

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**CÉLULAS *NATURAL KILLER* EM UMA COORTE DE PACIENTES
COM ARTRITE REUMATÓIDE TRATADOS COM RITUXIMABE**

MARIANA PIRES GARCIA

Porto Alegre, dezembro de 2013.

**CÉLULAS *NATURAL KILLER* EM UMA COORTE DE PACIENTES
COM ARTRITE REUMATÓIDE TRATADOS COM RITUXIMABE**

MARIANA PIRES GARCIA

Orientador: Dr. Ricardo Machado Xavier

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Alegretti

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

Porto Alegre, dezembro de 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Pires Garcia, Mariana

Células Natural Killer em uma coorte de pacientes com artrite reumatóide tratados com rituximabe / Mariana Pires Garcia. -- 2013.
52 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.
Coorientadora: Ana Paula Alegretti.

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

1. células Natural Killer. 2. artrite reumatóide. 3. rituximabe. I. Machado Xavier, Ricardo , orient. II. Alegretti, Ana Paula, coorient. III. Título.

RESUMO

OBJETIVOS: Avaliar o perfil e o número absoluto e percentual de células NK verdadeiras (CD56+CD16+CD3-) e de células NK e NKT (CD56+) no sangue periférico de uma coorte de pacientes com artrite reumatóide (AR) antes e durante o tratamento com rituximabe (RTX).

MÉTODOS: Foram analisados dez pacientes do grupo controle (doadores de sangue) e dez pacientes com AR que receberam duas infusões de RTX 1g separadas por intervalo de 14 dias. As análises imunofenotípicas para avaliação do perfil e quantificação de células NK foram realizadas pré e após a infusão ou até a recaída clínica. Pacientes respondedores e não respondedores foram classificados de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) em 6 meses.

RESULTADOS: A quantidade de células NK verdadeiras não demonstrou variação significativa pré e após o tratamento com RTX. Contudo, houve aumento percentual de células CD56+ entre o primeiro e o segundo mês após a infusão com RTX. Além disso, os pacientes respondedores apresentaram uma tendência de aumento do número absoluto de células NK verdadeiras após dois meses de tratamento. Já em relação ao grupo controle, observou-se um aumento significativo do número de células NK basais nos pacientes com AR ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES: Foi identificada uma tendência de aumento nos valores absolutos de células NK verdadeiras entre os pacientes respondedores no segundo mês após a infusão com RTX. Não foi identificada uma variação significativa no perfil e quantidade de células NK nos pacientes com AR pré e após o tratamento com RTX. Contudo, foi observado que os pacientes com AR possuem uma quantidade maior de células NK do que os controles, sugerindo um possível envolvimento destas células na AR.

PALAVRAS-CHAVE: células *Natural Killer*, rituximabe, artrite reumatóide

ABSTRACT

OBJECTIVES: To assess the profile as well as the absolute number and percentage of true NK cells (CD56+CD16+CD3-), and NK and NKT cells (CD56+) in the peripheral blood of a cohort of patients with rheumatoid arthritis (RA) before and during rituximab (RTX) therapy.

METHODS: Ten control patients (blood donors) and ten patients with RA were assessed. The latter group received two intravenous infusions of 1g RTX, separated by a 14 day interval. Immunophenotypic analyses of NK cells were conducted before and after infusion, or until clinical relapse. After six months, respondents and non-respondents were reassessed according to American Rheumatology Criteria (ARC).

RESULTS: The number of true NK cells did not significantly change after treatment with RTX. However, an increase in the percentage of CD56+ cells was observed between the first and second month after RTX infusion. Respondents also displayed a tendency toward an increased number of true NK cells after two months of treatment. At baseline, the number of NK cells was also found to be significantly higher in patients with RA than in control individuals ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS: Respondents displayed a tendency toward an increase in the absolute number of true NK cells in the second month after RTX infusion. No significant changes in the profile and frequency of NK cells were found between pre- and post-RTX treatment assessments of patients with RA. However, it was found that patients with RA have a higher number of NK cells than control participants, suggesting a possible role of these cells in RA.

KEYWORDS: cells *Natural Killer*, rituximab, rheumatoid arthritis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fenótipos das subpopulações de células NK: CD56^{bright} e CD56^{dim}12

Figura 2 – Mecanismos de ação das células NK que contribuem na patogênese da AR: interação entre diversas células através da produção de citocinas e do contato célula-célula20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais receptores de células NK	14
------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno
AR	Artrite reumatóide
CDAI	<i>Clinical Disease Activity Index</i>
DAS 28	<i>Disease Activity Score 28</i>
DMCD	Drogas modificadoras do curso de doença
FAN	Fator antinuclear
FasL	Ligante da proteína Faz
FR	Fator reumatóide
GM-CSF	Fator estimulador do crescimento de granulócitos e monócitos
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICAD	Índice composto de atividade de doença
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
ITAMS	Motivos de ativação de imunorreceptores baseados em tirosina
ITIMS	Motivos inibidores de imunorreceptores baseados em tirosina

KIR	Receptores tipo Imunoglobulina de células <i>Natural Killer</i>
KLR	Receptores NK do tipo C, semelhantes à lectina
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MTX	Metotrexate
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NF- κ B	Fator nuclear Kappa-B
RANK-L	Ligante do RANK
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL	Ligante de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
RTX	Rituximabe

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	9
2- REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1- <i>Células Natural Killer (NK)</i>	11
2.2 - <i>Mecanismos de ação das células NK</i>	12
2.3 - <i>Receptores das células NK</i>	13
2.4 - <i>Células NK e a artrite reumatóide</i>	17
2.5 - <i>Células NK em pacientes com AR utilizando RTX</i>	20
3 - JUSTIFICATIVA	22
4 - OBJETIVOS DO ESTUDO	23
4.1 - <i>Objetivo principal</i>	23
4.2 - <i>Objetivos secundários</i>	23
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
6 - ARTIGO EM INGLÊS	29
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
ANEXOS	50
<i>Anexo 1 - Critérios do American College of Rheumatology 1987 para classificação da artrite reumatóide</i> ...	50
<i>Anexo 2 - Critérios classificatórios para artrite reumatóide 2010 ACR/EULAR</i>	51
<i>Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	52

1- INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença crônica inflamatória das articulações que afeta em torno de 1% da população mundial, afetando as mulheres duas vezes mais do que os homens. Sua incidência aumenta com a idade e o pico ocorre entre os 30 e 70 anos (1). A hiperplasia sinovial é uma característica marcante destes pacientes, com membranas proeminentes, projeções de vilosidades na sinóvia além de edema tecidual. Esse processo parece para alguns autores estar relacionado com a infiltração macrocitária e aumento da produção de interleucina 8 (IL-8) (2). O aumento do infiltrado macrocitário é preditor da destruição da articulação. Diversas linhagens celulares estão envolvidas ao infiltrado, sendo os linfócitos TCD4 responsáveis por 70% e os macrófagos por 20%. Alterações imunológicas nos pacientes com AR têm um potencial papel no prognóstico da doença, e estudos têm avaliado o perfil imune destes pacientes no sangue periférico e no líquido sinovial (3). Além disso, existe um grande interesse no papel das células *Natural Killer* (NK) nas doenças inflamatórias autoimunes, às quais são vistas tradicionalmente como alterações mediadas pelas células T, B e macrófagos (4,5).

Neste contexto, tem sido sugerido que as células NK poderiam participar da desregulação imune em vários níveis, através da interação com outras células do sistema imune inato e adaptativo e através da produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como o interferon gama (IFN- γ), a interleucina 5 (IL-5), a interleucina 10 (IL-10), a interleucina 13 (IL-13), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator estimulador do crescimento de granulócitos e monócitos (GM-CSF). Estudos que avaliam e associam o número, os fenótipos e as funções das células NK às doenças autoimunes têm sido realizados (6). No entanto, torna-se difícil determinar se estas alterações quantitativas e qualitativas decorrem do processo inflamatório, de distúrbios imunológicos, da terapia utilizada ou se representam um defeito primário destas células (7).

O rituximabe (RTX) é um anticorpo monoclonal quimérico direcionado à molécula CD20 presente na superfície de linfócitos pré-B até os linfócitos B maduros. O tratamento da AR com anticorpos monoclonais depletoria de célula B

tem se mostrado eficaz na maioria dos pacientes, embora alguns indivíduos sejam refratários e o mecanismo desta ausência de resposta ainda não esteja esclarecido (8, 9). Este fármaco possui basicamente três mecanismos de ação: lise mediada pelo complemento, indução da apoptose e citotoxicidade celular mediada por anticorpos. Dentre os diferentes mecanismos de ação, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada pelas células NK desempenha um papel central (9-12). Embora inúmeros estudos tenham sugerido que a célula NK pode desempenhar tanto um papel protetor quanto patogênico na AR, poucos relatos foram encontrados sobre o comportamento das células NK em pacientes submetidos ao tratamento com RTX (13-15). Assim, outros estudos são necessários a fim de elucidar o papel das células NK frente à terapia depletora de células B, identificando novos biomarcadores capazes de prever ou medir a resposta terapêutica (13).

