférico.<sup>6</sup> O tratamento da AR com RTX demonstrou eficácia significativa no controle de sinais e sintomas e melhoria da função física, além de benefícios na prevenção do dano radiológico.<sup>13-19</sup>

Embora um grande número de pacientes apresente resposta satisfatória ao tratamento com RTX, cerca de 40 a 50% são refratários e o mecanismo dessa falha ainda não está completamente esclarecido.<sup>5,18,19</sup> Nesse contexto, a busca de biomarcadores que possam prever quais os subgrupos de pacientes com maior potencial de beneficiar-se dessa terapia tem sido um dos objetivos dos estudos mais atuais relacionados à droga. Essa estratégia, além de reduzir custos, poderia minimizar períodos de atividade de doença e a exposição a possíveis efeitos colaterais de um tratamento ineficaz.<sup>20</sup>

Vários estudos pesquisaram a associação entre a expressão aumentada das proteínas reguladoras do complemento (PRC) 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.<sup>21</sup> Esse 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 duas a três vezes quando usados anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59.<sup>22</sup> Outros autores encontraram resistência aumentada à lise mediada pelo complemento desencadeada pelo RTX quando da expressão aumentada de CD55<sup>23</sup> e CD59.<sup>24</sup>

Embora existam achados consistentes de que a expressão de PRC, particularmente CD55 e CD59, possa ser usada como biomarcador de resposta ao tratamento com RTX em doenças linfoproliferativas, nenhum trabalho na literatura fez essa correlação em pacientes portadores de AR.

O objetivo deste estudo é correlacionar a expressão basal das PRC CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B do sangue periférico de uma coorte de pacientes com AR iniciando tratamento com RTX com o nível de depleção dessas células no sangue periférico e seu tempo de repopulação. Será avaliada, ainda, a correlação entre a expressão dessas proteínas com a resposta clínica conforme os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR).

## Material e métodos

### População do estudo

Foram incluídos 10 pacientes consecutivos portadores de AR com indicação clínica para início do tratamento com RTX conforme diretrizes da Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR): falha ou intolerância a pelo menos dois regimes de drogas modificadoras do curso de doença (DMCDs) tradicionais e um agente anti-TNF.<sup>25</sup> Os outros critérios de inclusão foram: idade igual ou superior a 18 anos; diagnóstico de AR havia pelo menos seis meses segundo os critérios do ACR<sup>1</sup>; escore DAS28 (Disease Activity Score 28) maior ou igual a 3,2; uso de método contraceptivo adequado para pacientes férteis e desejo de participar voluntariamente e capacidade de compreender o protocolo, documentado por assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLS). Foram excluídos os pacientes com: sobreposição de doença reumática autoimune, doenças linfoproliferativas e neoplásicas; presença de infecção ativa; uso de drogas citotóxicas; sorologia positiva para HIV, HBV ou HCV; tuberculose ativa; alergia ou hipersensibilidade ao RTX; mulheres gestantes ou em amamentação; participantes em outro estudo clínico com intervenção; classe funcional IV definida com base nos critérios de funcionalidade de Steinbroker para AR<sup>26</sup> e terapia prévia com RTX. Os pacientes receberam duas infusões de 1 g de RTX separadas por intervalo de 14 dias. Todos foram pré-medicados com metilprednisolona 100 mg, paracetamol 1 g e dexclorfeniramina 2 mg. Os pacientes foram acompanhados por um período máximo de 24 meses.

### Avaliação clínica

Todos os pacientes fizeram visita basal imediatamente antes da infusão do RTX, mensal nos seis meses após as infusões e depois trimestral. Em cada visita foram coletados testes laboratoriais de rotina (hemograma, transaminases, creatinina, exame comum de urina, velocidade de hemossedimentação [VHS] e proteína C reativa). Na primeira visita também

foram feitos fator reumatoide (FR), fator antinuclear (FAN), complementos, sorologias anti-HCV, anti-HIV, anti-HBc e HBsAg, radiografia de tórax, mãos e pés e teste de Mantoux. Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados em cada visita: contagem de 28 articulações edemaciadas e/ou dolorosas (feita sempre pelo mesmo examinador); escore global de atividade doença (0-100 mm em uma escala visual analógica [VAS] atribuído tanto pelo examinador quanto pelo paciente); escore de dor (0-100 mm), *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) e escore DAS28 com o uso de VHS.

