

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze nefrologiche ed uro-andrologiche

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D2

Settore Scientifico disciplinare: MED/14

TITOLO TESI

**Utilizzo del Rituximab nel trattamento delle vasculiti
ANCA associate**

Presentata da: Dr Guido Jeannin

Coordinatore Dottorato

Prof Sandro Mattioli

Relatore

Prof Giovanni Cancarini

Correlatore

Prof Gaetano La Manna

Esame finale anno 2012

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	2
Le vasculiti ANCA associate	pag.	2
Rituximab.....	pag.	6
Antigene CD20.....	pag.	6
Meccanismi d'azione del Rituximab	pag.	9
Schemi terapeutici	pag.	10
Effetto sui linfociti periferici e linfonodali	pag.	11
Razionale dell'utilizzo del Rituximab	pag.	13
Ruolo dei linfociti B nell'autoimmunità.....	pag.	13
Ipotesi eziopatogenetiche della GW.....	pag.	15
Rituximab nelle vasculiti: revisione della letteratura.....	pag.	19
SCOPO DELLO STUDIO	pag.	30
PAZIENTI E METODI.....	pag.	31
RISULTATI.....	pag.	42
DISCUSSIONE.....	pag.	57
BIBLIOGRAFIA.....	pag.	71

INTRODUZIONE

Le vasculiti ANCA (anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili) associate (AAV).

Le vasculiti ANCA associate (AAV) comprendono tre patologie autoimmuni eterogenee: la poliangiite microscopica (MPA), la Granulomatosi di Wegener (GW), e la sindrome di Churg-Strauss (CHS). La caratteristica istologica principale delle AAV è una vasculite necrotizzante dei vasi di piccolo calibro prevalentemente a livello dei reni, dei polmoni e del sistema nervoso periferico. La glomerulonefrite necrotizzante extracapillare pauci-immune è una delle manifestazioni più comunemente osservate. La GW è una vasculite necrotizzante che colpisce i vasi di piccolo e medio calibro caratterizzata nelle prime fasi della patologia da una infiammazione necrotizzante granulomatosa del tratto respiratorio superiore ed inferiore; con la progressione della malattia spesso si rende evidente una vasculite disseminata con glomerulonefrite necrotizzante pauci-immune (figura 1).

La MPA è una vasculite dei piccoli e medi vasi che presenta parecchie similitudini cliniche e patologiche con la GW (figura 2). La glomerulonefrite extracapillare pauci-immune è più frequente nella MPA (90%). Entrambe queste patologie sono associate con la presenza nel siero di autoanticorpi che reagiscono contro specifici enzimi contenuti all'interno dei granuli azzurrofilari dei neutrofili e nei lisosomi dei monociti. La maggioranza dei pazienti con GW presenta autoanticorpi che reagiscono contro la proteinasi 3 (PR3), quelli con MPA presentano invece anticorpi che reagiscono contro la mieloperossidasi (MPO) (1).

L'infiammazione granulomatosa cronica delle alte e basse vie respiratorie è comunque una caratteristica peculiare della GW che probabilmente proprio per questo presenta una maggior tendenza alle recidive (2). Le lesioni granulomatose possono rappresentare per anni l'unica manifestazione di malattia ma la maggior parte dei pazienti successivamente sviluppa una vasculite sistemica. La persistenza o la riattivazione di queste lesioni infiammatorie nelle vie

aeree sarebbero in grado di scatenare le recidive di malattia anche dopo molti anni di remissione clinica (3). La CHS è la più rara delle AAV e si presenta con una fase iniziale caratterizzata da manifestazioni atopiche (rinite, poliposi nasale, asma) che possono durare anche mesi o anni, successiva comparsa di eosinofilia ematica e tissutale (infiltrati polmonari migranti) ed infine con una vasculite necrotizzante a livello di vari organi (polmone, cuore, reni, cute, nervi periferici) (1).

L'incidenza delle vasculiti sistemiche primitive è circa 40/milione/anno, quella delle AAV è circa 15-20/milione/anno. La prevalenza è variabile fra i 90 ed i 400/milione. L'incidenza delle AAV aumenta con l'età, ma mentre l'incidenza della GW si stabilizza oltre i 50-60 anni, l'incidenza della MPA continua ad aumentare. Questa associazione implica un possibile coinvolgimento eziologico dell'invecchiamento del sistema immunitario ed un possibile coinvolgimento di fattori ambientali. L'esposizione alla silice è associata ad una maggiore incidenza di MPA (1).

Se non trattate le AAV evolvono rapidamente. Una serie storica mostra una sopravvivenza media di cinque mesi ed una mortalità maggiore del 90% a due anni senza trattamento (4). Dalla fine degli anni 60 venne introdotto da Fauci e Wolff un protocollo basato sull'utilizzo di ciclofosfamide per via orale e cortisone: visto l'elevato tasso di remissione e di sopravvivenza ottenuto (maggiore dell'80% a 5 anni) divenne presto la terapia standard (2, 5).

Purtroppo l'elevata frequenza di recidive (in particolare della GW) determina l'utilizzo di ripetuti cicli di ciclofosfamide esponendo i pazienti all'importante tossicità di questo farmaco: infezioni maggiori, infertilità, disordini mieloproliferativi, cistiti emorragiche, neoplasie vescicali (2, 6).

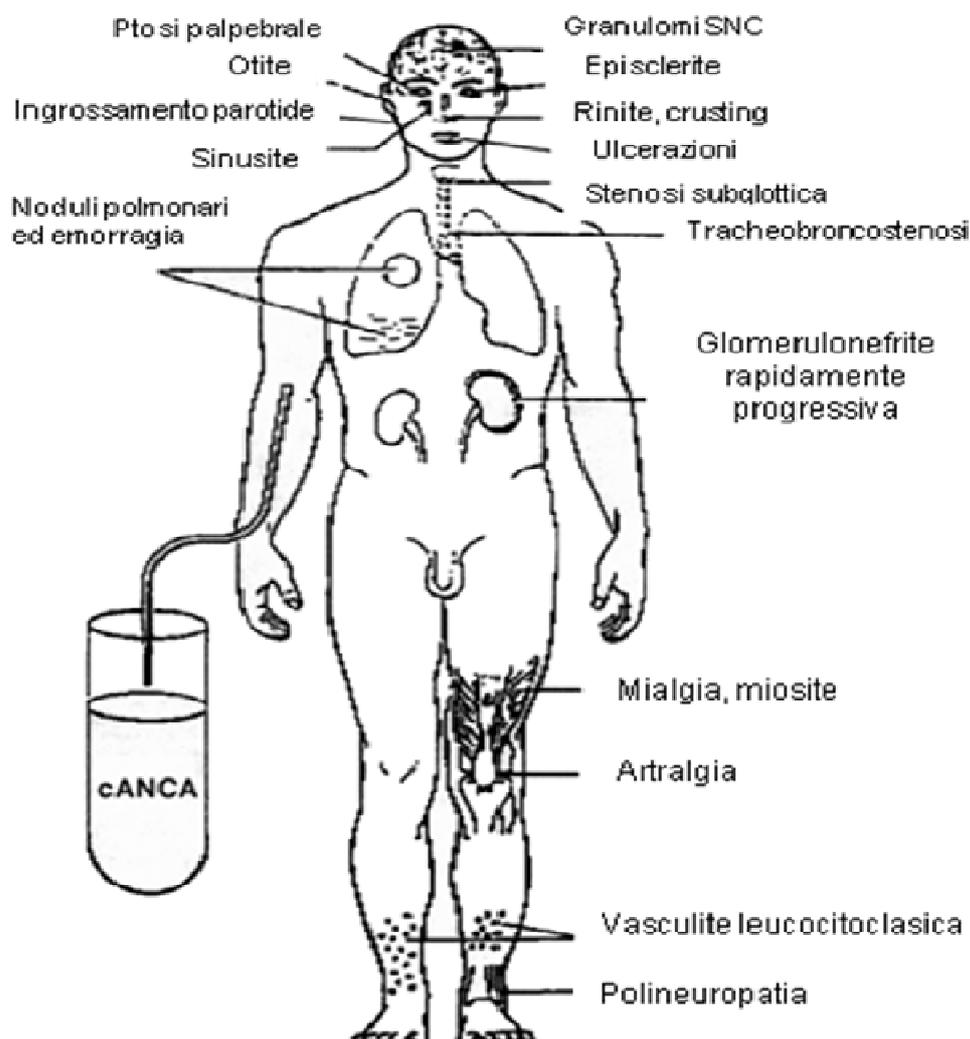


Figura 1. Principali manifestazioni cliniche della Granulomatosi di Wegener (GW).

Circa il 25% dei pazienti trattati con ciclofosfamide presenta effetti collaterali severi legati alla terapia (7). Fino al 50% dei pazienti con GW in remissione avrà una recidiva entro 5 anni e dovrà quindi essere ritrattato. Considerando la sua tossicità si dovrebbe cercare di limitare l'utilizzo di ciclofosfamide soprattutto in una patologia cronica e recidivante quale è la GW.

Negli ultimi anni l'adozione di uno schema terapeutico basato sull'uso della ciclofosfamide per via endovenosa come farmaco induttore della remissione sostituito da farmaci meno tossici

nella successiva fase di mantenimento (azatioprina o methotrexate), ha permesso di ridurre le dosi utilizzate e quindi limitare gli effetti tossici senza aumentare il rischio di recidive. Tuttavia anche questo schema terapeutico è associato ad una elevata tossicità soprattutto nei pazienti pluri-trattati e non è in grado di prevenire completamente le recidive (8-11).

Si stanno perciò sperimentando nuovi farmaci biologici con specifici target terapeutici con lo scopo di ottenere il controllo della malattia riducendo la tossicità del trattamento.

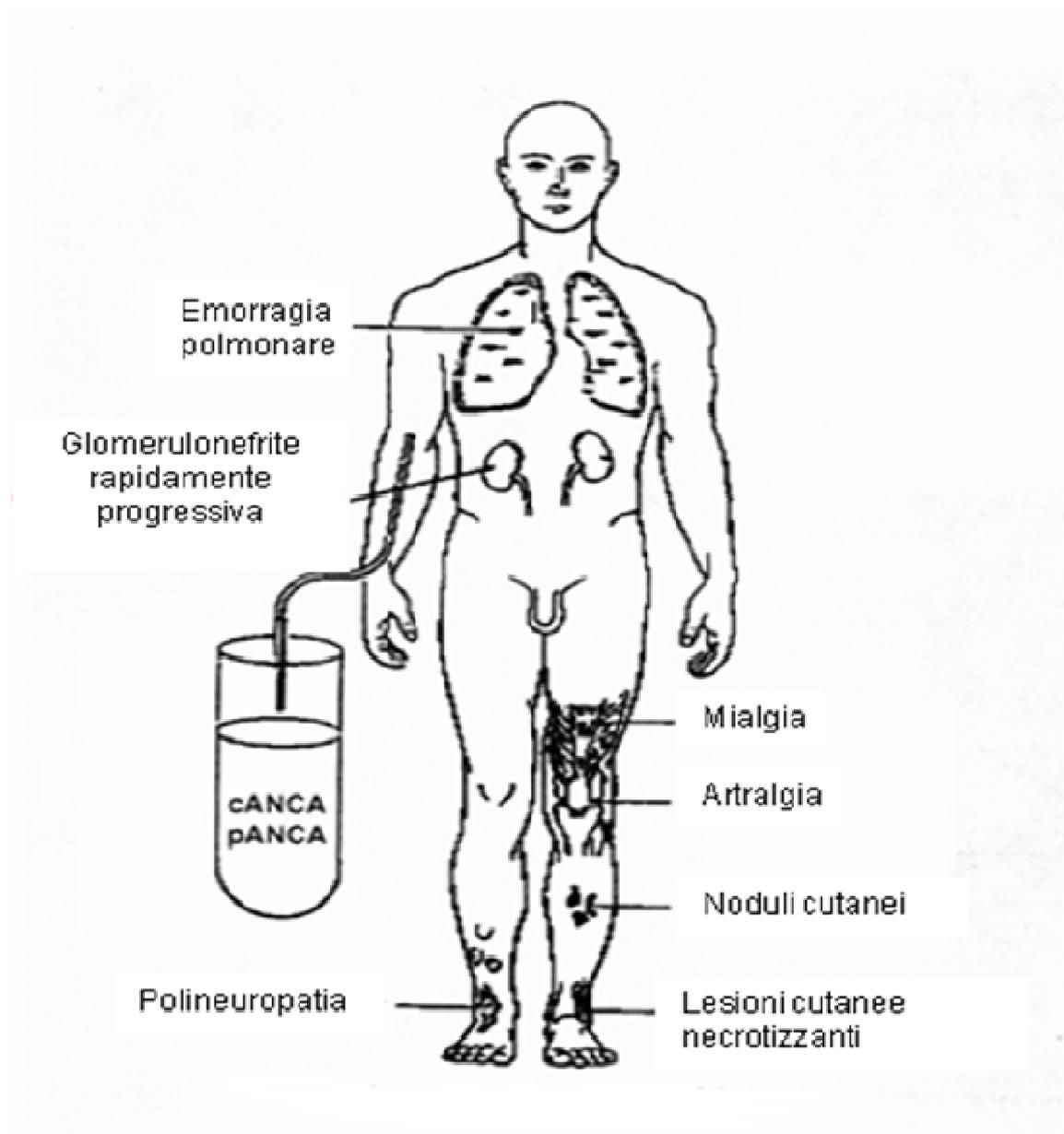


Figura 2. Principali manifestazioni cliniche della micropoliangiite (MPA).

RITUXIMAB

Rituximab (RTX) è un anticorpo monoclonale chimerico murino/umano specifico per l'antigene umano CD20 espresso sui linfociti B. L'immunoglobulina G (IgG) è composta da due catene pesanti e due catene leggere unite da ponti disolfuro. La struttura immunoglobulinica presenta una regione variabile che determina la specificità del legame con l'antigene CD20 ed una regione costante che è altamente conservata fra i diversi anticorpi ed è importante per le funzioni effettrici dell'anticorpo all'interno dell'organismo. Essendo gli anticorpi murini responsabili di severe reazioni allergiche, attraverso tecniche di ingegneria genetica la struttura costante dell'anticorpo murino è stata sostituita con sequenze proteiche umane in grado di limitarne l'immunogenicità: la regione variabile murina anti-CD20 umano è stata fusa con le regioni costanti di una IgG e della catena leggera k umane (12, figura 3).

CD 20 è una fosfoproteina espressa sulla superficie dei pre-linfociti B e sui linfociti B maturi sia quiescenti che attivati; non è espressa sulle cellule staminali, sui pro-linfociti B, sulle plasmacellule e in altri tessuti. Variabile e dibattuta è la sua espressione sulla superficie dei linfociti B memoria (figura 4). Questo tipo di distribuzione permette al RTX la specifica eliminazione dei linfociti B senza comprometterne la rigenerazione dalle cellule staminali e dai pro linfociti B e senza alterare la produzione delle immunoglobuline dalle plasmacellule. Infatti brevi trattamenti con RTX non determinano una significativa riduzione dei livelli di immunoglobuline, cicli più prolungati sono in grado invece di indurre una significativa deplezione immunoglobulinica soprattutto nei bambini.

La ridotta incidenza di gravi infezioni registrate in corso di trattamento potrebbe essere spiegata proprio della continua produzione di immunoglobuline da parte delle plasmacellule CD20 negative (13, 14).

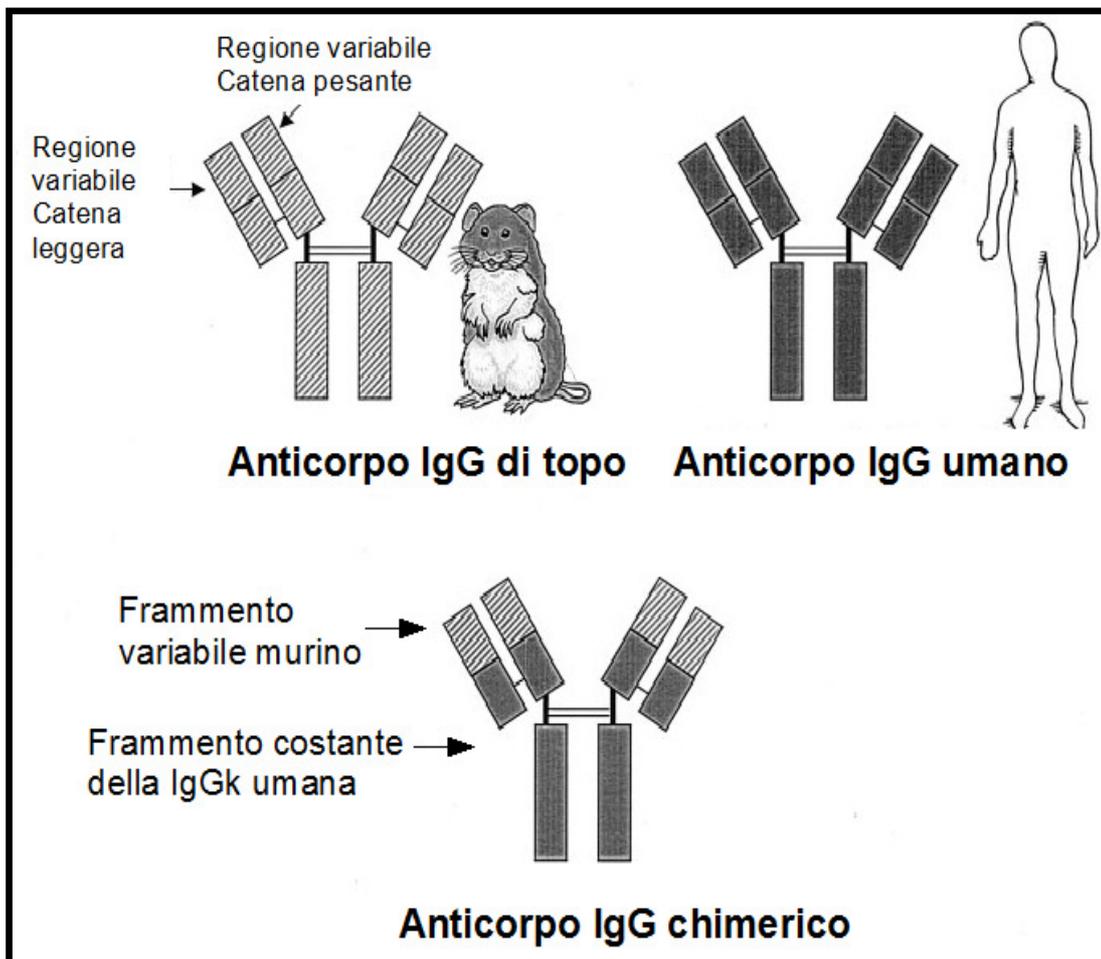


Figura 3. Anticorpo chimerico IgG ottenuto dalla fusione della porzione costante di una IgGk umana col frammento variabile di un anticorpo murino con specificità anti-CD20. Modificata (12).