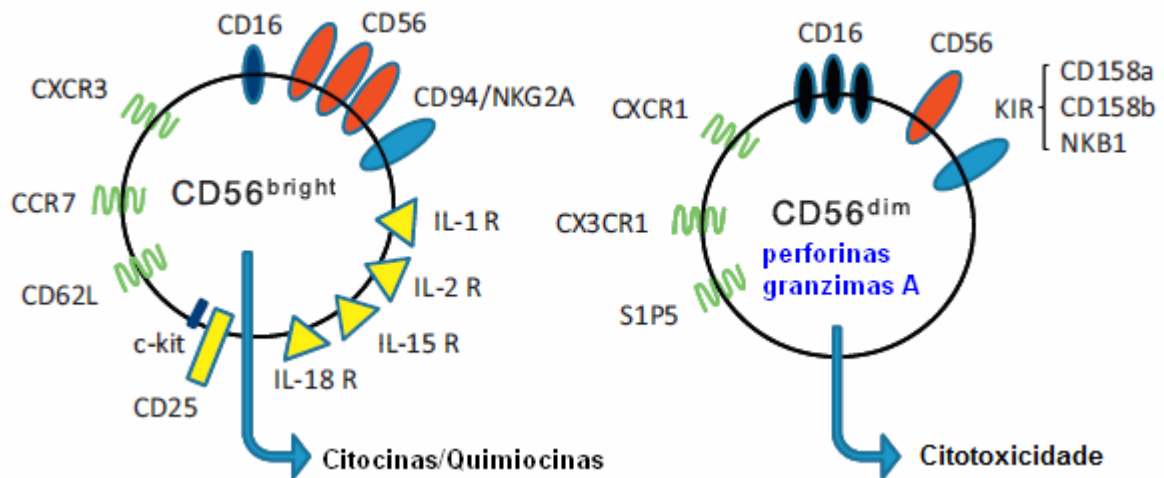
2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Células *Natural Killer* (NK)

As células NK foram originalmente descritas como grandes linfócitos granulares citotóxicos não específicos importantes na resposta precoce às células tumorais e infecções virais. Posteriormente, estas células foram reconhecidas como uma linhagem celular única, compreendendo 10-15% do total de células mononucleares do sangue periférico (16,17). Existem aproximadamente 2 bilhões de células NK nos adultos distribuídas em diversos órgãos e tecidos, tais como a medula óssea, os linfonodos, o útero, o fígado, o intestino (14). Devido à sua ativação ocorrer precocemente em uma resposta imunológica sem sensibilização prévia para o desenvolvimento de células de memória, as células NK fazem parte da imunidade inata, em contrapartida ao linfócito T citotóxico da resposta imune adaptativa (18).

Estas células são derivadas das células tronco hematopoiéticas oriundas da medula óssea e são fenotipicamente definidas como CD56⁺CD16⁺CD3⁻, podendo ainda ser subdivididas em pelo menos duas subpopulações conforme a expressão de determinados antígenos e seu mecanismo funcional (16, 19). As células NK que expressam CD56^{dim} CD16^{bright} constituem 90% do total no sangue periférico e são eficientes em exterminar células alvo, com atividade essencialmente citotóxica. Em contraste, as células NK CD56^{bright} CD16^{dim} correspondem a menos de 10% do total e possuem como principal função a secreção de citocinas, incluindo, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (20). Além disso, estas subpopulações diferem em relação à expressão de receptores modulatórios de atividade, de moléculas de adesão e de receptores de citocinas e quimiocinas que facilitam a migração aos tecidos linfóides e aos sítios de inflamação (21-23). A figura 1 mostra os dois principais fenótipos de células NK descritos acima.

Figura 1- Fenótipos das subpopulações de células NK: CD56^{bright} e CD56^{dim}



Fonte: Adaptado de Ahern, 2011 (5).

2.2 - Mecanismos de ação das células NK

As principais funções das células NK são a citotoxicidade e a produção de citocinas. As células NK desenvolvem o mecanismo de citotoxicidade quando ativadas por algumas citocinas, tais como IL-2 e IL-15. Além disso, essas células são capazes de formar uma citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC), através da ligação da porção Fc das imunoglobulinas ao receptor CD16 expresso na superfície de suas membranas celulares (14).

Estas células induzem apoptose através de moléculas que estão armazenadas nos grânulos citoplasmáticos. Uma vez ativadas, as células NK liberam monômeros de perforina cuja principal função é perfurar a membrana celular das células alvo, permitindo a ação das granzimas A e B que induzem à morte celular. Outras moléculas expressas por estas células e que também são mediadoras da apoptose são o ligante de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) e o receptor da proteína Fas (FasL) (24, 25). As células NK também produzem citocinas, das quais o IFN- γ é criticamente importante na resposta imune inata e adaptativa através da indução da resposta Th1 e da imunorregulação da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade humano de classe I (MHC-I) em uma variedade de células, como as células apresentadoras de antígenos

(APCs). Algumas subpopulações podem também produzir TNF- α , GM-CSF, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β (25-28).

2.3 - Receptores das células NK

As atividades das células NK são reguladas por meio da ativação e inibição das moléculas receptoras expressas em sua superfície celular, codificadas por genes localizados nos cromossomos 12 e 19. Usualmente as células NK expressam mais de um antígeno, em contraste às células B e T que são controladas principalmente por dois receptores (14,29-30).

As moléculas receptoras de células NK podem ser subdivididas em duas categorias diferentes baseadas na capacidade de ligação ou não ao MHC-I. Estas moléculas também podem ser estruturalmente divididas em: receptores NK da superfamília das imunoglobulinas e receptores NK do tipo C, semelhante à lectina (KLR) (14,31) (tabela 1). Os ligantes para esses receptores são as moléculas encontradas na superfície celular cuja expressão sofreu alteração resultante da infecção ou da lesão. Habitualmente, as proteínas virais e as induzidas por estresse são capazes de ativar os receptores que estimulam a atividade das células NK (32). Os ligantes inibitórios que bloqueiam as atividades das células NK mais comumente envolvem as proteínas MHC-I. A reduzida expressão das moléculas de classe I torna as células susceptíveis à lise mediada por células NK. Uma redução na expressão de MHC-I normalmente se dá nas células infectadas por vírus e nas células neoplásicas, tornando-as susceptíveis ao ataque das células NK. Contudo, as células normais não são expostas à destruição pelas células NK porque todas as células nucleadas expressam moléculas MHC-I (33).

Tabela 1- Principais receptores de células NK

Receptores de células NK	
Apresentam como ligante o MHC-I	Não se ligam ao MHC-I
Família Ly49	Família Ly49
Família KIR	Família NKRP-1
Família CD94/NKG2	Família NCR
	Família NKG2D
Superfamília das Imunoglobulinas	Receptores NK semelhantes à lectina (KLR)
Família KIR	Família Ly49
Família NCR	Família NKRP-1
Fcγ RIII	Família NKG2D
	Família CD94/NKG2

Fonte: Adaptado de Shegarfi, 2012 (14).

2.3.1- Receptores de inibição

Esta família de receptores possui como característica a presença de motivos inibidores do imunorreceptor tirosina (ITIMs) em suas caudas citoplasmáticas. Essas moléculas são essenciais para as funções de sinalização nas células NK, recrutando enzimas fosfatases que se contrapõem ao efeito das cinases nas cascatas de sinalização iniciadas pelos receptores ativadores. Dessa maneira, quando ocorre a ligação das moléculas MHC-I às regiões extracelulares dos receptores inibidores, o

resíduo tirosina presente nos ITIMs é fosforilado e a seguir diversas fosfatases são recrutadas resultando na sinalização reduzida dos receptores ativadores (32).

A primeira família deste grupo é a chamada família dos receptores tipo imunoglobulina de células *killer* (KIR). Os KIRs reconhecem diferentes variantes do MHC-I, tais como as moléculas HLA-A, B e C. Embora, alguns membros dessa família possuam caudas citoplasmáticas curtas sem ITIMs, funcionando como receptores de ativação, esta ligação é de menor afinidade (26,34). Tem sido sugerido que o receptor KIR2DL4, um membro da família KIR, pode ligar-se ao antígeno leucocitário humano (HLA-G) supostamente envolvido no mecanismo de imunorregulação da artrite reumatóide (26,35).

Estudos que associam possíveis fatores de risco genéticos na AR com receptores de células NK são preliminares. Entretanto, está claramente definido que os receptores do tipo KIR estão associados com as doenças autoimunes (36).

Yen e cols. (37) demonstraram em uma série de pacientes com AR complicada o aparecimento de uma população de células T incomum em indivíduos sadios (CD4+CD28-) envolvida no dano endotelial. Essa população apresentou algumas semelhanças com as células NK, tais como a expressão do antígeno CD57, produção de IFN- γ , granzimas e perforinas. Além disso, este estudo associou a presença do gene codificante para o receptor KIR2DS2, um receptor de função estimulatória, e seus ligantes do tipo HLA-C aos pacientes com maiores complicações vasculares na AR, confirmando a hipótese de que a expressão de um receptor KIR estimulatório, na ausência de um receptor com função inibitória que reconheça as células MHC-I próprias, pode contribuir para as doenças autoimunes.

A segunda família de genes inibidores é composta por heterodímeros compostos de lectina C, denominados NKG2. Estes receptores apresentam-se ligados ao antígeno CD94 e possuem como ligante a molécula HLA-E. Assim como os KIRs, alguns deste receptores se associam a moléculas acessórias que exibem ITAMs (motivos de ativação de imunorreceptores baseados em tirosina), tais como a proteína DAP 12, liberando sinais de ativação. A expressão dos NKG2/CD94 é modulada através de citocinas, contrariamente aos KIRs, que normalmente apresentam uma expressão estável. Outros membros deste grupo incluem o NKRP-

1, KLRG e o Ly49, respectivamente expressos em subtipos de células NK e T e em roedores (26).

