

Dissertação
Mestrado Integrado em Medicina

NOVAS EVIDÊNCIAS NA TERAPÊUTICA BASEADA NA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B EM DOENÇAS AUTO-IMUNES

Pedro Manuel Botelho Valente*

*Aluno 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar/HSA-CHP**,
Universidade do Porto*

ORIENTADOR:

Dr. António Joaquim dos Santos Pereira Sá Marinho

*Assistente Hospitalar Medicina Interna do Serviço de Medicina Interna e
Unidade de Imunologia Clínica do HSA-CHP*

PORTO 2009

* Endereço: Pedro Manuel Botelho Valente; R. Egas Moniz Lt9; 4660-219 Resende; Portugal. Pedrovalente.icbas@gmail.com

** HSA-CHP: Hospital de Santo António – Centro Hospitalar do Porto

RESUMO

A doença auto-imune caracteriza-se como uma síndrome clínica causada pela activação anómala das células T, das células B ou de ambas, na ausência de uma infecção ou outra doença identificável, tendo sido considerada a susceptibilidade genética e as condições internas e ambientais, os factores contribuintes para auto-imunidade, ao que se denomina Mosaico da Auto-imunidade.

Nos últimos 5 anos, muitos estudos levaram ao um melhor entendimento das especificidades e funções das células B, sendo que, actualmente são consideradas essenciais na fisiopatologia destas doenças, não só pela produção de auto-anticorpos como também, pela sua capacidade de secreção de citocinas inflamatórias, participação na apresentação de antígenos, amplificação da activação das células T e a linfogénese ectópica.

O sucesso da depleção de células B no tratamento da Artrite Reumatóide com o rituximab (anticorpo monoclonal anti-CD20) tem estimulado a investigação dos seus efeitos em outras doenças auto-imunes tais como o Lúpus Eritematoso Sistémico, a Síndrome de Sjogren e as Vasculites Sistémicas.

O potencial demonstrado desta terapêutica levou a que se desenvolvesse novos fármacos com mecanismos e locais de actuação distintos do rituximab, como o Belimumab, o Atacicept e o BR3-Fc que bloqueiam a proliferação da célula B, ou outros que funcionam como o rituximab ligando-se ao CD20 e induzindo a morte celular (ofatumumab e o ocrelizumab).

Apesar da intensa investigação levada a cabo nos últimos anos, apenas o Rituximab foi aprovado pelas entidades oficiais e apenas para o tratamento da Artrite Reumatóide, ainda que seja usado em muitas outras doenças auto-imunes como terapêutica de escape.

O avanço na investigação tem sido limitado pela heterogeneidade e raridade destas doenças e assim, surge a necessidade de otimizar protocolos de actuação, métodos de construção e avaliação clínica e laboratorial, de modo a estandardizar a investigação nesta área, com o intuito de melhorar e aumentar as opções terapêuticas disponíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Auto-imunidade, doença auto-imune, Depleção células B, Rituximab, Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistémico, Síndrome de Sjogren, Vasculite.

INTRODUÇÃO

Auto-imunidade consiste na resposta imune directa contra antígenos do corpo do hospedeiro, e apesar de integrar um grupo de doenças extremamente mal definidas, a doença auto-imune caracteriza-se como uma síndrome clínica causada pela activação das células T, das células B ou de ambas, na ausência de uma infecção ou outra doença identificável, tendo sido considerada a susceptibilidade genética e os factores internos e ambientais, como factores contribuintes para a auto-imunidade, o que se denomina de Mosaico da Autoimunidade. (Shoenfeld *et al*, 2008)

As doenças auto-imunes, à excepção da Artrite Reumatóide (AR) e da Tiroidite Auto-imune, são doenças individualmente raras, mas no seu conjunto afectam aproximadamente 5% da população nos países ocidentais. (Davidson *et al*, 2001)

Durante muitos anos o dogma central da imunologia assentava na depleção clonal das células auto-reactivas permitindo apenas o desenvolvimento do repertório de células do sistema imune que reconhecessem especificamente os antígenos estranhos. Contudo observações posteriores permitiram concluir que existe um baixo grau de auto-reactividade fisiológica e que esta é crucial para o bom desenvolvimento do sistema imunitário. (Dighiero *et al*, 1999)

Visto que não existem diferenças significativas entre as estruturas dos auto-antígenos e os antígenos estranhos, os linfócitos não evoluem para distinguir estes dois tipos, como muitos investigadores têm especulado, mas sim para responder ao antígeno apenas em determinados microambientes, geralmente na presença de citocinas inflamatórias. (Silverstein *et al*, 2000)

Assim o desafio tem sido entender quando é que este processo auto-reactivo se torna patológico e como as células T e as células B contribuem para a lesão tecidual. (Davidson *et al*, 2001)

Historicamente, baseando-se na presença dos auto-anticorpos as células B eram tidas como componentes principais nestas patologias. (Waalder, 1940) No entanto a partir da década de 80 esta noção mudou e pelo seu papel efector e desenvolvimento nos órgãos alvo, as células T foram consideradas como os elementos essenciais nas doenças auto-imunes. (Janossy *et al*, 1981)

Nos últimos anos tem-se verificado uma crescente elucidação acerca da patogenia das doenças auto-imunes e, conseqüentemente, um esclarecimento mais detalhado das funções específicas das diferentes células do sistema imunitário, tendo voltado

as células B a ser consideradas extremamente importantes, tanto na origem como na manutenção das patologias auto-reactivas. Para isto, em muito contribuiu o uso de terapias anti-células B, que ao originar a depleção destes linfócitos mostrou excelentes resultados no tratamento das doenças auto-imunes, em modelos animais e em humanos. E este foi o catalisador para uma investigação acérrima nesta área, que tem feito revelações extraordinariamente importantes não só para o melhor conhecimento da imunopatologia como para o consequente melhor tratamento destas efermidades. (Browning, 2006)

OBJECTIVOS

Esta dissertação tem como objectivos expor os mecanismos básicos e as funções das células B na auto-imunidade e patologias auto-reactivas, assim como apresentar uma sistematização das evidências clínicas do papel da depleção das células B nas doenças auto-imunes, sua aplicação prática e potenciais efeitos adversos.

PARTE I- A CÉLULA B

O CICLO DE VIDA DAS CÉLULAS B

As células B têm um ciclo de vida complexo, e é importante considerar as suas vias de desenvolvimento, de modo a entender os diferentes pontos de intervenção. Estas células originam-se das *Stem cells* na medula óssea onde adquirem a sua especificação imunológica. (Burrows *et al* 1997).

Aqui, as células B passam por uma sequência de estadios intermédios, caracterizados pelo rearranjo progressivo dos segmentos génicos V, D, e J do locus das cadeias pesadas das Ig (Imunoglobulinas) e dos segmentos génicos V e J do locus das cadeias leves das Ig. Assim, distinguidas pelas diferentes expressões de marcadores de superfície celular, as Stem cells evoluem de forma ordenada e sequencial passando por células Pró-B, depois células Pré-B e de seguida células B imaturas. Estas entram na corrente sanguínea como células B de transição, e migram para os órgãos linfoides secundários. (Carter, 2006)

As células B que ultrapassam esta fase, tornam-se *células B naïve*, e consistem em células B maduras periféricas que ainda não foram expostas a antígenos. (Burrows *et al* 1997)

A diferenciação das células B é dividida frequentemente em 2 linhagens, chamadas B1 e B2. As células B1 que se encontram bem descritas em murinos, têm sobrevida longa e surgem precocemente no desenvolvimento, são auto-renováveis e ocupam a cavidade peritoneal e a pleural. Estas produzem anticorpos imunoglobulinas M (IgM) conhecidas como anticorpos naturais, essenciais contra bactérias encapsuladas e sem hipermutação somática extensa, reconhecendo geralmente múltiplos antígenos, ou seja, são polirreactivas. (Haas *et al*, 2005) Nos humanos as suas funções estão pouco caracterizadas devido à ausência de marcadores específicos, no entanto, os anticorpos naturais encontram-se bem identificados e estão descritas células B semelhantes às B1 que se encontram aumentadas em doentes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). (Milner *et al*, 2005)

As células B2, por outro lado, têm a capacidade de gerar anticorpos hiper-mutados e compreendem a parte mais adaptativa do sistema das células B, formando-se e diferenciando-se na medula óssea onde ocorre a remoção das células auto-reactivas (tolerância central). Após esta primeira selecção, as células B sobreviventes imaturas, com receptores funcionais, deixam a medula e migram para o baço, onde ocorre uma nova selecção (tolerância periférica). (Goodnow *et al*, 2005) Esta selecção implica que, de seguida, as células sejam dirigidas para uma das 2 vias de maturação, a da célula B folicular ou a da célula B da zona marginal. As células B foliculares difundem-se globalmente pelos órgãos linfóides secundários e formam o cerne da resposta humoral adaptativa. As células B da zona marginal são especializadas em localizar-se no compartimento que contacta com os agentes patogénios. (Burrows *et al* 1997) As células B1 e as células da zona marginal são semelhantes, sendo componentes chave da parte do sistema imune que é activado rapidamente para responder aos patogénios no sangue, cavidade peritoneal e cavidade pleural. (Lopes-Carvalho *et al*, 2005)

As células B foliculares *naïve* contactam com os antígenos nos órgãos linfóides secundários e em conjugação com as *células T help* activam-se e proliferam. Estas células B activadas podem, então, diferenciar-se em plasmablastos que se convertem em plasmócitos de semi-vida curta. Em ratos, esta conversão ocorre no baço, no limite entre a polpa vermelha e a polpa branca, em regiões chamadas “*bridging*

channel". Estes plasmócitos, de semi-vida curta, duram 2-3 dias e existem para permitir uma resposta imediata aos agentes patogénicos, a esta resposta imediata constituída por activação das células B, expansão focal e formação dos plasmócitos de semi-vida curta, chama-se *resposta extrafolicular*, visto ocorrer, como referido, fora dos folículos de células B. Tipicamente esta fase demora 3-7 dias. Os Plasmócitos são capazes de produzir consideravelmente mais imunoglobulinas do que os plasmablastos e acredita-se que constituem uma fase terminal de diferenciação, metabolicamente adaptada para a secreção maciça de imunoglobulinas. (MacLennan *et al*, 2003)

A seguir à reacção extra-folicular, ocorre a migração de células B activadas para o folículo de células B, onde coalescem, constituindo uma estrutura chamada centro germinativo. No centro desta estrutura encontra-se uma rede reticular altamente especializada, constituída por células dendríticas foliculares. Durante a reacção do centro-germinativo, as células sofrem uma proliferação muito rápida, bastando tipicamente 2 células B para originar um centro germinativo. Como resultado desta reacção, originam-se Plasmócitos de semi-vida longa e Células Memória. Os Plasmócitos derivados desta reacção alteram os seus receptores de citocinas o que permite a sua saída do baço, podendo posteriormente alojar-se na medula óssea, onde podem atingir uma longevidade superior a 6-12 meses. (Kunkel *et al*, 2003)

Para uma melhor compreensão da diferenciação das células B e do seu papel no sistema imune é importante interiorizar o conceito de selecção clonal das células B, que ocorre durante o processo de diferenciação, sendo que cada clone expressa um anticorpo específico. A selecção clonal tem subjacente a memória imunológica e permite a expansão de determinado clone aquando da exposição ao antígeno respectivo. Para ser possível a resposta a um número adequado de antígenos é necessário um grande número de clones que é conseguido pelas muitas recombinações conseguidas pelo gene dos linfócitos responsável por codificar as proteínas do receptor de antígenos. Ocorre ainda diversificação adicional através de mutações somáticas dos anticorpos durante a expansão clonal periférica. (Meffre *et al* 2008)

No entanto estes processos também originam moléculas auto-reactivas, o que constitui um potencial problema. Deste modo o sistema imune evoluiu de modo a que a ligação do antígeno (seja ele do próprio ou estranho) ao receptor de membrana, não é suficiente para a induzir a produção de anticorpos. As células B

necessitam receber sinais de activação adicionais, como ligação às citocinas ou a co-receptores, que se relacionem com patógenos específicos e também possuir determinados mecanismos que suprimam a resposta inflamatória na ausência de agentes antígenos estranhos.