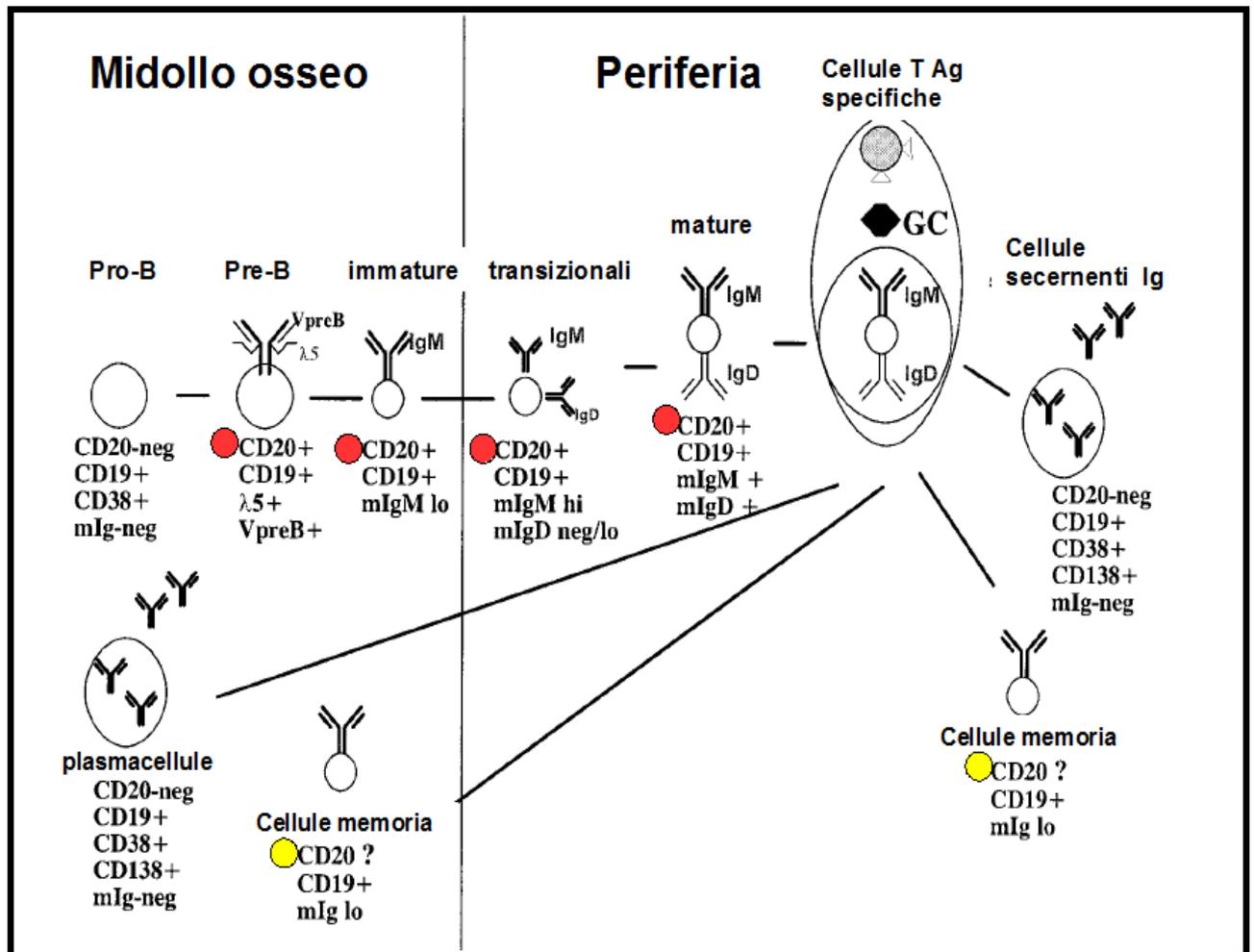


Figura 4. Espressione di CD20 sui linfociti B nel midollo osseo ed in periferia. Controversa è la sua espressione sulle cellule B memoria. Modificata (27).

CD20 ha un peso molecolare di circa 33-37 KD e presenta quattro regioni transmembrana, un loop extracellulare di 44 aminoacidi ed i terminali amino e carbossilico intracitoplasmatici (15).

Ad oggi il suo ruolo sulla fisiologia dei linfociti B non è ancora chiaro: non esistono ligandi naturali e ratti CD20-knockout non presentano nessun deficit immunologico (14).

Basandosi su omologie strutturali e modelli murini è stato postulato che CD20 possa

funzionare come sub-unità di un canale del calcio: questo spiegherebbe perché il legame di CD20 con RTX può influenzare l'attivazione cellulare, la differenziazione e la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S (16-18).

Il legame del CD20 non modula la sua espressione e non ne determina una internalizzazione.

CD20 non viene secreto e non si conoscono analoghi di membrana che possano interferire con una terapia specifica anti-CD20 (19). Il potenziale di questa terapia deriva dall'osservazione che il trattamento con anticorpi anti-CD20 induce la morte dei linfociti B anche senza la necessità di coniugare l'anticorpo con una tossina (12). L'eliminazione dei linfociti B da parte del RTX è determinata attraverso quattro meccanismi principali (figura 5) che hanno probabilmente un ruolo differente nel killing linfocitario in diversi microambienti:

1. dopo il legame con un dominio extracellulare di CD20 RTX è in grado di attivare il complemento con formazione del complesso terminale e conseguente lisi cellulare complemento-mediata.
2. Tramite una citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente indotta dal legame della porzione Fc dell'anticorpo con i rispettivi recettori (FcγR in particolare di tipo IIIa) sulle cellule citotossiche (macrofagi, cellule Natural Killer, linfociti T CD4/CD8).
3. Alterando la possibilità delle cellule B di rispondere ad altri segnali stimolatori.
4. Attivando le vie intracellulari che determinano l'apoptosi (20-23).

Il ruolo di questi differenti meccanismi varierebbe secondo il pool di linfociti considerato, per esempio la citotossicità cellulo-mediata tramite interazione con il recettore Fc sarebbe il meccanismo predominante attivo sui linfociti B presenti nel sangue periferico, mentre l'attivazione complementare giocherebbe un ruolo primario nel killing linfocitario all'interno degli organi linfoidei (24). Polimorfismi dei recettori FcγIIIa ed FcγIIa sono stati associati con l'efficacia antitumorale e nel trattamento del lupus eritematoso sistemico (LES) (25).

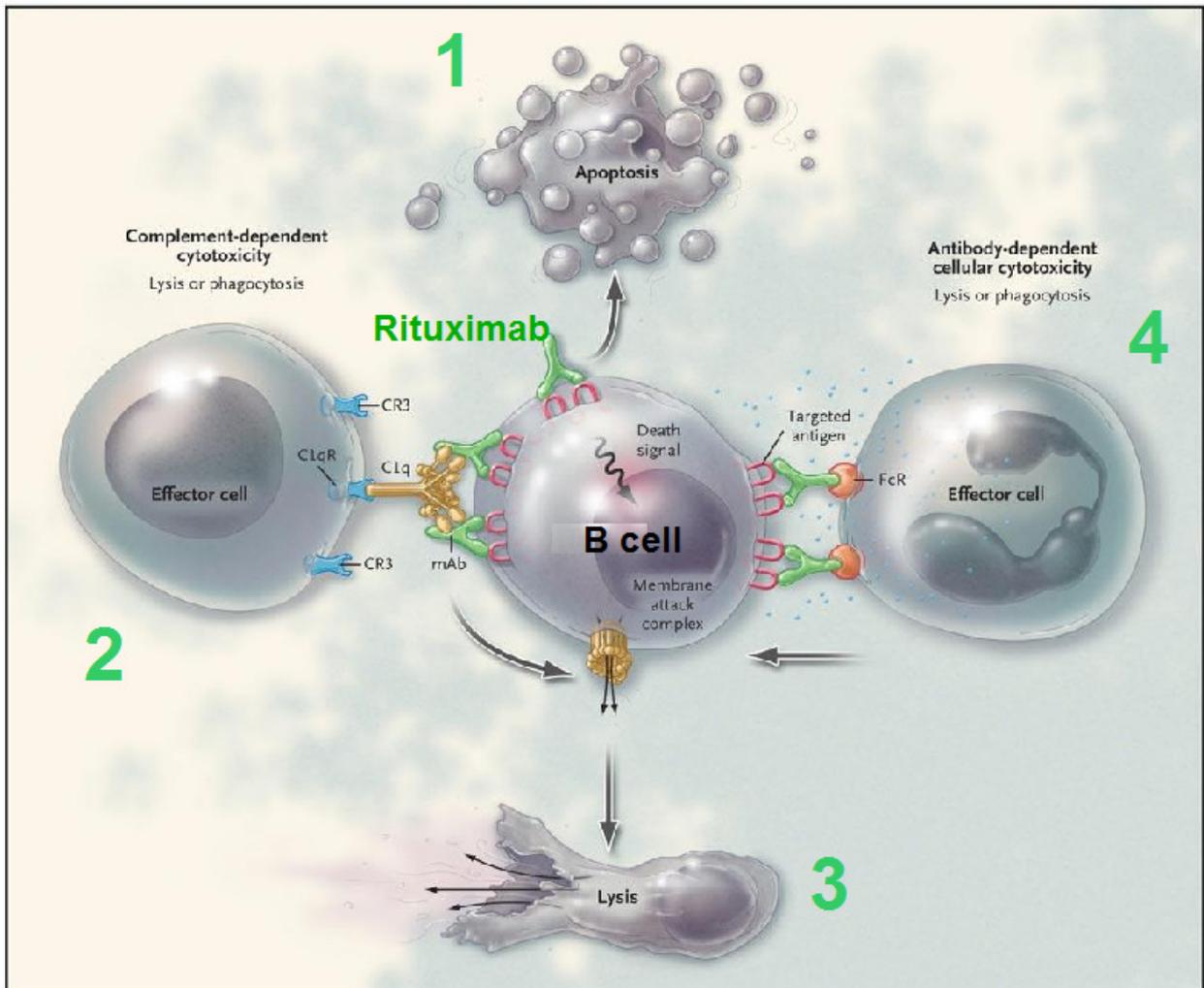


Figura 5. Meccanismi d'azione del RTX: induzione dell'apoptosi (1), citotossicità complemento mediata (2 e 3), citotossicità cellulo-mediata (2 e 4). Modificata (26).

Il RTX è stato estensivamente utilizzato in ambito ematologico in differenti tipi di linfomi B CD20+ ma anche per trattare patologie autoimmuni quali la porpora trombocitopenica idiopatica, l'anemia emolitica autoimmune, l'artrite reumatoide (AR), il LES, le vasculiti ANCA positive e la crioglobulinemia mista HCV correlata (25,27).

La dose appropriata di RTX ed il numero delle somministrazioni dipenderebbero dalla patologia da trattare: nella maggior parte dei casi di patologia linfomatosa lo schema base iniziale prevede la somministrazione di 375 mg/m² a cadenza settimanale per 4 settimane,

schema che è stato applicato anche al trattamento delle vasculiti ANCA positive. Nel LES e nell'AR lo schema consiste in 1 gr di RTX somministrato a cadenza bisettimanale in due sole dosi. Molto variabili risultano le associazioni farmacologiche utilizzate come anche i diversi stadi delle singole patologie nei quali è stato utilizzato. Nell'ambito dell'autoimmunità l'indicazione all'utilizzo approvata dalla Food and Drug Administration (FDA) è per l'AR in associazione con il methotrexate per le forme resistenti a farmaci bloccanti il Tumor Necrosis Factor α (TNF α) e recentemente per le forme severe di AAV.

La farmacodinamica e farmacocinetica del RTX sono condizionate da svariati fattori non precisamente prevedibili e studiati: le dosi, la tempistica di somministrazione, la massa di linfociti B sia circolanti sia residenti negli organi linfoidi, la capacità di clearance del sistema reticoloendoteliale che può essere influenzata da patologie epatiche, da diversi polimorfismi dei recettori γ per il frammento costante delle immunoglobuline, dal sistema del complemento con i rispettivi recettori e dalla funzionalità renale.

Con lo schema utilizzato convenzionalmente delle 4 somministrazioni settimanali il farmaco può essere rilevato nel siero anche dopo mesi dall'ultima somministrazione, ma esiste una notevole variabilità inter-individuale (28-34).

Dati ottenuti su topi transgenici che esprimono l'antigene umano CD20 sui linfociti B suggeriscono che la sensibilità delle cellule B CD20+ dipenderebbe dal microambiente circostante, dall'omeostasi regolata da molecole integriniche e dalle dinamiche circolatorie nei diversi compartimenti corporei dove esistono differenti tipi di interazione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. Tutti questi segnali sarebbero in grado di attivare una serie di secondi messaggeri intracellulari condizionanti in ultima analisi la sensibilità delle cellule B al RTX. Ad esempio in questi ratti transgenici i linfociti B della zona marginale dei linfonodi (considerati essere coinvolti nei normali processi di risposta anticorpale) non sono completamente eliminati dal RTX come avviene invece per i linfociti B CD20+ periferici, inoltre la loro eliminazione risulta essere prevalentemente complemento mediata (mentre per i linfociti

periferici prevale un processo di citotossicità anticorpo dipendente). Le cellule marginali venivano eliminate radicalmente dopo essere state mobilitate con l'utilizzo di anticorpi anti-integrine $\alpha 1$ ed $\alpha 4$: questo effetto sinergico potrebbe essere la base scientifica per l'utilizzo di nuove terapie di associazione (24).

Non esistono molti dati sull'uomo riguardanti la sensibilità delle diverse sotto-popolazioni di linfociti CD20+. Dati su animali indicano che RTX induce la deplezione del 98% dei linfociti B periferici ma solo il 40-70% dei linfociti B linfonodali con notevole variabilità inter-individuale (12). Questi ed altri risultati suggeriscono quindi che la completa deplezione dei linfociti B periferici che si ottiene dopo la somministrazione di RTX non rispecchia una deplezione completa linfocitaria nei follicoli linfoidi localizzati in stazioni linfonodali ed in siti extranodali (come ad esempio i follicoli linfoidi individuati nelle lesioni granulomatose endonasali in pazienti con GW o localizzati nelle sinovie di pazienti con AR) .

In sostanza potrebbero esistere dei siti protetti responsabili della resistenza al farmaco e della continua produzione anticorpale nonostante la prolungata deplezione linfocitaria periferica e quindi della persistenza della patologia e delle recidive.

Nei pazienti con linfoma (ma anche con patologie autoimmuni) i linfociti B CD20+ circolanti vengono eliminati entro le prime 3 settimane di trattamento e ricompaiono solo dopo 6-9 mesi, recuperando valori normali mediamente dopo un anno. Dopo il recupero numerico si evidenzia un cambio fenotipico dei linfociti B che risultano avere un deficit relativo di CD27, un marker dei linfociti B memoria, suggerendo che i linfociti B che ricompaiono sarebbero di tipo naive. Questa riorganizzazione fenotipica del comparto B potrebbe essere fondamentale per il recupero della tolleranza immunitaria, in quanto le cellule B naive più facilmente rispetto alle cellule memoria vanno incontro a fenomeni di tolleranza quando vengono esposte agli antigeni (35). I pazienti che dopo aver recuperato la popolazione B linfocitaria rimangono a lungo sierologicamente ANCA negativi e clinicamente in remissione, potrebbero essere quelli che hanno recuperato una tolleranza immunologica grazie alla distruzione dei cloni autoreattivi.

Va qui sottolineato il possibile ruolo dei linfociti B memoria autoreattivi CD20 negativi (quindi teoricamente non colpiti dal RTX) nel perpetuare o riattivare anche a distanza di mesi o anni la patologia autoimmune riattivandosi quando esposti all'autoantigene. Sarebbe quindi importante una terapia di associazione in grado di colpire anche queste cellule memoria autoreattive.

RAZIONALE DELL'UTILIZZO DEL RTX NELLE VASCULITI ANCA POSITIVE

Il razionale dell'utilizzo del RTX nelle AAV ed in particolare nella GW risiede nell'importante ruolo patogenetico che hanno i linfociti B in questa patologia (tabella I).

In generale le cellule B possono contribuire ai meccanismi patogenetici dell'autoimmunità nelle diverse patologie attraverso vari meccanismi:

- 1) la produzione di autoanticorpi patogeni come il fattore reumatoide, gli ANCA e gli anticorpi cationici anti-DNA.
- 2) La produzione di citochine (ad esempio interleuchina 6 e 10) che possono alterare la funzione di altre cellule incluse le cellule del sistema immunitario (ad esempio i sinoviociti nell'AR e le cellule mesangiali).
- 3) Funzionando come cellule presentanti l'antigene altamente competenti e presentando autoantigeni alle cellule T inducendone l'attivazione.

Studi su ratti evidenziano la capacità delle cellule B di indurre nefrite indipendentemente dalla loro abilità nel produrre autoanticorpi (27).

Tabella I. Funzioni fisiologiche e patologiche dei linfociti B (27).

Funzioni immunobiologiche dei linfociti B	Funzioni immunobiologiche dei linfociti B in corso di patologia autoimmune
Funzione di cellule presentanti l'antigene per i linfociti T	Funzione di cellule presentanti l'antigene per i linfociti T autoreattivi
Producono citochine che stimolano/modulano le cellule mononucleate	Producono citochine che stimolano/modulano le cellule mononucleate
Uptake degli antigeni tramite le Ig di superficie per la processazione e presentazione	Uptake degli autoantigeni tramite le Ig di superficie per la processazione e presentazione
Producono anticorpi dopo stimolazione antigenica	Producono autoanticorpi dopo stimolazione di un autoantigene che possono essere direttamente o indirettamente patogeni (formazione di immunocomplessi)
Produzione costitutiva di Ig da parte delle plasmacellule	Produzione costitutiva di autoanticorpi da parte delle plasmacellule
Cellule memoria in attesa di riesposizione all'antigene	Cellule memoria autoreattive in attesa di riesposizione all'autoantigene
	Proliferazione clonale incontrollata o prolungata sopravvivenza
	Infiltrazione diretta di organi (ad esempio le vie aeree nella GW, il rene nel LES, le articolazioni nell'AR, il fegato nella crioglobulinemia mista essenziale)

I quesiti cardine nella comprensione fisiopatologica delle patologie autoimmuni sono: dove, perché e come avviene e si mantiene l'attivazione autoimmunitaria e la produzione degli autoanticorpi.

Recenti modelli animali hanno evidenziato l'importanza dell'infiammazione degli organi target e della persistente presentazione degli autoantigeni in tessuti linfoidi organizzati.

Lesioni infiammatorie presenti in varie patologie autoimmuni come l'AR, la sindrome di Sjogren e la tiroidite di Hashimoto contengono distinte aree ricche di cellule B.

La GW può essere studiata come modello di patologia autoimmune: in una prima fase di malattia si sviluppano delle lesioni granulomatose localizzate nella alte e basse vie aeree (fase localizzata), in un secondo momento si può avere un coinvolgimento sistemico vasculitico strettamente associato alla formazione di anticorpi ANCA verso l' antigene chiave PR3 (36).