2.3.2- Receptores de ativação

Os receptores deste grupo possuem como característica moléculas ligadas não covalentemente, cujas caudas citoplasmáticas recrutam cinases envolvidas em sinalização. A ligação a estes adaptadores denominados ITAMs desencadeia uma cascata de sinalização com rearranjos no citoesqueleto, proliferação, secreção de grânulos e citocinas pelas células NK e T (5).

Os receptores de ativação das células NK incluem vários grupos de moléculas estruturalmente distintas, e são conhecidos apenas alguns de seus ligantes. O Fc γ RIIIa (CD 16), um dos primeiros receptores de ativação identificados nestas células, liga-se à porção Fc das imunoglobulinas humanas (IgG1 e IgG3) e é responsável pela citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada pelas células NK (14).

Alguns estudos demonstraram que o polimorfismo de um alelo relacionado ao gene codificante do receptor Fc γ RIIIa está associado à melhor resposta da terapia com RTX. Verificou-se que os pacientes homocigotos para o aminoácido valina apresentavam uma afinidade de ligação maior com IgG1, exibindo, desta forma, através de suas células NK, uma toxicidade celular mediada por anticorpos mais aguda (38-40). Consequentemente, estes achados fortalecem a importância da resposta à terapia mediada pela ação das células NK. Um estudo mais recente que analisou pacientes com AR tratados com RTX não identificou a associação entre o polimorfismo e a melhor resposta à terapia (41). Portanto, os resultados ainda discordantes da associação dos genótipos Fc γ RIIIa indicam que ainda há necessidade de maior compreensão do assunto.

Outros membros deste grupo incluem os receptores estimulatórios NK da família NCR (do inglês, Natural Cytotoxicity Receptor). Destacam-se dentre estes, o NKp30, NKp44, NKp80 e o NKp46, exclusivamente expresso nas células NK. Alguns estudos têm demonstrado a atividade destes receptores mediando a função de morte celular de células alvo tumorais (14,34).

Um receptor que merece destaque, embora esteja distantemente relacionado à família NKG2, é o NKG2D. Este receptor associa-se à proteína adaptadora DAP 10 ou 12 reconhecendo ligantes que normalmente não são expressos em células normais, mas são regulados positivamente pelo estresse ou dano ao DNA. Desta forma, as células NK podem utilizar esses receptores para eliminar células do hospedeiro infectadas por vírus e células tumorais (26,42).

2.4 - Células NK e a artrite reumatóide

A excessiva produção de citocinas nas articulações de pacientes com AR através da interação de células do sistema imune inato e adaptativo contribui para a progressão da doença, caracterizada pela inflamação crônica com consequente destruição da cartilagem, das articulações e dos ossos (43). Estudos demonstraram uma redução no número de células NK no sangue periférico de pacientes de algumas doenças autoimunes, incluindo AR (44-46). Contudo, não está claro se essas alterações no número de células NK são uma consequência da inflamação em curso ou uma causa subjacente à autoimunidade (5,46).

Desta forma, estudos têm sugerido que as células NK, através da produção de citocinas inflamatórias, desempenham tanto um papel patogênico, quanto protetor no desenvolvimento da AR (14). Dentre as citocinas essenciais na patogênese da AR destaca-se o TNF- α , claramente demonstrado pelo sucesso no tratamento com as terapias anti-TNF α (47). Tem sido demonstrado que o fator nuclear Kappa-B (NF- κ B), um importante regulador do crescimento e da diferenciação das células NK, pode ser ativado na presença de TNF- α e de IL-15, desencadeando vias de sinalização inflamatórias através dos condrócitos, causando danos na matriz extracelular e destruição da cartilagem adjacente (48,49).

Dalbeth e Callan (50) analisaram a frequência e o fenótipo das células NK no sangue periférico e no líquido sinovial de pacientes com AR demonstrando que o subtipo CD56^{bright} estava presente em maior proporção nas articulações inflamadas. Análises das propriedades funcionais destas células demonstraram sua capacidade em secretar mais TNF- α e IFN- γ do que as células NK presentes no sangue

periférico, ativando macrófagos e células B, em resposta às citocinas IL-12 e IL-15. Assim, pode-se dizer que este subtipo de células NK demonstrou contribuir na persistência da inflamação das articulações (5,50), o que contradiz alguns achados de que o número e a função destas células está reduzido na AR (45).

Outro estudo demonstrou que as células NK são capazes de exterminar células dendríticas mielóides que falharam em seu processo de maturação, principalmente através de seus receptores de ativação do tipo NKp30. As células dendríticas maduras estão protegidas do processo de lise, uma vez que secretam grandes quantidades de HLA-E, o ligante para o receptor inibitório CD94/NKG2A. Esta habilidade funcional das células NK são eventos cruciais na migração das células apresentadoras de antígeno aos órgãos linfóides secundários e na interação destas com as células T que uma vez ativadas, desempenham um papel central no desenvolvimento das doenças autoimunes (51).

As células NK fornecem co-estimulação às células B e T através da expressão de moléculas tais como o CD40L, OX40, CD70 e CD86, contribuindo para a patogênese da AR. Além disso, estas células interagem com fibroblastos estimulando a produção de IFN- γ pelos sinoviócitos (5,52).

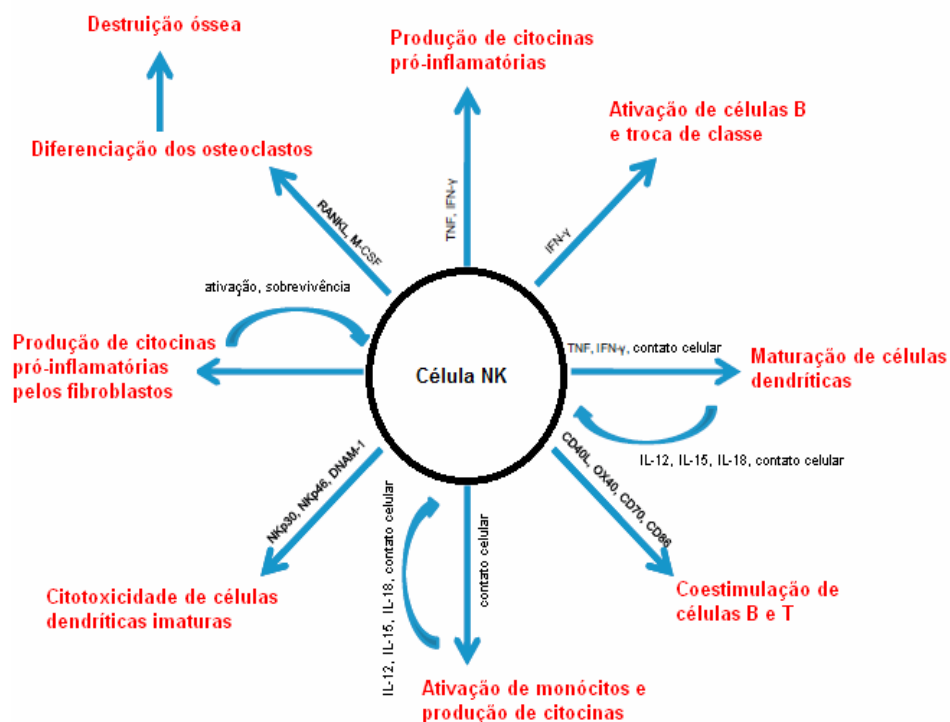
A progressiva destruição óssea periarticular é umas das características da AR, através da excessiva ação dos osteoclastos. Um estudo recente em modelo animal sugeriu que as células NK isoladas do líquido sinovial são capazes de induzir a formação de osteoclastos a partir dos monócitos CD14+. Este processo é dependente de RANKL e M-CSF, ambos expressos por células NK, sugerindo que estas células desempenham um papel fundamental na destruição óssea (53). Contrariando estes achados, Lo e cols. (54) demonstraram o papel protetor das células NK utilizando o mesmo modelo de artrite induzida em camundongos. Neste estudo, pode-se observar que anticorpos mediadores da depleção de células NK resultaram em uma exacerbação da doença, provavelmente pela diminuição na produção de IFN- α , uma citocina capaz de bloquear a diferenciação das células Th17, descritas recentemente como o subtipo de células T mais patogênico das doenças autoimunes, incluindo a AR (55,56).

Outro fator que têm sido descrito na literatura e que pode explicar o efeito protetor das células NK, ocorre através de mecanismos de deleção de linfócitos B e T ativados. As células T ativadas estimulam os ligantes para os receptores NKG2D, mediando desta maneira a citotoxicidade celular das células NK (57,58).

Estudos que associam a autoimunidade e as células NK têm sido baseados em análises no sangue periférico, o que dificulta os achados, uma vez que as reações autoimunes ocorrem muitas vezes nos tecidos linfóides secundários e nos órgãos alvo. Ainda neste contexto, outra possível limitação destes estudos é o compartilhamento de alguns marcadores entre as células NK, NKT e T, tornando complicado o processo de identificação destas células (59).

A figura 2 mostra alguns mecanismos de como a célula NK pode contribuir para patogênese da AR.