### Avaliação da resposta clínica

A resposta clínica ao tratamento foi avaliada seis meses após a infusão do RTX, foi considerada positiva quando o paciente atingisse resposta > 20% conforme os critérios estabelecidos pelo ACR.<sup>27</sup> Foi considerada falha de resposta quando ocorresse uma melhoria abaixo de 20% em relação aos parâmetros basais segundo os mesmos critérios. Recaída clínica foi considerada quando houvesse perda da resposta ACR20 em pacientes considerados respondedores.

### Análises imunofenotípicas

As análises de citometria de fluxo do sangue periférico foram feitas imediatamente antes da primeira infusão do RTX, um, dois e seis meses após a 2<sup>a</sup> infusão do RTX e após em intervalos trimestrais conforme técnica padronizada nos leucócitos,<sup>28</sup> em período inferior a 24 horas após a coleta. Resumidamente, 100 µl de sangue total foram colocados em tubos de poliestireno e submetidos à coloração com 8 µl de cada anticorpo monoclonal fluorocromo-conjugado contra PercP-CD19, CD55PE, CD59FITC, CD35PE e CD46FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Após a incubação, 1 ml de FACSllyse (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) foi adicionado e lise foi permitida por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas e ressuspensas em 0,5 ml de solução tamponada com fosfato (PBS) e analisadas no *software* CellQuest<sup>TM</sup> do citômetro de fluxo FACSCalibur – BD (Becton Dickinson). A intensidade de fluorescência de membrana foi calculada através da intensidade média de fluorescência (*mean fluorescence intensity* – MFI). A definição de células positivas ou negativas foi estabelecida quando a coloração de isotipo controle foi feita, a fim de definir os *gates* e distinguir coloração positiva de autofluorescência ou ligação de anticorpo não específico. Em cada uma dessas coletas foram quantificadas as células que marcavam CD19. A expressão de CD55, CD59, CD35 e CD46 foi pesquisada antes da infusão do RTX, somente nas subpopulações CD19+.

Foram adquiridos 100.000 de eventos na região dos linfócitos no citômetro de fluxo. Os dados foram analisados em *software* Infinicyt na região dos linfócitos (em termos de valores relativos e intensidade de fluorescência), usaram-se os dados do hemograma coletado de rotina para cálculo dos valores absolutos.

Depleção de células B no sangue periférico foi definida por um valor de CD19+ < 0,005 × 10<sup>9</sup>/L no total de leucócitos. Repopulação de células B foi considerada quando a concentração de células B fosse > 0,005 × 10<sup>9</sup>/L no total de leucócitos.

### Análise estatística

Devido à inexistência de estudos anteriores que avaliaram a expressão de PRC e a depleção e repopulação de linfócitos B após RTX em pacientes com AR, optamos por uma coorte piloto de 10 pacientes que forneceria as informações necessárias para o cálculo mais preciso do tamanho amostral em estudos posteriores para confirmar as observações deste trabalho, caso houvesse alguma tendência de associação.

Os dados foram analisados com o programa SPSS 16.0 para Windows. Para comparar as médias dos valores paramétricos foi feito o teste t de Student para amostras pareadas e para valores não paramétricos foi usado o teste de Mann-Whitney. As correlações foram analisadas por meio do teste de Pearson para dados paramétricos e correlação de Spearman para dados não paramétricos. Foi considerada correlação estatisticamente significativa quando valor de  $p < 0,05$  e clinicamente significativa quando coeficiente de correlação superior a 0,4.

### Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA sob número 09-585 e recebeu financiamento do Fundo de Apoio à Pesquisa e Eventos do HCPA (Fipe). Todos os pacientes participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLS). O laboratório Roche contribuiu com a doação do RTX para os 10 pacientes por meio de protocolo de iniciativa do pesquisador, sem interferência no desenho, na análise e na elaboração do estudo.

