
**I fattori predittivi
di risposta a rituximab
nel trattamento
dell'artrite reumatoide**

A cura di
Maurizio Benucci

I fattori predittivi di risposta a rituximab nel trattamento dell'artrite reumatoide

A cura di

Maurizio Benucci

UOS di Reumatologia, Ospedale S. Giovanni di Dio, Firenze

INDICE

INTRODUZIONE	5
DEPLEZIONE DEI LINFOCITI B CIRCOLANTI	6
DEPLEZIONE DEI LINFOCITI B A LIVELLO SINOVIALE	7
FATTORE REUMATOIDE E ANTICORPI ANTI-PEPTIDE CICLICO CITRULLINATO	7
DEPLEZIONE DELLE CELLULE T E SINTESI DI CITOCHINE	8
CONCLUSIONI	10
BIBLIOGRAFIA	10

Comitato Editoriale

Stephanie Blick
Laura Brogelli
Giuliana Gerardo
Luisa Granziero
Claudio Oliveri
Filippo Polcaro

Redazione

Rosy Bajetti

Produzione

Atlanta Biondi
Loredana Biscardi
Silvia Minora
Rita Sgreccia

**inScience Communications™**

a Wolters Kluwer business

Wolters Kluwer Health

Via B. Lanino, 5
20144 Milano

Via R. Gigante, 20
00143 Roma

www.kwhealth.it

© 2010 Wolters Kluwer Health Italy S.r.l.

In Focus. Registrazione del Tribunale di Milano n. 474 del 7 agosto 1997

Direttore responsabile: Giulio Zuanetti

Finito di stampare nel mese di ottobre 2010 da GECA S.p.A. (Cesano Boscone - MI)

Pubblicazione fuori commercio riservata alla Classe Medica

Tutti i diritti sono riservati, compresi quelli di traduzione in altre lingue. Nessuna parte di questa pubblicazione potrà essere riprodotta o trasmessa in qualsiasi forma o per mezzo di apparecchiature elettroniche o meccaniche, compresi fotocopiatura, registrazione o sistemi di archiviazione di informazioni, senza il permesso scritto da parte dell'Editore. L'Editore è disponibile al riconoscimento dei diritti di copyright per qualsiasi immagine utilizzata della quale non si sia riusciti a ottenere l'autorizzazione alla riproduzione.

Nota dell'Editore: nonostante la grande cura posta nel compilare e controllare il contenuto di questa pubblicazione, l'Editore non sarà ritenuto responsabile di ogni eventuale utilizzo di questa pubblicazione nonché di eventuali errori, omissioni o inesattezze nella stessa.

Ogni prodotto menzionato deve essere usato in accordo con il Riassunto delle Caratteristiche di Prodotto fornito dalle Case Produttrici.

L'eventuale uso dei nomi commerciali ha soltanto lo scopo di identificare i prodotti e non implica suggerimento all'utilizzo.

Si ringrazia ROCHE S.p.A. per il contributo bibliografico fornito.

INTRODUZIONE

I linfociti B svolgono un ruolo centrale nella risposta immunitaria, esercitando molteplici funzioni: presentano l'antigene alle cellule T, con la conseguente attivazione di queste ultime, sintetizzano numerose citochine pro-infiammatorie [*tumor necrosis factor* (TNF), interleuchina (IL)-6, linfotossina-alfa] e producono anticorpi indirizzati contro le strutture *non-self*^[1-3].