Figura 2- Mecanismos de ação das células NK que contribuem na patogênese da AR: interação entre diversas células através da produção de citocinas e do contato célula-célula.



Fonte: Adaptado de Ahern, 2011 (5).

2.5 - Células NK em pacientes com AR utilizando RTX

O rituximabe é um anticorpo quimérico direcionado à molécula CD20 presente na superfície de linfócitos B. A ligação deste anticorpo às células B ocasiona a depleção das mesmas através de três mecanismos de ação: lise mediada pelo complemento, indução da apoptose e citotoxicidade celular mediada por anticorpos. Dentre os diferentes mecanismos de ação desta droga, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada pelas células NK desempenha um papel central (8, 10-12). Rudnicka e cols.(60) demonstraram, em um estudo com microscopia de alta resolução, que o RTX causa uma reorganização da molécula CD20 presente nas células B, aumentando em 60% a capacidade das células NK em mediar ADCC. Esta droga tem sido cada vez mais utilizada como um tratamento eficiente e específico, principalmente em linfoproliferações B (9,61-63) e doenças autoimunes (64-68). A maioria dos pacientes com AR responde bem ao tratamento, contudo, alguns são refratários e o mecanismo desta não resposta ainda não está esclarecido (8).

Poucos estudos foram encontrados sobre o perfil imune das células NK em pacientes submetidos ao tratamento com rituximabe. Reis e cols. (69) em um estudo com apenas três pacientes demonstraram um aumento da frequência de células T reguladoras periféricas CD4+CD25+ e do subtipo de células NK CD3-CD16+CD56+ em pacientes com LES e AR após o tratamento com rituximabe; além disso, uma redução da população de células T-NK foi observado nos pacientes com boa resposta clínica. Parietti e cols. (70) em um estudo com células iNKt, um subtipo de células T que compartilha alguns marcadores com células NK, demonstraram que o número destas células estava diminuído em pacientes com AR quando comparado com indivíduos sadios e que após a terapia com RTX, houve um aumento da frequência destas células associado à remissão clínica. Recentemente outro estudo mostrou uma correlação significativa entre células NK ativadas três meses após a infusão da droga e a resposta clínica em 6 meses e 1 ano, sugerindo que as células NK ativadas podem ser um marcador recente da resposta clínica (71). Os mesmos autores em um estudo preliminar demonstraram que a frequência de células NK CD56+CD16+ diminui após quatro meses de infusão da droga, embora tenha ocorrido um aumento de células NK ativadas associado aos índices preditores de atividade da doença (13).

Assim, o mecanismo exato de como este medicamento influencia a resposta imunológica levando à melhora clínica dos pacientes não está esclarecido. Além disso, não existe uma clara associação entre a melhora clínica dos pacientes após a depleção de células B ou redução do fator reumatóide (72). Inúmeros estudos têm salientado que as células NK por sua capacidade de secretar citocinas inflamatórias, interagindo com outras células do sistema imunológico, podem desempenhar tanto um papel protetor quanto patogênico na AR (13-15). Assim, outros estudos são necessários a fim de elucidar o papel das células NK frente à uma terapia depletora de células B na AR, identificando novos biomarcadores capazes de prever ou medir a resposta terapêutica (13).

3 - JUSTIFICATIVA

O RTX é uma nova alternativa de tratamento em pacientes com AR moderada à grave refratária aos DMCDs tradicionais e às drogas anti-TNF. Um de seus mecanismos de ação é a citotoxicidade celular mediada por anticorpos. Sabe-se que as células NK desempenham um papel central em induzir ADCC. Embora a maioria dos pacientes com AR apresente uma resposta favorável à terapia, alguns são refratários e o mecanismo desta falha ainda não está bem esclarecido. Tem sido investigado o papel das células NK, uma vez que estas células desempenham tanto um papel patogênico como protetor em diversas doenças autoimunes, incluindo a AR. Assim, a busca de biomarcadores que possam prever quais os subgrupos de pacientes com maior potencial de beneficiar-se do tratamento com RTX, além de reduzir custos, poderia minimizar períodos de atividade de doença e a exposição a possíveis efeitos colaterais de um tratamento ineficaz.

4 - OBJETIVOS DO ESTUDO

4.1 - Objetivo principal

Determinar o número absoluto e o percentual de células NK verdadeiras (CD56+CD16+CD3-) e de células NK e NKT (CD56+ total) no sangue periférico de uma coorte de pacientes antes e durante o tratamento com rituximabe.

4.2 - Objetivos secundários

Verificar se há relação de atividade de doença e resposta terapêutica com a alteração no número absoluto e percentual de células NK nestes pacientes de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia.

Verificar se existe alteração no valor basal, absoluto e percentual, de células NK verdadeiras e de células NK e NKT entre indivíduos saudáveis e pacientes com AR.

Verificar se existe correlação entre o valor basal, absoluto e percentual, de células NK verdadeiras e de células NK e NKT e o tempo de repopulação de células B após a terapia com rituximabe.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31 (3):315-324.
2. Akahoshi T. [Interleukin-8 in pathogenesis of rheumatoid arthritis]. *Nihon Rinsho.* 2005;63 Suppl 1:163-6.
3. Hussein MR, Fathi NA, El-Din AM, Hassan HI, Abdullah F, Al-Hakeem E, et al. Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(3):321-8.
4. Pazmany L. Do NK cells regulate human autoimmunity? *Cytokine.* 2005;32(2):76-80.
5. Ahern DJ, Brennan FM. The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators? *Immunol Lett.* 2011;136(2):115-21.
6. Flodström-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Höglund P, Ljunggren HG. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(6):634-40.
7. Flodström M, Shi FD, Sarvetnick N, Ljunggren HG. The Natural Killer cell: friend or a foe in autoimmune disease? *Scand J Immunol.* 2002;55(5): 432-41
8. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):613-20.
9. Gürcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(1):10-25.
10. Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood.* 2006;108(8):2648-54.
11. Assous N, Gossec L, Dieudé P, Meyer O, Dougados M, Kahan A, et al. Rituximab therapy in rheumatoid arthritis in daily practice. *J Rheumatol.* 2008;35(1):31-4.
12. Benedetti L, Facco M, Franciotta D, Dalla Torre C, Campagnolo M, Lucchetta M, et al. NK cells and their receptors in naive and rituximab-treated patients with anti-MAG polyneuropathy. *J Neurol Sci.* 2013;331(1-2):86-9.
13. Lurati A, Marrazza MG, Re KA, Scarpellini M. Relationship between NK Cell Activation and Clinical Response in Rheumatoid Arthritis Treated with Rituximab. *Int J Biomed Sci.* 2009;5(2):92-5.

14. Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. Natural Killer cells and their role in rheumatoid arthritis: friend or foe?. *Scientific World Journal*. 2012;2012:491974.
15. Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G, Perricone R. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmun Rev*. 2011;10(10):577-81.
16. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.
17. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38.
18. Falgarone G, Jaen O, Boissier MC. Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2005;72(1):17-25.
19. Mendes R, Bromelow KV, Westby M, Galea-Lauri J, Smith IE, O'Brien ME, et al. Flow cytometric visualisation of cytokine production by CD3-CD56+ NK cells and CD3+CD56+ NK-T cells in whole blood. *Cytometry*. 2000;39(1):72-8.
20. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-40.
21. Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):568-80.
22. Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2010;131(4):451-8.
23. Tian Z, Gershwin ME, Zhang C. Regulatory NK cells in autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2012;39(3):206-15.
24. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:257-86.
25. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res*. 2003;90:127-56.
26. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23: 225-74.
27. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22: 405-29.
28. Colonna M. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity*. 2009;31(1): 15-23.
29. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006;214:73-91.
30. Cheent K, Khakoo SI. Natural Killer cells: integrating diversity with function. *Immunol*. 2009;126: 449-57.
31. Yokoyama WM, Kim S. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity*. 2006;24(3):249-57.

32. Jie HB, Sarvetnick N. The role of NK cells and NK cell receptors in autoimmune disease. *Autoimmunity*. 2004;37(2):147-53.
33. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-44.
34. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, et al. Human natural killer cells receptors and co-receptors. *Immunol Rev*. 2001;181:203-14
35. Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2006 ;67(8) :561-7.
36. Körner C, Altfeld M. Role of KIR3DS1 in human diseases. *Front Immunol*. 2012;3:326.
37. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2001;193(10):1159-67.
38. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754-8.
39. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3940-7.
40. Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, et al. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the FcγRIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood*. 2007;110(7):2561-4.
41. Sarsour K, Greenberg J, Johnston JA, Nelson DR, O'Brien LA, Oddoux C, et al. The role of the FcγRIIIa polymorphism in modifying the association between treatment and outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab versus TNF-α antagonist therapies. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31(2):189-94.
42. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-9.
43. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3537-45.
44. Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM, et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009;60(6):1753-63.
45. Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M, Arima K, et al. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2009;19(3):245-52.