Assim, a auto-imunidade pode resultar de alterações intrínsecas das células B que contornam esta necessidade de sinais de activação extrínseca ou, resultar de uma resposta intrínseca normal a sinais de activação inapropriados gerados pelo sistema inato. (Carter, 2006)

CÉLULAS B E AUTO-IMUNIDADE

Os mecanismos pelos quais as células B participam na indução e manutenção das doenças auto-imunes têm vindo a ser cada vez mais investigados, devido ao estímulo provocado pelo recente sucesso clínico das terapias moduladoras de células B nestas patologias. Estes mecanismos incluem a capacidade de produzir auto-anticorpos, a secreção de citocinas inflamatórias, a participação na apresentação de antígenos, a amplificação da activação das células T e a linfogénese ectópica. (Martin *et al* 2004)

AUTO-ANTICORPOS E COMPLEXOS IMUNES

A produção de anticorpos e complexos imunes, geralmente, são acções benéficas das células B na remoção de agentes patogénicos ou substâncias, contudo, estas podem ter um lado negativo, uma vez que, se forem dirigidas para componentes do próprio indivíduo (*self*), estes mecanismos não podem remover eficazmente o antígeno, gerando um processo inflamatório crónico que leva a lesão de órgãos alvo. (Browning, 2006)

Os auto-anticorpos podem alterar os mecanismos efectores do sistema imune, assim como, interferir com diversas funções celulares, como por exemplo, os anticorpos que se ligam ao receptor da hormona estimuladora da tiróide (TSH) e mimetizam a activação da TSH, sem originar o feedback negativo normal dos estados fisiológicos, o que origina uma produção contínua das hormonas tiroideias e, consequentemente, hipertiroidismo - Doença de Graves. (Martin *et al* 2006)

Os auto-anticorpos também induzem a doença através da activação do complemento, mediada pela região Fc (*fragment crystallizable*) do anticorpo. A

miastenia gravis é um bom exemplo, visto que, a activação do complemento e a deposição de complexos de ataque à membrana são os principais mecanismos responsáveis pela ruptura e perda dos complexos pós-sinápticos e consequente alteração da transmissão neuromuscular. (Richman *et al* 2003) De modo semelhante, na Síndrome de Goodpasture, a deposição de auto-anticorpos anti-colagenio IV da membrana basal nos rins e alvéolos pulmonares induz glomerulonefrite e pneumonite intersticial hemorrágica necrotizante, respectivamente, através da activação do complemento e consequente recrutamento de células inflamatórias. (Hudson *et al* 2003)

Estes anticorpos *anti-self* também podem mediar a lesão de órgãos através da formação de complexos imunes, que se podem depositar nos órgãos alvos e provocar patologia, como na Hepatite C associada ao síndrome de crioglobulinemia mista, em que os complexos formados com as proteínas virais podem depositar-se na pele, nos rins, ou nos nervos periféricos provocando lesões purpúricas, glomerulonefrite ou mononeurite respectivamente. De modo semelhante, os complexos auto-imunes anti-dsDNA podem activar o complemento mediando a nefrite auto-imune. (Martin *et al* 2006)

Além da activação do complemento, os auto-anticorpos e os complexos imunes também activam os receptores Fc, que são expressos tanto pelas células mielóides como Linfóides, sendo a sua acção e activação diversificada, devido aos polimorfismos existentes. Os monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos expressam os receptores Fc de alta afinidade, FCγRI (CD64) e receptores Fc de baixa afinidade, FCγRII (CD32) e FCγRIII (CD16). (Ravetch *et al*, 2001)

No modelo de murino com artrite inflamatória, o CD16 tem um papel fundamental na fase inicial da doença, enquanto o CD64 parece ser mais importante numa fase mais tardia da destruição da cartilagem. Por outro lado, em modelos de murinos experimentais de encefalite alérgica e glomerulonefrite auto-imune, o CD64 parece ser dispensável para a doença, enquanto o CD16 é crucial para a iniciação e manutenção da doença. (Abdul-Majid *et al*, 2002; Fujii *et al* 2003)

Os sinais gerados por estes receptores de activação são contrabalançados pelo receptor inibitório FCγRIIB que também se mostrou essencial na patologia auto-imune. Ratos com deficiência deste receptor desenvolvem auto-imunidade *lúpus-like*, e modelos de LES, além de, expressarem níveis baixos destes receptores nos centros

germinativos de células B, a expressão forçada de FCγRIIB nestes ratos reverteu a autoimunidade. (McGaha *et al*, 2005)

Os complexos imunes podem também modular a função das células dendríticas (C.Ds.) através da interacção e activação dos receptores Fcγ, Fcα, e Fcε. Tem sido demonstrado que a activação das C.Ds. pelos complexos imunes aumenta a apresentação de antígenos tanto em ratos como em humanos. Além disso, a apresentação cruzada de antígenos pode permitir uma activação das células T com uma concentração de antígeno mais de 1000 vezes inferior. Em várias doenças auto-imunes tanto os anticorpos como os antígenos, parecem actuar em sinergismo para activar e mediar o processo patológico. Por exemplo os complexos imunes, que contêm cromatina, presentes no LES, accionam o CD16 e o receptor Toll-Like (via dependente ou independente) nas C.Ds. (Boule *et al* 2004)

Este estímulo conjunto induz a expressão de BAFF, que pertence à superfamília do factor de necrose tumoral (TNF) e está implicado na patogénese do LES. Adicionalmente, os complexos imunes que contêm DNA ou RNA, também presentes no LES, activam as C.Ds. através de receptores Fc, estimulando a produção de IFN-α, uma citocina chave, implicada na patogenia do LES. Apesar de os exemplos acima citados fornecerem evidência da patogenia dos auto-anticorpos, a maioria dos auto-anticorpos descritos não têm um papel definido na patogenia ou simplesmente são irrelevantes para o seu inicio ou manutenção. Contudo, a detecção de auto-anticorpos podem ajudar no diagnóstico da doença [p.ex. Factor Reumatoide (FR) para Artrite Reumatoide (AR), ou Anticorpos anti-nucleares (ANA) para LES] e potencialmente servir como marcadores da actividade da doença. (p.ex. anti-dsDNA no LES). (Rahman *et al*, 2008)

INTERACÇÃO CÉLULA B- CÉLULA T

A maioria das doenças auto-imunes envolve as células B, não só pela acção directa dos anticorpos mas também pela sua capacidade de modular a actividade das células T e C.Ds. Consistentemente com a importância das células no desenvolvimento das doenças auto-imunes e linfoproliferativas, os ratos com predisposição ao desenvolvimento de LES (MRL/lpr), mas completamente deficientes em células B (ratos μMT MRL/lpr), exibiram uma considerável diminuição da produção de auto-anticorpos, da linfoproliferação, ou da glomerulonefrite, com um aumento substancial na sobrevivência. Surpreendentemente, os ratos transgénicos (mIgM

MRL/lpr), que apenas expressam a forma IgM de membrana e são incapazes de segregar anticorpos ou auto-anticorpos, desenvolveram significativamente menos, glomerulonefrite ou mortalidade comparado com os ratos MRL/lpr com a linhagem de células B integra mas em valores mais significantes do que nos ratos μ MT MRL/lpr. (Chan *et al*, 1999)

Este facto também foi verificado em modelos de ratos mlgM diabéticos que apresentavam incidência de diabetes mais baixa do que o modelo selvagem, mas mais alta do que os modelos com ausência total de células B. (Wong *et al* 2004)

Ao contrário do rato MLR/lpr, o rato μ MT MRL/lpr não desenvolve doenças mediadas por auto-anticorpos ou por complexos imunes, mas exhibe diminuição maciça na activação das células T CD4 e CD8, assim como, menos infiltração linfocítica nos órgãos alvo. Além disto a acumulação de células memória T CD8 é inibida cerca de 10 vezes mais na ausência de células B. (Chan *et al*, 1999)

As células B podem activar as células T CD8 directamente ou com apresentação cruzada via activação das células T CD4. Os investigadores testaram um rato onde as células B apenas tinham falta de β 2-microglobulina e por isso sem expressão MHC I (*major histocompatibility complex class I*) e, mesmo assim, eram capazes de activar as células T CD4+ e CD8+. (Chan *et al*, 2000)

Assim a activação directa das células T pelas células B pode ocorrer independentemente da apresentação cruzada de antígenos (auto-antígeno apresentado através de MHC classe I das células B às células T CD8+). Além disto, através de um modelo de artrite induzida por proteoglicano usando ratos mlgM MRL/lpr, a apresentação do antígeno pelas células B foi necessária para a activação das células T e, concluiu-se que o desenvolvimento de doença inflamatória grave requer a presença de anticorpos patogénicos e da activação das células T. Em conjunto, estes dados indicam o papel significante da activação directa das células T pelas células B em vários modelos que simulam a auto-imunidade. (O'Neill *et al*, 2005)

Evidências adicionais, indicando um importante papel das células B na orientação da função das células T, são fornecidas por experiências que envolvem o bloqueio CD40/CD40L. O bloqueio do CD40, que é membro da superfamília TNF (*Tumor necrosis factor*), através do anticorpo monoclonal anti-CD40L demonstrou ser benéfico em alguns modelos de ratos com LES, Encefalite Alérgica, Artrite Inflamatória e Colite. Como era de prever, o anti-CD40L bloqueia a troca de classe da Imunoglobulina (Ig) e as mutações somáticas, diminui os anticorpos anti-dsDNA e a

infiltração de células B nos órgãos alvo, e induz um estado geral de inatividade das células B. Além disto, esta inibição provoca um período de não responsividade das células T. (Bourgeois et al, 2002)

SECREÇÃO DE CITOCINAS

As células B podem segregar citocinas e quimiocinas, incluindo IL-6, MIP1 α , MIP1 β , que podem modular a maturação, migração e a função das células dendríticas (C.Ds.). As C.Ds. de ratos deficientes em células B, produzem níveis elevados de IL-12 e uma diferenciação díspar das células T que segregam IL-4. (Martin *et al* 2006)

NEOLINFOGÊNESE

Vários estudos têm demonstrado que a formação e manutenção dos órgãos e estruturas linfóides baseiam-se em redes de sinalização de moléculas da família TNF/TNFR, integrinas e quimiocinas, demonstrando uma importante função das células B e que um bloqueio destas vias de sinalização resulta na desagregação das estruturas linfóides. (Drayton *et al*, 2006)

Folículos tipo linfóide foram descritos na bolsa sinovial em doentes com AR, nas glândulas salivares inflamadas na S. de Sjogren, no compartimento meníngeo na esclerose múltipla, e nos lobos da tireóide em pacientes com Tireoidite Auto-imune e nos rins de doentes com Nefrite Lúpica. (Aloisi *et al*, 2006)

Na artrite reumatóide foram descritas três apresentações distintas. O primeiro tipo tem todas as características de uma estrutura linfóide, sendo indistinguível dos gânglios linfáticos. O segundo, tem células T, células B e células dendríticas de maneira semi-organizada. O terceiro tipo caracteriza-se por células T isoladas e células B sem as típicas células dendríticas na sua proximidade. Visto que os dois primeiros tipos não surgem em todos os pacientes não são consideradas essenciais na patogênese de todas as doenças auto-imunes. Contudo, devido à heterogeneidade das doenças auto-imunes e devido ao seu surgimento nos órgãos alvo, estas estruturas desempenham um papel importante em subgrupos destes doentes. Estas fases podem, talvez, corresponder a fases distintas da organização

inflamatória no tecido sinovial e poderá isto representar uma razão para que a terapêutica seja mais eficaz antes da agregação linfática.