Tali meccanismi risultano fondamentali anche nella patogenesi dell'artrite reumatoide (AR)^[1-3]. La produzione continua di citochine contribuisce all'insorgenza e al mantenimento di un processo infiammatorio cronico, al quale consegue la progressione del danno articolare^[2,3]. Inoltre, alcuni linfociti B possono sintetizzare autoanticorpi, definiti come anticorpi diretti contro antigeni *self*^[4]. Infatti, in assenza di patologie autoimmuni, i linfociti B che producono autoanticorpi sono riconosciuti da specifici linfociti T, che ne inducono l'apoptosi. Nei pazienti affetti da AR, tale meccanismo è alterato: i linfociti B autoreattivi sfuggono al riconoscimento da parte dei linfociti T, proliferano e sintetizzano autoanticorpi, che contribuiscono alla patogenesi dell'AR mediante una pluralità di meccanismi (attivazione del sistema del complemen-

to, attivazione dei neutrofili, ulteriore incremento della sintesi di citochine pro-infiammatorie)^[5]. La deplezione dei linfociti B appare quindi come una strategia terapeutica particolarmente promettente nell'AR.

Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico, che lega l'antigene CD20, una fosfoproteina espressa sulle membrane di alcuni linfociti B (linfociti CD20+), riducendone l'espressione e promuovendone l'internalizzazione^[6-8]. Il legame di rituximab con l'antigene CD20 induce una deplezione dei linfociti B attraverso un triplice meccanismo d'azione (*Tabella 1*)^[9]. Occorre ricordare come l'antigene CD20 sia espresso unicamente nel corso della maturazione dei linfociti B, ma non nelle cellule staminali o in quelle mature, che, pertanto, non vengono deplete dall'azione del farmaco. Inoltre, la deplezione dei linfociti B perdura per circa 6 mesi dopo il trattamento e viene seguita da una ripopolazione tra il 9° e il 12° mese successivamente all'interruzione della terapia con rituximab^[10,11].

L'obiettivo di questa pubblicazione è riassumere le attuali conoscenze circa i fattori predittivi di risposta a rituximab nel trattamento dell'AR.

Tabella 1 Triplice meccanismo d'azione di rituximab (elaborata graficamente da^[9])

Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , ADCC)	Rituximab attiva il sistema del complemento, determinando lisi dei linfociti B
Citotossicità complemento-dipendente (<i>complement-dependent cytotoxicity</i> , CDC)	Il legame di rituximab a CD20 permette il reclutamento di cellule <i>natural killer</i> , citotossiche sui linfociti B
Induzione dell'apoptosi	L'interazione di rituximab con CD20 innesca meccanismi di <i>signalling</i> che inducono l'apoptosi dei linfociti B

DEPLEZIONE DEI LINFOCITI B CIRCOLANTI

I risultati di uno studio di fase IIa, in doppio cieco, hanno dimostrato un'assenza di correlazione tra deplezione dei linfociti B circolanti e risposta clinica e una variabilità nel *recovery* di queste cellule nei pazienti trattati con rituximab^[12].

Nel corso di un altro studio, che ha misurato la concentrazione dei linfociti B tramite citofluorimetria di flusso ad alta sensibilità, è stata evidenziata una deplezione di questa linea cellulare a circa 15 giorni dalla somministrazione di rituximab; è stata invece dimostrata una ripopolazione a una media di 8 mesi dall'inizio del trattamento, con la formazione di linfociti B *naïve* che presentavano un aumento dell'espressione di CD38 e CD5^[13]; nel corso della ripopolazione, il numero di cellule B immature è aumentato.

È da sottolineare come esista un'associazione positiva tra numero di cellule B della memoria e *relapse* di AR^[14].

In un altro studio, la ripopolazione dei linfociti B ha riguardato principalmente le cellule CD27-IgD+ *naïve*; nella stessa analisi, è emerso come una modesta concentrazione plasmatica di linfociti CD27+IgD- della memoria sia correlata a una buona risposta clinica^[15].

A livello del plasma periferico e del midollo osseo, la popolazione predominante è rappresentata da linfociti B immaturi e/o in fase di transizione (CD38++CD24++) e da cellule CD27+IgD- della memoria, mentre i linfociti IgD+ sono completamente depleti.

In uno studio a lungo termine è stata osservata una riduzione dei linfociti B

CD27+ a livello sia del plasma periferico sia del midollo osseo; tuttavia, la somministrazione di rituximab ha indotto una deplezione solo temporanea di cloni autoreattivi^[16].