Se la patogenicità degli ANCA nell'indurre la vasculite sembra ormai accertata (esistono a riguardo numerosi modelli in vitro ed in vivo) non è noto il “primum movens” che ne induce la formazione. Vi sono attualmente due teorie più accreditate:

1) una suggerisce che la genesi dei PR3-ANCA sia da attribuire al fenomeno della “complementarietà autoantigenica” (37) già ipotizzata per altre malattie autoimmuni. La prima risposta immune si svilupperebbe verso il prodotto proteico sintetizzato dall'anticodone di DNA dell'antigene PR3 o verso un suo omologo di origine infettiva. Questo “anti”prodotto proteico indurrebbe la produzione di anticorpi che poi si rivolgerebbero contro PR3 data la sua maggiore disponibilità. Sono stati creati modelli animali immunizzati con il prodotto proteico antisense della PR3 in grado di sviluppare PR3-ANCA ed in pazienti con GW sono stati individuati anticorpi verso il prodotto proteico antisense della PR3. Esiste inoltre una certa complementarietà di alcune sequenze di DNA dello Stafilococco Aureo (spesso associato alla produzione di PR3-ANCA nell'uomo e alle riattivazioni della GW) con il gene della PR3.

2) La seconda teoria attribuisce la genesi degli ANCA ad una disfunzioni nei processi apoptotici dei neutrofili (38, 39). In modelli animali (40, 41) la somministrazione di neutrofili in apoptosi ha determinato la sintesi di ANCA (solo verso PR3 ed MPO).

Ma quale nesso esiste fra lesioni granulomatose e PR3- ANCA ?

Si ipotizza che un agente esogeno possa indurre un'inflammatione cronica delle vie aeree; gli studi del gruppo di Groningen hanno dimostrato l'importante ruolo della colonizzazione nasale da Stafilococco Aureo nella GW:

1. la mucosa nasale è la “riserva naturale” dello Stafilococco Aureo.
2. Il 100% dei pazienti con GW versus il 25% della popolazione generale sono portatori

cronici nasali di *Stafilococco Aureo*.

3. Le riacutizzazioni di malattia sono associate alla presenza del germe.
4. Le misure di eradicazione della colonizzazione si mostrano efficaci nel prevenire le riacutizzazioni della malattia (per questo motivo i pazienti affetti da GW devono essere sorvegliati rispetto alla presenza di *Stafilococco Aureo* mediante l'esecuzione periodica di tamponi nasali e se colonizzati deve essere attuata una terapia antibiotica generale e locale).

In soggetti predisposti un meccanismo immunitario complesso porterebbe dalla colonizzazione-infezione cronica a carico della mucosa nasale alla formazione del granuloma e successivamente alla generazione di una malattia autoimmunitaria ad espressione generalizzata (42).

Numerosi dati sperimentali hanno individuato nella PR3 l'elemento chiave nello scatenamento dell'autoimmunità nei soggetti predisposti. La PR3 è una serin-proteasi che viene rilasciata ed esposta sulla superficie cellulare dopo l'attivazione dei polimorfonucleati e dei monociti. E' stato dimostrato che in soggetti con GW la PR3 è in grado di attivare le cellule dendritiche tramite uno specifico recettore (PAR2-R) (figura 6). Le cellule dendritiche attivate funzionando come cellule presentanti l'antigene PR3 inducono l'attivazione di cellule T CD4+CD28- altamente differenziate anti-PR3 (cellule effettrici/memoria) in grado di determinare la formazione di granulomi nelle alte e basse vie aeree. Il granuloma risulta costituito per il 50/70% da celle T CD4+CD28- e per il 30-50% da cellule di derivazione monocitica (macrofagi, cellule giganti multinucleate, fibroblasti) e da granulociti polimorfonucleati. All'interno dei granulomi si verrebbero poi a formare delle aree ricche di linfociti B (limphoid-like) dove a seguito dell'interazione con i linfociti T e con altre cellule presentanti l'antigene i linfociti B andrebbero incontro ad una maturazione antigene guidata, trasformandosi in plasmacellule capaci di produrre anticorpi diretti contro la PR3 (43-47).

In un interessante lavoro Gross e colleghi hanno individuato clusters di cellule B all'interno di lesioni granulomatose endonasali di pazienti con GW (36) ed hanno ipotizzato che la

formazione degli ANCA anti-PR3 origini in questi granulomi nella prima fase della patologia, quando i pazienti sono spesso ancora ANCA negativi; successivamente la patologia evolverebbe verso una forma generalizzata vasculitica PR3-ANCA positiva.

Le biopsie nasali di tutti i pazienti con GW analizzati da Gross hanno evidenziato granulomi con follicoli linfoidi adiacenti ricchi di cellule mononucleate delle quali circa il 30% erano linfociti B CD20+. Venivano inoltre individuati neutrofili e monociti esprimenti l'autoantigene PR3, plasmacellule CD38+ e linfociti T CD4+ tipo Th1. Il tessuto della paziente di controllo non evidenziava cellule B né plasmacellule. Questa vicinanza strutturale suggerisce un processo locale di selezione e maturazione di affinità B cellulare antigene guidato.

Successivamente Gross e colleghi hanno analizzato il repertorio genetico codificante per le catene pesanti anticorpali isolate dalle biopsie endonasali di sei differenti pazienti con GW confrontandolo con quello di pazienti sani. L'analisi effettuata ha mostrato un tasso di mutazione molto più elevato nei pazienti affetti, tipico di un processo di selezione guidato da un antigene con caratteristiche compatibili con PR3.

Un processo di selezione B cellulare simile è stato rilevato all'interno dei follicoli linfoidi delle membrane sinoviali di pazienti affetti da AR nei quali viene prodotto l'autoanticorpo tipico della patologia (il fattore reumatoide).

In conclusione anche se l'eziologia della GW non è nota questi lavori suggeriscono un ruolo determinante dei linfociti B nella fisiopatologia della GW e quindi risulta evidente il razionale dell'utilizzo del RTX. Resta da chiarire il “primum movens” responsabile della formazione delle lesioni granulomatose e l'eventuale ruolo dei linfociti B nella costituzione e nel mantenimento della struttura granulomatosa.

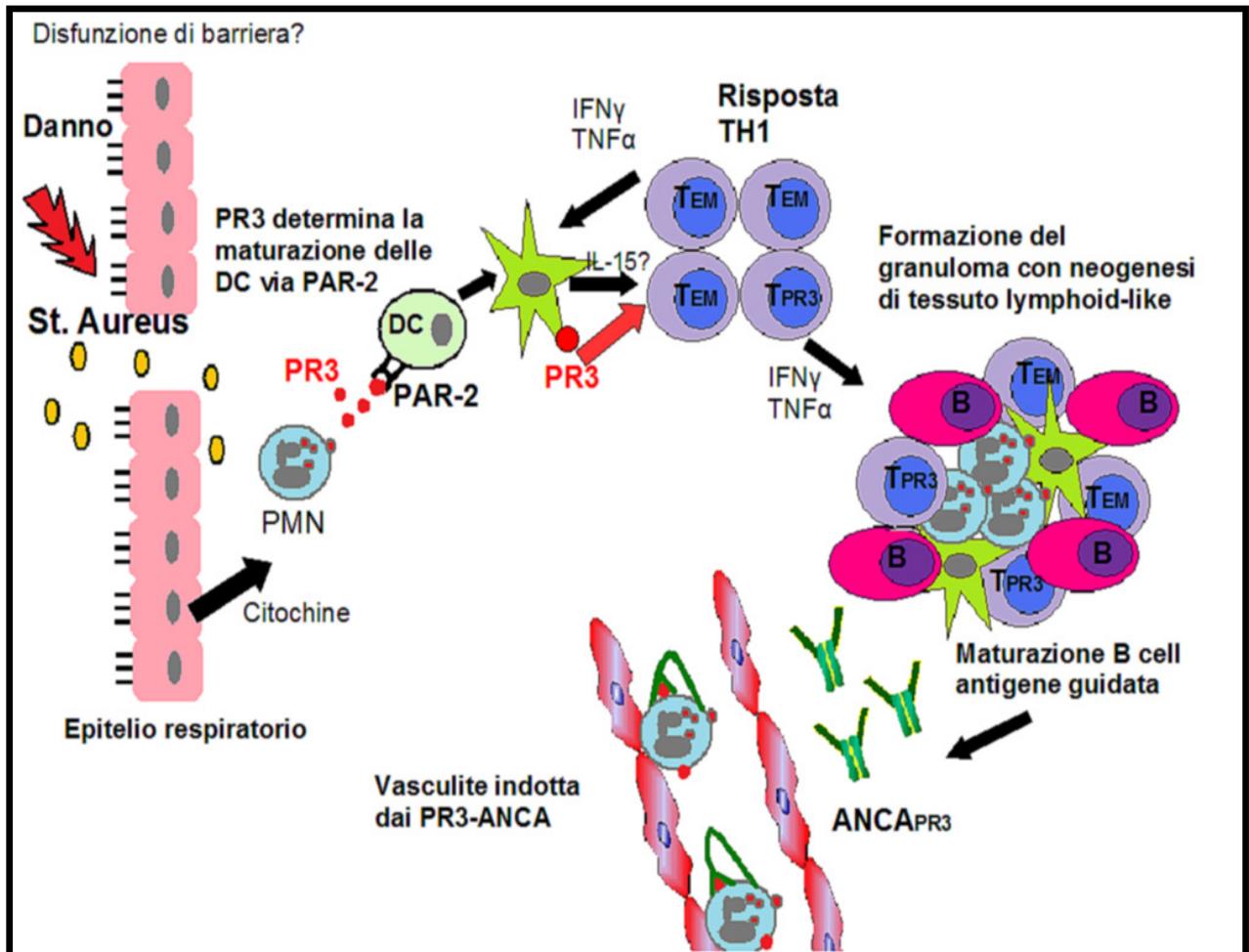


Figura 6. Eziofisiopatologia della GW. Un agente esogeno determina un'inflammatione a livello delle vie respiratorie, liberazione della proteinasi 3 (PR3) e attivazione delle cellule dendritiche (DC) tramite il recettore attivato dalle proteasi 2 (PAR-2). Le cellule dendritiche inducono una risposta tipo Th1 specifica per PR3 con formazione di un granuloma ricco di aree lymphoid-like. Nel granuloma le cellule B CD20+ subiscono un processo di maturazione antigene dipendente trasformandosi in plasmacellule produttrici di PR3-ANCA che scatenano una vasculite del microcircolo. PMN: polimorfonucleati; T_{EM}: cellule T effettrici/memoria; IFN γ : interferone γ ; TNF α : tumor necrosis factor α . Modificata (47).

REVISIONE DELLA LETTERATURA

Sono stati pubblicati recentemente due trials randomizzati e controllati che hanno studiato l'utilizzo del RTX come farmaco di induzione della remissione delle AAV in alternativa al protocollo standard con ciclofosfamide (CYC) (48, 49).

'Rituximab versus Cyclophosphamide for ANCA-associated Vasculitis' (RAVE) (49) è un trial multicentrico, randomizzato, doppio ceco condotto per valutare l'efficacia e la sicurezza del RTX vs la CYC nell'indurre la remissione in pazienti con AAV di nuova diagnosi o con recidive severe. 197 pazienti affetti da forme severe di GW o MPA (3:1) sono stati inclusi nello studio e randomizzati a ricevere RTX (375 mg/m², 4 somministrazioni a cadenza settimanale) o CYC (2mg/kg/die per via orale) associati a glucocorticoidi. Lo schema della terapia steroidea era uguale in entrambi i gruppi e consisteva in 3 boli endovenosi di metilprednisone da 1 gr a cadenza giornaliera per 3 giorni consecutivi, seguiti da prednisone per via orale con riduzione progressiva dei dosaggi fino alla completa sospensione al termine del quinto mese. Ottenuta la remissione fra il terzo ed il sesto mese i pazienti trattati con CYC proseguivano con azatioprina (AZA) come terapia di mantenimento, mentre i pazienti del gruppo RTX sospendevano ogni terapia. Nei due gruppi vi era un egual numero di pazienti con nuova diagnosi e di pazienti con recidive. Nel gruppo di pazienti trattati con RTX 63 (64%) ottenevano l'endpoint primario (BVAS/WG uguale a 0 in assenza di terapia steroidea a 6 mesi) vs 52 (53%) nel gruppo di quelli trattati con CYC. Questo risultato evidenziava la non inferiorità del RTX (P<0.0001) e sfiorava la significatività statistica per superiorità (P 0.09). Non si osservava una differenza nella risposta al trattamento nel sottogruppo di pazienti con coinvolgimento maggiore renale (99 pazienti) od emorragia alveolare (50 pazienti). Lo studio non evidenziava differenze significative nella risposta alla terapia nei pazienti con nuova diagnosi, ma nel sottogruppo di pazienti trattati per recidiva maggiore il RTX si dimostrava superiore alla CYC.

Non vi era differenza nell'incidenza di eventi avversi minori o maggiori nei due gruppi di trattamento. Sulla base dei risultati di questo trial la FDA ha approvato l'utilizzo del RTX per l'induzione della remissione in pazienti con GW o MPA severe.

L'altro trial randomizzato e controllato chiamato 'Rituximab versus Cyclophosphamide in ANCA Associated Renal Vasculitis' (RITUXVAS) includeva 44 pazienti con AAV severa di nuova diagnosi (GW o MPA) ed interessamento renale (48). I pazienti venivano randomizzati 3:1 a ricevere (oltre al prednisone) RTX (375 mg/m² in 4 dosi a cedenza settimanale) più due dosi endovenose di CYC somministrate contemporaneamente alla prima ed alla terza infusione di RTX (33 pazienti) o boli di CYC per via endovenosa per 3-6 mesi seguiti da AZA per via orale (11 pazienti). Contrariamente ai pazienti arruolati nel trial RAVE, tutti i pazienti del trial RITUXVAS venivano mantenuti in terapia anche con basse dosi di steroide. La remissione completa veniva ottenuta nell' 82% dei pazienti trattati con RTX e nel 91% di quelli del gruppo CYC. A 12 mesi non vi era una differenza significativa nel mantenimento della remissione (BVAS di 0 per almeno 6 mesi) fra i due bracci (76% vs 82%). Anche la percentuale di eventi avversi registrati non differiva fra i due gruppi (18% di decessi).

In entrambi i trials la frequenza delle recidive era un importante endpoint secondario. Nel RITUXIVAS il 15% dei pazienti trattati con RTX vs il 10% di quelli trattati con CYC avevano una recidiva nel corso di 12 mesi di follow-up. A distanza di 2 anni nel gruppo trattato con RTX solo 7/33 (21%) pazienti recidivavano nonostante non assumessero nessuna terapia di mantenimento; nel gruppo di pazienti trattati con CYC che assumevano AZA come terapia di mantenimento le recidive registrate erano comparabili (2/11, 18%).

Anche nel RAVE le recidive registrate a 6 mesi erano comparabili fra i due gruppi. Ad un follow-up di 18 mesi il 36% dei pazienti trattati con RTX (senza terapia di mantenimento) vs il 31% di quelli trattati con CYC (che assumevano AZA come mantenimento) erano ancora in remissione (50).

Un altro autore ha trattato 23 pazienti con severa AAV di nuova diagnosi o ad una recidiva

maggiore con due dosi di RTX a distanza di 2 settimane e 6 dosi endovenose di CYC ogni 15 giorni (più steroide per os). Come terapia di mantenimento veniva utilizzata l'AZA e basse dosi di steroide. Tutti i pazienti ottenevano una remissione clinica entro 6 settimane. Ad un follow-up medio di 39 mesi venivano registrate 3 recidive maggiori e 2 recidive minori in 5 pazienti rilevate mediamente a distanza di 30 mesi dal trattamento (51).

Anche la maggior parte delle altre piccole casistiche pubblicate concludono che il RTX è efficace e sicuro con una risposta in quasi il 90% dei pazienti trattati (52-73).

La maggior parte di questi studi includevano pazienti pluri-trattati che avevano una recidiva di vasculite ed erano intolleranti o refrattari al trattamento standard (steroidi e CYC).

Considerando le principali casistiche pubblicate sono stati descritti 245 pazienti trattati con RTX per recidiva di AAV o per malattia resistente al trattamento standard dei quali 210 erano affetti da GW, 30 da MPA e 5 da CHS. 179/245 pazienti (73%) hanno ottenuto una remissione completa, 45/245 (18%) una remissione parziale e 21/245 (9%) non hanno risposto al RTX (Tabella II). Diversi erano i criteri utilizzati per definire la remissione (52-73).

Tutti gli autori hanno riportato una rapida regressione delle manifestazioni di tipo vasculitico (entro giorni o settimane) mentre più dibattuta è risulta essere l'efficacia verso le manifestazioni granulomatose.

Complessivamente sui 146 pazienti descritti con GW che presentavano una recidiva di tipo granulomatoso 107/146 (73%) hanno ottenuto una risposta completa, 18/146 (12%) una risposta parziale e 21/146 (14%) non hanno risposto al trattamento. In sostanza tutti i fallimenti e quasi metà delle risposte parziali riportate nella valutazione complessiva di tutte le recidive (sia vasculitiche che granulomatose) sono riferibili a recidive di tipo granulomatoso.

Tre casistiche hanno evidenziato una particolare refrattarietà di alcune manifestazioni granulomatose, soprattutto dei granulomi retro-orbitari (56-58).

Aries (57) e colleghi hanno trattato con RTX otto pazienti con GW refrattari sia alla CYC che a farmaci bloccanti il TNF α (Infliximab ed Etanercept) che presentavano manifestazioni

prevalentemente granulomatose. Tutti i pazienti avevano un interessamento delle alte vie respiratorie, cinque un granuloma retro-orbitario, due una stenosi subglottica ed uno dei noduli polmonari. A distanza di quattro settimane dall'ultima dose di RTX (quattro somministrazioni mensili da 375 mg/m²) 2/8 (25%) avevano ottenuto una remissione completa, uno otteneva una risposta parziale e 5/8 (63%) non avevano risposto. Tre dei pazienti refrattari al RTX presentavano un peggioramento dei granulomi retro-orbitari anche ad un follow-up più prolungato. Come terapia di associazione oltre allo steroide a basso dosaggio cinque pazienti proseguivano la CYC, due utilizzavano il methotrexate (MTX) ed uno il micofenolato mofetile (MYC). Questi risultati negativi si prestano a diverse interpretazioni considerando alcune particolarità della casistica:

- lo schema di somministrazione del RTX era differente rispetto a quello adottato degli altri autori, con intervalli di somministrazione delle quattro dosi di RTX mensili invece che settimanali (considerando l'estrema variabilità farmacocinetica e farmacodinamica inter-individuale non si può escludere che alcuni pazienti siano stati sotto-trattati).
- Il follow-up di sole quattro settimane dall'ultima dose è probabilmente troppo breve per cogliere il pieno effetto farmacologico del RTX, in particolare verso le manifestazioni granulomatose.
- I pazienti trattati erano tutti veri refrattari sia alla CYC che a plurimi altri trattamenti precedenti (anche con Infliximab ed Etanercept) rappresentando forse un subset di malattia estremamente resistente.

I linfociti B periferici erano a livelli bassi già prima del trattamento nella maggior parte dei pazienti. Tutti i pazienti hanno evidenziato dopo RTX una deplezione completa dei linfociti B periferici ma solo in uno gli ANCA si riducevano.

L'autore ha successivamente segnalato la remissione completa dei cinque pazienti refrattari dopo trattamento con boli endovenosi di AZA: è possibile che il RTX abbia avuto un ruolo (perlomeno sinergico) nella remissione, considerando che la sua piena efficacia terapeutica può

richiedere mesi per evidenziarsi (58).