No interior destas estruturas linfóides, as células podem proporcionar um ambiente catalisador para a geração de sinais inflamatórios e para a activação de células T e células dendríticas, contribuindo em larga escala para a doença inflamatória. Foram implantados tecidos sinoviais no tecido cutâneo de ratos e neste modelo, a interrupção dos sinais de co-estimulação das células T-B, assim como, a depleção das células B anularam a manutenção dos folículos ectópicos assim como a activação das células T e mielóides. Estes dados sugerem um papel importante das células B na neolinfogénese ectópica, e realça uma possível vantagem do uso das células B como alvo nas doenças auto-imunes. (Takemura *et al*, 2001)

DEPLEÇÃO E INIBIÇÃO DAS CÉLULAS B

Para compreender melhor o papel das células B na auto-imunidade, muitos estudos basearam-se na sua inibição ou depleção. Assim as três principais estratégias usadas foram: o uso de anticorpos anti-proteínas de superfície das células B; geração de proteínas de fusão ou anticorpos que bloqueassem os sinais celulares que permitem a sobrevivência destas células; e a geração de anticorpos que activam as vias da apoptose. Os alvos das terapias experimentais foram-se modificando, melhorando assim a experiência nesta área. (Martin *et al*, 2004)

ALVOS POTENCIAIS PARA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B

RECEPTOR DE ANTIGÉNIO DAS CÉLULAS B (BCR)

O BCR é um complexo multi-protéico contendo uma imunoglobulina (Ig) de membrana IgD ou anticorpos IgM e associa-se a heterodímeros Ig- α e Ig- β que intervêm na transdução de sinal. Os sinais gerados através da activação de BCR são cruciais ao desenvolvimento das células B e à resposta aos antígenos. Defeitos na sinalização de BCR podem resultar em imunodeficiência ou em predisposição à auto-imunidade. A geração e manutenção das células B auto-reactivas são reguladas pela estimulação dos auto-antígenos que é mediada pelo BCR. (Blank *et al*, 2007)

Já em 1980 Cooper *et al* demonstrou, em ratos, que o tratamento perinatal com anticorpos policlonais anti-Ig diminuiu eficazmente as células B com Ig de superfície,

verificando que as células imaturas recém-formadas e libertadas do órgão linfóide primário detêm uma sensibilidade peculiar à depleção com anti-Ig. No entanto esta estratégia foi muito menos aplicável em ratos adultos porque estes possuem grandes concentrações de Ig circulante que anula os anti-Ig.

Posteriormente, Cerny *et al* (1987) usou anticorpos monoclonais directamente para IgD de superfície, ultrapassando os elevados níveis de IgM circulantes. Esta técnica mostrou-se bastante eficaz na diminuição do número de células B circulantes. Contudo, apesar do seu sucesso em termos experimentais, esta estratégia estava limitada como uso terapêutico, visto que, a maioria das células patológicas tem uma alteração dos isótipos, não expressando IgD de membrana.

De modo a ultrapassar estas limitações, foram usadas outras abordagens, que em vez de usarem como alvo o BCR, passaram a usar como alvo, os componentes da sinalização transmembranar associados ao BCR e o CD79. Todavia, o desenvolvimento destes reagentes parou, em parte, devido ao baixo grau de ligação aos receptores de membrana das células B, o que resultava em pouca eficiência na indução da apoptose e em escassa depleção das células alvo. (Zhang *et al*, 1995)

Actualmente está descrito o uso de Ig intravenosas em várias patologias auto-imunes. Estas Igs consistem em IgG normais inespecíficas obtidas a partir do plasma de milhares de dadores, e o seu mecanismo de acção ainda não está esclarecido. A principal hipótese postula que a sua eficácia resida na neutralização dos auto-anticorpos impedido que estes activem o sistema BCR. Mais recentemente, têm-se desenvolvido estudos no sentido de criar Igs com mais especificidade para determinadas doenças auto-imunes, tendo estes estudos mostrado resultados bastante encorajadores, no entanto, são necessários mais estudos nesta área para a possível aplicação na prática clínica. (Blank *et al*, 2007)

CD20

CD20 é uma proteína transmembranar pouco expressa nas células pré-B, ascendendo a sua expressão para cerca de 90 000 cópias por célula nas células B, tanto normais como malignas, e sendo a sua expressão nula nos plasmócitos. (Uchida *et al*, 2004) No entanto, estes podem ser induzidos a produzir CD20 através de cultura com Interferão- γ . Ratos com expressão de CD20 nula não demonstram um fenótipo específico e aparentam ter respostas das células B normais. Assim, a sua função

específica nas células B permanece desconhecida, tendo os estudos com anti-CD20 um papel crucial para o seu entendimento. (Eisenberg *et al* 2005)

O anticorpo monoclonal Anti-CD20 (Rituximab) realiza a depleção eficaz dos linfócitos B humanos por períodos de três meses até mais de um ano, através de mecanismos que envolvem principalmente o receptor Fc, mas também, o complemento e os sinais pró-apoptóticos, entre outros. (Grillo-Lopez *et al*, 1999)

A cinética da depleção das células B varia entre os diferentes subgrupos de células B, assim, a depleção ocorre rapidamente nas células circulantes no sangue (atingindo > 90% de depleção em minutos), lentamente nas células B dos gânglios linfáticos e baço e (atingindo 60 a 70% de depleção em um dia) e ainda mais lentamente nas células B da cavidade peritoneal (depleção significativa só se verifica após sete dias). A análise de amostras esplénicas revelou que, o micro-ambiente influencia a sensibilidade à depleção das células B, sendo que, enquanto ocorre uma depleção > 90% das células B foliculares em dois dias, as células da zona marginal apresentam uma depleção de apenas 25-50%. Tal como a zona marginal, as células B da cavidade peritoneal (principalmente B1) e as células do centro germinativo demonstram a maior resistência relativa ao tratamento com anti-CD20. A resistência destes subgrupos não se deve à falta de expressão de CD20, visto que, todas estas células expressam CD20 em quantidades semelhantes às células B foliculares mais sensíveis. As diferentes sensibilidades também não se devem a diferenças na biodisponibilidade do anticorpo monoclonal, dado que, em todos estes subgrupos, a molécula CD20 se encontra saturada com esta terapêutica. A resistência das células B da zona marginal também não se deve a factores intrínsecos, visto que, quando estas são mobilizadas para a circulação sanguínea, estas tornam-se susceptíveis à depleção com anti-CD20. Do mesmo modo, quando as células são inibidas de sair dos gânglios linfáticos ficam protegidas contra a depleção pelo anticorpo. Estes dados realçam a importância do acesso intravascular, que se deve ao facto de, as células B da circulação, dos gânglios linfáticos, peritoneais e foliculares esplénicas serem eliminadas pelas células de Kupffer hepáticas por um mecanismo mediado pelo receptor Fc.

Experiências em modelos animais com quimera de medula óssea, verificaram que as células B da zona marginal sofrem depleção completa na presença de um competidor célula B CD20 negativo, sugerindo que o microambiente participa na protecção celular, na ausência de competição para factores de resgate locais. Assim,

o bloqueio do factor de sobrevivência BAFF/BLyS com a proteína de fusão BR3-Fc actua sinergicamente com o anticorpo monoclonal anti-CD20 aumentando a depleção das células B.

Assim, o acesso intravascular, a localização e o microambiente são as explicações mais plausíveis para estas diferenças. (Gong *et al* 2005)

CD52, CD40, CD22

Os investigadores têm dirigido esforços essencialmente na depleção das células B, tendo como alvo antigénios preferencialmente expressos nas células B.

O **CD52** além de ser expresso pelas células B e T normais e malignas, também é expresso por grupos de células medulares CD32+, células NK, monócitos, macrófagos, e alguns tecidos do sistema reprodutor masculino. O Alemtuzumab, que é um anticorpo monoclonal anti-CD20, origina a depleção tanto de células T como células B e, alguns estudos, sem ocultação e não comparativos, têm demonstrado eficácia no tratamento de Leucemias Linfocíticas Crônicas de células B resistentes à fludarabina. (Robak, 2005)

O **CD40** é altamente expresso nas células B e é um transdutor de sinal de activação destas células. Dullforce *et al* (1998) verificou que o tratamento de ratos com o anticorpo monoclonal anti-CD40 originava um aumento das respostas independentes das células T em vez da inibição do sistema imune. Contudo, em 2002 Pearson *et al* mostrou, em primatas não humanos (PNH), que o uso de anti-CD40 pode ser eficaz na transplantação renal.

O início da sinalização BCR é balanceada por co-receptores positivos (CD19, CD21) e negativos (CD22).

O **CD22** é uma proteína transmembranar restrita das células B, expressa tanto nas células normais como nos linfomas de células B não Hodgkin e controla os limiares de sinalização BCR, através de três factores citoplasmáticos inibitórios que recrutam as proteínas de sinalização inibitórias SHIP e SHP1. O Epratuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD22 e tem demonstrado actividade clínica potencial. (Tedder *et al*, 2005)

A combinação deste anticorpo com agentes quimioterapêuticos, apesar de levantar maiores questões de segurança, revelou não só a depleção das células B como também, eficácia no tratamento de murinos com artrite induzida pelo

colagénio. Curiosamente os antígenos anti-colagénio não se alteram, o que suporta mais uma vez um papel das células B independente dos anticorpos, na patogenia da artrite inflamatória. (Dunussi-Joannopoulos *et al* 2005)

Os esforços que estão a decorrer no desenvolvimento de terapias dirigidas a outros alvos das células B incluindo CD19, CD23, CD80 e HLA-DR, certamente irá ajudar a compreender melhor os princípios celulares da imunoterapia. (Martin *et al*, 2004)

BLOQUEIO DA SOBREVIVÊNCIA E DA ACTIVAÇÃO DAS CÉLULAS B

Algumas citocinas desempenham funções essenciais para o desenvolvimento e diferenciação das células B.

Em ratos, a **IL-7** actua como factor de crescimento em células pró-B e pré-B, expandindo-as nos órgãos linfóides primários antes da sua diferenciação em células B imaturas ou células B maduras. O bloqueio da função de IL-7 em murinos com anti-IL-7 ou bloqueando o receptor de IL-7 com anticorpo monoclonal, inibe o desenvolvimento precoce das células B, assim como, inibe a geração de novas células B imaturas à periferia. Apesar deste papel nas células B de ratos, em humanos, a IL-7 tem um papel no desenvolvimento das células T, mas não das células B. Contudo, e mais importante para uma abordagem terapêutica, verificou-se que existe uma dependência secundária de IL-7 nas linhagens de células B tanto de ratos como de humanos. As diferenças entre a biologia das células de ratos e as células humanas geram barreiras na avaliação do potencial terapêutico desta abordagem. (Giliani *et al* 2005)

A **IL-21** é produzida especificamente por um grupo de células T activadas que entram nos folículos de células B após o contacto com o antígeno e fornecem células T help para activação antígeno-específica das células B. A hipersecreção de IL-21 origina, em modelos animais, patologia lúpus-like caracterizada por glomerulonefrite proliferativa focal com deposição de complexos imunes com IgG, hepatite necrotizante, anemia e trombocitopenia auto-imune. Esta citocina tem funções diversas visto que o seu receptor é expresso por células B, células T, células NK e células dendríticas. Assim, são necessários mais estudos para definir tanto o seu potencial terapêutico, como a segurança desta abordagem nas doenças auto-imunes. (Ozaki *et al*, 2004)

A **IL-10** também tem sido implicada no crescimento das células B humanas. Esta citocina actua *in vitro* sinergicamente com IL-2, IL-4 e IL-5, aumentando o tempo de vida e a activação das células B. Os seus efeitos sinérgicos com estas citocinas estimuladoras do crescimento das células B, juntamente com a sua acção diversificada na apresentação de antígenos pelas células dendríticas e macrófagos e os seus efeitos inibitórios da função das células T fazem de IL-10 um alvo interessante mas também um desafio da investigação. (Asadullah *et al*, 2003)

BAFF/BLYS E OS SEUS RECEPTORES BAFFR/BR3, TACI, BCMA.