46. Yanagihara Y, Shiozawa K, Takai M, Kyogoku M, Shiozawa S. Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 1999;118(1):131-6.
47. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1993;36(12):1681-90.
48. Lee J, Lee SH, Shin N, Jeong M, Kim MS, Kim MJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha enhances IL-15 induced natural killer cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(4):718-23.
49. Roman- Blas JA, Jimenez SA. NF-Kappa B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(9):839-48.
50. Dalbeth N, Callan MF. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1763-72.
51. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev.* 2006;214:219-28.
52. Chan A, Filer A, Parsonage G, Kollnberger S, Gundle R, Buckley CD, et al. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58(3):707-17.
53. Söderström K, Stein E, Colmenero P, Purath U, Müller-Ladner U, de Matos CT, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29):13028-33.
54. Lo CK, Lam QL, Sun L, Wang S, Ko KH, Xu H, et al. Natural killer cell degeneration exacerbates experimental arthritis in mice via enhanced interleukin-17 production. *Arthritis Rheum.* 2008;58(9):2700-11.
55. Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, et al. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):2876-85.
56. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1123-32.
57. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood.* 2007;110(2):606-15.
58. Lu L, Ikizawa K, Hu D, Werneck MB, Wucherpfennig KW, Cantor H. Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity.* 2007;26(5):593-604.
59. Johansson S, Berg L, Hall H, Höglund P. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol.* 2005;26(11):613-8.

60. Rudnicka D, Oszmiana A, Finch DK, Strickland I, Schofield DJ, Lowe DC, et al. Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood*. 2013;121(23):4694-702.
61. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res*. 2006;30(5):625-31.
62. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001;98(12):3383-9.
63. Fierro MT, Savoia P, Quaglino P, Novelli M, Barberis M, Bernengo MG. Systemic therapy with cyclophosphamide and anti-CD20 antibody (rituximab) in relapsed primary cutaneous B-cell lymphoma: a report of 7 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(2):281-7.
64. Thatayatikom A, White AJ. Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2006;5(1):18-24.
65. Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN. Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. *Clin Immunol*. 2007;123(1):66-73.
66. Vigna-Perez M, Hernández-Castro B, Paredes-Saharopoulos O, Portales-Pérez D, Baranda L, Abud-Mendoza C, et al. Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R83.
67. Silverman GJ, Boyle DL. Understanding the mechanistic basis in rheumatoid arthritis for clinical response to anti-CD20 therapy: the B-cell roadblock hypothesis. *Immunol Rev*. 2008;223:175-85.
68. Mease PJ. B cell-targeted therapy in autoimmune disease: rationale, mechanisms, and clinical application. *J Rheumatol*. 2008;35(7):1245-55.
69. Reis EA, Athanazio DA, Lima I, Oliveira e Silva N, Andrade JC, Jesus RN, et al. NK and NKT cell dynamics after rituximab therapy for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2009;29(4):469-75.
70. Parietti V, Chiffot H, Sibilia J, Muller S, Monneaux F. Rituximab treatment overcomes reduction of regulatory iNKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol*. 2010;134(3):331-9.
71. Lurati A, Bertani L, Marrazza M, Re KA, Bompane D, Scarpellini M. NK cell count as predictor of clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Biologics*. 2012;6:83-7.
72. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004;350(25):2572-81.

6 - ARTIGO EM INGLÊS

NATURAL KILLER CELLS IN A COHORT OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS TREATED WITH RITUXIMAB

Mariana Pires Garcia ⁽¹⁾, Daniela Viecelli Cervantes ⁽¹⁾, Julia Barros Schmid ⁽²⁾, Ana Paula Alegretti ⁽³⁾, Laiana Schneider ⁽¹⁾, Claiton Viegas Brenol ⁽⁴⁾, Ricardo Machado Xavier ⁽⁵⁾.

1. Medical Sciences master's student, Graduate School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

2. Intern, Clinical Pathology Service, Porto Alegre Clinical Hospital

3. Biochemical pharmacist, Clinical Pathology Service of the Porto Alegre Clinical Hospital

4. Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, UFRGS; Head of the Reference Center for Rheumatoid Arthritis, Porto Alegre Clinical Hospital/SES-RS

5. Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, UFRGS, Head of the Rheumatology Department, Porto Alegre Clinical Hospital.

Corresponding Address:

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

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

ZIP Code: 90.035-003 – Porto Alegre, Brazil

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

OBJECTIVES: To assess the profile as well as the absolute number and percentage of true NK cells (CD56+CD16+CD3-), and NK and NKT cells (CD56+) in the peripheral blood of a cohort of patients with rheumatoid arthritis (RA) before and during rituximab (RTX) therapy.

METHODS: Ten control patients (blood donors) and ten patients with RA were assessed. The latter group received two intravenous infusions of 1g RTX, separated by a 14 day interval. Immunophenotypic analyses of NK cells were conducted before and after infusion, or until clinical relapse. After six months, respondents and non-respondents were reassessed according to American Rheumatology Criteria (ARC).

RESULTS: The number of true NK cells did not significantly change after treatment with RTX. However, an increase in the percentage of CD56+ cells was observed between the first and second month after RTX infusion. Respondents also displayed a tendency toward an increased number of true NK cells after two months of treatment. At baseline, the number of NK cells was also found to be significantly higher in patients with RA than in control individuals ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS: Respondents displayed a tendency toward an increase in the absolute number of true NK cells in the second month after RTX infusion. No significant changes in the profile and frequency of NK cells were found between pre- and post-RTX treatment assessments of patients with RA. However, it was found that patients with RA have a higher number of NK cells than control participants, suggesting a possible role of these cells in RA.

KEYWORDS: cells *Natural Killer*, rituximab, rheumatoid arthritis

INTRODUCTION

Natural Killer (NK) cells are important components of the adaptive immune system, and play an especially significant role in the early responses to viruses and tumor cells (1). The cytotoxic activity of these cells is regulated by inhibitory and excitatory signals. Therefore, cells which express reduced levels of major histocompatibility complex (MHC) class I proteins are susceptible to apoptosis mediated by the down-regulation of inhibitory receptors (2, 3).

The potential protective and pathogenic roles of these cells in autoimmune diseases have been investigated by a number of studies (4-6). The literature has also suggested that the roles and functions of NK cells in autoimmune diseases may be partially explained by differences in anatomical sites, genetic factors, and in the release of inflammatory cytokines (7).

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic joint inflammation, which results in cartilage destruction and bone erosion (8). Although the immunological mechanisms involved in this disease are not entirely known, studies show that the interaction between cells such as macrophages, T and B lymphocytes, dendritic cells, neutrophils, fibroblasts and NK cells in the joints may contribute significantly to disease development (9,10).

Current treatments for RA are based on drugs that decrease the inflammatory consequences of autoimmune activation, such as disease course-modifying drugs (DCMD) and immunobiological agents. When anti-tumoral necrosis factor (TNF) therapy fails, patients are often treated with rituximab (RTX) (11).

RTX is a monoclonal chimeric antibody directed at the CD20 molecule present on the surface of pre-B to mature B lymphocytes. Although B-cell-depleting monoclonal antibodies have been shown to be sufficiently efficient and specific in the treatment of RA, some individuals are refractory to treatment, and the mechanisms responsible for the lack of clinical response have not been sufficiently elucidated (12,13). The binding of RTX to the CD20 antigen may lead to B-cell depletion through three distinct mechanisms: complement-mediated cell lysis, induction of apoptosis and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). NK cells play an especially important role in the latter mechanism (13-16). Studies show that after RTX

administration, changes in NK cell markers may occur, and have a significant impact on ADCC capacity (17,18). Bhat and Watzl (19) have also found that RTX is only able to induce ADCC for approximately 16 hours, after which these cells appear to lose their competence, leading to a decrease in perforins and B granzymes (19).

Although a number of studies have suggested that NK cells may play both protective and pathogenic roles in RA, few investigations have looked into the behavior of these cells in patients undergoing treatment with RTX (7,11,20). Therefore, the goal of the present study was to determine the absolute number and relative proportion of NK (CD56+CD16+CD3-) and NKT cells (CD56+ total) in the peripheral blood of a cohort of patients before and during treatment with a single course of RTX.

MATERIAL AND METHODS

STUDY POPULATION:

The study was conducted on 10 patients with RA seen at the outpatient Rheumatology Clinic of the Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA). Ten healthy individuals (blood donors) were also evaluated for comparison. All patients were consecutively admitted and recommended treatment with RTX according to Brazilian Rheumatology Society (SBR) treatment guidelines: failure of or intolerance to at least two traditional DCMDs and one anti-TNF agent (21). The study medication was donated by the Roche laboratory. The following inclusion criteria were applied: age equal to or over 18 years; meeting American College of Rheumatology (ACR) criteria for RA for at least 6 months (21); having been recommended treatment with RTX; DAS28 score (*Disease Activity Score 28*) equal to or greater than 3.2; use of adequate contraceptive methods; agreeing to participate in the study, and being able to understand and sign an informed consent document. Patients were excluded from participation for the following reasons: concomitant rheumatic, autoimmune, lymphoproliferative and neoplastic disorders; presence of active infection; use of cytotoxic drugs; being seropositive for HIV, HBV or HCV; active tuberculosis; allergy or hypersensitivity to RTX; being pregnant or breastfeeding; participating in other

clinical trials; functional class IV functional status according to Steinbrocker criteria (22) and having a history of RTX treatment.

CLINICAL ASSESSMENT

All patients were assessed at baseline, on a monthly basis for 6 months, and then at three-month intervals for the duration of the study. Each assessment involved routine laboratory tests (hemogram, transaminases, creatinine, urine analysis, hemosedimentation speed (HSS) and C-reactive protein). On the first visit, rheumatoid factor (RF), antinuclear factor (ANF), complement dosages, anti-HCV, anti-HIV, anti-HBC and HBsAG serologies, as well as chest, hand and feet X-ray examinations were conducted. Mantoux tests were also carried out. The following clinical parameters were assessed at each visit: count of 28 swollen or painful joints (always evaluated by the same examiner), global disease activity score on a 0-100 mm visual analogue scale (VAS) (scored by both the patient and the physician), pain score (0-100 mm), Health Assessment Questionnaire (HAQ) and DAS-28 score using ESR.