Le conclusioni dell'autore erano che alcune manifestazioni granulomatose ed in particolare i granulomi retro-orbitari, in virtù della loro struttura costitutiva (linfociti T, macrofagi, cellule giganti, neutrofili e follicoli linfoidi “protetti”), possano essere naturalmente resistenti al RTX. Omdal ha trattato tre pazienti con manifestazioni granulomatose senza successo (56).

Brihaye nella sua casistica di otto pazienti (58) ha segnalato due pazienti con granuloma retro-orbitario definiti refrattari al RTX che ottenevano però un miglioramento clinico con scomparsa del dolore ed una lieve riduzione dimensionale delle lesioni valutate alla risonanza magnetica nucleare (interpretabili probabilmente come una risposta positiva). Due pazienti che presentavano noduli polmonari a lenta risoluzione venivano considerati come remissioni parziali: a distanza di 15 mesi un paziente presentava la scomparsa dei noduli e dopo 24 mesi anche l'altro paziente mostrava una riduzione delle dimensioni dell'unico nodulo rimasto. Questi due casi sottolineano la necessità di un lungo follow-up per valutare la completa risposta al farmaco (oltre che la possibile permanenza di lesioni fibrotiche/cicatrizziali).

Le altre principali casistiche riportano invece ottimi risultati anche verso le manifestazioni granulomatose con una tempistica di risposta ritardata rispetto alle manifestazioni vasculitiche.

Keong e colleghi (53) hanno trattato con RTX 10 pazienti con recidiva di GW refrattari o intolleranti alla CYC nel corso di un trial pilota prospettico. Le manifestazioni erano sia di tipo vasculitico che granulomatoso. Lo schema di RTX utilizzato era quello convenzionale di quattro infusioni da 375 mg/m² a cadenza settimanale associato a prednisolone per via orale ad un dosaggio iniziale di 1 mg/kg/die. Tutti i pazienti hanno ottenuto la remissione clinica completa con un BVAS/GW (Birmingham Activity Vasculitis Score modificato per la GW) di 0 entro tre mesi dal trattamento, lo steroide è stato scalato in sei mesi. Cinque pazienti (50%) sono stati ritrattati con RTX secondo protocollo per ricomparsa degli ANCA mediamente dopo 9 mesi di follow-up. In tutti i pazienti trattati la remissione è stata preceduta dalla rapida deplezione dei linfociti B CD20+ circolanti e gli ANCA sono calati significativamente (in molti negativizzati)

dopo RTX.

Stasi (60) ha trattato con RTX secondo lo schema convenzionale 10 pazienti con vasculite ANCA positiva (otto GW e due MPA) refrattari alla CYC. Le recidive erano prevalentemente di tipo vasculitico. In associazione al RTX veniva somministrato prednisone per via orale (fino a 2 mg/kg/die) scalato poi in corso di miglioramento clinico. Nove pazienti (90%) hanno ottenuto una rapida e completa risposta, tre pazienti (30%) hanno recidivato a distanza di 12, 16 e 24 mesi dal trattamento ed hanno ottenuto una nuova remissione dopo un secondo ciclo di RTX. Gli ANCA si sono negativizzati in 8 pazienti su 10 (80%).

Eriksson (54) ha trattato sette pazienti con GW e due con MPA resistenti alla CYC con RTX ad una dose di 500 mg a settimana per quattro settimane, prednisone alla dose media di 17,5 mg/die, scalato progressivamente e svariati altri immunosoppressori in associazione (MYC, CYC, AZA). Ad un follow-up di sei mesi ha osservato una remissione completa in otto pazienti e parziale in uno. Gli ANCA non sono variati significativamente dopo trattamento. Due pazienti hanno avuto una recidiva a 12 e 13 mesi di osservazione.

Smith (59) ha trattato 11 pazienti con vasculite (5 con GW) associando al RTX un pre-trattamento con 500 mg di CYC per via endovenosa ed ottenendo una remissione completa in 9/11 (82%) pazienti. La terapia in corso prima del RTX veniva proseguita (AZA o MYC) ed associata a prednisone ad un dosaggio iniziale di 1 mg/kg/die scalato nell'arco di sei mesi. Gli ANCA si riducevano in tutti i pazienti ma non si osservava una correlazione temporale fra la riduzione dei livelli anticorpali e la remissione clinica che in alcuni casi risultava essere precedente, inoltre alcuni pazienti recidivavano senza che prima fossero ricomparsi gli ANCA. In tutti i casi (sei) la ricomparsa dei linfociti B CD20+ periferici precedeva le recidive. Il tempo medio di remissione prima delle recidive era 16,5 mesi.

Henes (61) ha trattato con RTX sei pazienti con recidiva di GW utilizzando la leflunomide come farmaco di mantenimento ed ottenendo 5/6 (83%) risposte complete ed una parziale (sinusite persistente).

Sanchez-Cano (62) ha trattato quattro pazienti con GW ad estrinsecazione prevalentemente granulomatosa utilizzando come terapia di mantenimento basse dosi di steroide associate a MTX (in tre pazienti) o CYC (in un paziente), ottenendo in tutti una remissione completa.

Lovric (64) ha trattato 15 pazienti (13 con GW) che presentavano manifestazioni sia vasculitiche che granulomatose resistenti alla CYC associando un immunosoppressore (AZA, MTX, CYC, MYC o ciclosporina) e basse dosi di steroide come terapia di mantenimento. Sei pazienti (6/15, 40%) hanno ottenuto una remissione completa ed otto (8/15, 53%) una remissione parziale (definita come una riduzione del BVAS di almeno il 50%). L'unica paziente che non aveva risposto al RTX presentava persistenza di malattia a livello oculare e delle alte vie aeree ed è stata in seguito trattata con successo associando Infliximab e MTX. Quest'ultimo caso evidenzia il possibile ruolo sinergico dell'associazione (anche in tempi successivi) di farmaci che agiscono più o meno selettivamente su diversi steps del processo autoimmunitario. Gli ANCA sono calati in tutti i pazienti eccetto che nella paziente resistente, tre pazienti sono stati successivamente ritrattati con RTX per recidiva con esito positivo.

Taylor (65) ha trattato con 2 dosi di RTX da 1 gr 10 pazienti con manifestazioni granulomatose (7 con granulomi retro-orbitari, 6 con sclerite posteriore) resistenti alle terapie convenzionali (CYC, MYC, anti-TNF, MTX) ottenendo in tutti una remissione completa.

Martinez (66) ha valutato la risposta al RTX di 34 pazienti con GW con coinvolgimento granulomatoso delle alte vie aeree (naso, orecchie e gola, regione ENT) ed oculare refrattari alla terapia standard. A distanza di 6 mesi venivano registrate 23 remissioni complete (62%), 9 parziali (26%), 4 pazienti non ottenevano la remissione (12%) ma rispondevano positivamente ad un secondo ciclo di RTX. Quattro su 5 pazienti con granuloma retro-orbitario ottenevano la remissione. Due pazienti presentavano una successiva recidiva trattata con altri farmaci.

In uno studio retrospettivo di 65 pazienti con GW e manifestazioni prevalentemente granulomatose (granulomi retro-orbitari, ENT, noduli polmonari) refrattarie trattati con RTX veniva riportato il 75% (49/65 pazienti) di remissioni complete ed il 23% di remissioni parziali,

un solo paziente non otteneva la remissione. In tutti veniva ottenuta la deplezione dei linfociti B CD20+ periferici (67).

SEO ha trattato con successo 8 pazienti con manifestazioni granulomatose di GW (fra cui 3 granulomi retro-orbitari) ottenendo in tutti una remissione completa (68).

Menthon ha trattato 17 pazienti con manifestazioni granulomatose di GW refrattari od intolleranti a diversi farmaci immunosoppressori: 8 venivano trattati con RTX, 9 con Infliximab. Solo 2 dei pazienti trattati con RTX non ottenevano la remissione (uno con una stenosi bronchiale ed uno con un granuloma retro-orbitario), il RTX induceva un numero di remissioni superiore rispetto all'Infliximab (69).

Complessivamente nelle casistiche principali sono stati descritti 28 casi di granuloma retro-orbitario (53, 56-59, 63, 65-69) trattati con RTX: diciotto (18/28, 64%) hanno risposto positivamente mentre dieci (10/28, 36%) non hanno risposto (variabili erano comunque i criteri utilizzati per definire la risposta).

In tutte le casistiche viene riportato che dopo RTX le cellule B CD20+ rapidamente scompaiono dalla circolazione sistemica e si ricostituiscono gradualmente dopo circa 6 mesi. Al contrario la riduzione/scomparsa degli ANCA non è uniforme e non è sempre predittiva dell'ottenimento della remissione. Alcuni studi hanno evidenziato una correlazione fra scomparsa dei linfociti B periferici, riduzione degli ANCA e remissione clinica, così come fra ricostituzione del pool periferico delle cellule B, ricomparsa degli ANCA e recidive (52, 53, 60). Altri autori non hanno invece ottenuto un calo significativo degli ANCA dopo RTX (54, 57) e non hanno riscontrato una correlazione fra ANCA e livello di attività di malattia. Alcuni pazienti hanno ottenuto una remissione stabile nonostante elevati livelli sierici di ANCA (54). Sono stati descritti anche pazienti negativizzati sierologicamente che hanno recidivato senza la ricomparsa degli ANCA (59, 64).

La frequenza di recidive riportata nei diversi studi è molto variabile essendo condizionata dalla durata del follow-up, dalle terapie di mantenimento utilizzate e dagli schemi di ritrattamento profilattici utilizzati da alcuni autori dopo la ricomparsa degli ANCA.

A complicare l'interpretazione dei risultati si aggiunge l'estrema variabilità dei trattamenti intrapresi prima, durante e dopo i cicli di RTX. In alcuni studi il RTX è stato associato alle terapie convenzionali (di induzione o mantenimento) quali CYC, AZA, MTX, leflunomide o MYC (54, 56-59, 61, 62, 64). Una parte dei pazienti sono stati trattati con plasmferesi e boli di steroide secondo le indicazioni cliniche. Altri autori hanno utilizzato il RTX unicamente in associazione con steroide sospendendo le altre terapie in corso (52, 53, 60, 63).

L'utilizzo del RTX come farmaco di mantenimento della remissione non è codificato: in alcune casistiche i pazienti sono stati ritrattati unicamente sulla base della ricomparsa degli ANCA senza che mostrassero alcun segno clinico di recidiva (52, 53). A 12 mesi di follow-up tutti questi pazienti ritrattati sono rimasti in remissione ed il titolo degli ANCA si è ridotto (anche se non negativizzato) in tutti. Un altro autore ha somministrato dosi supplementari di RTX a distanza di 4-6 mesi dal primo ciclo (58).

Un recente studio retrospettivo ha riportato i risultati di 39 pazienti con AAV in remissione completa o parziale trattati con RTX come terapia di mantenimento. Inizialmente 35 su 39 pazienti ricevevano due dosi di RTX da 1 gr a distanza di 2 settimane, 4 pazienti ricevevano 4 dosi a cadenza settimanale di RTX da 375 mg/m². Successivamente tutti i pazienti ricevevano 1 gr di RTX ogni 4 mesi. Tutti i pazienti avevano un follow-up di almeno un anno e 20 avevano un follow-up di 2 anni. Solo 3 pazienti presentavano una recidiva minore. La percentuale di pazienti che assumevano un altro farmaco immunosoppressivo si riduceva dall'87% al 41% a 12 mesi ($P < 0.001$) ed al 30% a 24 mesi (70).

Un altro studio retrospettivo (Roubaud-Baudron) ha valutato 28 pazienti con AAV (24 GW, 4 MPA) che hanno ricevuto una media di 4 dosi di RTX come terapia di mantenimento dopo aver ottenuto la remissione. A 38 mesi di follow-up solo 2 hanno presentato una recidiva

polmonare poco prima della dose programmata di RTX (71).

Tabella II. Principali casistiche della letteratura sull'uso del RTX nelle AAV.

Casistiche	N° pz./ Diagnosi	Manifestazioni granulomatose	Dosi di RTX	Terapie precedenti	Terapie concomitanti	Risultati	Follow- up (mesi)	N° recidi -ve	ANCA trend
Keogh 2005 (52)	11 GW	4 ENT, 2 P	4x375 mg/m ² /W	8 CYC, 1 MTX 1 MYC, 1 PD	3 PE 11MPDev1grx3 11 PD 1 mg/kg	11 CR	14	2	↓ in tutti
Eriksson 2005 (54)	7 GW 2 MPA	4 P, 7 ENT	6x4x500mg 2x2x500mg /W 1x4x375mg /m ² /W	CYC + various	5 MYC, 2 CYC 1AZA, +PD	8 CR 1 PR	6-25	2	No ↓
Smith 2006 (59)	5 GW 5 MPA 1 CHS	2 SB, 1 P, 1 ROG, 3 ENT	4x375 mg/m ² /W	Vari AZA/MYC +PD	AZA/MYC +PD	9 CR 1 PR 1 F	23	6	↓ in tutti
Keogh 2006 (53)	10 GW	7 ENT, 3 P, 2 SNC, 1 ROG	4x375 mg/m ² /W	3 CYC, 3 AZA 2 MYC, 2 ETC +PD	PD 1 mg/kg scalato in 5 mesi 3 MPD iv1grx3	10 CR	>5	1	↓ in tutti
Arise 2006 (57)	8 GW	8 ENT, 5 ROG, 1 P, 2 SS	4x375 mg/m ² /4 W	8 CYC, 6 IFX 2 ETC, 1 MTX 1 LFN, 1 MYC	5 CYC, 2 MTX 1 MYC +PD	2 CR 1 PR 5 F	1		↓ in 1
Omdal 2006 (56)	3 GW	1 ROG, 1 SS, 1 P	4x375 mg/m ² /W		1 MTX, 1 AZA 2 MPD iv, +PD	3 F	12		
Tamura 2006 (63)	2 GW	2 ROG, 2 M, 2 ENT, 1 P, 1 BS	4x375 mg/m ² /W	2 CYC 1 MTX	1 MPD 3 gr iv +PD	2 CR	10	1	↓ in tutti
Stasi 2006 (60)	8 GW 2 MPA	3 ENT	4x375 mg/m ² /W	4 CYC, 2 CS 4 solo TMP- SMX	PD fino a 2 mg/kg	9 CR 1 PR	33,5	3	8/10 neg 2/10 ↓
Brihaye 2007 (58)	8 GW	6 ENT, 4 P, 2 ROG	4x375 mg/m ² /W	4 CYC, 2MYC, 2 MTX, 1 AZA	3 MTX, 3 MYC 1 AZA, 1 LFN +PD	3 CR 3 PR 2 F (?)	12,5 RTX mant.	1	↓
Henes 2007 (61)	6 GW	5 ENT, 6 P, 1 SS, 1 M	4x375 mg/m ² /W	CYC	5 LFN +PD a 1 mg/kg	5 CR 1 PR	16	1	↓
Sanchez- Cano 2008 (62)	4 GW	4 ENT, 3 P, 2 SS, 1 CNS	4x375 mg/m ² /W	3 CYC, 2 MTX 1 AZA, 1 ETC	1 CYC 3 MTX +PD	4 CR	15	2	↓

Tabella II. Principali casistiche della letteratura sull'uso del RTX nelle AAV (continua).

Casistiche	N° pz./ Diagnosi	Manifestazioni granulomatose	Dosi di RTX	Terapie precedenti	Terapie concomitanti	Risultati	Follow- up (mesi)	N° recidi -ve	ANCA trend
Lovric 2008 (64)	13 GW 1 MPA 1 CHS	9 ENT, 3 P	4x375 mg/m ² /W	CYC	6 AZA/ MYC 1 CYC, 1 CS 1 MTX, 1 IFX	6 CR 8 PR 1 F	3-39	3	↓
Seo 2008 (68)	8 GW	7 ENT, 3 ROG, 5 P, 1 SS	4x375 mg/m ² /W	6 refrattari a CYC, MTX, AZA, MYC	PD, CYC	8 CR		5	↓
Roccatello 2008 (72)	2 GW 4 MPA 1 CHS	2 ENT 2 P	4x375 mg/m ² /W	Rescue therapy, intolleranti o refratt. a CYC	PD	7 CR	12	0	↓
Taylor 2009 (65)	10 GW	9 ENT, 7 ROG, 6 EPI	2x1 gr/2W+ CYC (6 boli)	9 CYC, 4 anti-TNF, 10 AZA	2 MTX, 5 MYC 3 CYC +PD	10 CR	12 RTX mante- niment.	0	↓
Martinez Del Pero 2009 (66)	34 GW	ENT 26, SS 11, 5 ROG, 3 EPI	14 pts 4x375 mg/m ² /W 20 pts 2x1 gr/2W	Refrattari CYC, MTX, AZA, INF	PD	23 CR 9 PR 2 F (1 ROG)	25	2	↓
Jones 2009 (67)	46 GW 10 MPA 5 CHS 4 NC	ENT, P, ROG	4x375 mg/m ² /W 2x1 gr/2W	MTX, AZA, anti TNF, MYC, Ig, CYC	28 pz CYC ev PD	75% CR 23% PR 1 F	20 3-55	28	↓
Ramos- Casals 2010 (73)	17 GW 2 MPA	6 ENT, 14 P	4x375 mg/m ² /W 2x1 gr/2W		PD Altri	10 CR 3 PR 6 F	31	9	
Mansfield 2011 (51)	13 GW 10 MPA	Solo renale	2x1 gr/2W+ CYC (6 bolus)		PD + AZA	22 CR 1 F	39	5	↓
Mention 2011 (69)	8 GW	5 ENT, 4 P 1 ROG, 2 SS	4x375 mg/m ² /W 2x1 gr/2W	Refrattari alla CYC	PD, CYC, AZA, MTX, MYC	4 CR 2 PR 2 F (SS, ROG) 1Dec.	12		↓

GW: granulomatosi di Wegener; MPA: micropoliarterite; CHS: Churg-Strauss; CYC: ciclofosfamide; MTX: methotrexate; AZA: azatioprina; CS: ciclosporina; MYC: micofenolato; PD: prednisone; MPD: metilprednisone; IFX: Infliximab; ETC: Etanercept; TMP-SMX: trimethoprim/sulfamethoxazolo; LFN: leflunomide; PE: plasma-exchange; Ig: immunoglobuline; ANCA: anticorpi anticitoplasma dei neutrofili; ROG: granuloma retro-orbitario; P: noduli polmonari; SB: stenosi di un bronco; SS: stenosi subglottica; ENT: rinite crostosa (regione orecchie-naso-gola); EPI: episclerite; M: meningite; SNC: sistema nervoso centrale; CR: remissione completa; PR: remissione parziale; F: fallimento.

SCOPO DELLO STUDIO

- 1) Valutare l'efficacia del RTX nel trattamento delle manifestazioni vasculitiche e granulomatose delle vasculiti ANCA associate (AAV) sia all'esordio che in corso di recidiva.
- 2) Valutare le complicanze correlate all'utilizzo del RTX nei pazienti con AAV

PAZIENTI E METODI

A partire da Gennaio 2006 a Dicembre 2011 presso il reparto di nefrologia degli Spedali Civili di Brescia 51 pazienti con AAV in fase attiva sia all'esordio che in corso di recidiva sono stati trattati con RTX. Trentasette pazienti erano affetti da GW, 13 da MPA ed uno da CHS.