Durante os últimos anos, o factor activador das células B BAFF/BLYS (membro da família do TNF), tem-se mostrado decisivo para a sobrevivência das células da linhagem B além do estágio transição. BAFF/BLYS é produzido por células estromais rádio-resistentes e células mielóides activadas e apresenta receptores nas células B, principalmente o receptor BAFFR/BR3 e em menor grau os receptores TACI e BCMA. O BAFF através do seu receptor BAFFR/BR3 desponta a activação do factor transcripcional NFkB2 e da cinase serinotreonina PIM2, o que origina um estímulo anti-apoptótico através da activação do factor de sinalização Bcl-2 e da inibição do factor de sinalização Bad. As investigações neste campo, verificaram que ratos deficientes em BAFF ou BAFFR ou, ainda, com bloqueio da interacção entre estes dois elementos através da utilização de BAFFR/BR3-Fc, TACI-Fc e BCMA-Fc, apresentaram uma redução marcada de células da linhagem B. (Kalled, 2005)

A cinética da modulação das células B usando inibidores BAFF, comparada com o tratamento com anti-CD20, é ligeiramente mais lenta, iniciando ao terceiro dia e atingindo 80-95% em 7-14 dias. Ao contrário da depleção mediada pelo anticorpo anti-CD20, as células B dos gânglios linfáticos e as células esplénicas (foliculares e zona marginal) são igualmente sensíveis ao bloqueio BAFF. Pelo contrário, o desenvolvimento e manutenção das células B linhagem B1 da cavidade peritoneal são independentes de BAFF.

As células B auto-reactivas competem com as células B normais para este factor de sobrevivência crítico que é o BAFF, mostrando que, as células B auto-reactivas parecem exibir grande dependência do BAFF para a sua sobrevivência. Do mesmo modo, verificou-se que as células B autorreactivas são competitivamente eliminadas em ambientes com limitação de BAFF. (Mackay, 2005)

Em ratos transgénicos com aumento da expressão de BAFF/BLyS ocorre expansão de todas as células B esplénicas, com um grande efeito nas células de transição e células B da zona marginal, o que resulta no desenvolvimento de manifestações Lupus-like ou Síndrome Sjogren like. Por outro lado, o bloqueio de BAFF/BLyS (BAFFR/BR3-Fc, TACI-Fc, BCNA-Fc) em modelos murinos com lúpus, inibe directamente as células B, inibe a activação secundária das células T e reduz os títulos de anticorpos, aumentando assim a sobrevivência. (Kalled, 2005)

Associada à observação de que os níveis de BAFF se encontram elevados em vários distúrbios auto-imunes, o bloqueio de BAFF oferece uma oportunidade de poder afectar preferencialmente as células B auto-reactivas. (Mackay, 2005)

PARTE II – A CLÍNICA

TERAPIAS ANTI-CÉLULA B NA ARTRITE REUMATÓIDE (AR): DADOS CLÍNICOS

A AR é uma das doenças auto-imunes melhor estudada, sendo que a maioria da informação acerca dos efeitos da depleção de células B na AR deriva de ensaios clínicos com o Rituximab, que está disponível para o tratamento do linfoma desde 1997. O Rituximab é um anticorpo monoclonal geneticamente modificado, composto por porções com origem no rato e no homem e que tem como alvo o marcador de superfície das células B - CD20. Esta ligação selectiva induz a morte celular e apesar dos mecanismos envolvidos não estarem completamente compreendidos, evidência experimental suporta o envolvimento de pelo menos 3 mecanismos:

A **Citotoxicidade dependente do complemento**, que envolve a proteína do sistema complemento C1q, formação de poros circulares na membrana celular resultando no compromisso da integridade membranar, o que leva, por fim, à lise celular.

A **Citotoxicidade celular dependente dos anticorpos**, que leva ao dano da membrana e lise celular via recrutamento de macrófagos, células NK, e células T citotóxicas.

A **Apoptose**, induzida directamente pela ligação do Rituximab ao CD20

E a **Inibição do crescimento**. (Cragg, 2005)

O Rituximab foi inicialmente aprovado em 1997 para o tratamento do linfoma Não-Hodgkin de células B em casos de recidiva ou refractário, e de baixo grau ou

folicular. Em 2006 foi aprovado pela FDA para o uso na AR após a demonstração da sua eficácia em ensaios clínicos. (Mease, 2008) Os primeiros casos descritos que demonstravam a eficácia deste fármaco na AR, foram publicados entre 1999 e 2002 e consistiam em estudos não randomizados, nem controlados e não envolvendo mais de 5-10 doentes. (De Vita *et al*, 2002)

EFICÁCIA CLÍNICA DO RITUXIMAB

O primeiro estudo randomizado, controlado, com dupla ocultação, que visava o uso de Rituximab em pacientes com AR consistiu num ensaio clínico de fase II envolvendo 161 pacientes com AR activa, apesar do tratamento com Metotrexato (MTX). Estes pacientes foram então divididos aleatoriamente em 4 grupos tendo recebido um de 4 tratamentos possíveis. O grupo que serviu como controlo recebeu MTX na dose que recebia habitualmente (pelo menos 10mg/semana), outro grupo manteve o MTX e acrescentou Rituximab ao tratamento, um terceiro grupo recebeu Rituximab com Ciclofosfamida (750mg IV nos dias 3 e 17) e o último grupo parou a toma habitual de MTX e recebeu Rituximab como monoterapia. Nestes 3 regimes o Rituximab foi administrado IV na dose de 1000mg ao dia 1 e ao dia 15 de tratamento. De referir ainda que, todos os pacientes receberam concomitantemente glicocorticóides. Às 24 semanas as proporções de pacientes que atingiram 50% de melhoria dos sintomas de acordo com os critérios ACR (American College of Rheumatology [ACR50]) foram 43% para rituximab-MTX, 41% para rituximab-ciclofosfamida, 33% para monoterapia com rituximab e 13% para monoterapia com MTX. Foram encontrados tendências semelhantes para ACR20 e ACR70 (melhorias de 20% e 70% respectivamente) e as respostas mantiveram-se por 48 semanas. (Edwards *et al*, 2004)

O rituximab continua a ter efeito benéfico durante pelo menos 2 anos. Cerca de 45% dos pacientes que receberam rituximab mais MTX completaram 2 anos de seguimento sem a necessidade de tratamento posterior, comparado com 15% dos que receberam placebo mais MTX, 10% dos que receberam rituximab isolado e 22% dos que receberam rituximab mais ciclofosfamida. Era considerada a repetição do tratamento quando houvesse um aumento >20% da tumefacção e dor da articulação. A necessidade de repetir o tratamento era determinada em última instância pelo médico. (Strand *et al*, 2006)

Emery P et al em 2006 levaram a cabo um ensaio clínico de fase IIb que visava avaliar a eficácia de diferentes doses de rituximab mais MTX com e sem glicocorticóides (GCs), em pacientes com AR refractária aos medicamentos modificadores de doença, inclusive aos agentes biológicos. Neste estudo conhecido por DANCER (Dose-Ranging Assessment iNternational Clinical Evaluation of Rituximab in RA), tanto a dose standard (1000mg x 2) como a dose reduzida (500mg x 2) de rituximab em combinação com MTX concederam números significativamente superiores de ACR20 e ACR50 e respostas “boas/moderadas” na escala da European League Against Rheumatism (EULAR) quando comparadas com MTX associado a um placebo. As respostas ACR70 e EULAR “boas”, foram mais frequentes em pacientes que receberam a dose *standard*. A eficácia não foi afectada pelo uso concomitante de altas doses de GCs entre as infusões. Ambas as doses de rituximab foram bem toleradas com baixa incidência de efeitos adversos. Extensões deste ensaio clínico, indicaram que o retratamento foi eficaz a seguir a um ciclo completo de terapia com rituximab em pacientes que, apesar de terem resposta numa primeira instância, recidivaram durante o follow-up. (Emery et al, 2006)

O estudo de fase III conhecido por REFLEX (Randomized Evaluation of Long-term Efficacy of rituximab in RA), randomizado, com dupla ocultação, foi delineado para determinar a eficácia e a segurança do rituximab em pacientes com AR activa que tiveram, anteriormente, uma resposta inadequada a agentes anti-TNF (incluindo etanercept, infliximab, ou adalimumab). Todos os pacientes receberam também ácido fólico, metilprednisolona intra-venosa (IV), e prednisona oral durante as duas semanas de tratamento. A terapia com rituximab associado a MTX mostrou ser significativamente superior que MTX mais placebo tendo como referência medições às 24 semanas usando as escalas ACR (ACR20 51% vs.18%, ACR50 27% vs. 5%, ACR70 12% vs. 1%) e a EULAR (resposta moderada/boa 65% vs. 22%). (Cohen *et al* , 2006)

A eficácia e segurança de infusões repetidas de rituximab têm sido avaliadas através de extensões dos ensaios de fase II e III citados acima (incluindo o REFLEX e o DANCER) envolvendo um total de 1039 doentes. Destes, 570 receberam 2 ciclos de rituximab, 191 receberam 3 e 40 pacientes receberam 4 ciclos da terapêutica. As respostas ACR20, ACR50, ACR70 foram semelhantes quer após o primeiro ciclo, quer após os ciclos subsequentes, assim como, os efeitos adversos foram observados mais frequentemente nos primeiros 3 meses. Visto isto, os autores concluíram que o

tratamento com múltiplos ciclos de rituximab tem respostas clínicas sustentadas e sem novos efeitos adversos. (Keystone *et al* 2007)

O relatório preliminar de um follow-up de 6 anos dos ensaios clínicos com rituximab, incluiu um total de 2578 que receberam múltiplos tratamentos, de modo que, 1890 receberam pelo menos 2 ciclos, 1043 pelo menos 3 e, 425 pelo menos 4 e 133 receberam 5 ciclos sem revelar aumento do total de efeitos adversos, efeitos adversos significativos ou aumento das taxas de infecção. No entanto a partir do 5º ciclo parece haver uma tendência para o aumento das infecções graves apesar de o número de doentes ainda ser pequeno até a data para se poder concluir. (van Vollenhoven *et al*, 2008)

Thurlings *et al* (2008), avaliaram 30 doentes que receberam mais de 3 ciclos de rituximab em intervalos de pelo menos 6 meses, independentemente da resposta inicial ao 1º ciclo de rituximab, tendo em conta a escala EULAR. Dos 24 que foram eleitos a retratamento, 7 não tinham respondido ao primeiro ciclo de tratamento e continuaram a não responder aos sucessivos ciclos desta terapêutica. Pelo contrário, os 17 doentes que tinham respondido ao primeiro ciclo, experienciaram respostas semelhantes aos ciclos subsequentes. Os autores concluíram que o retratamento com rituximab não é efectivo em pacientes que não mostraram melhorias após o primeiro ciclo, sendo consistente com a noção de que esses doentes representam um subgrupo patogeneticamente distinto.

A SEGURANÇA DO RITUXIMAB

Os ensaios clínicos conduzidos até à data têm mostrado que o rituximab é bem tolerado na maioria dos doentes com AR, sendo o perfil de segurança descrito no seu uso na AR semelhante ao descrito durante o tratamento de Linfomas. De referir que a incidência de efeitos adversos relacionados com a infusão foram menores durante o tratamento de AR do que dos linfomas. Ainda assim são frequentes a ocorrência de efeitos adversos leves/moderados em doentes tratados com rituximab, ocorrendo principalmente durante a primeira infusão, atingindo cerca de 30-45% dos pacientes.