È stato inoltre suggerito come la terapia con rituximab riduca preferenzialmente, nei pazienti con AR in fase attiva, i linfociti B CD19+HLA-DR+; la deplezione dei linfociti B CD19+CD27+ della memoria è associata a una risposta clinica^[17]. La prima fase della ripopolazione è apparsa caratterizzata dalla produzione di linfociti B CD38++IgD+CD10+ immaturi^[18], mentre l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare avanzate ha mostrato come le cellule B IgD+CD27+ della memoria fossero particolarmente sensibili all'azione di rituximab^[19].

Nel corso di uno studio recente, condotto su 158 pazienti, è stato osservato che una mancata risposta iniziale al trattamento con rituximab è associata a una concentrazione più elevata di linfociti pre-B e a una deplezione incompleta; tuttavia, la somministrazione di un ulteriore ciclo di terapia prima della ripopolazione completa ha aumentato la deplezione e migliorato la risposta clinica^[20].

Sebbene il trattamento con rituximab sia efficace nel ridurre la concentrazione di linfociti B nel plasma periferico, l'entità della deplezione di queste cellule da altri siti, come i linfonodi o i tessuti linfoidei terziari, può essere variabile: una mancata deplezione può portare a una mancata risposta o a un *relapse* precoce della patologia.

DEPLEZIONE DEI LINFOCITI B A LIVELLO SINOVIALE

I risultati di alcuni studi hanno dimostrato come le cellule B a livello sinoviale siano deplete, ma non completamente eliminate, dal trattamento con rituximab; è stata inoltre evidenziata una correlazione fra l'entità della deplezione, in particolare delle cellule CD22+, e la risposta clinica^[21,22].

Nel corso di uno studio condotto da Thurlings et al. su 24 pazienti affetti da AR, sono stati valutati gli effetti di rituximab sulla concentrazione sinoviale di linfociti B e di plasmacellule produttrici di anticorpi^[23]. Già a partire dalla 4ª settimana dopo la somministrazione di rituximab (1000 mg/die, ai giorni 1 e 15), è stata osservata una riduzione significativa della concen-

trazione dei linfociti B nella sinovia dei pazienti inclusi nello studio. In alcuni pazienti, tale riduzione è stata ancora più evidente alla 16ª settimana successiva al trattamento. La somministrazione di rituximab ha inoltre determinato una marcata riduzione delle plasmacellule, che è risultata correlata a una diminuzione del DAS28 (*Disease Activity Score 28 joints*) alla 24ª settimana, suggerendo quindi come la deplezione delle plasmacellule nella sinovia possa essere predittiva della risposta clinica.

Non sono state invece evidenziate correlazioni fra la risposta clinica e la concentrazione plasmatica di rituximab, la sintesi di anticorpi anti-chimerici o la persistenza delle cellule B sinoviali^[24].

FATTORE REUMATOIDE E ANTICORPI ANTI-PEPTIDE CICLICO CITRULLINATO

Gli autoanticorpi RF (*rheumatoid factor*) e anti-CCP (*anti-cyclic citrullinated peptide*) sono tipicamente associati all'AR, e in particolare alle forme più aggressive della patologia^[25,26]. I risultati di numerosi studi osservazionali sono concordi nell'affermare come la prevalenza di autoanticorpi RF e anti-CCP sia più elevata nei pazienti affetti da AR, rispetto alla popolazione generale (*Tabella 2*)^[27-29]. Da altri risultati clinici è emerso come la positività per RF e/o anti-CCP possa precedere anche di 14 anni l'insorgenza della sintomatologia dell'AR^[30] e come sia predittiva di una rapida progressione radiografica della patologia^[31].