RTX ADMINISTRATION

Patients received two RTX infusions of 1g each, separated by a 14 day interval. All patients were premedicated with 100mg methylprednisolone, 1g paracetamol and 2mg dexchlorpheniramine.

FLOW CYTOMETRY

A total of 4.5mL of peripheral blood was collected in Vacutainer tubes containing Na-EDTA before the beginning of RTX treatment, as well as 1,2,6,9,12,18 and 24 months into treatment. Blood was also drawn whenever a new medication regimen was instituted due to clinical relapse. Within 24h of collection, a complete hemogram was performed on each sample using the Sysmex XE-2100 analyzer (Sysmex Corporation/Japan).

NK cells were characterized using the monoclonal antibodies (MosAc) CD16, CD56 and CD3, conjugated, respectively, with the following fluorochromes: fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and PE-Cy5. B cells were characterized using the CD19 antibody, conjugated with FITC. Leukocyte marking was conducted by placing 100 μ L blood (diluted to 5000 cells/ μ L) in polystyrene tubes, and incubating these at room temperature with 8 μ L of each fluorochrome-conjugated antibody (BD- Biosciences- Becton, Dickinson, San Diego, CA, EUA). After 15 minutes, 1.0mL of FACSlyse (BD) was added to each tube, and the lysis was further incubated for 10min at room temperature. Samples were then rinsed once with a 2.0mL phosphate buffer solution (PBS) and re-suspended in 0.5mL PBS. Immediately afterwards, events were recorded and analyzed in the cytometer.

A total of 100,000 events were recorded using the FACScalibur[®] flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA), and the CellQuest (BD) software with 5 simultaneous reading parameters and 3 fluorescence parameters (FL1, FL2, FL3). The Paint-a-Gate[™] (BD) software was used for immunophenotypic analysis. The results were analyzed using 10^0 , 10^1 , 10^2 and 10^3 dot-plots, with scores below 10^1 scored as negative for marker expression. The definition of positive and negative cells was set using isotype control antibodies, so as to define the *gates* (regions of cell populations) and distinguish between positive coloration, self-fluorescence and nonspecific antibody binding.

DEFINITION OF B-CELL DEPLETION

B-cell depletion was defined as an absolute CD19+ cell count below 0.005×10^9 per liter of peripheral blood. B-cell repopulation was defined as counts over 0.005×10^9 /liter of peripheral blood.

DEFINITION OF CLINICAL RESPONSE

Clinical response to treatment was assessed 6 months after RTX infusion, and was considered positive when the patient displayed an ACR criteria improvement of over 20% (23). Clinical relapse was defined as an improvement of less than 20%

compared to baseline parameters. Clinical relapse was considered to occur when patients who had previously fulfilled criteria for a positive response no longer achieved ACR20.

STUDY DURATION

Patients were followed for a minimum of 24 months. The endpoint of the study was the presence of clinical relapse, at which point participants were recommended to undergo further RTX infusions (if time to relapse was over 6 months) or referred to disease control treatment (when relapse occurred within 6 months of treatment, constituting RTX treatment failure).

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed using the SPSS[®] (Statistical Package for the Social Sciences) software, version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive statistics were determined using median and interquartile ranges. The Friedman test for nonparametric data was used to compare variables between different assessment points. Between-group comparisons were made using the Mann-Whitney test. Correlations were analyzed using Spearman's coefficients, and were considered significant when $p < 0.05$.

ETHICAL ASPECTS

The present study was approved by the HCPA Research Ethics Committee. All patients and control group participants signed an informed consent document. All adverse events were reported to the National Health Surveillance Agency (ANVISA).

The study was entirely designed and developed by the present authors. The Roche laboratory only contributed by donating the study medication to the 10 patients studied through a research initiative.

RESULTS

The present sample consisted of 10 female patients, with a median age of 49. The demographic characteristics of patients and healthy subjects are described in Table 1. The median disease duration was 8 years. All patients were undergoing treatment with methotrexate (median 25 mg/week) and prednisone (median 10 mg/day), and had received treatment with at least one anti-TNF agent. Of the nine patients (90%) who were FR-positive, 8 (80%) had joint erosion.

The clinical response assessment showed that 8 patients (80%) achieved ACR20 after 4 months. Three (30%) of these individuals were still responding to treatment after 6 months, while 5 relapsed before this time. DAS28 scores after four months of treatment suggested that 5 patients (50%) had low disease activity, and 3 (30%) had remitted. After 6 months of treatment with RTX, only 1 patient (10%) had low disease activity. B lymphocyte repopulation in peripheral blood occurred two months after RTX infusion in 5 patients (50%) and 6 months after RTX infusion in the remaining participants.

The absolute number and percentage of CD56+CD16+CD3- cells did not statistically differ between assessments. The absolute values and percentages of NK and NKT cells detected at different time points are displayed on Table 2. Between the first and second month after RTX infusion, all patients displayed an increase in CD56+ cells, although this change was not reflected in absolute values (median 17.5%, $p < 0.05$). One patient was excluded from this analysis as markers were not available on their first assessment and immunophenotyping could not be conducted.

The sample was then divided into two groups according to sustained ACR20 response after 6 months. Analyses showed that, two months after RTX infusion, respondents (2 patients) had a higher absolute number of CD56+CD16+CD3- cells than non-respondents (7 patients), although this difference was not statistically significant (Table 3 $p = 0.053$; Figure 2).

The correlation between the absolute number and percentage of NK cells at baseline in patients who repopulated after 2 (4 patients) and 6 months (5 patients) did not statistically differ.

When the number of true NK cells and NKT cells at baseline were compared between patients with RA (n=9) and the control group (n=10), the patients were found to have a significantly higher number of these cells, both in terms of percentages and absolute values (Table 4).

DISCUSSION

In the present study, no significant alterations in the absolute number and percentage of true NK cells (CD56+CD16+CD3-) were found after B cell depletion with RTX. Leandro et al. (12) analyzed 24 patients with RA and also failed to find significant differences in this variable between assessments conducted 1 and 3 months after RTX infusion. A similar finding was obtained by Benedetti et al. (16), who assessed the effect of RTX therapy on patients with polyneuropathy. The authors of the study attributed their results to the small sample size used. However, Lurati et al. (11) found a significant reduction in the number of NK cells in the peripheral blood of patients previously treated with RTX. The study also assessed the presence of activated NK cells (defined as CD54^{bright}), and identified an association between an increased number of these cells and clinical improvement after RTX therapy. In a more recent study, the same authors found an increase in the number of NK cells and of activated NK cells after RTX infusion (24).

Although the present results did not agree with previous findings, when the sample was divided into respondents and nonrespondents, analyses showed a tendency toward an increased number of true NK cells in respondents after 2 months of treatment. However, this pattern was not observed at other assessment points. It is possible that the small sample size used in the present study led to low statistical power, making it more difficult to detect between-group differences. The present study also found no significant differences in the baseline number of NK cells between patients who repopulated after two versus six months.

An increase in the percentage of CD56+ cells (NK and NKT cells) in the blood was found between the first and second month following RTX infusion. However, this difference was not apparent in absolute values. Parietti et al. (25), in a study of invariant NK cells (iNKT), found a subtype of T cells which shared markers with NK

cells, and noted that patients with RA had a lower number of these T cells than healthy individuals. After RTX treatment, the authors observed an increase in the number of these cells, which was associated with clinical remission.

The present study also found a statistically significant increase in the absolute numbers and percentages of true NK cells as well as NK and NKT cells in patients with RA as compared to the control group (blood donors), demonstrating a possible role of these cells in RA. Some authors have found reduced numbers of NK and NKT cells in the peripheral blood of patients with this condition (26-29). Conigliaro et al. (7) found that the absolute number and frequency of these cells was lower in a cohort of patients with RA than in healthy individuals, but also reported an increase in the number of these cells after etanercept therapy. Although these studies contradict the present findings, an investigation of patients with recurrent spontaneous abortions found that these individuals displayed an increase in the absolute number and percentage of NK cells in the immune system prior to pregnancy. These changes differed significantly from those observed in control patients (healthy adults), suggesting that the production of cytokines and the activation of antigen-presenting cells may lead to the development of pathological responses, increasing the likelihood of spontaneous abortions. The variability in these results may be explained by the fact that many studies investigate the number of NK cells in peripheral blood rather than in secondary lymph nodes and target organs, where autoimmune reactions are also known to occur.

These cells are known to secrete several types of cytokines and inflammatory chemokines. Their presence in the synovial membranes of patients with RA, and probable interaction with many other cell types, may contribute to the progression of disease. Although some studies (30,31) have suggested that these cells may play a protective role, the present findings indicated that the cells are also likely to play a pathogenic role in cases of RA. Due to the diversity in their functions, these cells may be involved both in the regulation and in the development of inflammatory responses.

Therefore, although no statistically significant associations were identified in the present study, it is possible that NK cells may increase after RTX therapy. Future studies using larger samples and activated NK cell markers may make important

contributions to the comprehension of the role of these cells in the physiopathology of rheumatoid arthritis.