A maioria das infusões de rituximab é acompanhada pela sensação moderada de aperto na garganta. Outros efeitos laterais são: hipotensão, hipertensão, febre e arrepios, eritema, prurido, náuseas, e dor lombar. Pensa-se que estas manifestações se devam à libertação de citocinas causada pela lise de células B. Reacções anafiláticas graves ou broncoespasmo são raros, contudo, aquando da infusão, deve

estar disponível medicação para responder as estas eventuais reacções, o que inclui, metilprednisolona, solução salina para administração IV, broncodilatadores inalatórios e epinefrina intra-muscular. (Edwards *et al*, 2004)

Frequentemente é usada pré-medicação para evitar as reacções de infusão. Uma abordagem consiste em medicar os pacientes com Paracetamol (625 mg P.O.) e difenidramina (50 mg P.O.) antes de cada infusão. Uma dose de metilprednisolona (100mg) 30 minutos antes da infusão também tem sido usada em alguns ensaios clínicos. O estudo DANCER demonstrou que o uso de CTs orais, não apresentou efeitos significativos na incidência das reacções durante a segunda infusão. Além disto, mesmo com a pré-medicação a proporção de pacientes que sofrem reacções de infusão é significativo. (Emery *et al*, 2006)

A percentagem de reacções de infusão decresce para cerca de 15% durante os ciclos posteriores de rituximab. (Fleischmann *et al*, 2006)

O possível risco teórico de infecções graves tem preocupado a comunidade clínica, no entanto, este não parece estar significativamente aumentado em adultos tratados com rituximab, em comparação com aqueles tratados com MTX. Por exemplo, no ensaio clínico de fase II referido acima ocorreram infecções graves em 2,5% dos doentes tratados com MTX, e em 3% dos doentes tratados com rituximab associado. De referir que ocorreu uma morte por pneumonia no grupo tratado com rituximab em monoterapia, e um paciente desenvolveu bacteriémia estafilocócica e artrite séptica no grupo tratado com rituximab associado a ciclofosfamida. (Edwards *et al*, 2004)

No ensaio clínico REFLEX não se verificou diferença significativa na incidência de infecções entre os grupos, tendo ocorrido infecções graves em 3,7% no grupo placebo e 5,2% no grupo tratado com rituximab. Todas as infecções deste último grupo se resolveram sem sequelas, excepto um caso de celulite gangrenosa que cursou com amputação do primeiro dedo do pé. Nenhum paciente contraiu Tuberculose ou outra infecção oportunista durante as 24 semanas do estudo. (Cohen *et al*, 2006)

Apesar de, nos ensaios clínicos, não ser aparente o aumento da incidência de infecções oportunistas, têm sido reportadas infecções graves de reactivação vírica, por vezes fatais, associadas ao uso de rituximab. A ocorrência de 2 casos de Leucoencefalopatia multifocal progressiva em doentes com LES e um caso num

doente com AR, tratados com rituximab levou a FDA (United States Food and Drug Administration) a emitir avisos de alerta. (Calabrese et al, 2007)

Foram também descritos recentemente infecções graves por Citomegalovirus, reactivação da Hepatite B, e babesiose resistente, associado ao tratamento com rituximab em pacientes previamente em doentes imunodeprimidos. (Krause *et al*, 2008)

APLICAÇÃO DA TERAPIA COM RITUXIMAB NA PRÁTICA CLÍNICA

O Rituximab em combinação com o MTX, está indicado para pacientes adultos com AR activa de intensidade moderada a intensa, que previamente não tenham respondido a uma ou mais terapias anti-TNF, ou que tenham perdido a capacidade de resposta a esta terapêutica com o tempo, ou ainda, que tenham tido efeitos adversos aquando do uso de anti-TNF. (Assous *et al*, 2008)

Apesar de a dose 500mg se ter mostrado tão eficaz como a dose 1000mg no ensaio clínico de fase IIb DANCER, apenas a dose mais alta foi avaliada no ensaio clínico de fase III REFLEX. Assim, a dose standard aprovada pela FDA consiste na administração de duas infusões IV de 1000mg cada, com duas semanas de intervalo. Para reduzir as reacções adversas da administração IV é, globalmente, recomendada a administração de 100 mg IV de Metilprednisolona 30 minutos antes da administração de rituximab, podendo ainda ser usados paracetamol e difenidramina. A administração de rituximab leva à depleção quase completa das células B em duas semanas após a primeira dose (a depleção das células B é medida pela contagem de células B periféricas CD19+ uma vez que este marcador é co-expresso com CD20 e porque a presença do anticorpo monoclonal anti-CD20 no plasma pode interferir com a contagem). A maioria dos pacientes mostra depleção das células B periféricas durante pelo menos 6 meses, com uma pequena proporção de pacientes (4%) mantendo esta depleção por longos períodos, podendo atingir mais de três anos. (Mease *et al*, 2008)

Têm aumentado os estudos que visam definir o intervalo ideal entre ciclos aquando da necessidade de re-tratamento com rituximab e, até à data, as evidências apontam que o intervalo óptimo entre ciclos é entre 6 a 12 meses. (Keystone *et al* 2007)

Evidências em pacientes com linfoma e LES, tratados rituximab sugerem que a depleção de células B diminui a resposta do sistema imune à vacinação. Por este motivo é recomendado que as vacinas necessárias sejam administradas antes do início do tratamento com este fármaco. (Looney *et al* 2007)

TERAPIAS EMERGENTES ANTI-CD20 NA AR

Um Ensaio Clínico (HuMax-CD20) de fase II, randomizado, com dupla ocultação e controlado com placebo, está a testar o uso do **Ofatumumab** (um anticorpo monoclonal completamente de origem humano) em pacientes com AR activa. Os primeiros resultados revelaram que as respostas ACR20 foram atingidas às 24 semanas em 41-50% dos pacientes tratados com este fármaco, em comparação com os 9% atingidos no grupo placebo. (Ostergaard *et al* 2007)

Um ensaio clínico recente de fase I/II estudou 237 pacientes com AR severa/moderada reportou que o **Ocrelizumab**, um anticorpo monoclonal humano, foi bem tolerado e demonstrou actividade clínica com todas as doses estudadas (10, 50, 200, 500, 1000 mg) às 24 semanas. Está a ser realizado um ensaio clínico de fase III para avaliar a segurança deste fármaco na AR e no LES. (Hutas, 2008)

TRU-015 é outro agente anti-CD20 que não se trata de um anticorpo monoclonal mas sim de uma pequena cadeia polipeptídica simples recombinante. Num ensaio clínico de fase II, randomizado, com dupla ocultação, e controlado com placebo, o uso das doses 800 mg e 1600 mg de TRU-015 levou a melhorias significativas na actividade da AR em comparação com o placebo. (Mease, 2008).

OUTRAS TERAPIAS ANTI-CÉLULAS B

Têm sido desenvolvidos outros agentes específicos para as células B que têm como alvos outros marcadores de superfície das células B (ex. CD22), ou receptores que modulam a função destas células como o BLYS (= BAFF) e APRIL (um ligando indutor da proliferação associado ao BAFF). (Dorner *et al*, 2007)

Apesar destes agentes ainda se encontrarem em fase de ensaios clínicos, alguns têm, já, evidenciado eficácia na AR e outras doenças auto-imunes.

Belimumab (BmAb) é um anticorpo monoclonal humano que inibe a actividade de BLYS/BaFF. Num ensaio clínico de fase II envolvendo 238 indivíduos, este anticorpo

foi comparado com placebo como tratamento em doentes com AR previamente tratados com medicamentos modificadores da doença e terapias biológicas. O BmAb mostrou-se bem tolerado e a resposta AR20 às 24 semanas foi modesta (29% vs. 16%). Ocorreram também reduções significativas do número de células B às 20-24 semanas. Apesar de o seu papel no tratamento da AR não estar esclarecido, este fármaco pode demonstrar no futuro alguma utilidade em regimes de tratamento combinados com outros agentes anti-células B, nomeadamente associado ao rituximab e como terapia de manutenção. (Mckay *et al* 2005)

Atacicept (Ig-TACI) é uma proteína de fusão antagonista da manutenção das células B e dos factores de sobrevivência BlyS e APRIL. Esta proteína tem-se mostrado capaz de induzir a diminuição (dose-dependente) das células B maduras do sangue periférico. Os dados farmacocinéticos obtidos num ensaio clínico de fase I sugerem que, doses repetidas de atacicept originam uma redução significativa dos níveis de Imunoglobulina, incluindo uma diminuição de 41-44% de Factor Reumatóide no grupo tratado com a maior dose. De referir ainda que o atacicept foi bem tolerado e mostrou bons indícios nos resultados ACR20 em doentes com AR activa de intensidade moderada. São necessários ensaios clínicos de maiores dimensões, para uma melhor compreensão da eficácia e segurança deste novo agente. (Tak *et al*, 2008)

BR3-Fc, é uma proteína de fusão recombinante humana que bloqueia o BAFF e encontra-se a ser estudada em ensaios clínicos. Os resultados de um estudo de segurança e farmacocinética/farmacodinâmica na AR, revelou uma redução do número de células B em cerca de 55%. (Vital *et al*, 2008)

TERAPIAS ANTI-CÉLULAS B EM OUTRAS DOENÇAS AUTO-IMUNES

LÚPUS ERMATOSO SISTÉMICO (LES): RITUXIMAB - DADOS CLÍNICOS

Foram realizados vários estudos não controlados, sem ocultação, com uma duração de 6-12 meses, envolvendo números reduzidos de doentes (N<20) resistentes à terapia imunossupressora standard, tendo mostrado que, de uma maneira geral, o rituximab é eficaz e bem tolerado nestes doentes. As respostas clínicas foram documentadas usando o índice clínico do British Isles Assessment Group (BILAG) e o índice de actividade de doença no LES (SLEDAI).

Looney RJ et al. (2004), realizou um ensaio clínico de fase I/II, sem ocultação no qual foi adicionado Rituximab à terapia habitual, tendo mostrado bons resultados referentes à segurança e à eficácia. Os esquemas terapêuticos usados foram: infusão única de 100 mg/m² (baixa dose), infusão única de 375 mg/m² (dose intermédia) ou 4 infusões de 375mg/m² com uma semana de intervalo entre cada infusão (dose alta). A maioria dos doentes (11/17) revelou uma depleção profunda de células B e, além disto, mostrou uma melhoria clínica que persistiu durante 12 meses, apesar da ausência de alterações significativas nos níveis de complemento e anti-dsDNA. As baixas doses estiveram associadas à não resposta e ao desenvolvimento de anticorpos quiméricos humanos (HACA).

Um estudo mais recente introduziu diferentes regimes de rituximab em pacientes com LES activo e refractário. O rituximab foi administrado em regime de 1 infusão de 500 mg por semana durante 4 semanas, ou 1 infusão de 1000 mg por semana durante 2 semanas. O tratamento foi bem tolerado e o número de células B diminuiu rapidamente durante 14 dias em todos os pacientes, tendo a depleção se mantido até 6 meses após o tratamento. Nove dos treze doentes que terminara o estudo, manifestaram resposta clínica (escala BILAG) enquanto 3 doentes desenvolveram HACA associados ao desaparecimento do rituximab do soro. (Tanaka et al,2006)

Um estudo com follow-up alargado de 38 doentes com LES com depleção de células B após tratamento com rituximab mostrou que, 33% dos pacientes se mantiveram bem, sem a necessidade dos agentes imunossupressores habituais. A maioria das agudizações ocorreram 6-12 meses após o tratamento, e os autores concluíram que o perfil de auto-anticorpos pode ser usado para identificar quais os pacientes que teriam uma resposta mais sustentada. Outro estudo envolveu 16 pacientes do sexo feminino com LES grave e refractário que foram tratadas com 1 infusão por semana de Rituximab (375 mg/m²) durante 4 semanas, combinado com 2 infusões de ciclofosfamida (0,5 mg/m²). O follow-up foi realizado ao 1º, 2º, 4º e 6º mês após o tratamento e depois de 3 em 3 meses. Este esquema terapêutico revelou bastante eficácia, com uma resposta completa ou remissão ocorrendo em, aproximadamente, 50% dos pacientes. O tempo médio para alcançar SLEDAI-50 (uma melhoria de 50 na escala SLEDAI) foi 3 meses e a média de duração da depleção das células B foi 7 meses. (Jonsdottir et al 2006)

Foram estudadas as modificações das células B no LES após a terapia com rituximab, revelando que ocorre uma melhoria abrupta das alterações na

homeostasia das células B, com uma diminuição da proporção de células B memória auto-reactivas. Os investigadores sugeriram então que, a eficácia máxima e as remissões a longo prazo com rituximab estão dependentes do restabelecimento completo da tolerância das células B com eliminação das células memória e plasmócitos auto-reactivos. (Anolik *et al*, 2004)

Têm aumentado as evidências que suportam a eficácia clínica da terapia com rituximab em pacientes com nefrite lúpica, tratando-se no entanto de estudos de pequena dimensão.