La diagnosi di AAV era stata formulata secondo i criteri clinici dell'American College of Rheumatology e la definizione data dalla conferenza di Chapel Hill (78, 79). Per tutti i pazienti la diagnosi era sierologicamente e/o biopticamente confermata.

La decisione di trattare questi pazienti con RTX rispetto alla terapia convenzionale (che nella maggior parte delle situazioni avrebbe richiesto l'utilizzo della CYC) era basata su alcune considerazioni:

- il RTX è un farmaco estensivamente utilizzato con successo in campo ematologico e vi sono ormai in letteratura molte segnalazioni sulla sua efficacia anche in ambito autoimmunitario.
- Sono descritti solamente rarissimi casi di effetti collaterali severi associati al suo utilizzo e quasi sempre quando utilizzato in associazione con altre terapie citolitiche o immunosoppressive.
- Molti pazienti erano stati esposti precedentemente a ripetuti cicli di CYC con dosi cumulative elevate ed alcuni di essi avevano già manifestato effetti collaterali severi (cistite emorragica, gravi infezioni, leucopenia).
- Alcuni pazienti erano risultati refrattari al trattamento con CYC.
- La giovane età di alcuni di essi li avrebbe esposti a possibili effetti collaterali supplementari (infertilità, rischio neoplastico); proprio i pazienti più giovani, avendo mediamente la storia patologica più lunga, richiederanno molto probabilmente altri trattamenti per successive recidive.

Abbiamo valutata accuratamente tutta la documentazione clinica e laboratoristica dei 51

pazienti descrivendone le caratteristiche demografiche (età, sesso, razza) e ricostruendone la storia clinica passata, l'esordio della malattia e le terapie precedenti effettuate.

Abbiamo quindi descritto i tipi di recidive che hanno portato all'utilizzo del RTX.

Per valutare lo stato di attività della malattia abbiamo utilizzato il BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score) versione 2003 (figura 7), score ideato per misurare il livello di attività delle vasculiti identificandone tutte le possibili manifestazioni d'organo (80). Le vasculiti sono patologie clinicamente estremamente eterogenee che possono interessare praticamente ogni organo ed apparato del nostro corpo, risulta pertanto difficile descrivere in maniera omogenea i singoli pazienti e “quantificare” la severità e l'estensione della malattia, elementi indispensabili per confrontare casistiche e valutare l'efficacia delle terapie.

Diversi autori hanno cercato nel tempo di costruire degli score in grado di esprimere numericamente il grado di coinvolgimento multisistemico delle vasculiti. Il sistema attualmente più validato e condiviso è rappresentato dal BVAS (67).

Il principio che sta alla base di questo score-system è che le manifestazioni patologiche vengono valutate solo se esprimono una fase di attività della vasculite. Abbinato al BVAS è stato creato anche un glossario (figura 8) in cui viene data una precisa definizione di ogni manifestazione patologica che deve essere soddisfatta per attribuire la manifestazione stessa alla vasculite. Questo glossario distingue nettamente le manifestazioni patologiche espressione di malattia attiva e come tali suscettibili di miglioramento con la terapia da quelle che rappresentano esiti cicatriziali di pregresse fasi di attività e quindi non più suscettibili di miglioramento.

Lo “score-system” è ideato per poter essere agevolmente completato al momento della valutazione clinica, essendo gli “item” valutati ricavabili dall'anamnesi o dall'esame obiettivo e da essenziali dati di laboratorio. Pochi “item” richiedono una verifica strumentale o una valutazione specialistica.

Nel BVAS sono state considerate complessivamente 66 caratteristiche cliniche divise per 9

diversi organi ed apparati. In base al loro peso clinico ed al grado di severità, ad ogni manifestazione ed ad ogni apparato è stato attribuito un diverso punteggio.

Il BVAS è stato applicato in oltre 10 trials terapeutici sulle vasculiti pubblicati da vari autori negli ultimi 5 anni (82) ed è considerato la misura standard di attività di malattia nei trials su varie patologie vasculitiche.

In molti studi riguardanti l'utilizzo del RTX nelle AAV è stata utilizzata una variante del BVAS modificata per la GW (83). Tuttavia questo score, come anche il BVAS 2003, è un ottimo indicatore dell'attività di malattia di tipo vasculitico ma risulta essere meno sensibile e di più complessa interpretazione quando applicato alle forme prevalentemente granulomatose, che dopo trattamento possono permanere evidenti radiologicamente per mesi o anni anche con un punteggio di 0 al BVAS. Non è quindi facile né univoco interpretare l'evoluzione delle manifestazioni granulomatose dopo una terapia: a nostro giudizio uno score BVAS uguale a 0 non è sempre corrispondente ad una situazione di remissione clinica completa. E' necessario integrare il BVAS con delle valutazioni radiologiche specifiche ripetute nel corso del follow-up post-terapia per interpretare l'evoluzione e quindi il significato clinico delle lesioni granulomatose a lenta ed incompleta risoluzione.

VASCULITIS ACTIVITY SCORE 2003

Tick box **only** if abnormality represents active disease (use the Vasculitis Damage Index, VDI to score items of damage). If there are no abnormalities in a system, please tick the "None" box

If **all** the abnormalities recorded represent smouldering/low grade/ grumbling disease, and there are no new/worse features, please remember to tick the box at the bottom right corner

	None	Active disease		None	Active disease
1. General	<input type="radio"/>		6. Cardiovascular	<input type="radio"/>	
Myalgia		<input type="radio"/>	Loss of pulses		<input type="radio"/>
Arthralgia or arthritis		<input type="radio"/>	Valvular heart disease		<input type="radio"/>
Fever $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$		<input type="radio"/>	Pericarditis		<input type="radio"/>
Weight Loss ≥ 2 kg		<input type="radio"/>	Ischaemic cardiac pain		<input type="radio"/>
2. Cutaneous	<input type="radio"/>		Cardiomyopathy		<input type="radio"/>
Infarct		<input type="radio"/>	Congestive cardiac failure		<input type="radio"/>
Purpura		<input type="radio"/>	7. Abdominal	<input type="radio"/>	
Ulcer		<input type="radio"/>	Peritonitis		<input type="radio"/>
Gangrene		<input type="radio"/>	Bloody diarrhoea		<input type="radio"/>
Other skin vasculitis		<input type="radio"/>	Ischaemic abdominal pain		<input type="radio"/>
3. Mucous membranes/eyes	<input type="radio"/>		8. Renal	<input type="radio"/>	
Mouth ulcers/granulomata		<input type="radio"/>	Hypertension		<input type="radio"/>
Genital ulcers		<input type="radio"/>	Proteinuria >1+		<input type="radio"/>
Adnexal inflammation		<input type="radio"/>	Haematuria ≥ 10 rbc/hpf		<input type="radio"/>
Significant proptosis		<input type="radio"/>	Creatinine 125-249 $\mu\text{mol/l}$		<input type="radio"/>
Red eye (Epi)scleritis		<input type="radio"/>	Creatinine 250-499 $\mu\text{mol/l}$		<input type="radio"/>
Red eye conjunctivitis/blepharitis/keratitis		<input type="radio"/>	Creatinine ≥ 500 $\mu\text{mol/l}$		<input type="radio"/>
Blurred vision		<input type="radio"/>	Rise in creatinine > 30% or		
Sudden visual loss		<input type="radio"/>	Creatinine clearance fall > 25%		<input type="radio"/>
Uveitis		<input type="radio"/>	9. Nervous system	<input type="radio"/>	
Retinal vasculitis/retinal vessel		<input type="radio"/>	Headache		<input type="radio"/>
Thrombosis/retinal exudates/			Meningitis		<input type="radio"/>
Retinal haemorrhages		<input type="radio"/>	Organic confusion		<input type="radio"/>
4. ENT	<input type="radio"/>		Seizures (not hypertensive)		<input type="radio"/>
Bloody nasal discharge/nasal			Stroke		<input type="radio"/>
Crusts/ulcers and/or granulomata		<input type="radio"/>	Cord lesion		<input type="radio"/>
Paranasal sinus involvement		<input type="radio"/>	Cranial nerve palsy		<input type="radio"/>
Subglottic stenosis		<input type="radio"/>	Sensory peripheral neuropathy		<input type="radio"/>
Conductive hearing loss		<input type="radio"/>	Motor mononeuritis multiplex		<input type="radio"/>
Sensorineural hearing loss		<input type="radio"/>	10. OTHER	<input type="radio"/>	
5. Chest	<input type="radio"/>				<input type="radio"/>
Wheeze		<input type="radio"/>			<input type="radio"/>
Nodules or cavities		<input type="radio"/>			<input type="radio"/>
Pleural effusion/pleurisy		<input type="radio"/>			<input type="radio"/>
Infiltrate		<input type="radio"/>			<input type="radio"/>
Endobronchial involvement		<input type="radio"/>			
Massive haemoptysis/Alveolar haemorrhage		<input type="radio"/>			
Respiratory failure		<input type="radio"/>			
			PERSISTENT DISEASE ONLY:		
			Tick here if all the above abnormalities are due to low grade grumbling disease and not due to new/ worse disease		<input type="checkbox"/>

Figura 7. Modulo di valutazione del BVAS 2003 (80).

Glossary and scoring for BVAS 2003. GENERAL RULE: disease features are scored only when they are due to active vasculitis, after excluding other causes (e.g. infection, hypertension, etc.). If the feature is due to active disease, it is scored in the boxes. It is essential to apply these principles to each item below. Scores have been weighted according to the severity which each symptom or sign is thought to represent. Tick "Persistent Disease" box if all the abnormalities are due to active (but not new or worse) vasculitis. If any of the abnormalities are due to new/worse disease, DO NOT tick the "Persistent Disease" box. For some features, further information (from specialist opinion or further tests) is required if abnormality is newly present or worse. Remember that in most instances, you will be able to complete the whole record when you see the patient. However, you may need further information before entering some items. Please leave these items blank, until the information is available, and then fill them in. For example, if the patient has new onset of stridor, you would usually ask an ENT colleague to investigate this further to determine whether or not it is due to active Wegener's granulomatosis.		BVAS persistent	BVAS new/worse
1. General	Maximum scores	2	3
Myalgia	Pain in the muscles	1	1
Arthralgia or arthritis	Pain in the joints or joint inflammation	1	1
Fever $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$	Documented oral/axillary temperature elevation. Rectal temps are 0.5°C higher	2	2
Weight Loss	At least 2kg loss of body weight (not fluid) having occurred since last assessment or in the 4 weeks not as a consequence of dieting	2	2
2. Cutaneous	Maximum scores	3	6
Infarct	Area of tissue necrosis or splinter haemorrhages	1	2
Purpura	Petechiae (small red spots), palpable purpura, or ecchymoses (large plaques) in skin or oozing (in the absence of trauma) in the mucous membranes.	1	2
Ulcer	Open sore in a skin surface.	1	4
Gangrene	Extensive tissue necrosis (e.g. digit)	2	6
Other skin vasculitis	Livedo reticularis, subcutaneous nodules, erythema nodosum, etc	1	2
3. Mucous membranes/eyes	Maximum scores	3	6
Mouth ulcers/granulomata	Aphthous stomatitis, deep ulcers and/or "strawberry" gingival hyperplasia, excluding lupus erythematosus, and infection	1	2
Genital ulcers	Ulcers localised in the genitalia or perineum, excluding infections.	1	1
Adnexal inflammation	Salivary (diffuse, tender swelling unrelated to meals) or lacrimal gland inflammation. Exclude other causes (infection). Specialist opinion preferably required.	2	4
Significant proptosis	Protrusion of the eyeball due to significant amounts of inflammatory in the orbit; if unilateral, there should be a difference of 2 mm between one eye and the other. This may be associated with diplopia due to infiltration of extra-ocular muscles. Developing myopia (measured on best visual acuity, see later) can also be a manifestation of proptosis	2	4
Red eye (Epi)scleritis	Inflammation of the sclerae (specialist opinion usually required). Can be heralded by photophobia.	1	2
Red eye conjunctivitis	Inflammation of the conjunctivae (exclude infectious causes and excluding uveitis as cause of red eye, also exclude conjunctivitis sicca which should not be scored as this is not a feature of active vasculitis); (specialist opinion not usually required).	1	1
Blepharitis	Inflammation of eyelids. Exclude other causes (trauma, infection). Usually no specialist opinion is required		
Keratitis	Inflammation of central or peripheral cornea as evaluated by specialist		
Blurred vision	Altered measurement of best visual acuity from previous or baseline, requiring specialist opinion for further evaluation.	2	3
Sudden visual loss	Sudden loss of vision requiring ophthalmological assessment.		6
Uveitis	Inflammation of the uvea (iris, ciliary body, choroid) confirmed by ophthalmologist.	2	6
Retinal vasculitis	Retinal vessel sheathing on examination by specialist or confirmed by retinal fluorescein angiography	2	6
Retinal vessel thrombosis	Arterial or venous retinal blood vessel occlusion		
Retinal exudates	Any area of soft retinal exudates (exclude hard exudates) seen on ophthalmoscopic examination.		
Retinal haemorrhages	Any area of retinal haemorrhage seen on ophthalmoscopic examination.		
4. ENT	Maximum scores	3	6
Bloody nasal discharge/nasal crusts/ulcers and/or granulomata	Bloody, mucopurulent, nasal secretion, light or dark brown crusts frequently obstructing the nose, nasal ulcers and/or granulomatous lesions observed by rhinoscopy	3	6
Paranasal sinus involvement	Tenderness or pain over paranasal sinuses usually with pathologic imaging (CT, MR, x-ray, ultrasound)	1	2
Subglottic stenosis	Stridor and hoarseness due to inflammation and narrowing of the subglottic area observed by laryngoscopy	3	6
Conductive hearing loss	Hearing loss due to middle ear involvement confirmed by otoscopy and/or tuning fork examination and/or audiometry	1	3
Sensorineural hearing loss	Hearing loss due to auditory nerve or cochlear damage confirmed by audiometry	2	6
5. Chest	Maximum scores	3	6
Wheeze	Wheeze on clinical examination	1	2
Nodules or cavities	New lesions, detected by CXR		3

		BVAS persistent	BVAS new/worse
Pleural effusion/pleurisy	Pleural pain and/or friction rub on clinical assessment or new onset of radiologically confirmed pleural effusion. Other causes (e.g. infection, malignancy) should be excluded	2	4
Infiltrate	Detected by CXR or CT scan. Other causes (infection) should be excluded	2	4
Endobronchial involvement	Endobronchial pseudotumor or ulcerative lesions. Other causes such as infection or malignancy should be excluded. NB: smooth stenotic lesions to be included in VDI; subglottic lesions to be recorded in the ENT section.	2	4
Massive haemoptysis/alveolar haemorrhage	Major pulmonary bleeding, with shifting pulmonary infiltrates; other causes of bleeding should be excluded if possible	4	6
Respiratory failure	Dyspnoea which is sufficiently severe as to require artificial ventilation	4	6
6. Cardiovascular	Maximum scores	3	6
Loss of pulses	Loss of pulses in any vessel detected clinically; this may include loss of pulses leading to threatened loss of limb	1	4
Valvular heart disease	Significant valve abnormalities in the aortic mitral or pulmonary valves detected clinically or echocardiographically.	2	4
Pericarditis	Pericardial pain &/or friction rub on clinical assessment.	1	3
Ischaemic cardiac pain	Typical clinical history of cardiac pain leading to myocardial infarction or angina. Consider the possibility of more common causes (eg atherosclerosis)	2	4
Cardiomyopathy	Significant impairment of cardiac function due to poor ventricular wall motion confirmed on echocardiography	3	6
Congestive cardiac failure	Heart failure by history or clinical examination	3	6
7. Abdominal	Maximum scores	4	9
Peritonism	Acute abdominal pain with peritonism/peritonitis due to perforation/infarction of small bowel, appendix or gallbladder etc., or acute pancreatitis confirmed by radiology/surgery/elevated amylase	3	9
Bloody diarrhoea	Of recent onset; inflammatory bowel disease and infectious causes excluded.	3	9
Ischaemic abdominal pain	Severe abdominal pain with typical features of ischaemia confirmed by imaging or at surgery, with typical appearances of aneurysms or abnormal vasculature characteristic of vasculitis.	2	6
8. Renal	Maximum scores	6	12
Hypertension	Diastolic BP>95, accelerated or not, with or without retinal changes.	1	4
Proteinuria	>1+ on urinalysis; >0.2g/24 hours Infection should be excluded.	2	4
Haematuria	10 or more RBC per hpf (high power field), excluding urinary infection and urinary lithiasis (stone)	3	6
Creatinine 125-249	Serum creatinine values 125-249 µmol/l at first assessment only.	2	4
Creatinine 250-499	Serum creatinine values 250-499 µmol/l at first assessment only.	3	6
Creatinine ≥ 500	Serum creatinine values 500 µmol/l or greater at first assessment only.	4	8
Rise in creatinine > 30% or creatinine clearance fall > 25%	Significant deterioration in renal function attributable to active vasculitis.		6
9. Nervous system	Maximum scores	6	9
Headache	New, unaccustomed & persistent headache	1	1
Meningitis	Severe headache with neck stiffness ascribed to inflammatory meningitis after excluding infection/bleeding	1	3
Organic confusion	Impaired orientation, memory or other intellectual function in the absence of metabolic, psychiatric, pharmacological or toxic causes.	1	3
Seizures (not hypertensive)	Paroxysmal electrical discharges in the brain & producing characteristic physical changes including tonic & clonic movements & certain behavioural changes.	3	9
Stroke	Cerebrovascular accident resulting in focal neurological signs such as paresis, weakness, etc. A stroke due to other causes (eg atherosclerosis) should be considered & appropriate neurological advice is recommended	3	9
Cord lesion	Transverse myelitis with lower extremity weakness or sensory loss (usually with a detectable sensory level) with loss of sphincter control (rectal & urinary bladder).	3	9
Cranial nerve palsy	Facial nerve palsy, recurrent nerve palsy, oculomotor nerve palsy etc. excluding sensorineural hearing loss and ophthalmic symptoms due to inflammation	3	6
Sensory peripheral neuropathy	Sensory neuropathy resulting in glove &/or stocking distribution of sensory loss. Other causes should be excluded (e.g. idiopathic, metabolic, vitamin deficiencies, infectious, toxic, hereditary).	3	6
Motor mononeuritis multiplex	Simultaneous neuritis of single or many peripheral nerves, only scored if motor involvement. Other causes should be excluded (diabetes, sarcoidosis, carcinoma, amyloidosis).	3	9
10. OTHER	Other feature of active vasculitis-please describe		

Figura 8. Glossario del BVAS 2003 (80).

Prima del trattamento con RTX era stata accuratamente esclusa la presenza di patologie infettive in atto tramite:

- esami ematochimici generali ed esami colturali specifici di vari liquidi biologici.
- Esami strumentali eseguiti secondo le indicazioni cliniche (radiografia del torace, ecografia addominale/pelvica, broncoscopia, ecocardiogramma trans-toracico e/o trans-esofageo, tomografia assiale computerizzata e/o risonanza magnetica nucleare delle specifiche sedi coinvolte quali addome, torace, massiccio facciale ed encefalo).