La correlazione fra gli *outcomes* clinici in seguito alla somministrazione di rituximab e la positività per RF e/o anti-CCP è stata ampiamente valutata nel corso di numerosi studi. I risultati dello studio

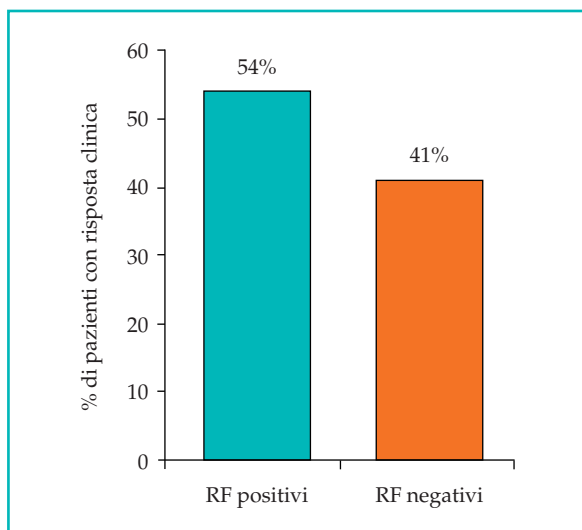
multicentrico REFLEX (*Randomized Evaluation of Long-Term Efficacy of Rituximab in RA*), con disegno randomizzato in doppio cieco, dimostrano come rituximab più metotrexato abbia determinato una riduzione della concentrazione di RF più marcata rispetto alla monoterapia con metotrexato^[7]. Lo stesso studio dimostra, inol-

Tabella 2 Prevalenza di autoanticorpi RF e anti-CCP in pazienti affetti da artrite reumatoide (AR) e nella popolazione generale (elaborata graficamente da^[27-29])

	Prevalenza autoanticorpi	
	Pazienti con AR	Popolazione generale
RF	50-66%	7-13%
anti-CCP	41-48%	3-9%

anti-CCP, *anti-cyclic citrullinated peptide*; RF, *rheumatoid factor*.

Figura 1 Incidenza di risposta clinica, secondo i criteri ACR20, in pazienti trattati con rituximab positivi e negativi per RF (*rheumatoid factor*). ACR, American College of Rheumatology (elaborata graficamente da^[7]).



tre, come la percentuale di soggetti che raggiungono la risposta ACR20 sia maggiore nel gruppo di pazienti positivi per RF rispetto al gruppo di pazienti negativi per tale autoanticorpo (*Figura 1*)^[7]. Nello studio di Quartuccio et al. in uno scenario *real-life*, è emerso come, tra i pazienti che hanno ottenuto una risposta ACR ≥ 50 , più del 90% fosse positivo per RF [67/73] e più dell'80% per gli anticorpi anti-CCP [43/64]^[26]. L'analisi statistica ha confermato la correlazione tra la positività per RF e il raggiungimento di una risposta clinica secondo i criteri EULAR (*The European League Against Rheumatism*) sia nell'analisi univariata ($p < 0,0001$), sia in quella multivariata ($p = 0,001$).