Por exemplo, num estudo sem ocultação, os doentes receberam 1 infusão por semana, durante 4 semanas, de rituximab (dose: 375mg/m²) em associação a prednisolona oral. A terapia foi bem tolerada e resultou numa depleção de células B durante 1-7 meses. Foi definida remissão completa como a normalização dos níveis de creatinina e albumina séricas, sedimento urinário inactivo e uma proteína urinária <500 mg/24H; e remissão parcial, como melhoria de 50% em todos os parâmetros renais que estavam anormais antes do tratamento. A remissão parcial foi alcançada por 8/10 pacientes em 2 meses. Cinco destes pacientes alcançaram, subsequentemente, a remissão completa que se manteve por 12 meses em 4 destes pacientes. Curiosamente a remissão clínica esteve associada à diminuição das células *T Helper*, apoiando a ideia que já foi referida, de que as células B têm um papel adicional na auto-imunidade, influenciando directamente as células T. (Sfikakis *et al*, 2005)

Noutro estudo, foram analisadas as alterações histológicas em biópsias renais realizadas antes e depois do tratamento com Rituximab (4x 375 mg/m²) em 7 mulheres com Nefrite lúpica grave e refractária. Os sinais e sintomas nefríticos melhoraram em todas as pacientes, sendo que 3 atingiram a remissão completa e 2 atingiram remissão parcial. Além disto, o perfil histológico melhorou na maioria das pacientes e os níveis de anti-dsDNA decaíram em média 100 U/ml. (Gunnarsson *et al*, 2007)

O restabelecimento das células B no sangue periférico e no tecido linfóide foi avaliado num estudo que envolveu o follow-up alargado de 15 pacientes que tinham sido tratados com rituximab durante o ensaio clínico de fase I/II descrito anteriormente. Nos 3 pacientes que estavam em remissão clínica, 5 anos após o tratamento, o total de células B memória mantiveram-se significativamente inferiores aos controlos saudáveis (6,3% vs. 30,5%). Por outro lado, os pacientes que

não responderam à terapêutica ou que apenas tiveram uma resposta a curto prazo apresentaram níveis elevados de células B, sem diferenças significativas relativamente aos controlos. A recuperação tardia das células B memória correlacionou-se com o grau de expansão das células B transitórias no sangue periférico, durante a reconstituição pós-tratamento. Contudo a biopsia de tecido da amígdala, revelou reacções do centro germinativo activas apesar dos níveis baixos de células B no sangue periférico, sugerindo que a reconstituição das células B memória no sangue periférico é retardada em função de uma recuperação lenta do tecido linfóide secundário, com implicações importantes para a tolerância e competência imunológica. (Anolik *et al*, 2007)

Os efeitos laterais referidos para o tratamento da AR, no geral aplicam-se ao tratamento do LES. De realçar apenas o surgimento de dois casos de Leucoencefalopatia (doença viral do SNC causada pela activação de um vírus latente) descritos em doentes com LES tratados com rituximab e apenas 1 em doentes com AR, no entanto, também está descrita a ocorrência de Leucoencefalopatia em doentes com LES que nunca foram tratados com rituximab. (Calabrese *et al*, 2007)

OUTRAS TERAPIAS ANTI-CÉLULAS B

Um ensaio clínico de fase I, controlado, randomizado e com dupla ocultação, testou o uso de **Belimumab** (1 infusão ou 2 infusões distanciadas 21 dias) no tratamento do LES em 57 indivíduos e, apesar de revelar ser bem tolerado pelos pacientes, ter havido redução das células B e anti-dsDNA, não houve alterações na actividade do LES. Outro ensaio clínico, multicêntrico, de fase II, envolveu 449 indivíduos com LES que foram randomizados a receber placebo ou, então, 3 infusões belimumab (aos dias: 0, 14 e 28) e, posteriormente, todos os meses durante 76 semanas. O belimumab não levou a uma melhoria dos sinais e sintomas de LES nem aumentou o período sem agudizações lúpicas que eram os objectivos primordiais, no entanto melhorou estes factores nos pacientes seropositivos. Ficou também demonstrado que com o tratamento com belimumab ocorreu uma progressão mais lenta da doença e uma menor necessidade de terapia com glicocorticoide. Encontrase a decorrer um ensaio clínico de fase III. (Ding *et al*, 2008)

Num ensaio clínico de fase Ib, o **atacept** (administração subcutânea) foi usado em 32 pacientes com LES com actividade leve/moderada, tendo sido demonstrada a

actividade biológica deste fármaco, visto que, ocorreram diminuições dose-dependente dos níveis de imunoglobulinas e do número de linfócitos do sangue periférico. Neste estudo sem dupla ocultação verificou-se uma melhoria clínica e poucos efeitos adversos associados ao atacicept. (Dall'Era et al, 2007)

O **Epratuzumab** é um anticorpo monoclonal humanizado, que se liga ao CD22 na superfície dos linfócito B, provocando uma rápida internalização com complexo anti-corpo-CD22 e a fosforilação de CD22 e, portanto, funcionando como um imunomodelador. Este fármaco não apresenta citotoxicidade dependente do complemento, mas alguma citotoxicidade dependente do anti-corpo. O Epratuzumab não causa depleção total das células B circulante mas atinge reduções na ordem dos 30-45%. (Carnahan et al, 2007) Um estudo não controlado, com duração de 12 semanas avaliou este fármaco no tratamento de 14 pacientes com LES activo e reportou que todos os pacientes toleraram o tratamento e todos obtiveram melhorias clínicas, contudo parece ter um efeito de curta duração. (Dorner et al, 2006) De referir ainda que, a combinação de rituximab com Epratuzumab, não diminuiu a capacidade do rituximab induzir apoptose, citotoxicidade dependente do anticorpo nem a citotoxicidade dependente do complemento, e além disto, parece melhorar a eficácia clínica. (Carnahan et al, 2007)

Interferir com a interacção entre as células B e as células T é um alvo teoricamente muito atractivo para o tratamento do LES, Contudo, um ensaio clínico randomizado, controlado, que envolveu 85 pacientes com LES activo (leve/moderado) tratados com uma infusão intravenosa de anticorpo monoclonal **anti-CD40L** não mostrou eficácia superior deste fármaco comparado com o placebo. (Kalunian et al, 2002)

SÍNDROME DE SJOGREN (SS)

Tem também sido evidenciado o importante papel das células B na síndrome de Sjogren e consequentemente a relevância da depleção de células B como alvo terapêutico para esta patologia.

Pijpe J, em 2005, reportou os resultados de um ensaio clínico de fase II, sem ocultação, no qual, 15 doentes com SS primário com menos de 4 anos de evolução foram tratados com uma infusão semanal de 375mg/m² de rituximab durante 4 semanas. Este tratamento resultou numa diminuição rápida das células B periféricas,

enquanto os níveis de IgG se mantiveram estáveis. Quatro pacientes desenvolveram HACA e alguns referiram sintomas semelhantes à doença do soro. Todos os doentes mostraram uma melhoria significativa da sintomatologia e alguns, um aumento da função da glândula salivar. (Pijpe *et al*, 2005) Biópsias da glândula parótida obtidas antes e depois do tratamento em alguns pacientes forneceram a primeira evidência de uma diminuição da infiltração linfóide após o tratamento. (Pijpe *et al*, 2006) Um follow-up alargado deste grupo de doentes revelou que a terapêutica foi efectiva durante 6-9 meses e que, a repetição do tratamento resultou numa resposta clínica similar. (Meijer *et al*, 2006)

Num outro estudo, que consistiu numa análise retrospectiva de 16 doentes com SS primário que tinham sido tratados com Rituximab para o tratamento de Linfoma ou manifestações sistémicas, apenas uma minoria dos pacientes referiram melhoria dos sintomas sicca. (Seror *et al*, 2007)

Por outro lado, Devauchelle-Pensec *et al* (2007), estudou o efeito do rituximab em 16 pacientes com SS primário, administrando $375\text{mg}/\text{m}^2$ deste fármaco por semana, durante duas semanas, e verificou que, à semana 12 houve uma melhoria significativa dos sintomas.

Outro estudo utilizou 2 doses de rituximab ($375\text{mg}/\text{m}^2$), administradas com 7 dias de intervalo tendo reportado que pelo 15º dia, todos os pacientes apresentavam depleção completa das células B e que 14 doentes mantiveram uma supressão marcada destas células até às 40 semanas. Oito pacientes tinham um número elevado de células B nas glândulas salivares antes do tratamento e, cerca de 4 meses depois do tratamento foram biopsados novamente, não revelando qualquer célula B nesta localização. Esta depleção manteve-se aos 8 meses em 3 doentes que foram biopsados uma terceira vez. Uma observação interessante foi o facto de que os pacientes que tinham altos valores séricos de BAFF, tinham uma menor duração da Linfopenia de células B. (Pers *et al* 2007)

Para uma compreensão completa da eficácia do rituximab no SS, é necessária a realização de ensaios clínicos randomizados, controlados e com amostras mais significativas.

Além do CD20, o CD22 parece ser um alvo com muito potencial na terapêutica da SS. Pensa-se que o CD22 actue como um receptor para a recirculação das células B através da sua afinidade para moléculas de superfície do endotélio das vénulas.

Assim, esta molécula de adesão pode ter um papel determinante na entrada das células B nas glândulas lacrimais e salivares de doentes com SS. (Steinfeld *et al*, 2006)

O **Epratuzumab** funciona essencialmente através da modulação das células B e não tanto através da sua depleção na circulação e, sendo assim, devido aos diferentes mecanismos de acção pode ser exequível a utilização conjunta de anti-CD20 e anti-CD22. (Leonard *et al* 2005)

Num ensaio clínico, de fase I/II, sem dupla ocultação, foram administradas 4 infusões IV de epratuzumab com intervalos de 2 semanas entre as doses (360mg/m² cada dose) a 14 pacientes com SS primário. Os níveis das células B tiveram reduções médias de 54% às 6 semanas e 39% às 18 semanas, contudo, os níveis das células T e de imunoglobulinas não sofreram alterações significativas. A expressão de CD22 pelas células B periféricas ficou diminuída durante pelo menos 12 semanas após a terapia. Cerca de 53% dos pacientes atingiram uma boa resposta clínica em 6 semanas e 67% atingiram boa resposta clínica às 32 semanas. (Tant *et al*, 2006)

VASCULITES

As vasculites constituem, também, uma patologia onde o tratamento anti-células B pode ter um papel determinante.

Os primeiros estudos usando rituximab no tratamento da crioglobulinemia tanto relacionada, como não relacionada ao vírus da hepatite C (HCV), demonstraram vários graus de eficácia e segurança. (Ghijsels *et al* 2004)

Um estudo mais recente avaliou a eficácia e a tolerância do rituximab em 8 doentes com vasculite cryoglobulinemica mista tipo II, nos quais, tinha falhado tratamento com glicocorticoides, imunossupressores ou anti-virais, tendo sido administrada uma infusão de 375 mg/m² de rituximab semanalmente, durante 4 semanas e tendo depois sido realizada uma infusão a cada 3-4 meses durante 1 ano. Apesar da crioglobulinemia ter persistido em todos os doentes, as úlceras cutâneas desapareceram parcial ou completamente. A neuropatia periférica diminuiu em 3 doentes e estabilizou em 5 e as artralguas foram atenuadas em 5 pacientes. Dos 4 doentes com glomerulonefrite, 3 demonstraram uma redução significativa da creatinina sérica e da proteinúria. (Gallien *et al* 2006)

Dados preliminares sugerem que o rituximab é eficaz e bem tolerado no tratamento da vasculite associada ao anticorpo anti-citoplasma neutrofílico (ANCA).