Lo schema di trattamento adottato è stato quello utilizzato comunemente in ambito ematologico e già applicato nelle piccole casistiche di pazienti con AAV ed in due trials randomizzati e controllati (48, 49).

La maggior parte dei pazienti sono stati trattati con 4 somministrazioni endovenose di RTX alla dose di 375 mg/m² di superficie corporea con cadenza settimanale. L'infusione veniva effettuata in ambiente ospedaliero tramite un accesso venoso periferico ed aveva una durata di quattro ore per la prima somministrazione e di tre ore per le successive. Durante la somministrazione del RTX i pazienti erano allettati e venivano rilevate ogni 30 minuti la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca e la temperatura corporea. Un'ora prima dell'infusione i pazienti venivano pre-medicati con 10 mg di clorfenamina ed 1 gr di paracetamolo per via endovenosa.

In considerazione dell'esperienza maturata dal 2006 e dell'analisi dei nuovi dati presenti in letteratura dal 2011 si decideva di non adottare uno schema rigido di somministrazione del RTX nei pazienti con recidiva ma di somministrare una o due dosi secondo la gravità della recidiva, la risposta clinico/laboratoristica ed il rischio infettivo del singolo paziente.

Nella maggior parte dei pazienti trattati per recidiva veniva proseguita la terapia immunosoppressiva in atto precedentemente come terapia di mantenimento (MTX o AZA), con lieve aumento dei dosaggi solo in alcuni casi. La maggior parte dei pazienti trattati all'esordio di malattia assumeva invece solo PD come terapia di mantenimento post-RTX.

Dopo il trattamento con RTX i pazienti continuavano i controlli ambulatoriali inizialmente a cadenza settimanale poi secondo le esigenze cliniche. Ad ogni controllo i pazienti venivano valutati con attento esame clinico e venivano esaminati i principali dati ematochimici, in particolare il titolo degli ANCA con metodica ad immunofluorescenza ed immunoenzimatica (ELISA), gli indici infiammatori (proteina C reattiva, fibrinogeno, α 2-globuline, piastrine, leucociti), l'esame emocromocitometrico con formula, gli indici di funzionalità epatica e renale, la protidemia e foresi, l'esame delle urine con valutazione del sedimento urinario, gli indici di citolisi (LDH, AST, ALT) e l'assetto lipidico.

Sulla base dei dati presenti in letteratura che evidenziano un azzeramento dei linfociti B CD20+ in tutti i pazienti dopo la somministrazione di RTX, ed una loro successiva ricomparsa dopo circa 6 mesi, dal 2011 veniva effettuato un monitoraggio dei livelli di linfociti B CD20+ tramite la tipizzazione linfocitaria su sangue periferico per valutarne la ricomparsa post-RTX.

Gli esami strumentali di controllo venivano effettuati secondo le specifiche situazioni cliniche.

METODI DI DOSAGGIO DEGLI ANCA UTILIZZATI

Esistono due metodi per evidenziare gli ANCA: il test di immunofluorescenza indiretta (IFI) e la ricerca degli anticorpi diretti contro la PR3 e la MPO attraverso test in fase solida come la tecnica immunoenzimatica (ELISA).

1) Il test di immunofluorescenza indiretta.

Il siero del paziente opportunamente diluito viene incubato con un preparato di leucociti (ottenuti da sangue di donatori sani attraverso citocentrifugazione) disposti su un vetrino e fissati con etanolo al 99%. Dopo l'incubazione i vetrini vengono lavati per rimuovere le proteine del siero e tutti gli anticorpi non complessati con l'antigene. Viene successivamente seminato l'antisiero fluorescinato specifico verso le IgG umane che si legherà agli ANCA adesi ai neutrofili sviluppando una fluorescenza visibile con uno specifico microscopio (a fluorescenza).

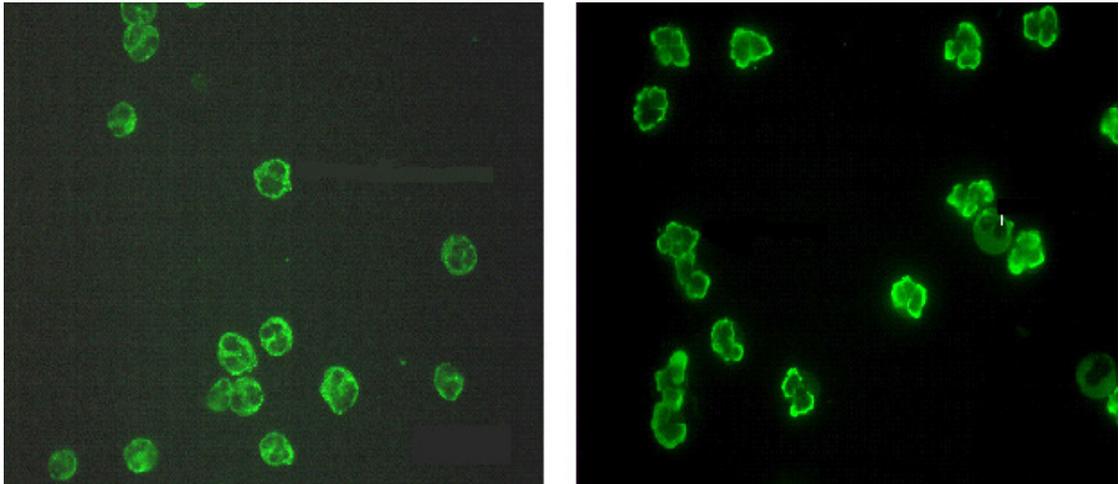


Figura 9. Immunofluorescenza di tipo C ANCA (figura a sinistra) e di tipo P ANCA (figura a destra) degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili.

La lettura viene effettuata confrontando il campione in esame con un controllo positivo ed uno negativo. La positività viene espressa in modo semiquantitativo (negativo, +1, +2, +3, +4).

Con la metodica a immunofluorescenza sono evidenziabili due pattern di positività: uno granulare citoplasmatico diffuso (C-ANCA) ed uno perinucleare (P-ANCA) (Figura 9).

2) I test in fase solida

Eseguito con tecniche immunoenzimatiche (ELISA). Si utilizzano come antigeni la MPO o la PR3. L'antigene viene adsorbito alle cellette di plastica di una piastra. I sieri dei pazienti vengono diluiti 1:100 e incubati nella celletta con l'antigene legato alla piastra. Viene successivamente seminato l'antisiero: una specifica immunoglobulina anti-IgG umana marcata con l'enzima fosfatasi alcalina. L'antisiero si lega con l'anticorpo fissato all'antigene. Viene aggiunto poi il substrato specifico per la fosfatasi legata all'antisiero determinando lo sviluppo del colore. L'intensità della colorazione è proporzionale al livello di anticorpi presenti nel siero in esame. Vengono successivamente costruite delle curve di calibrazione che consentono una valutazione numerica della reazione colorimetrica. Quindi a differenza dell'IFI in cui la

positività viene espressa con metodo semiquantitativo e con un certo grado di operatore dipendenza, la metodica ELISA esprime la positività con metodo quantitativo ed oggettivo.

La ricerca degli ANCA con ELISA ha un importante ruolo sia diagnostico che nel follow-up dei pazienti vasculitici. Non vi è ancora una standardizzazione delle metodiche e quindi le unità di misura sono differenti tra i diversi laboratori: ciò rende difficile ed impreciso il confronto dei livelli di ANCA ottenuti da diversi centri.

Solitamente la positività in IFI con pattern C-ANCA è associata ad una positività al test ELISA per anticorpi anti-PR3, mentre il pattern P-ANCA si associa con una positività per anticorpi anti- MPO.

Le linee guida internazionali (84) suggeriscono uno screening del siero dei pazienti utilizzando la metodica dell'IFI e solo in caso di positività è consigliata la successiva conferma con il test immunoenzimatico ELISA specifico per anticorpi anti-PR3 ed anti-MPO.

Considerando però che circa il 5% di sieri di pazienti con vasculite è positivo solo all'ELISA, in caso di fondato sospetto clinico potrebbe essere opportuno utilizzare comunque entrambe le metodiche (anche con IFI negativa). Un siero è definito positivo per ANCA solo in caso di positività all'IFI confermata da positività al test ELISA per uno dei due antigeni. E' necessario inoltre che vi sia concordanza fra le due metodiche: C-ANCA positivo/anti-PR3 positivo e P-ANCA positivo/anti-MPO positivo.

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati raccolti su un data base in Microsoft Office Excel 2007®. Le analisi statistiche sono state condotte con Statgraphics Plus 5.0. E' stata eseguita l'analisi descrittiva delle variabili esaminate che comprendeva media, deviazione standard, valori massimo e minimo. I confronti statistici fra medie sono stati eseguiti con il test t di Student. Sono stati accettati, come livelli di probabilità significativi, valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

A partire da Gennaio 2006 fino a Dicembre 2011 presso il reparto di nefrologia degli Spedali Civili di Brescia sono stati trattati con RTX 51 pazienti affetti da AAV in fase attiva. Trentasette pazienti erano affetti da GW, 13 da MPA ed uno da CHS.

Erano tutti pazienti di razza bianca con un'età media di 53 ± 19 anni (range 14-85), 25 maschi e 26 femmine. Quindici pazienti (15/51, 29%) venivano trattati all'esordio della malattia vasculitica (9 MPA, 5 GW, 1 CHS), 36 (36/51, 71%) ad una recidiva (32 GW, 4 MPA).

La maggior parte dei 36 pazienti trattati con RTX per recidiva di malattia presentavano una lunga storia precedente di malattia vasculitica, il tempo medio dalla prima diagnosi di malattia era $91,9\pm 61$ mesi, (range 9-228), tutti avevano avuto altre recidive prima del trattamento con RTX e molti di essi erano stati già precedentemente trattati con CYC (26/36, 72%). Cinque (5/36, 14%) erano stati recentemente trattati senza successo con CYC per la recidiva di malattia che richiedeva successivamente l'utilizzo del RTX (pazienti considerati resistenti alla CYC) (Tabella III).

Le manifestazioni di malattia pre-RTX erano di tipo vasculitico in 22 pazienti (22/51, 43%), granulomatoso in 21 (21/51, 41%) e sia di tipo vasculitico che granulomatoso in 8 pazienti (8/51, 16%). Complessivamente 30 pazienti (30/51, 59%) presentavano almeno una manifestazione vasculitica e 29 pazienti (29/51, 57%) almeno una manifestazione di tipo granulomatoso (figura 10).

Fra le manifestazioni vasculitiche 20 pazienti (20/51, 39%) presentavano una glomerulonefrite rapidamente progressiva (GNRP), di questi 5 richiedevano l'inizio del trattamento emodialitico (HD) all'esordio di malattia che poteva essere successivamente sospeso in due pazienti (2/5, 40%); 7 pazienti (7/51, 14%) avevano una microematuria di tipo glomerulare con funzione renale conservata; 20 pazienti (20/51, 39%) presentavano una

sintomatologia infiammatoria sistemica (febbricola, artro-mialgie, calo ponderale); 6 (6/51, 12%) manifestavano una porpora cutanea (in uno di essi era di tipo granulomatoso) e due avevano delle ulcere cutanee (2/51, 4%) . Un solo paziente con MPA all'esordio presentava una emorragia polmonare associata a GNRP. Una paziente presentava un interessamento vasculitico del sistema nervoso centrale che causava una emorragia midollare con residua paraplegia (figura 12).

La manifestazione granulomatosa più frequente erano i noduli polmonari diagnosticati in 18 pazienti (18/51, 35%), l'interessamento delle alte vie respiratorie (ENT, regione orecchio, naso, gola) si registrava in 10 pazienti (10/51, 20%), il coinvolgimento delle orbite e della laringe/bronchi (prevalentemente stenosi sub-glottica) era presente in un egual numero di pazienti (6/51, 12%); 3 pazienti presentavano una episclerite (3/51, 6%); una paziente presentava un quadro di pachimeningite (figura 11) .



Figura 10. Tipo di manifestazioni di AAV (Pz: pazienti).

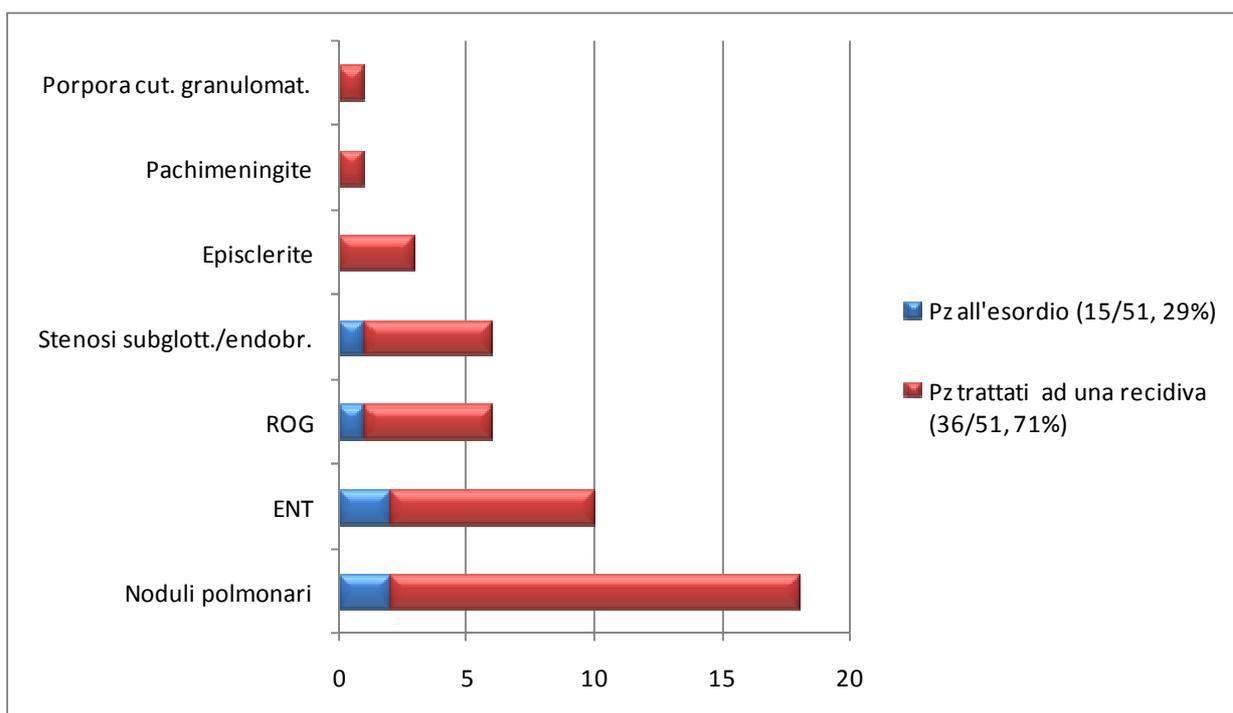


Figura 11. Numero e tipo di manifestazioni granulomatose dei pazienti con AAV trattati con RTX all'esordio o ad una recidiva (ROG: granuloma retro-orbitario, ENT: coinvolgimento della regione orecchio-naso-gola).

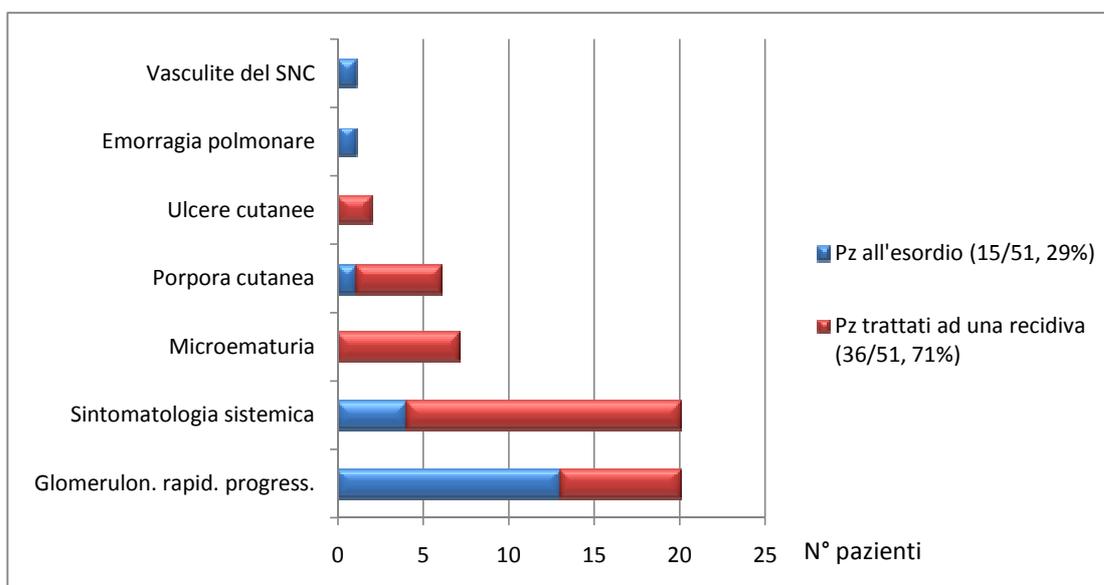


Figura 12. Numero e tipo di manifestazioni vasculitiche dei pazienti con AAV trattati con RTX all'esordio e ad una recidiva.

Lo score BVAS 2003 medio pre-RTX era di 10,9 ($\pm 5,2$).

I 15 pazienti trattati all'esordio di malattia erano in maggioranza pazienti affetti da MPA (9/15, 60%), tutti presentavano una manifestazione vasculitica e solo tre (3/15, 20%) affetti da GW avevano una concomitante manifestazione granulomatosa (che risultava prevalente in due pazienti con noduli polmonari multipli e coinvolgimento del massiccio facciale).

La manifestazione vasculitica più frequente nei pazienti trattati all'esordio di malattia era la GNRP (13/15, 87%), 5 pazienti (5/15, 33%) dovevano iniziare il trattamento HD che poteva poi essere sospeso in 2. Lo score BVAS 2003 medio dei 15 pazienti trattati all'esordio di malattia era 14,6 ($\pm 4,6$), significativamente maggiore rispetto al BVAS 2003 medio registrato nei 36 pazienti trattati ad una recidiva ($9,4 \pm 4,8$) ($p < 0,05$).

I 36 pazienti trattati ad una recidiva erano invece in maggioranza pazienti affetti da GW (32/36, 89%) con recidive di tipo esclusivamente granulomatoso (21/36, 58%) o sia di tipo vasculitico che granulomatoso (5/36, 14%). Meno di un terzo di essi presentava una recidiva esclusivamente di tipo vasculitico (10/36, 28%).

Al primo trattamento il numero medio di somministrazioni di RTX era 3 (range 1-4), la dose media per somministrazione era 765 mg (± 175 , range 400-1000). Venivano utilizzati due schemi principali di trattamento iniziale: 375 mg/m² a cadenza settimanale per 4 settimane (nella maggior parte dei casi) o 1 gr a cadenza bisettimanale per 2 somministrazioni complessive. Nel trattamento delle recidive veniva utilizzato lo schema di 375 mg/m² a cadenza settimanale per 4 settimane fino al 2011 quando, sulla base dell'esperienza maturata e dei dati presenti in letteratura si decideva di non adottare uno schema fisso, ma veniva preferita la somministrazione di una o due dosi di RTX stabilite secondo la gravità della recidiva e la risposta individuale.