## Resultados

Dez pacientes do sexo feminino, com uma mediana de 49 anos, foram incluídos neste estudo. As características basais estão na [tabela 1](#). A mediana de duração de doença foi de oito anos. Todos os pacientes usavam metotrexate (mediana de 25 mg/semana) e prednisona (mediana de 10 mg/dia) e haviam usado pelo menos um anti-TNF. Nove pacientes (90%) eram FR positivas e oito (80%) tinham erosões articulares.

Na avaliação de resposta clínica, oito pacientes (80%) atingiram ACR20 quatro meses após a infusão do RTX, porém somente três (30%) mantiveram essa resposta aos seis meses. Quando considerado o índice de atividade DAS28, após quatro meses da infusão do RTX três pacientes (30%) apresentavam remissão clínica, duas (20%) baixa atividade clínica e cinco (50%) moderada atividade de doença. Já na avaliação seis meses após a infusão do RTX, apenas uma paciente (10%) apresentava baixa atividade clínica.

A repopulação dos linfócitos B no sangue periférico foi identificada na análise de dois meses após a infusão de RTX em cinco pacientes (50%) e na análise de seis meses nas demais.

A [tabela 2](#) traz a mediana da expressão de CD55, CD59, CD35 e CD46, avaliada por meio do MFI nos linfócitos B do total de pacientes e dos subconjuntos com repopulação identificada em dois e seis meses. Os pacientes com repopulação dos linfócitos B no sangue periférico aos dois meses apresentaram expressão aumentada de CD46 (mediana de MFI de 72) em relação àqueles com repopulação aos seis meses (mediana de MFI de 47), o que confirmou uma correlação entre uma

**Tabela 1 – Características basais dos pacientes tratados com RTX**

	Pacientes com AR (n = 10)
Idade (anos), mediana (intervalo)	49 (37-56)
Sexo feminino, n (%)	10 (100)
Brancos, n (%)	8 (80)
Fator reumatoide positivo, n (%)	9 (90)
Duração da doença (anos), mediana (intervalo)	8 (2-18)
Erosões, n (%)	8 (80)
VHS (mm/h), mediana (intervalo)	27,5 (8-120)
PCR (mg/l), mediana (intervalo)	10,8 (4-42,2)
HAQ (0-3), mediana (intervalo)	1 (0,750-2,125)
DAS28-VHS, mediana (intervalo)	5,6 (4,4-6,82)
Uso atual de MTX, n (%)	10 (100)
Dose MTX (mg/semana), mediana (intervalo)	25 (20-25)
Uso atual de corticoesteroides, n (%)	10 (100)
Dose de prednisona (mg/dia), mediana (intervalo)	10 (5-15)
Anti-TNF prévios, n (%)	
1	9 (90)
≥ 1	1 (10)
Anti-TNF usados, n (%)	
Adalimumabe	5 (50)
Etanercepte	2 (20)
Golimumabe	1 (10)
Infliximabe	3 (30)

AR, artrite reumatoide; DAS28-VHS, Disease Activity Score in 28 joints using the erythrocyte sedimentation rate; HAQ, Health Assessment Questionnaire; Intervalo = valores mínimo e máximo encontrados; MTX, metotrexate; PCR, proteína C reativa; VHS, velocidade de hemossedimentação.

maior expressão de CD46 com repopulação mais precoce dos linfócitos B no sangue periférico (coeficiente de correlação de  $-0,733$ ,  $p = 0,016$ ). Tendência semelhante foi encontrada com CD35, porém sem significância estatística (mediana de MFI de 444 para pacientes com repopulação mais precoce versus 289 para aqueles com repopulação mais tardia, com um coeficiente de correlação de  $-0,522$ ,  $p = 0,12$ ). Não foram encontradas correlações entre as expressões de CD55 e CD59 nos linfócitos B e o tempo de repopulação dos linfócitos B nesta amostra de pacientes (coeficiente de correlação de  $-0,383$  e  $-0,174$  e valor de  $p = 0,275$  e  $0,631$ , respectivamente).

Embora encontrada variação na expressão de CD55, CD59, CD35 e CD46 nos linfócitos B dos pacientes estudados, não encontramos correlação entre essa expressão e a resposta clínica medida por meio do ACR20 aos seis meses. As expressões das PRC aferidas por meio da mediana do MFI entre os pacientes respondedores (CD59 = 39; CD55 = 456; CD35 = 444 e CD46 = 79) não diferiram estatisticamente em relação aos não respondedores (CD59 = 40; CD55 = 322; CD35 = 346 e CD46 = 49). Esses dados encontram-se na [tabela 3](#).