Apesar do tratamento convencional com ciclofosfamida e glicocorticoide ser frequentemente eficaz, está associado a elevada taxa de recidiva e toxicidade. Um estudo, sem dupla ocultação, avaliou 10 doentes com Granulomatose de Wegener recidivante que foram tratados com 1 infusão semanal de 375mg/m² de rituximab durante 4 semanas, associada a 1mg/Kg de prednisona diariamente. Todos os doentes toleraram bem o rituximab e alcançaram uma depleção rápida das células B, com remissão completa em 3 meses. Os níveis de proteinase-3-ANCA diminuíram em todos os doentes e negativaram em 6 doentes, após a remissão induzida por esta terapêutica. Os doentes que não negativaram estes valores foram aqueles que tinham os valores mais elevados inicialmente. Cinco doentes que foram tratados novamente com rituximab (em monoterapia) devido à recidiva e aumento dos valores de ANCA e do número de células B, foram capazes de manter a remissão. (Keogh *et al* 2006)

Além destas, estão identificadas muitas outras doenças auto-imunes em que a depleção de células B, nomeadamente com Rituximab, revelou resultados positivos, no entanto, trata-se de estudos com um número muito reduzido de indivíduos, não randomizados e não controlados ou, apenas descrição de casos. Assim está descrito na literatura o uso desta estratégia na Púrpura Trombocitopénica Idiopática, Esclerose Múltipla, Doença de crioaglutinina, Anemia Hemofílica Auto-imune, Doença Enxerto vs. Hospedeiro, Crioglobulinemia, Púrpura trombocitopénica trombótica, Nefropatia mediada por IgM, Penfigo Vulgar, Doença de Graves, Hemofilia A e Dermatomiosite. Apesar de apresentarem boas respostas, estes estudos são de difícil interpretação devido à falta de uniformização, falta de critérios objectivos para a avaliação clínica e devido ao uso frequente de outras terapias concomitantemente. São necessários estudos de maiores dimensões, randomizados, controlados e com follow-up alargado para se poder tirar conclusões mais seguras e sustentadas. (Gurcan *et al.* 2009)

CONCLUSÃO

O papel das células B nas doenças auto-imunes tem sido desde há muito tempo um assunto controverso. Nos últimos 5 anos, muitos estudos levaram a um melhor entendimento das suas especificidades e funções nas patologias auto-imunes. Actualmente, as células B são consideradas essenciais na fisiopatologia destas doenças, não só pela produção de auto-anticorpos como também, pela sua capacidade de secreção de citocinas inflamatórias, participação na apresentação de antígenos, amplificação da activação das células T e a linfogénese ectópica. Apesar disto, constituem ainda desafios nesta área: Quais os subgrupos de células B que contribuem para a manutenção da doença e onde estas residem; Qual o papel relativo dos autoanticorpos, das células B apresentadoras de antígenos e dos plasmócitos de semi-vida longa e de semi-vida curta e ainda se o bloqueio precoce das células B patogénicas originará remissões mais prolongadas da doenças. (Browning, 2006)

Os estudos que envolveram a depleção de células B na terapêutica de doenças auto-imunes tanto em humanos como em modelos animais têm sido cruciais para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nestas patologias e para elucidar a importância e o papel das células B na génese e manutenção destas doenças. Por seu lado o avanço de estudos a nível molecular, além da compreensão de determinados mecanismos ao pormenor tem permitido o desenvolvimento de novos potenciais alvos terapêuticos. (Martin *et al*, 2006)

O rituximab é o fármaco, com alvo nas células B, mais estudado, com ensaios clínicos randomizados, bem delineados e de grande dimensão, que demonstraram grande evidência na eficácia deste tratamento nas doenças auto-imunes, tendo sido aprovado pela FDA e pela EMEA (European Medicines Agency), em 2006 para o tratamento da Artrite Reumatóide refractária aos anti-TNFs ou com contra-indicação aos mesmos. Nesta doença estão bem definidas as indicações e o protocolo de actuação, tendo os resultados sido muitíssimo positivos, apesar de existirem alguns efeitos laterais, como as reacções de infusão e as possíveis infecções oportunistas ou reactivadas, que são necessárias ter em conta. No entanto este fármaco é usado como terapêutica de recurso, sem aprovação, em muitas outras patologias auto-imunes, de salientar o LES, a síndrome de Sjogren, as vasculites sistémicas, a púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura trombocitopénica idiopática, Penfigo Vulgar e Dermatomiosite. (Gurcan *et al*. 2009)

Apesar de alguns estudos terem revelado bastantes benefícios com o uso quer de rituximab quer de outras terapias anti-células B, a evidência ainda é escassa e baseia-se essencialmente em ensaios clínicos não randomizados, sem ocultação, em estudos prospectivos de series de casos ou apenas descrição de casos isolados. Estes tipos de estudos não são considerados validos para uma extrapolação dos resultados, não constituindo evidência suficiente para a aprovação destas utilizações pelas autoridades oficiais. (Casals et al, 2008)

O avanço na investigação tem sido limitado pela heterogenicidade das doenças auto-imunes que torna muito difícil a regularização de protocolos de investigação e torna muito subjectiva a avaliação da progressão e efeitos terapêuticos. Além deste é importante não esquecer a raridade de muitas doenças, que impede o recrutamento de um número significativo de doentes. (Isenberg, 2008)

Vários ensaios clínicos de diversos fármacos anti-celulas B foram interrompidos, ou questionados pela comunidade, por diversas razões clínicas ou metodológicas. Exemplos mais evidêntes constituem: Um ensaio clínico com Belimumab que comprovou a sua eficácia no LES, no entanto 28% dos doentes tinha ANA's negativos; Um ensaio clínico com Epratuzumab que foi interrompido pela incapacidade de manter a disponibilidade do fármaco em estudo; o abandono por questões financeiras do ensaio clínico com Ocralizumab. (Wallace , 2009)

O LES é uma das patologias, que pela sua complexidade, gravidade e ineficiência clara dos fármacos actuais em alguns indivíduos, suscitou um interesse redobrado nas razões que limitam a investigação, levando Isenberg (2008) a publicar 8 conselhos que ajudariam a concretizar e otimizar as investigações, nesta área, com mais eficiência, tornando mais célere o esclarecimento acerca da eficácia e segurança de diversas terapias anti-células B no LES, e consequentemente acelerando a sua aprovação oficial:

- 1-** Apenas recrutar pacientes com manifestações clínicas e evidência serológica de LES.
- 2-** O recrutamento e a avaliação devem ser levados a cabo por clínicos experientes em LES.
- 3-** Deve ser recolhida informação suficiente a cada consulta que possibilite a avaliação pelos índices BILAG e SLEDAI.
- 4-** Toda a comunidade relacionada com LES deve participar activamente na determinação de medidas óptimas para os objectivos dos ensaios clínicos.

- 5-** Formação específica dos clínicos no uso das escalas BILAG e SLEDAI.
- 6-** É essencial enfatizar, durante a formação, a necessidade da atribuição das manifestações clínicas ou alterações nas análises sanguíneas especificamente ao LES e não a condições concomitantes.
- 7-** Reduzir o uso de prednisolona oral simultaneamente (sugestão $\leq 25\text{mg}/\text{dia}$) à entrada no ensaio clínico/agudizações lúpicas para minimizar a capacidade que as doses elevadas de glicocorticoides têm de encobrir diferenças entre os efeitos do fármaco usado e do placebo.
- 8-** O uso de um comité independente para examinar os resultados iniciais e ajudar a assegurar que a avaliação da actividade foi completamente a apropriada.

Assim, em analogia com o que já existe na Artrite Reumatóide e para o Rituximab e à semelhança do que nos é apresentado por Isenberg para os estudos em doentes com LES, deveriam ser reunidos esforços no sentido de otimizar protocolos de actuação, métodos de construção e avaliação clínica e laboratorial, de modo a estandardizar a investigação nesta área, tanto com outros fármacos além do rituximab, como nas muitas patologias auto-imunes, com o intuito de melhorar e aumentar as opções terapêuticas, que ainda se têm revelado, por vezes, insuficientes para estes doentes tão complexos e idiossincráticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Majid KB, Stefferl A, Bourquin C, Lassmann H, Linington C, et al. (2002). Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand. J. Immunol.* 55:70–81
- Aloisi F, Pujol-Borrell R (2006). Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nature Rev. Immunol.* 6, 205–217.
- Anolik JH, Barnard J, Cappione A, et al (2004). Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3580-90
- Anolik JH, Barnard J, Owen T, et al (2007). Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum*; 56: 3044-56
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. (2003). Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* 55:241–69.
- Assous N, Gossec L, Dieudé P, Meyer O, Dougados M, Kahan A, Allanore Y (2008). Rituximab Therapy in Rheumatoid Arthritis in Daily Practice. *J Rheumatol* 35: 31-34.
- Blank M, Shoenfeld Y.(2007). B cell targeted therapy in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 28: 62-68.
- Boule MW, Broughton C, MacKay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. (2004). Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatinimmunoglobulin G complexes. *J. Exp. Med.* 199:1631–40.
- Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A role for CD40 expression on CD8_T cells in the generation of CD8_T cell memory. *Science* 297, 2060–2063.
- Browning JL (2006) B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. 5: 564-576.
- Burrows PD, Cooper MD (1997). B cell development and differentiation. *Curr Opin Immunol* 9:239-244.
- Calabrese LH, Molly ES, Huang D, Ransohoff RM (2007). Progressive multifocal leukoencephalopathy in rheumatic diseases: evolving clinical and pathologic patterns of disease. *Arthritis Rheum* 56: 2116-28
- Calabrese, LH, Molloy, ES, Huang, D, Ransohoff, RM (2007). Progressive multifocal leukoencephalopathy in rheumatic diseases: Evolving clinical and pathologic patterns of disease. *Arthritis Rheum*; 56:2116-2121.
- Carnahan J, Stein R, Qu Z, et al (2007). Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab. *Mol Immunol* ; 44 (6): 1331-41.
- Carter RH (2006). B Cells in Health and Disease. *Mayo Clin Proc* 81(3): 377-384.
- Casals MR, et al. (2008) A systematic Review of the Off-Label Use of Biological Therapies in Systemic Autoimmune Diseases. *Medicine* 87: 345-364
- Cerny A, Starobinski M, Hugin AW, Sutter S, Zinkernagel RM, Izui S. (1987). Treatment with high doses of anti-IgM prevents, but with lower doses accelerates autoimmune disease in (NZW x BXSb)F1 hybrid mice. *J. Immunol.* 138:4222–28.
- Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J. Exp. Med.* 189:1639–48

- Chan OT, Shlomchik MJ. (2000). Cutting edge: B cells promote CD8+ T cell activation in MRL-Fas(*lpr*) mice independently of MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* 164:1658–62.
- Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, Keystone EC, Loveless JE, Burmester GR, Cravets MW, Hessey EW, Shaw T, Totoritis MC (2006). 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.* 54(9):2793-806.
- Cooper MD, Kearney JF, Gathings WE, Lawton AR (1980). Effects of anti-Ig antibodies on the development and differentiation of B cells. *Immunol. Rev.* 52:29–53.
- Cragg, MS (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 8:140-146.
- Dall'Era M, Chakravarty E, Wallace D, Genovese M, Weisman M, Kavanaugh A, Kalunian K, Dhar P, Vincent E, Pena-Rossi C, Wofsy D (2007). Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after atacicept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial. *Arthritis Rheum.* 56(12):4142-50
- Davidson A, Diamond B. (2001) Autoimmune Diseases. *N Engl J Med.* 345 (5): 340-350
- De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Famin R, Ferraccioli G (2002). Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum* 46: 2029-33.
- Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J, et al (2007) Improvement of Sjogren's syndrome after two infusions of rituximab (anti-CD20). *Arthritis Rheum* 57:310-318.
- Dighiero G, Rose NR. (1999) Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today*; 20:423-8.
- Ding C, Foote S, Jones G. (2008) B-cell-targeted therapy for Systemic Lupus Erythematosus- An update. *Biodrugs* 22(4): 239-249
- Dorner T, Kaufmann J, Wegener WA, Teoh N, Goldenberg DM, Burmester GR (2006). Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) for immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 8(3):R74. Epub 2006 21-29.
- Dorner T, Lipsky PE. (2007). B-cell targeting: a novel approach to immune intervention today and tomorrow. *Expert Opin Biol Ther* 7:1287-1299
- Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunol.* 7, 344–353.
- Dullforce P, Sutton DC, Heath AW. (1998). Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat. Med.* 4:88–91
- Dunussi-Joannopoulos K, Hancock GE, Kunz A, Hegen M, Zhou XX, et al. (2005). B-cell depletion inhibits arthritis in a collagen-induced arthritis (CIA) model but does not adversely affect humoral responses in a respiratory syncytial virus (RSV) vaccination model. *Blood* 106:2235–43
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350(25):2572-81.
- Eisenberg R, Looney RJ. (2005). The therapeutic potential of anti-CD20, What do B-cells do? *Clinical Immunology* 117: 207-213

Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, et al (2006). 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* 54:1390.