Dei 15 pazienti trattati all'esordio di malattia 7 (7/15, 47%) ricevevano una media di 6 sedute di plasmateresi (range 5-7) per GNRP (un paziente presentava una concomitante emorragia polmonare), 3 (3/15, 20%) ricevevano tre boli endovenosi di metilprednisone

all'inizio del ciclo con RTX.

Nessun paziente presentava segni di attività di malattia a sei mesi dal trattamento con RTX. (score BVAS 2003 uguale a 0). Si osservava quindi una riduzione significativa del punteggio BVAS 2003 post-RTX ($P < 0,01$). Le manifestazioni di tipo vasculitico regredivano in tutti i casi entro un mese dal termine del ciclo di RTX, le forme granulomatose rispondevano invece più lentamente richiedendo fino a sei mesi per la negativizzazione del BVAS 2003 e in alcuni casi con incompleta risoluzione radiologica delle lesioni (considerati esiti fibro-cicatriziali non riferibili a malattia attiva). La creatinemia media pre-RTX nei pazienti con GNRP era 5,1 mg/dl (range 1,7-HD), dopo RTX la creatinemia media era 3,2 mg/dl (range 0,9-HD).

Complessivamente il follow-up medio post-RTX era di 20,1 mesi ($\pm 18,7$). Nove pazienti (9/51, 18%) presentavano un totale di 11 recidive post-RTX, due pazienti venivano ritrattati due volte con RTX per recidiva. Una paziente veniva ritrattata con una dose di RTX senza recidiva in atto per permettere la riduzione della posologia del prednisone (PD) per una grave forma di osteoporosi. Sei recidive (6/11, 55%) erano di tipo solo vasculitico: 3 sindromi nefritiche, 2 caratterizzate da comparsa di petecchie cutanee e mucose, artro-mialgie ed aumento degli indici infiammatori (entrambe nello stesso paziente), una paziente veniva ritrattata per artro-mialgie, calo ponderale ed aumento degli indici infiammatori. Tre recidive (3/11, 27%) erano di tipo esclusivamente granulomatoso: una riattivazione di un granuloma retro-orbitario, una rinite crostosa ed in una paziente una riattivazione sia a livello nasale che polmonare (noduli). Due (2/11, 18%) pazienti presentavano una recidiva sia vasculitica che granulomatosa: una paziente presentava febbricola, artro-mialgie e rinite crostosa attiva; un paziente presentava microematuria, artralgie ed una riattivazione endobronchiale.

Tutti i pazienti ritrattati per recidiva post-RTX ottenevano nuovamente la remissione dopo l'ulteriore ciclo di trattamento.

Il tempo medio alla prima recidiva era 24,3 ($\pm 12,3$) mesi, il tempo medio ad una recidiva (prima o seconda) era 23,1 ($\pm 11,6$) mesi.

Nel gruppo dei 15 pazienti trattati all'esordio di malattia il follow-up medio era 8,5 (\pm 6,3) mesi, un solo paziente (1/15, 7%) con GW presentava una recidiva di tipo granulomatoso (granuloma retro-orbitario) a 14 mesi dal primo trattamento e rispondeva nuovamente al RTX.

Nel gruppo di 36 pazienti inizialmente trattati per recidiva il follow-up medio era 24,9 (\pm 20) mesi, 8 pazienti presentavano almeno una recidiva (8/36, 22%), 2 pazienti (2/36, 6%) presentavano due recidive post-RTX. (tabella III). Tutte le recidive si verificavano in pazienti con GW, nessun paziente con MPA presentava recidiva di malattia (figura 17).

All'ultimo follow-up venivano registrati 4 decessi (4/51, 8%), 3 fra i pazienti trattati all'esordio di malattia (3/15, 20%) ed uno nei pazienti trattati ad una recidiva di malattia (1/36, 3%) (figure 15 e 16). I tre decessi registrati fra i pazienti trattati all'esordio si verificavano tutti entro 5 mesi dal ciclo con RTX. Un paziente di 85 anni con MPA di nuova diagnosi moriva circa un mese dopo la somministrazione di una unica dose di RTX da 600 mg a causa di uno stato settico in corso di colecistite e pancreatite. Questo paziente aveva presentato all'esordio una GNRP con necessità temporanea di trattamento HD ed aveva ricevuto inizialmente anche 3 somministrazioni endovenose di metrilprednisone da 500 mg. Un'altra paziente di 78 anni affetta da MPA esordita con una GNRP in completa remissione dopo un ciclo di 3 dosi di RTX da 600 mg moriva a distanza di circa 5 mesi per un linfoma cerebrale. Questa paziente aveva presentato anche una micobatteriosi polmonare atipica dopo l'inizio della terapia con RTX ed aveva pertanto ricevuto solamente 3 della 4 dosi previste, era in terapia di mantenimento con basse dosi di PD. Un paziente di 79 anni con MPA esordita con GNRP di diagnosi tardiva doveva iniziare il trattamento HD cronico e moriva 2 mesi dopo un ciclo di trattamento con 2 dosi di RTX da 1 gr a causa di una sepsi a partenza da una ferita cutanea. Era in terapia di mantenimento con AZA e basse dosi di PD. Il quarto paziente deceduto aveva 81 anni ed era affetto da GW di lunga durata. Il decesso avveniva a causa di un infarto miocardico acuto (STEMI) 8 mesi dopo un ritrattamento con una dose unica di RTX per recidiva di sindrome nefritica (figura 13, tabella III).

Venivano registrate 4 complicanze infettive che condizionavano la sospensione del trattamento con RTX: una infezione da CMV, una infezione da HSV, una infezione da Clostridium Difficile ed una micobatteriosi atipica polmonare. Una paziente presentava una neutropenia transitoria riscontrata circa 3 mesi dopo la prima dose di RTX, la neutropenia si risolveva dopo la somministrazione del fattore stimolante le colonie di granulociti e monociti (GM-CSF).

Durante le somministrazioni di RTX in alcuni pazienti si è registrato un transitorio calo della pressione arteriosa che non ha richiesto nessun intervento terapeutico specifico se non il temporaneo rallentamento della velocità di infusione del farmaco. Un paziente ha manifestato una risposta infiammatoria sistemica alla fine dell'infusione del RTX con febbre elevata (39°C) e brivido scuotente. La febbre si risolveva dopo circa 12 ore, gli esami ematochimici successivi mostravano un transitorio incremento della proteina C reattiva (PCR) ed un importante aumento della procalcitonina. Le emocolture eseguite risultavano negative, i successivi controlli ematochimici evidenziavano una normalizzazione della PCR e della procalcitonina senza alcuna terapia aggiuntiva. È probabile che questa reazione sia stata determinata da una contaminazione batterica del preparato per infusione.

Dei 36 pazienti trattati con RTX per una recidiva 25 erano in terapia con MTX+PD (un paziente trapiantato di rene assumeva sia MTX che ciclosporina), 6 con AZA+ PD, 4 solo con PD, 1 paziente era in terapia con CYC. Il dosaggio del PD pre-RTX era in tutti i casi inferiore a 0,5 mg/kg. Dopo la terapia con RTX la maggior parte dei paziente manteneva l'immunosoppressore precedentemente assunto, in particolare 25 pazienti proseguivano il MTX, 3 l'AZA, 3 pazienti sospendevano l'AZA e proseguivano con solo PD, complessivamente 8 pazienti assumevano solo PD dopo RTX. Il dosaggio del PD era mantenuto invariato od aumentato fino ad un massimo di 0,5 mg/kg rispetto al dosaggio pre-RTX (figura 14).

Dei 15 pazienti trattati con RTX all'esordio di malattia 2 iniziavano successivamente una terapia di mantenimento con MTX (+PD), due con AZA (+PD), 11 proseguivano solamente con PD.

Tabella III. Caratteristiche e risultati dei pazienti con AAV trattati con Rituximab (RTX).

	Tutti i pazienti	Pazienti trattati all'esordio	Pazienti trattati ad una recidiva
Numero (%)	51	15/51 (29)	36/51 (71)
Maschi	25/51	7/15	18/36
Femmine	26/51	8/15	18/36
Età (anni)	53	62	50
Ds (±)	19	19,2	18
Range	14-85	19-85	14-81
Tipo di vasculite (%)			
GW	37 (73)	5 (33)	32 (89)
MPA	13 (25)	9 (60)	4 (11)
CHS	1 (2)	1 (7)	0 (0)
Durata della malattia pre RTX (mesi)	NA	NA	91,9 (±61)
Range			9-228
Tipo di manifestazione			
Vasculitica (%)	22 (43)	12 (80)	10 (28)
Granulomatosa (%)	21 (41)	0 (0)	21 (58)
Entrambe (%)	8 (16)	3 (20)	5 (14)
Manifestazioni vasculitiche (%)	30/51 (59)	15 (100)	15 (42)
GNRP/HD	20 (39)/5	13 (87)/5 (33)	7 (19)/0 (0)
Artro-mialgie/calorale ponderale	20 (39)	4 (27)	16 (44)
Microematuria	7 (14)	0 (0)	7 (19)
Porpora cutanea	6 (12)	1 (7)	5 (14)
Ulcere cutanee	2 (4)	0 (0)	2 (6)
Emorragia polmonare	1 (2)	1 (7)	0 (0)
Vasculite del SNC	1 (2)	1 (7)	0 (0)
Manifestazioni granulomatose (%)	29/51 (57)	3 (20)	26 (72)
Noduli polmonari	18 (35)	2 (13)	16 (44)
ENT	10 (20)	2 (13)	8 (22)
ROG	6 (12)	1 (7)	5 (14)
Stenosi subglottica/endobronchiale	6 (12)	1 (7)	5 (14)
Episclerite	3 (6)	0 (0)	3 (8)
Pachimeningite	1 (2)	0 (0)	1 (3)
Porpora cutanea granulomatosa	1 (2)	0 (0)	1 (3)
Creatinina in 20 pz con GNRP (mg/dl)			
Pre RTX (Range)/HD pz	5,1 (1,7-HD)/5		
Post RTX (range)/HD pz	3,2 (0,9-HD)/3		
BVAS 2003 pre RTX	10,9	14,6	9,4
DS	5,2	4,6	4,8
Range	5-25	9-25	5-19
Tipo di ANCA (%)			
cANCA PR3	29/44 (66)		
pANCA MPO	11/44 (25)		
Negativi	4/44 (9)		
hPCR mg/L(±Ds) pre-RTX	42,2 (±44,8)		

Tabella III. Caratteristiche e risultati dei pazienti con AAV trattati con RTX (II parte).

	Tutti i pazienti	Pazienti trattati all'esordio	Pazienti trattati ad una recidiva
Precedente esposizione a CYC (%) Recidiva dopo CYC (%)	NA	NA	26/36 (72) 5/36 (14)
Terapia pre/post RTX (%) MTX +PD AZA+PD Solo PD CYC+PD	NA	NA/2 (13) NA/2 (13) NA/11 (74)	25 (69)/25 (69) 6 (17)/3 (8) 4 (11)/8 (22) 1 (3)/ 0 (0)
N° dosi di RTX/pts (Range) Dosaggio medio (Ds)/Range (mg)	3 (1-4) 765 (±165)/400-1000		
N° pz trattati con plasmateresi (%) N° di plasmateresi/pz (range)	7 (14) 6 (5-7)	7 (47)	0 (0)
Follow-up (mesi) DS Range	20,1 18,7 1-71	8,5 6,3 1-24	24,9 20 3-71
BVAS 2003 6 mesi post RTX	0	0	0
Numero di recidive (per pz) Pz con 1 o più recidive (%) Pz con 2 o più recidive (%) Tipo di recidive: Vasculitiche Granulomatose Vasculitiche + granulomatose	11 (0,2) 9 (18) 2 (4) 6 3 2	1 (0,1) 1 (7) 0 (0) 0 1 0	10 (0,3) 8 (22) 2 (6) 6 2 2
Tempo alla prima recidiva (Ds) Mesi Range Tempo a qualsiasi recidiva (Ds) Mesi Range	24,3 (±12,3) 7-42 23,1 (±11,6) 7-42		
Decessi (%)	4 (8)	3 (20)	1 (3)

GW: Granuloamtosi di Wegener; MPA: micropoliarterite; CHS: Churg-Strauss; BVAS: Birmingham Vasculitis Activity Score; ANCA: anticorpi anticitoplasma dei neutrofili; hPCR: proteina C reattiva; ROG: granuloma retro-orbitario; ENT: coinvolgimento regione orecchie, naso, gola; PD: prednisone; CYC: ciclofosamide; AZA: azatioprina; MTX: methotrexate.

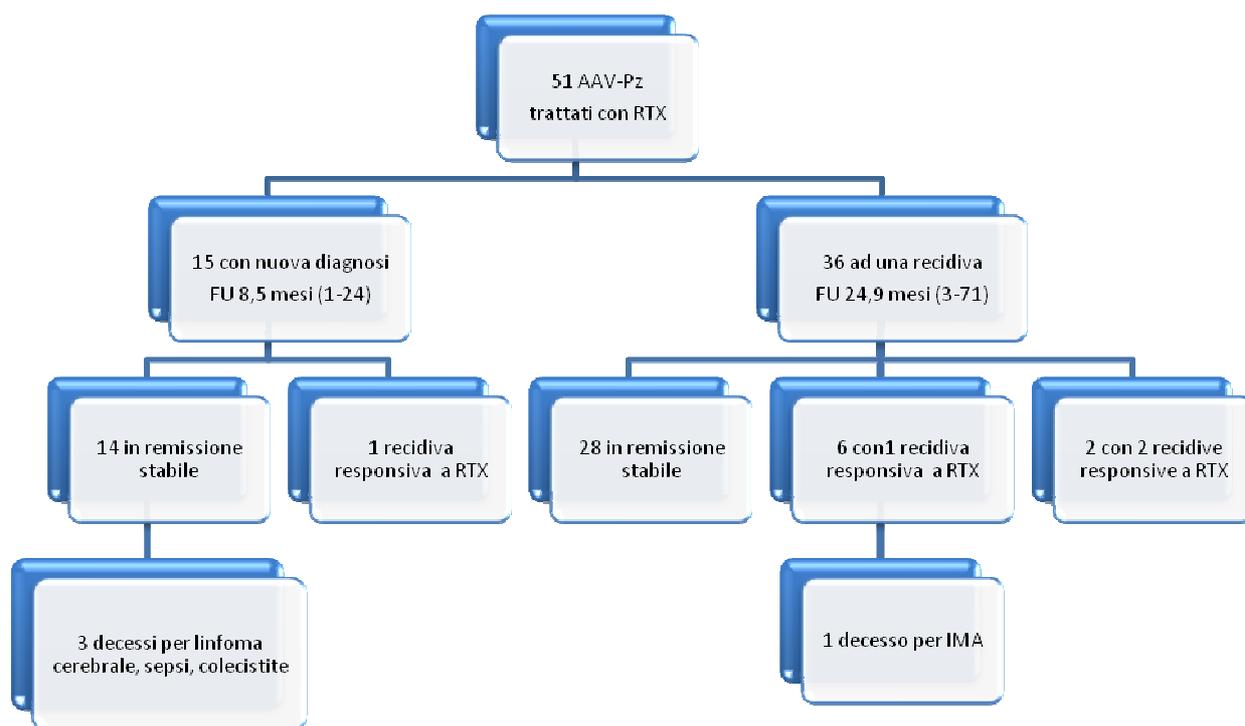


Figura 13. Schema riassuntivo dei nostri pazienti con AAV trattati con RTX.

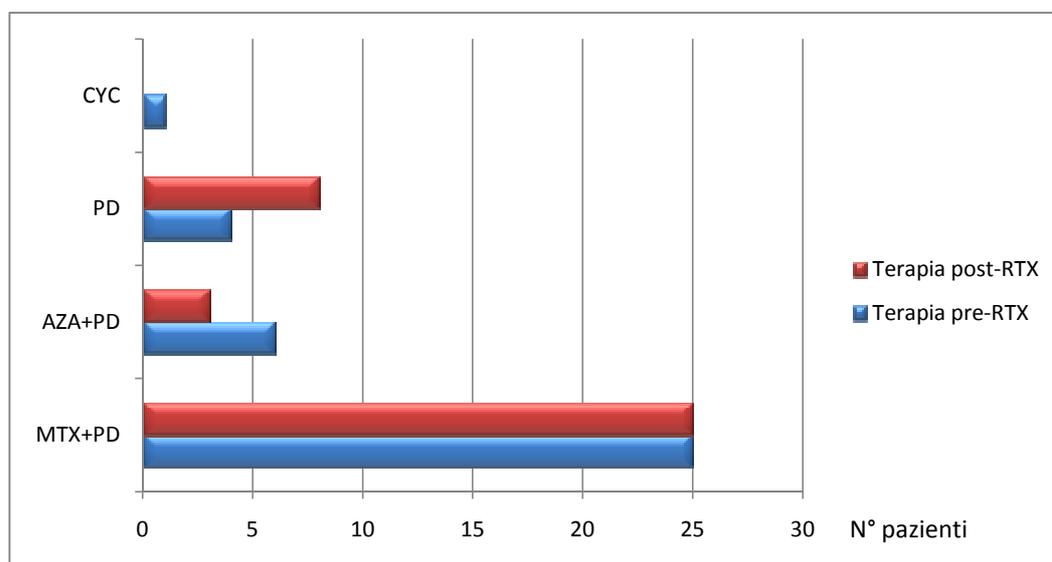


Figura 14. Terapia immunosoppressiva di mantenimento pre e post-RTX dei 36 pazienti trattati ad una recidiva (un paziente assumeva MTX + ciclosporina).
MTX: methotrexate; AZA: azatioprina; PD: prednisone.