DEPLEZIONE DELLE CELLULE T E SINTESI DI CITOCHINE

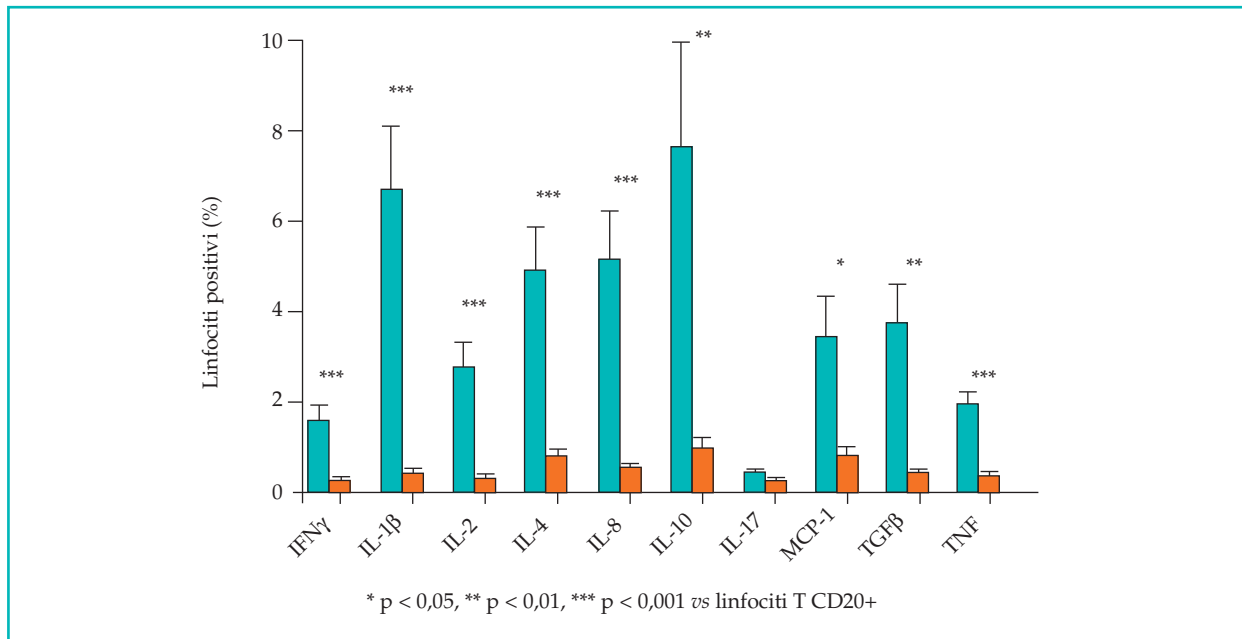
La riduzione nell'espressione dell'antigene CD20 determinata da rituximab non è limitata ai linfociti B, in quanto anche una percentuale, sia pur modesta (1,6-2,4%), di linfociti T esprime sulla propria superficie questa molecola (linfociti CD20+)^[32].

Nel corso di un recente studio, sono stati valutati il fenotipo e la funzionalità dei linfociti T CD3+ e CD20+ in pazienti affetti da AR e in controlli sani mediante una pluralità di metodologie di biologia cellulare e molecolare (fascicolazione fluorescenza-attivata a 4 colori, marcatura delle citochine, *uptake* della timidina triziata)^[33]. I risultati hanno dimostrato come la percentuale media di linfociti T che esprimevano l'antigene CD20 fosse confrontabile nei pazienti affetti da AR ($n = 27$) e nei controlli sani ($n = 142$) [1,2% (*range* 0,4-2,6%) vs 1,6% (*range* 0,1-6,8%)]. La somministrazione di rituximab ha determinato una riduzione nella concentrazione dei linfociti T che esprimevano l'antigene CD20^[33].

La valutazione della funzionalità cellulare ha mostrato come il maggior numero di cellule produttrici di citochine fosse CD20+. Inoltre, è da sottolineare come le cellule policlonali CD3+ e CD20+ fossero caratterizzate da una produzione di citochine pro-infiammatorie, come IL-1beta e TNFalfa (*Figura 2*)^[33], una modesta capacità proliferativa, uno stato di attivazione elevato e un aumento della suscettibilità all'apoptosi. Nel complesso, questi risultati suggeriscono come i linfociti T CD20+ siano una popolazione cellulare differenziata, con capacità immuno-regolatorie e pro-infiammatorie. Di conseguenza, la deplezione di queste cellule può rappresentare un ulteriore meccanismo d'azione di rituximab in pazienti affetti da AR.

Questi risultati sono stati confermati da altre esperienze. In un recente *case-report*, che descrive un paziente con AR resistente a numerosi trattamenti farmacologici, la somministrazione di rituximab ha determinato una brusca interruzione della sin-

Figura 2 Positività per la produzione di citochine, in linfociti T CD20+ (istogrammi verdi) e CD20- (istogrammi arancio) raccolti da pazienti affetti da artrite reumatoide (modificata graficamente da^[33]).