Table 1 - Patient characteristics at baseline*

	Patients with RA (n=10)	Healthy participants (n=10)
Age (years), median (interval)	49 (37 – 56)	37 (31-46)
Female, n (%)	10 (100)	2 (20)
Positive rheumatoid factor, n (%)	9 (90)	-
Disease duration (years), median (interval)	8 (2 – 18)	-
Bone erosion, n (%)	8 (80)	-
HSS (mm/h), median (interval)	27,5 (8 – 120)	-
CRP (mg/l), median (interval)	10,8 (4 – 42,2)	-
HAQ (0-3), median (interval)	1 (0,750 – 2,125)	-
DAS28-ESR, median (interval)	5,6 (4,4 – 6,82)	-
MTX, n (%)	10 (100)	-
MTX dose (mg/week), median (interval)	25 (20 – 25)	-
Corticoids, n (%)	10 (100)	-
Prednisone dose (mg/day), median (interval)	10 (5 – 15)	-
Prior anti-TNF therapy, n (%)		
1	9 (90)	-
≥ 1	1 (10)	-
Anti-TNF agents used, n (%)	5 (50)	-
Adalimumab	2 (20)	-
Etanercept	1 (10)	-
Golimumab	3 (30)	-

* RA = rheumatoid arthritis; HSS = hemosedimentation speed; CRP = C-reactive protein; HAQ = Health Assesment Questionnaire; DAS28-ESR = Disease Activity Score in 28 joints using the erythrocyte sedimentation rate; MTX = methotrexate; Interval = minimum and maximum values obtained

Table 2 - Absolute numbers and percentages of NK and NKT cells at different assessment points before and after RTX infusion.

		baseline	1 month after RTX	2 months after RTX	6 months after RTX	
	N	Median (P25-P75)	Median (P25-P75)	Median (P25-P75)	Median (P25-P75)	p*
CD56+CD3-	9	172.9	169.0	195.8	226.8	0.682
(absolute)		(153.8-257.3)	(149.5-185.9)	(104.1-242.4)	(145.3-256.5)	
CD56+CD3-	9	9.5	8.4	10.7	9.1	0.175
(%)		(6.8-12.3)	(6.1-10.9)	(8.1-12.4)	(8.4-12.4)	
CD56+	9	301.0	273.9	279.0	294.0	0.769
(absolute)		(247.4-441.7)	(208.1-417.2)	(243.3-416.5)	(275.3-369.6)	
CD56+	9	14.0	15.5	17.5	15.8	*0.023
(%)		(11.3-20.5)	(9.9-19.5)	(12.1-24.1)	(11.3-23.0)	

Note: Data are presented as mean (Interquartile range: P25 and P75). *p<0.05 was considered significant.

Table 3 - Absolute number of NK cells and clinical response after 6 months (ACR20).

Marker expression at different time points	Clinical response at 6 months		p*
	Respondents N=2	Non-respondents N=7	
	Median (P25-P75)	Median (P25-P75)	
CD56+CD3- (absolute) Baseline	171.2 (108-**)	171.5 (150.3-264)	0.558
CD56+CD3- (absolute) 1 month after RTX	236.7 (147.3-**)	173.2 (156.4-187)	0.770
CD56+CD3- (absolute) 2 months after RTX	253.1 (224.1-**)	185 (103.7-210)	0.053
CD56+CD3- (absolute) 6 months after RTX	243.6 (181.2-**)	210 (138.9-257.8)	0.909

Note: Data are presented as mean (Interquartile range: P25 and P75). *p<0.05 was considered significant. **P75 was not calculated due n<3.

Table 4 - Comparison between the absolute number and percent of NK and NKT cells at baseline between the control group (healthy participants) and individuals with RA.

Marker expression	Control Group N=10 Median (P25-P75)	Patient Group N=9 Median (P25-P75)	p*
CD56+CD3- (absolute)	51.3 (26.2-102.5)	171.6 (130.1-249)	* < 0.001
CD56+CD3- (%)	2.32 (1.7-4.9)	9 (6.2-11.7)	* < 0.001
CD56+ (absolute)	77 (59.2-154.1)	301 (247.4-441.7)	* < 0.001
CD56+ (%)	4.2 (2.7-8.1)	14 (11.3-20.5)	* < 0.001

Note: Data are presented as mean (Interquartile range: P25 and P75). *p<0.05 was considered significant.

Figure 1 - Percent of NK and NKT cells (CD56+total) at different assessment points.

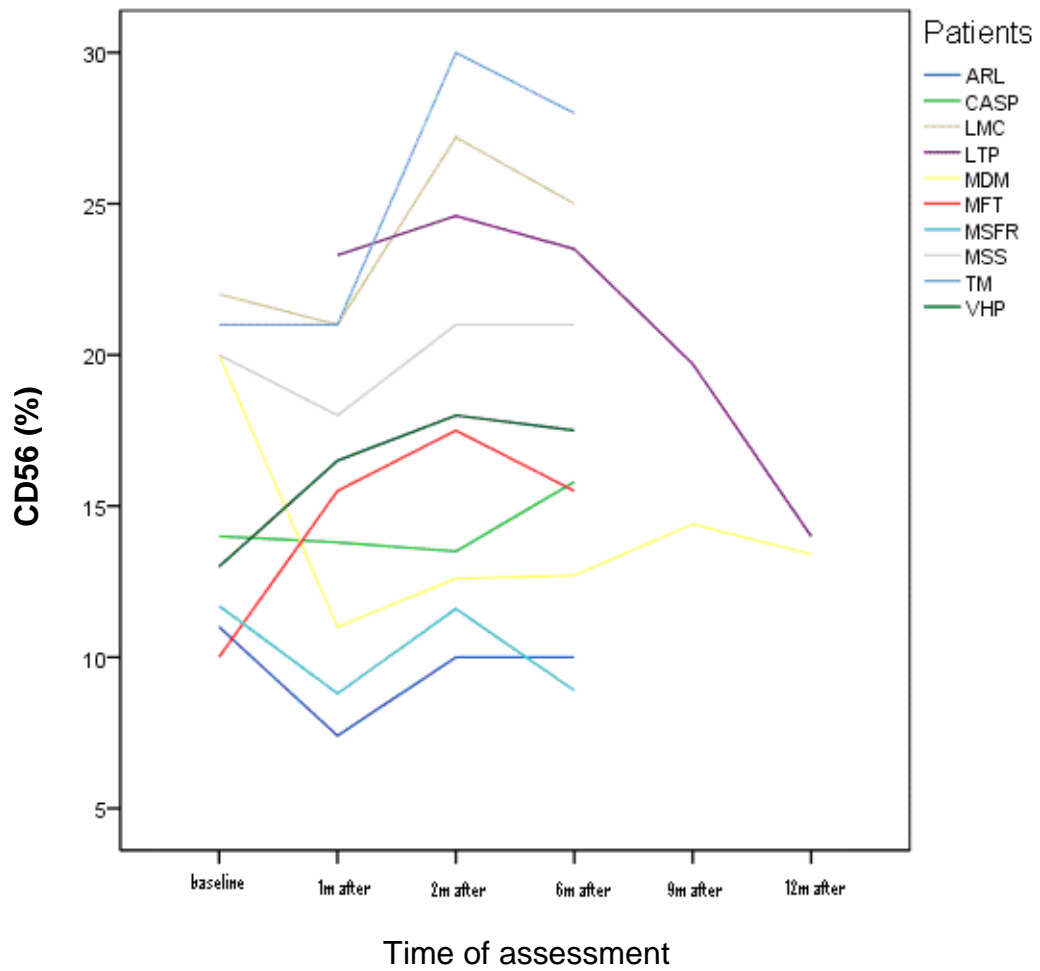
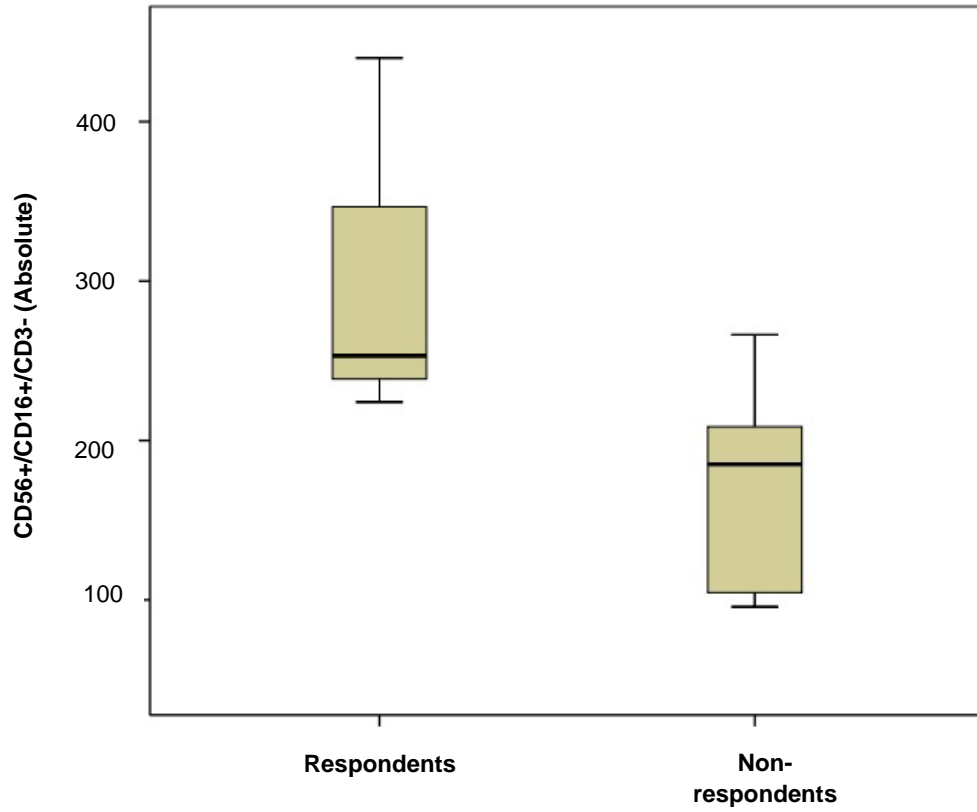


Figure 2 - Comparison between the absolute number of NK cells in respondents (two patients) and non-respondents (seven patients) two months after RTX infusion.