## Discussão

Neste estudo detectamos uma correlação entre a expressão aumentada de CD46 e repopulação mais precoce de linfócitos B no sangue periférico após o tratamento com RTX. Houve uma tendência semelhante com CD35, porém não

**Tabela 2 – Correlação entre a expressão basal de CD55, CD59, CD35 e CD46 em linfócitos B previamente ao tratamento com RTX e tempo de repopulação dessas células**

Antígeno	Repopulação de linfócitos B			Índice de correlação	Valor de p
	Total, n = 10 Mediana do MFI (Intervalo) <sup>a</sup>	2 meses, n = 5 Mediana do MFI (Intervalo) <sup>a</sup>	6 meses, n = 5 Mediana do MFI (Intervalo) <sup>a</sup>		
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 <sup>b</sup>

MFI, mean of fluorescence intensity.  
<sup>a</sup> Intervalo entre valores mínimos e máximos encontrados.  
<sup>b</sup> p < 0,05 = estatisticamente significativo.

**Tabela 3 – Correlação entre a expressão basal de CD55, CD59, CD35 e CD46 em linfócitos B previamente ao tratamento com RTX e resposta clínica em seis meses**

Antígeno	Resposta clínica em seis meses (ACR20)		Valor de p
	Respondedores, n = 3 Mediana do MFI (Intervalo) <sup>a</sup>	Não respondedores, n = 7 Mediana do MFI (Intervalo) <sup>a</sup>	
CD59	39 (29-66)	40 (27-60)	1
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

MFI, mean of fluorescence intensity.  
<sup>a</sup> Intervalo entre valores mínimos e máximos encontrados.

estatisticamente significativa. Essa associação reforça a hipótese de que a expressão aumentada de CD46 poderia diminuir a lise mediada pelo complemento, um dos mecanismos de ação do RTX, e, dessa forma, reduziria a eficácia da droga. Contudo, não houve correlação entre a expressão das PRC nos linfócitos B e a resposta clínica. Contrariando o racional biológico esperado de que os pacientes com expressão aumentada das PRC nos linfócitos B periféricos tratados com RTX teriam uma repopulação linfocitária mais precoce e uma resposta clínica menor à terapia, em nosso trabalho encontramos uma tendência de uma maior expressão de CD46 e CD55 nos linfócitos B periféricos dos pacientes, que atingiram ACR20 aos seis meses em relação aos não respondedores, porém sem significância estatística (p = 0,067). Acreditamos que esse achado aparentemente contraditório seja decorrente do pequeno tamanho amostral que levou à falta de poder deste estudo para avaliar adequadamente esse desfecho. Essa limitação provavelmente influenciou também os resultados que não mostraram correlação da expressão de CD55 e CD59 nos linfócitos B periféricos com a repopulação mais precoce dessas células no sangue periférico após o tratamento com RTX.

Outra questão importante neste estudo foi o baixo índice de resposta sustentada em seis meses (30%). Essa resposta foi inferior a estudos anteriores que avaliaram pacientes com AR com falha prévia à anti-TNF<sup>18,19</sup> nos quais foram obtidas respostas ACR20 de cerca de 50% em média aos seis meses. Nossa amostra, quando comparada com as populações estudadas nesses trabalhos, apresentava menores índices de HAQ (1,0 × 1,8-1,9, respectivamente), DAS28 (5,6 × 6,8) e tempo de

doença (8 anos × 10-12 anos), mas usava doses superiores de metotrexate (25 mg × 15 mg) e glicocorticoides. Todos nossos pacientes usavam glicocorticoides, enquanto apenas 65% usavam essa classe de droga no trabalho de Cohen et al.<sup>19</sup> Não sabemos, contudo, se essas diferenças influenciaram de alguma forma nossos resultados.