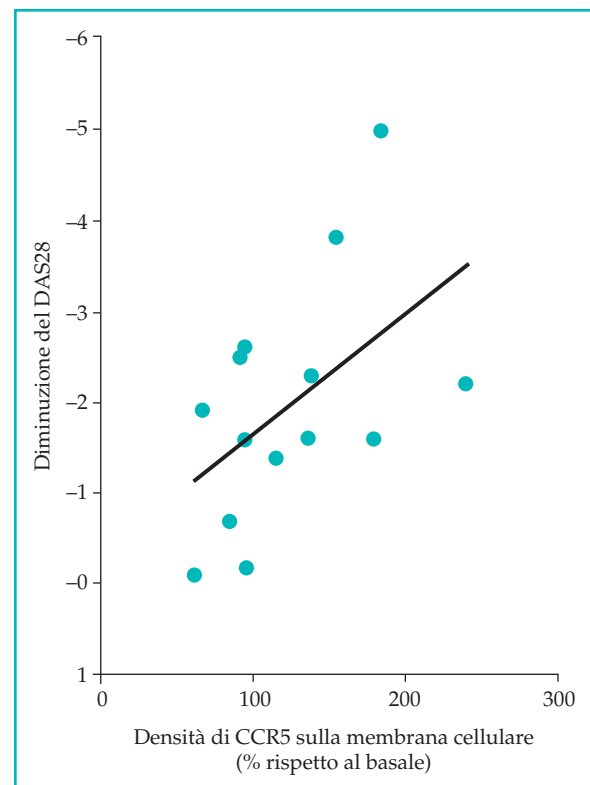


tesi di citochine caratteristica dei linfociti T *helper*; tale effetto è stato associato, a livello temporale, a un beneficio clinico^[34].

Nei pazienti affetti da AR, il recettore CCR5 (*chemokine receptor type 5*) per le chemochine a motivo C-C e il suo ligando CCL5 (*chemokine ligand type 5*) hanno un ruolo fondamentale nel reclutamento, a livello intra-articolare, delle cellule mononucleate da sangue periferico (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC)^[35]. In particolare, il livello di chemiotassi dei linfociti T verso le cellule sinoviali che sintetizzano CCL5 nei pazienti affetti da AR è determinato dalla densità di CCR5 sulla membrana cellulare^[36].

In uno studio recente, la densità di CCR5 è stata misurata in 27 soggetti affetti da AR, prima e dopo il trattamento con rituximab^[37]. Dopo trattamento con rituximab è stata osservata una correlazione altamente significativa (coefficiente di correlazione = -0,519; p = 0,007) fra l'incremento della densità del recettore CCR5 presente sulla membrana cellulare e il miglioramento del DAS28 (*Figura 3*)^[37].

Figura 3 Correlazione tra la densità di CCR5 sulla membrana cellulare dei linfociti T4 e lo score DAS28 in pazienti affetti da artrite reumatoide in fase attiva. DAS28, *Disease Activity Score 28 joints*; CCR5, *chemokine receptor type 5* (modificata graficamente da^[37]).



CONCLUSIONI

I linfociti B giocano un ruolo centrale nella patogenesi dell'AR: la deplezione di queste cellule mediante una terapia mirata, come rituximab, appare quindi una strategia terapeutica efficace.

La somministrazione di rituximab ha determinato una deplezione – ma non un'eradicazione completa – dei linfociti B a livello sinoviale, che è risultata associata a un miglioramento significativo del DAS28, suggerendo quindi come la deplezione delle plasmacellule nella sinovia possa essere predittiva della risposta clinica.

Il trattamento con rituximab ha determinato vantaggi clinici ancora più mar-

cati nei pazienti positivi per RF, un auto-anticorpo associato a una maggiore severità dell'AR.