REFERENCES

1. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38.
2. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:359-93.
3. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 2004;306(5701):1517-9.
4. Fort MM, Leach MW, Rennick DM. A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis. *J Immunol*. 1998;161(7):3256-61.
5. Takeda K, Dennert G. The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J Exp Med*. 1993;177(1):155-64.
6. Poirot L, Benoist C, Mathis D. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8102-7.
7. Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G, Perricone R. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmun Rev*. 2011;10(10):577-81.
8. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar;31 (3):315-324.
9. Panayi GS. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1993;32 Suppl 1:4-14.
10. Dalbeth N, Callan MF. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum*. 2002;46(7):1763-72.
11. Lurati A, Marrazza MG, Re KA, Scarpellini M. Relationship between NK Cell Activation and Clinical Response in Rheumatoid Arthritis Treated with Rituximab. *Int J Biomed Sci*. 2009;5(2):92-5.
12. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(2):613-20.
13. Gürcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(1):10-25.
14. Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*. 2006;108(8):2648-54.

15. Assous N, Gossec L, Dieudé P, Meyer O, Dougados M, Kahan A, et al. Rituximab therapy in rheumatoid arthritis in daily practice. *J Rheumatol.* 2008;35(1):31-4.
16. Benedetti L, Facco M, Franciotta D, Dalla Torre C, Campagnolo M, Lucchetta M, et al. NK cells and their receptors in naive and rituximab-treated patients with anti-MAG polyneuropathy. *J Neurol Sci.* 2013;331(1-2):86-9.
17. Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal antibody-coated target cells. *J Immunol Methods.* 2005;304(1-2):88-99.
18. Fischer L, Penack O, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Thiel E, et al. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol.* 2006;34(6):753-9.
19. Bhat R, Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One.* 2007;2(3):e326.
20. Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. Natural Killer cells and their role in rheumatoid arthritis: friend or foe?. *Scientific World Journal.* 2012;2012:491974.
21. Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2013;53:158-83.
22. Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992;35(5):498-502.
23. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(6):727-35.
24. Lurati A, Bertani L, Marrazza M, Re KA, Bompane D, Scarpellini M. NK cell count as predictor of clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Biologics.* 2012;6:837.
25. Parietti V, Chiffot H, Sibilia J, Muller S, Monneaux F. Rituximab treatment overcomes reduction of regulatory iNKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol.* 2010;134(3):331-9
26. Reis EA, Athanazio DA, Lima I, Oliveira e Silva N, Andrade JC, Jesus RN, et al. NK and NKT cell dynamics after rituximab therapy for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2009;29(4):469-75.
27. Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M, Arima K, et al. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2009;19(3):245-52.
28. Yanagihara Y, Shiozawa K, Takai M, Kyogoku M, Shiozawa S. Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 1999;118(1):131-6.

29. Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM, et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;60(6):1753-63.
30. Lo CK, Lam QL, Sun L, Wang S, Ko KH, Xu H, et al. Natural killer cell degeneration exacerbates experimental arthritis in mice via enhanced interleukin-17 production. *Arthritis Rheum.* 2008;58(9):2700-11.
31. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood.* 2007;110(2):606-15.

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo não foram observadas alterações estatisticamente significativas em relação ao número absoluto e percentual de células NK verdadeiras (CD56+CD16+CD3-) nos diferentes momentos de coleta após a terapia com RTX, apenas um aumento no valor percentual de CD56+ total no segundo mês. Entretanto, quando dividimos a amostra de pacientes em dois grupos (respondedores e não respondedores), verificamos que houve uma tendência de aumento do número absoluto destas células nos pacientes respondedores após dois meses de tratamento, embora isso não tenha se confirmado nas demais coletas. Uma possível explicação para isto seja a falta de poder deste estudo para detectar diferença entre os grupos, uma vez que o n foi pequeno. Assim, embora não tenhamos identificado associações estatisticamente significativas sugerimos que as células NK podem estar aumentadas após a terapia com RTX e que outros estudos com um número maior de pacientes, utilizando também marcadores de células NK ativadas, sejam realizados a fim de confirmar esta hipótese

Este estudo identificou um aumento estatisticamente significativo do número de células NK verdadeiras e de células NK e NKT, tanto em termos absolutos quanto percentuais, no grupo de pacientes com AR quando comparado com o grupo controle (indivíduos saudáveis). Diversos estudos têm demonstrado o papel patogênico das células NK nas doenças autoimunes, incluindo a AR. Sabe-se que estas células secretam uma variedade de citocinas e quimiocinas inflamatórias e estão presentes nas membranas sinoviais dos pacientes com AR, interagindo com diversos outros componentes do sistema imunológico, contribuindo desta forma para progressão da doença. Portanto, nossos achados sugerem um possível envolvimento destas células na AR, e provavelmente, devido à diversidade de suas funções, estas células estejam envolvidas tanto na regulação da resposta inflamatória, como no seu desenvolvimento.

ANEXOS

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

Critério	Definição
1. Rigidez matinal	Rigidez matinal com duração de pelo menos 1 hora até a melhora máxima
2. Artrite de três ou mais áreas articulares	Ao menos 3 áreas articulares simultaneamente afetadas, observadas pelo médico (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarsofalangeanas)
3. Artrite das articulações das mãos	Artrite em punhos ou metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais
4. Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo de áreas de ambos os lados do corpo
5. Nódulos reumatóides	Nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas, superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares
6. Fator reumatóide sérico positivo	Presença de quantidades anormais de fator reumatóide
7. Alterações radiográficas	Radiografias posteroanteriores de mãos e punhos demonstrando rarefação óssea justa-articular ou erosões

Para a classificação como AR, o paciente deve satisfazer pelo menos 4 dos 7 critérios. Os critérios 1-4 devem estar presentes por no mínimo seis semanas

Modificado a partir de Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1988 Mar;31(3):315-24

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

População alvo (quem deve ser testado?)

- Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema). *
- Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença

* Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriásica e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.

Acometimento articular (0-5)		Sorologia (0-3)		Duração dos sintomas (0-1)		Provas de atividade inflamatória (0-1)	
1 grande articulação	0	FR negativo e ACPA negativo	0	<6 semanas	0	PCR normal E VHS normal	0
2-10 grandes articulações	1	FR positivo ou ACPA positivo em baixos títulos	2	> ou igual a 6 semanas	1	PCR anormal OU VHS anormal	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2	FR positivo ou ACPA positivo em altos títulos	3				
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3						
>10 articulações (pelo menos 1 pequena)	5						

Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente com AR.

O domínio “acometimento articular” refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo IFD do pé ou mão, primeira MTF e primeira carpometacarpiana). Evidência adicional obtida por exames de imagem pode ser utilizada para confirmação dos achados clínicos. Considera-se, para fins de classificação, como pequenas articulações as MCF, IFP, MTF (segunda a quinta), primeira interfalangeana e punhos, como grandes articulações ombros, cotovelos, quadril, joelhos, tornozelos. Articulações adicionais (temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular, entre outras) podem ser contadas, na avaliação de “mais de 10 articulações”, desde que uma pequena (ao menos) esteja acometida.

No domínio “sorologia”, considera-se o resultado de fator reumatóide ou de anticorpos anti-peptídeos/proteínas citrulinadas negativo se o valor encontrado for igual ou menor ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o resultado encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual a três vezes o limite superior da normalidade; e positivo alto quando o valor encontrado for superior a três vezes o limite superior da normalidade.

O domínio “duração dos sintomas” refere-se ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação.

Já as “provas de atividade inflamatória” (velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa) são consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado.

Modificado de: Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis. 2010 Sep;69(9):1580-8.

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Avaliação do perfil imune em uma coorte de pacientes com artrite reumatóide antes e durante o tratamento com rituximabe.

Estamos convidando o Sr (a) a participar de um projeto de pesquisa cujo alvo de estudo é avaliar o perfil imune dos pacientes com artrite reumatóide tratados com rituximabe.

Objetivo do estudo:

O nosso objetivo de estudo é determinar o número absoluto e percentual de células *Natural Killer* e comparar as mudanças antes e durante o tratamento com rituximabe. Essa informação pode ser importante na escolha de medicações que sejam mais apropriadas para cada paciente.

Vantagens em participar do estudo:

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

Procedimentos:

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

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

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

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

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

Fui igualmente informado (a):

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

Nome e assinatura do paciente ou responsável: _____

Nome e assinatura do pesquisador: _____

Local e data: _____

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Telefone para contato: (51)3359-8315