Apesar das limitações relacionadas ao tamanho da amostra e baixo índice de resposta terapêutica em seis meses, este é o primeiro estudo a correlacionar a expressão das PRC 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. Estudos anteriores em doenças linfoproliferativas já haviam levantado a hipótese de que a expressão aumentada de PRC poderia reduzir a citotoxicidade mediada pelo complemento e influenciar na resposta ao tratamento com RTX.<sup>21,23,24,29</sup> Esses estudos envolveram modelos *in vitro*, animais e humanos. Dalle et al. pesquisaram a expressão de CD55, CD59 e CD46 em ratos que receberam células derivadas de linfoma folicular humano e detectaram uma expressão aumentada de CD59 naqueles com linfoma resistente ao RTX.<sup>24</sup> Terui et al. estudaram a expressão de CD55 em células de linfoma não Hodgkin (LNH) provenientes de 30 pacientes e evidenciaram que essa proteína contribuiu para a resistência à citotoxicidade mediada pelo complemento e resistência ao RTX.<sup>23</sup> Embora existam evidências de que as PRC possam ter um papel biomarcador de resposta ao RTX em doenças linfoproliferativas, essa associação nunca fora estudada em pacientes com AR.

Nossos achados reforçam a importância de mais estudos para avaliar o papel da variação das PRC na depleção dos

linfócitos B e seu impacto na eficácia terapêutica do RTX, que idealmente envolve coortes mais numerosas de pacientes com AR.

O potencial para importância clínica dessa correlação pode extrapolar apenas a previsão de resposta ao tratamento, uma vez que a combinação do RTX com inibidores das PRC, tais como a proteína recombinante Ad35KK++ e os anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59, poderia ser considerada. Essa combinação tem sido estudada em doenças linfoproliferativas com modelos *in vitro* e animais, com respostas favoráveis. O uso de anti-CD55 e anti-CD59 aumentou a citotoxicidade mediada pelo complemento, elevou a sensibilidade das células tumorais à ação do RTX.<sup>22,30-32</sup> Em estudo recente, Beyer *et al.* estudaram o uso de um pré-tratamento com Ad35K++ (proteína recombinante que induz a internalização e degradação de CD46) em macacos tratados com RTX subclínicas e observaram uma depleção celular completa dos linfócitos B periféricos.<sup>33</sup>

Concluimos que o aumento da expressão de C46 em linfócitos B de pacientes com AR pode prever uma repopulação mais precoce dessas células no sangue periférico dos pacientes tratados com RTX. Mais estudos são necessários para confirmar esse resultado, avaliar a correlação das outras PRC com repopulação e resposta clínica ao tratamento e permitir, assim, o uso dessas proteínas como biomarcadores de resposta ao RTX.

## Financiamento

Este estudo obteve apoio do Fundo de Apoio à Pesquisa e Eventos (Fipe), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, vinculado ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação. O laboratório Roche contribuiu com a doação do rituximabe para os 10 pacientes por meio de protocolo de iniciativa do pesquisador, sem interferência no desenho, na análise e na elaboração do estudo.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- 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;31:315-24.
- Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2005;204:55-73.
- Okroj M, Heinegard D, Holmdahl R, Blom AM. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med.* 2007;39:517-30.
- Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol.* 2006;118:127-36.
- 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;54:613-20.
- 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;58:2993-9.
- Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, Bertsias 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:R131.
- 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;56:772-8.
- 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;67:917-25.
- 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;67:402-8.
- 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;9:10-25.
- Atzeni F, Doria A, Turiel M, Sarzi-Puttini P. What is the role of rituximab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2007;6:553-8.
- 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;71:351-7.
- 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;70:39-46.
- 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;350:2572-81.
- 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;69:1629-35.
- 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;58:3657-64.
- 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;54:1390-400.
- 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;54:2793-806.
- Isaacs JD, Ferraccioli G. The need for personalised medicine for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:4-7.

21. 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;95:3900-8.
22. 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;98:3383-9.
23. 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;97:72-9.
24. 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;15:851-7.
25. Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol*. 2013;53:158-83.
26. 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;35:498-502.
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;38:727-35.
28. Alegretti AP, Mucenic T, Merzoni J, Faulhaber GA, Silla LM, Xavier RM. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Cell Immunol*. 2010;265:127-32.
29. Dziatczenia 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;27:743-6.
30. 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;67:10556-63.
31. 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 cytolysis. *Cancer Res*. 2011;71:2298-307.
32. 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;35:2175-83.
33. 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;21:291-9.