La riduzione nell'espressione dell'antigene CD20 determinata da rituximab non è limitata ai linfociti B, in quanto anche una modesta percentuale di linfociti T risulta essere CD20+ ed esprime citochine pro-infiammatorie.

La somministrazione di rituximab determina un incremento della densità del recettore CCR5 presente sulla membrana cellulare, un importante fattore della chemiotassi dei linfociti T verso la sinovia. Tale meccanismo è correlato alla riduzione del DAS28.

BIBLIOGRAFIA

1. Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1484-92
2. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 2004; 172: 3422-7
3. Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8: 25-54
4. Silverman GJ, Carson DA. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003; 5 (Suppl. 4): S1-6
5. 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
6. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with Rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350: 2572-81
7. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, et al.; REFLEX trial Group. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2793-806
8. Caporali R, Caprioli M, Bobbio-Pallavicini F, et al. Long term treatment of rheumatoid arthritis with rituximab. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 591-4
9. Taylor RP, Lindorfer MA. Immunotherapeutic mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 444-9
10. Gibbons LJ, Hyrich KL. Biologic therapy for rheumatoid arthritis: clinical efficacy and predictors of response. *BioDrugs* 2009; 23: 111-24
11. Leandro MJ, de la Torre I. Translational Mini-Review Series on B Cell-Directed Therapies:

-
- The pathogenic role of B cells in autoantibody-associated autoimmune diseases—lessons from B cell-depletion therapy. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 191-7
12. Breedveld F, Agarwal S, Yin M, et al. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cells levels do not correlated with clinical response. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 1119-28
 13. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, et al. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2993-9
 14. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein RM, Edwards JC. Recostitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 613-20
 15. Möller B, Aeberli D, Eggli S, et al. Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R62
 16. Rehnberg M, Amu S, Tarkowski A, et al. Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R123
 17. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R131
 18. Roll P, Dörner T, Tony HP. Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cells subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1566-75
 19. Muhammad K, Roll P, Einsele H, et al. Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IgD+CD27+ memory B cell receptors after rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2284-93
 20. Vital EM, Dass S, Rawstron AC, et al. Management of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis: predictor and outcome of re-treatment. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1273-9
 21. Vos K, Thurlings RM, Wijbrandts CA, et al. Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 772-8
 22. Kavanaugh A, Rosengren S, Lee SJ, et al. Assessment of rituximab's immunomodulatory synovial effects (ARISE trial) 1: clinical and synovial biomarker results. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 402-8
 23. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, et al. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 917-25
 24. Thurlings RM, Teng O, Vos K. Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 409-12
 25. Teng YK, Levarht EW, Toes RE, et al. Residual inflammation after rituximab treatment is associated with sustained synovial plasma cell infiltration and enhanced B cell repopulation. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1011-6
 26. Quartuccio L, Fabris M, Salvin S, et al. Rheumatoid factor positivity rather than anti-CCP positivity, a lower disability and a lower number of anti-TNF agents failed are associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48: 1557-9
 27. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2: 236-43
 28. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63
 29. Jansen AL, van der Horst-Bruinsma I, van Schaardenburg D, et al. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptide
-

-
- differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 2074-6
30. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380-6
 31. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; 146: 797-808
 32. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry* 1993; 14: 196-204
 33. Wilk E, Witte T, Marquardt N, et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3563-71
 34. Yamamoto A, Sato K, Miyoshi F, et al. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. *Mod Rheumatol* 2010; 20: 183-7
 35. Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin Immunol* 2001; 98: 39-45
 36. Desmetz C, Lin YL, Mettling C, et al. Cell surface CCR5 density determines the intensity of T cell migration towards rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin Immunol* 2007; 123: 148-54
 37. Portalès P, Fabre S, Vincent T, et al. Peripheral blood T4 cell surface CCR5 density as a marker of activity in rheumatoid arthritis treated with anti-CD20 monoclonal antibody. *Immunology*. 2009; 128 (1 Suppl.): e738-45

Impegnata per un ambiente migliore, Roche utilizza carta riciclata