Fleischmann R, van Vollenhoven R, Udel J, et al (2006). Infusion-associated events decrease with repeated courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 54 Suppl: S238.

Fujii T, Hamano Y, Ueda S, Akikusa B, Yamasaki S, et al. (2003). Predominant role of FcγRIII in the induction of accelerated nephrotoxic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 64:1406–16.

Gallien S, Le Guern V, Cohen P, Marien M, Mouthon L, Guillevin L (2006). Tolerance and efficacy of rituximab for type II mixed cryoglobulinemia (MC) [abstract]. *Ann Rheum Dis*; 65 Suppl: 373

Ghijssels E, Lerut E, Vanrenterghem Y, Kuypers D (2004). Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) treatment for hepatitis C-negative therapy-resistant essential mixed cryoglobulinemia with renal and cardiac failure. *Am J Kidney Dis* 43: e34-e38.

Giliani S, Mori L, de Saint BG, Le DF, Rodriguez-Perez C, et al. (2005). Interleukin-7 receptor α (IL-7R α) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunol. Rev.* 203: 110–26

Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, et al. (2005). Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J. Immunol.* 174:817–26.

Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435, 590–597.

Grillo-Lopez AJ, et al. (1999), Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma, *Semin. Oncol.* 26 (5 Suppl. 14) 66– 73.

Gunnarsson I, Sundelin B, Jónsdóttir T, Jacobson S, Henriksson E, van Vollenhoven R.(2007) Histopathologic and clinical outcome of rituximab treatment in patients with cyclophosphamide-resistant proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 56 (4): 1263-1272.

Gurcan HM et al. (2009) A review of the current use of rituximab in autoimmune disease. *International Immunopharmacology* 9: 10-25

Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7– 18.

Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, and Neilson (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N. Engl. J. Med.* 348, 2543–2556.

Hutas G (2008). Ocrelizumab, a humanized monoclonal antibody against CD20 for inflammatory disorders and B-cell malignancies. *Current Opinion in Investigational Drugs* 9 (11):1206-1215.

Isenberg D (2008). New therapies in systemic lupus erythematosus – trials, troubles and tribulations.... working towards a solution. *Lupus* 17:967-970.

Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G, (1981). Rheumatoid arthritis: a disease of T lymphocyte-macrophage immunoregulation. *Lancet* 2: 839-842.

Jonsdottir T et al (2006). Rituximab plus cyclofosfamide in severe LES. *Ann Rheum Dis*; 65 Suppl:200.

Kalled SL. (2005). The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol. Rev.* 204:43–54

Kalunian KC, Davis JC Jr, Merrill JT, Totoritis MC, Wofsy D (2002) Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 46 (12):3251-3258

Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Carlson KA, Schroeder DR, Specks U (2006). Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. *Am J Respir Crit Care Med* 173:180-187.

Keystone E, Fleischmann R, Emery P, et al (2007). Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum* 56:3896-3902.

Krause, PJ, Gewurz, BE, Hill, D, et al. (2008) Persistent and relapsing babesiosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 46:370-379.

Kunkel E J, Butcher EC (2003). Plasma-cell homing. *Nature Rev. Immunol.* 3: 822-829.

Leonard JP; Coleman M; Ketas J; Ashe M; Fiore JM; Furman RR; Niesvizky R; Shore T; Chadburn A; Horne H; Kovacs J; Ding CL; Wegener WA; Horak ID; Goldenberg DM (2005). Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 23(22):5044-5051

Looney RJ, Anolik JH, Campbell D. et al (2004). B cell Depletion as a Novel Treatment for Systemic Lupus Erythematosus: A Phase I/II Dose-Escalation Trial of Rituximab. *Arthritis Rheum* 50: 2580-9.

Looney RJ, Srinivasan R, Calabrese LH (2007). The effects of rituximab on

immunocompetency in patients with autoimmune disease. *Arthritis Rheum*; 58:5-14.

Lopes-Carvalho T, Kearney J F (2005) Marginal zone B cell physiology and disease. *Curr. Dir. Autoimmun.* 8, 91–123

Mackay F, Sierro F, Grey ST, Gordon TP (2005). The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases. *Curr. Dir. Autoimmun.* 8: 243-265

MacLennan IC et al (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8-18

Martin F, Chan AC (2004). Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 20:517–27

Martin F, Chan AC (2006). B Cell Immunology in disease: Evolving Concepts from clinic. *Annu. Rev. Immunol.* 24:467-96.

McGaha TL, Sorrentino B, Ravetch JV. (2005). Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science* 307:590–93

Mckay J, Chwalinska-Sadows H, Boling E, et al (2005). Belimumab (BmAb), a fully human monoclonal antibody to B-Lymphocyte Stimulator (BLyS), combined with standard of care therapy reduces the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in a heterogenous subject population [abstract]. *Arthritis Rheum*;52 Suppl: S710

Mease P, Keystone E, Kaelin, et al (2006). Recent disease activity affects outcome of second course of rituximab for AR. [abstract]. *Arthritis Rheum* 2006; 54 Suppl: S236

Mease PJ (2008). B Cell-Targeted Therapy in Autoimmune Disease: Rationale, Mechanisms, and Clinical Application. *J Rheumatol* 35:1245-55.

- Meffre E, Wardemann H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity, *Current Opinion Immunology* 20:632-638.
- Meijer JM, Pijpe J, van Imhoff GW, et al (2006). (Re)treatment with rituximab in patients with active primary Sjogren syndrome. *Ann Rheum Dis*; 65 Suppl: 476
- Milner EC, Anolik J, Cappione A, Sanz I, (2005). Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 433–452
- O'Neill SK, Shlomchik MJ, Glant TT, Cao Y, Doodles PD, Finnegan A (2005). Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 174:3781–88.
- Ostergaard M, Baslund , Rigby W, et al (2007). Ofatumumab (HuMax-CD20), a fully human CD20 monoclonal antibody, in the treatment of rheumatoid arthritis. Early results from an ongoing, double-blind, randomized, placebo controlled clinical trial [abstract]. *Ann Rheum Dis* 66:124.
- Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, et al. (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol.* 173:5361–71.
- Pearson TC, Trumbley J, Odom K, Anderson DC, Cowan S, et al. (2002). Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques. *Transplantation* 74:933–40.
- Pers J-O, Devauchelle V, Daridon C, et al (2007). BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 56:1464-1472
- Pijpe J, van Imhoff GW, Spijkervet FK, Roodenburg JL, Wolbink GJ, Mansour K, Vissink A, Kallenberg CG, Bootsma H (2005). Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study. *Arthritis Rheum* 52(9):2740-50
- Pijpe J, Bootsma H, Spijkervet FKL, Vissink A, Kallenberg CGM, Ihrler S (2006). Rituximab treatment in Sjogren's syndrome: clinical-histological evidence of the efficacy of B-cell depletion. *Ann Rheum Dis ; Suppl*:106
- Rahman A, Isenberg DA (2008) Mechanisms of disease of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*; 358:929-39.
- Ravetch, J.V., and Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annu. Rev. J. Immunol.* 167, 4710–4718.
- Richman, DP, and Agius, MA (2003). Treatment of autoimmune myasthenia gravis. *Neurology* 61, 1652–1661
- Robak T. (2005). Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Bio-Drugs* 19:9–22
- Seror R, Sordet C, Guillemin L, Hachulla E, Masson C, Ittah M, Candon S, Le Guern V, Aouba A, Sibilia J, Gottenberg JE, Mariette X (2007). Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 66(3):351-357
- Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, et al (2005). Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis Rheum* 52:501-13
- Shoenfeld MD, et al. (2008). The Mosaic of Autoimmunity: Prediction, Autoantibodies, and therapy in Autoimmune diseases. *IMAJ*; 10:13-19
- Pijpe J, van Imhoff GW, Spijkervet FK, Roodenburg JL, Wolbink GJ, Mansour K, Vissink

Silverstein AM, Rose NR (2000). There is only one immune system! The view from immunopathology. *Semin Immunol*; 12: 173-78.

Steinfeld SD, Youinou P (2006). Epratuzumab (humanised anti-CD22 antibody) in autoimmune diseases. *Expert Opin Biol Ther* 6(9):943-9

Strand V, Balbir-Gurman A, Pavelka K et al (2006). Sustained benefit in rheumatoid arthritis following one course of rituximab: improvements in physical function over 2 years. *Rheumatology Oxford*; 45: 1505-13

Tak, PP, Thurlings, RM, Rossier, C, et al. (2008). Atacicept in patients with rheumatoid arthritis: Results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating, single- and repeated-dose study. *Arthritis Rheum* 58:61-67.

Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J. Immunol.* 167:4710– 18

Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi, et al (2006). A multicenter phase I/II trial of rituximab for treatment of refractory systemic lupus erythematosus [abstract]. *Arthritis Rheum*; 54 Suppl: S258

Tant L, Steinfeld SD, Burmester GR, Teoh NK, Wegener WA, Goldenberg DM, Pradier O.(2006). Epratuzumab (humanised anti-CD22 antibody) in primary Sjögren's syndrome: an open-label phase I/II study. *Arthritis Res Ther.* 8(4):R129

Tedder TF, Poe JC, Haas, Km. (2005) CD22 : a multifunctional receptor that regulates B lymphocyte survival and signal transduction. *Adv Immunol.* 88: 1-50

Thurlings RM, Vos K, Gerlag DM, Tak PP (2008). Disease activity-guided rituximab therapy in rheumatoid arthritis: the effects of re-treatment in initial nonresponders versus initial responders. *Arthritis Rheum* 58:3657-3668.

Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, et al.(2004). Mouse CD20 expression and function. *Int. Immunol.* 16:119–29.

van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, et al (2008). Long-term safety of rituximab: 6-year follow-up of the RA clinical trials and re-treatment population [abstract]. *Arthritis Rheum*; 58:S300.

Vital E M, Emery P (2008). The development of targeted therapies in rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity* 31(3): 219-227

Waalder E (1940) On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 17: 172-188.

Wallace DJ (2009). New therapies in systemic lupus erythematosus – trials, troubles and tribulations-working towards a solution: part 2 – the politically incorrect version. *Lupus* 18: 101-103.

Wong FS, Wen L, Tang M, Ramanathan M, Visintin I, et al.(2004). Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 53:2581–87

Zhang L, French RR, Chan HT, O'Keefe TL, Cragg MS, et al. (1995). The development of anti-CD79 monoclonal antibodies for treatment of B-cell neoplastic disease. *Ther. Immunol.* 2:191–202.