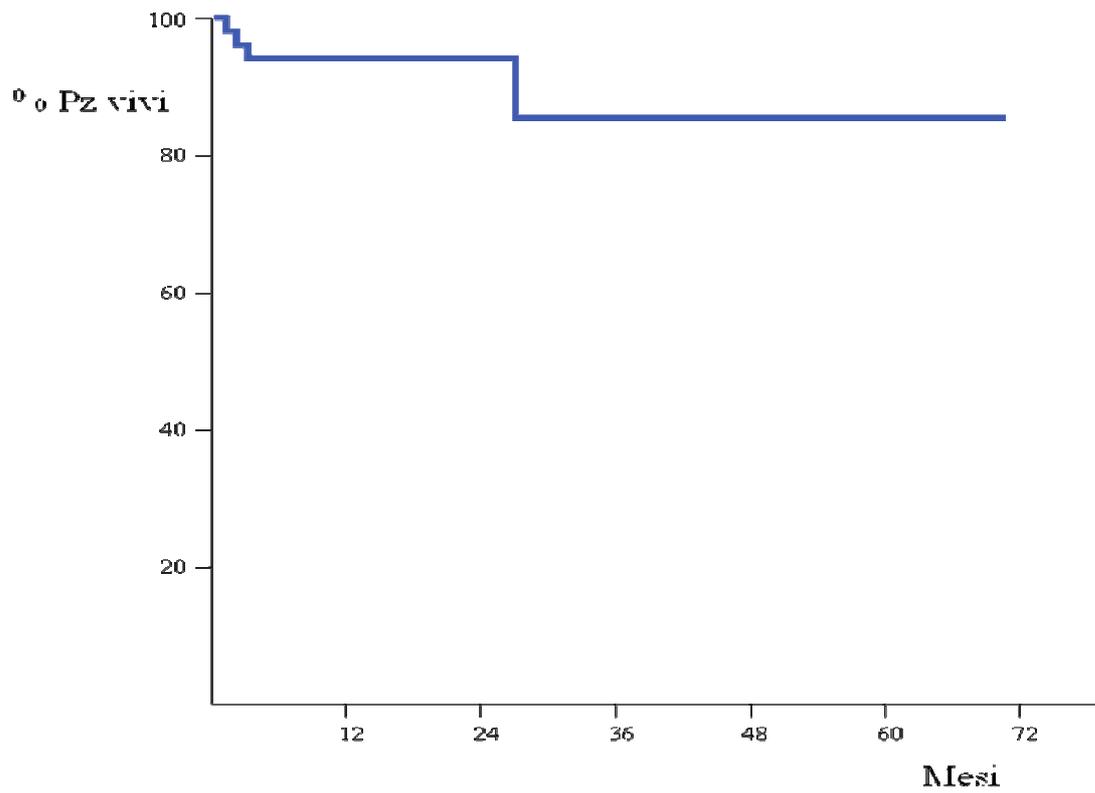


Figura 15. Sopravvivenza globale post-RTX.

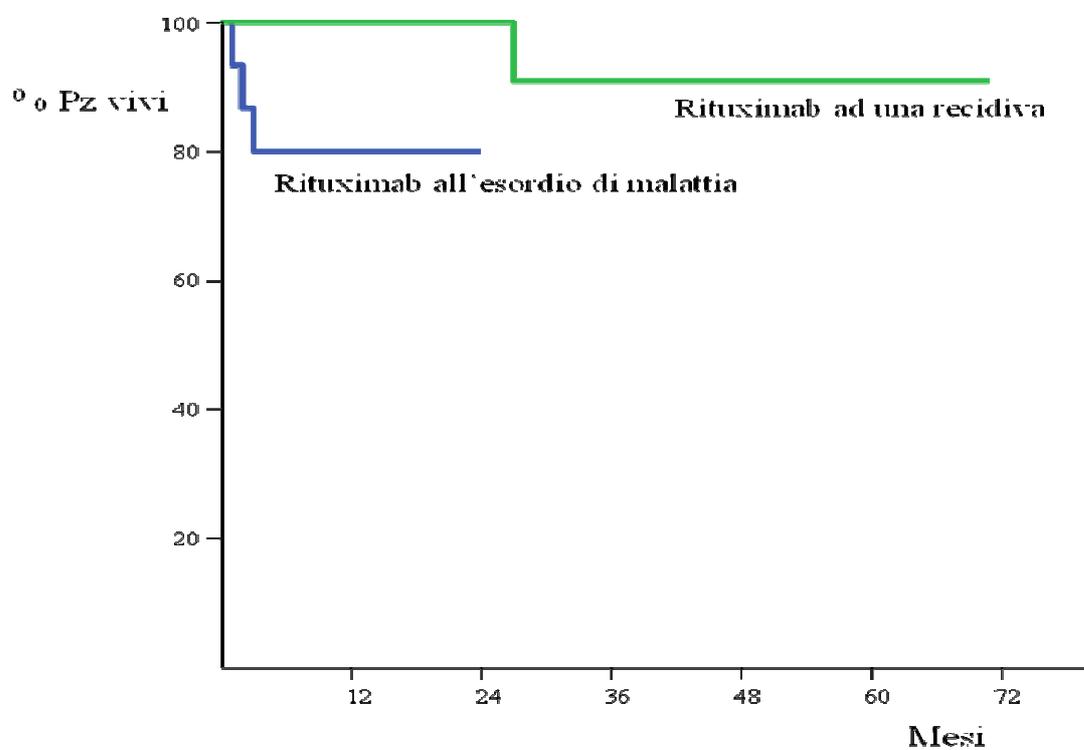


Figura 16. Sopravvivenza nei pazienti trattati all'esordio di malattia o ad una recidiva.

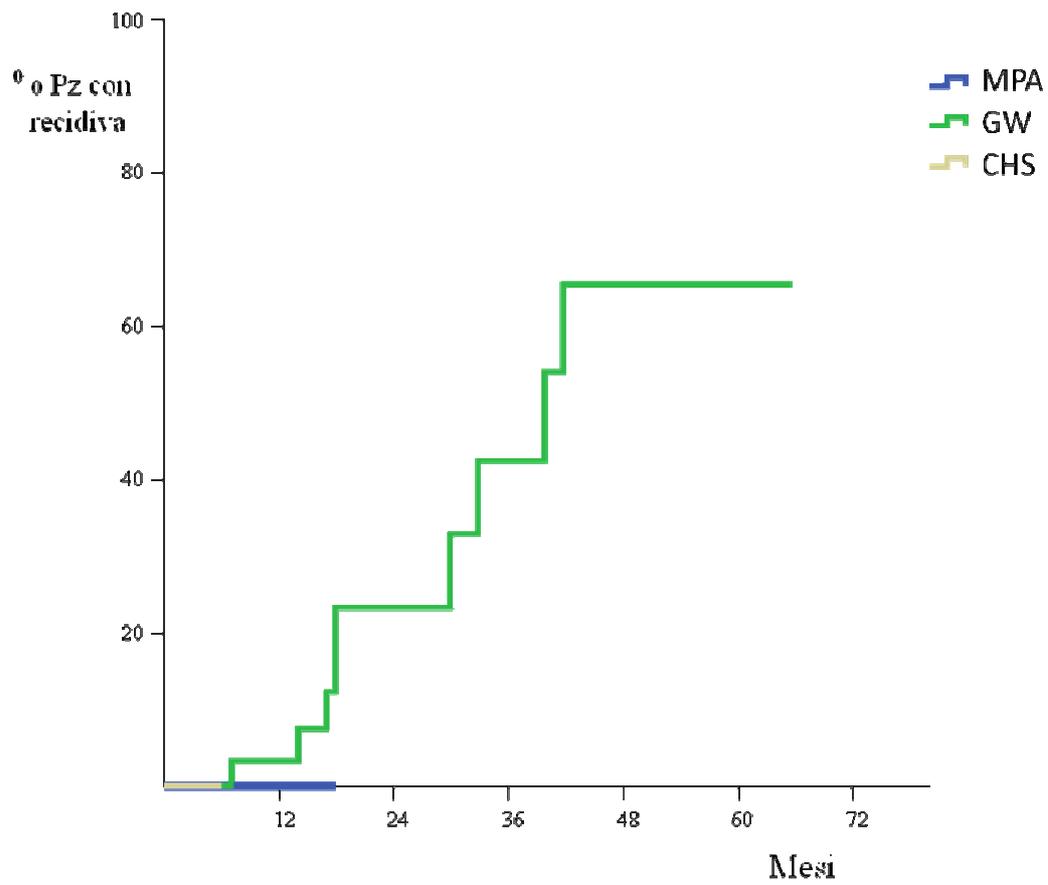


Figura 17. Tempo alla recidiva o fine follow-up nei pazienti con AAV post-RTX.

La valutazione degli ANCA era disponibile in 44 pazienti, 29 (29/44, 66%) presentavano positività per C-ANCA anti-PR3, 11 (11/44, 25%) per P-ANCA anti-MPO, 4 (4/44, 9%) risultavano ANCA negativi prima del RTX. Il livello medio degli ANCA anti-PR3 pre-RTX misurato con la metodica ELISA era di $110,1 \pm 73,3$ UA/ml (valori normali minori di 10 UA/ml), quello degli ANCA anti-MPO $172,2 \pm 32$ UA/ml (valori normali minori di 10 UA/ml). Il valore medio della PCR pre-RTX era $42,2 \pm 44,8$ mg/l (valori normali minori di 5 mg/l). Otto pazienti (8/51, 16%) non presentavano un aumento della PCR in corso di recidiva.

Dopo RTX si osservava una riduzione significativa del livello degli ANCA ($p < 0,01$, figura 18 e 19) che si negativizzavano in 16 pazienti (16/40, 40%). Il livello medio dei C-ANCA anti-PR3 post-RTX misurato con la metodica ELISA era di $40,0 \pm 60,0$ UA/ml (valori normali minori di 10 UA/ml), quello dei P-ANCA anti-MPO $50,9 \pm 72,4$ UA/ml (valori normali minori di 10 UA/ml).

Nel corso di tutte le 11 recidive post-RTX gli ANCA risultavano positivi, in 2 casi a basso titolo. In 8 episodi di recidiva gli ANCA non si erano mai precedentemente negativizzati, in 3 casi gli ANCA negativizzati si ripositivizzavano nuovamente prima della recidiva.

Il valore medio della PCR post-RTX era $5,8 \pm 10,6$ mg/l (valori normali minori di 5 mg/l): si osservava quindi una riduzione significativa degli indici infiammatori dopo il trattamento con RTX ($p < 0,01$, figura 20).

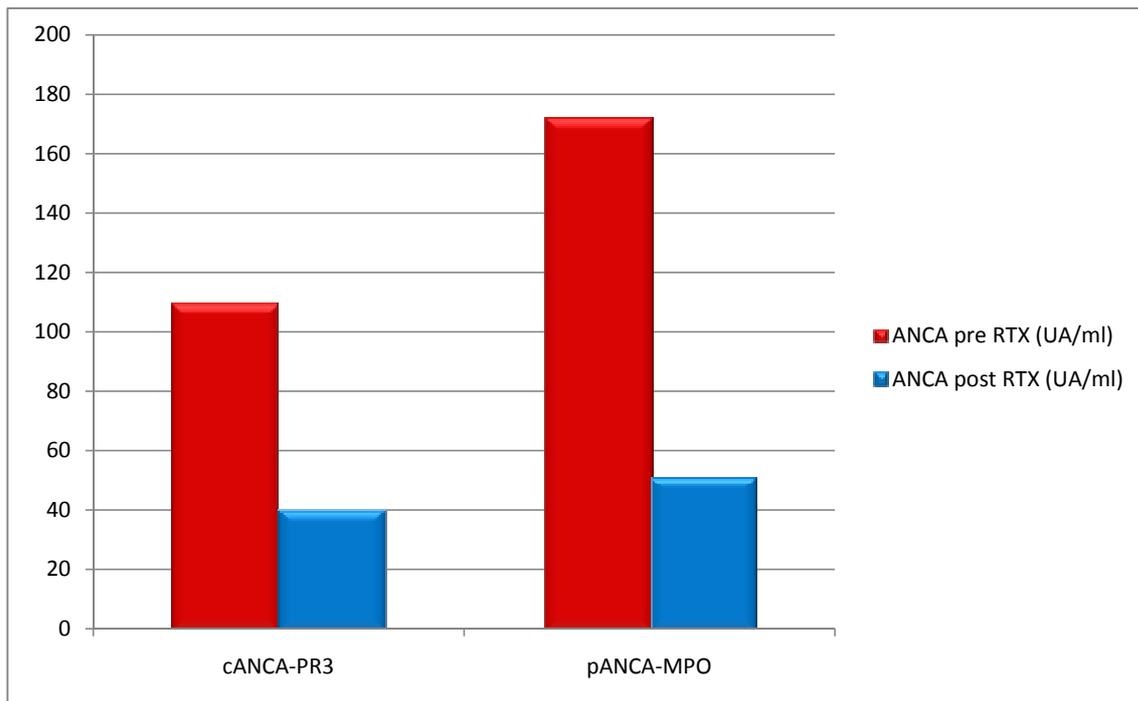


Figura 18. Riduzione significativa del livello medio degli ANCA dopo RTX ($p < 0,01$).

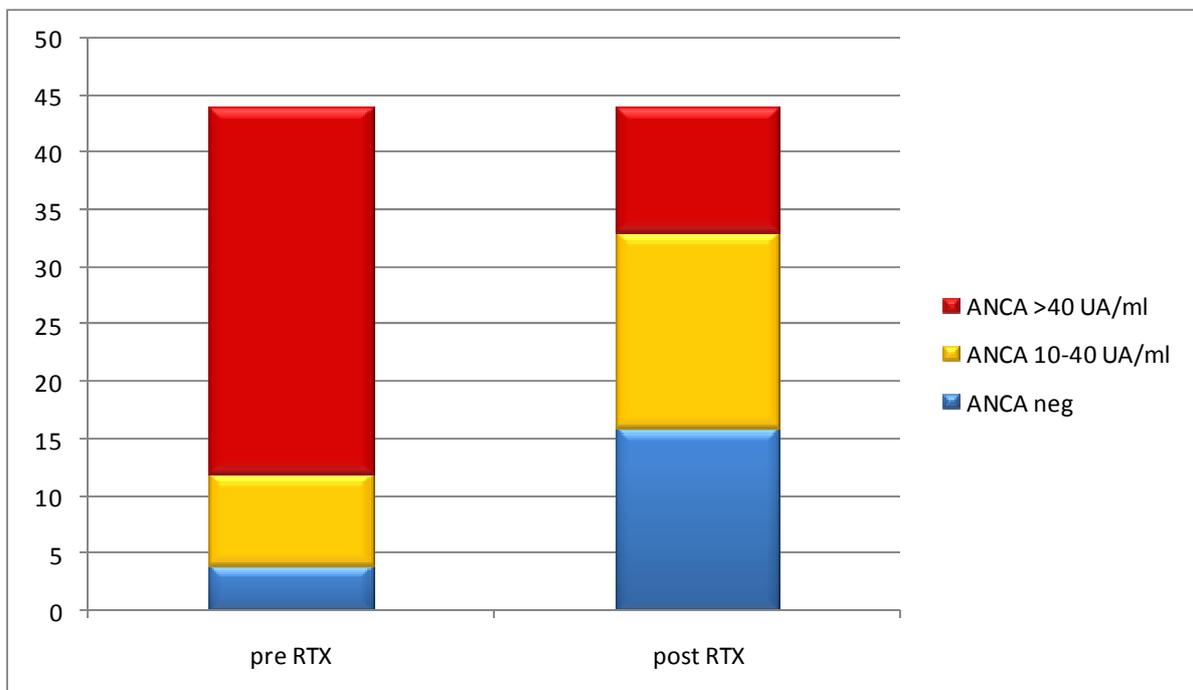


Figura 19. Numero di pazienti con livello degli ANCA di 0, fra 10 e 40 e >40 UA/ml prima e dopo il ciclo di RTX.

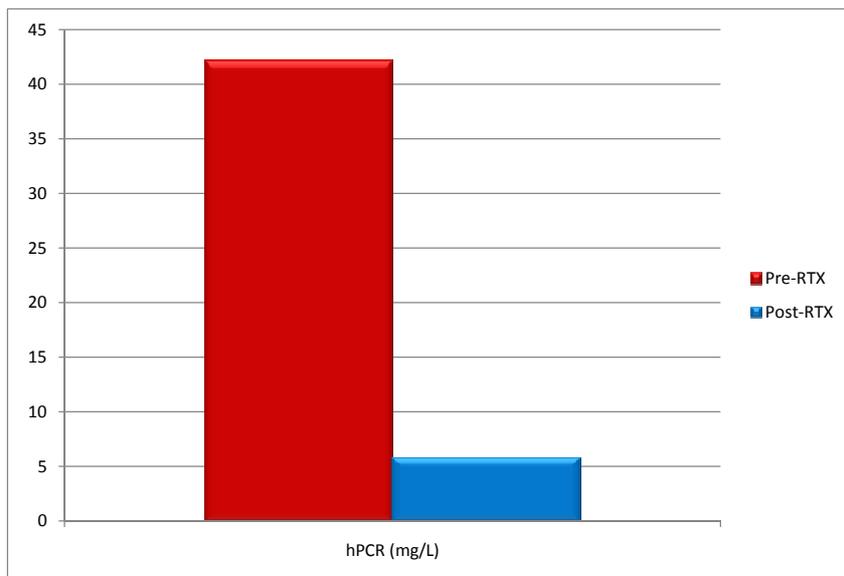


Figura 20. Riduzione significativa dei valori di proteina C reattiva (PCR) dopo RTX ($p < 0,01$).

DISCUSSIONE

La nostra casistica di 51 pazienti con AAV in fase attiva ha evidenziato l'efficacia del RTX nel ridurre il grado di attività di malattia rilevato dal BVAS 2003 (80). Infatti la maggior parte dei pazienti trattati presentavano una AAV attiva di grado severo con un BVAS 2003 medio di 10,9 (range 5-25), a distanza di sei mesi dal trattamento tutti erano in remissione con un BVAS 2003 di zero senza segni di malattia attiva rilevabili ($p < 0,01$).

Nella nostra casistica sono stati inclusi sia pazienti trattati all'esordio della vasculite (15/51, 29%) che pazienti con una lunga storia di malattia vasculitica precedente trattati con RTX ad una recidiva (36/51, 71%). Nei primi anni (2006-2009) abbiamo utilizzato il RTX prevalentemente per trattare recidive di tipo granulomatoso in pazienti con GW, successivamente con l'esperienza maturata ed i nuovi dati riportati in letteratura abbiamo deciso di iniziare ad utilizzare il RTX anche per trattare i pazienti all'esordio di malattia con manifestazioni vasculitiche (GNRP), come farmaco alternativo alla CYC.

I 15 pazienti trattati all'esordio di malattia presentavano tutti una malattia attiva di grado severo (BVAS 2003 medio di 14,6, range 9-25) e tutti mostravano almeno una manifestazione di tipo vasculitico. La maggior parte presentava P-ANCA anti-MPO positivi ed era affetto da MPA. In 13/15 (87%) pazienti la manifestazione più grave di malattia che richiedeva l'utilizzo del RTX era la GNRP, 5 (5/15, 33%) pazienti dovevano iniziare il trattamento emodialitico, una paziente che iniziava la dialisi presentava successivamente una emorragia midollare secondaria a vasculite del SNC ed un paziente presentava una sindrome pneumo-renale con emorragia polmonare. Sette di questi pazienti ricevevano anche una media di 6 plasmaferesi, 3 dei boli di metilprednisone. Due pazienti con GW all'esordio presentavano invece delle manifestazioni prevalentemente granulomatose (noduli polmonari, ENT, ROG).

Il RTX si è dimostrato efficace nell'indurre la remissione di malattia in tutti i pazienti trattati, già ad un mese dal termine del trattamento non erano evidenti manifestazioni

vascolitiche attive, la funzione renale migliorava significativamente nella maggior parte dei pazienti, 2/5 pazienti potevano sospendere il trattamento emodialitico. Fra i pazienti trattati all'esordio di malattia ad un follow-up medio di 8,5 mesi (range 1-25) si registrava solo una recidiva granulomatosa (ROG) che rispondeva ad un nuovo ciclo di RTX.

La maggior parte dei 36 pazienti trattati inizialmente per una recidiva erano invece affetti da GW (32/36, 89%) e presentavano manifestazioni prevalentemente granulomatose (la più frequente era rappresentata da noduli polmonari in un terzo dei casi). Tutti rispondevano al RTX, ad un follow-up medio di 24,9 mesi (3-71) si registravano un totale di 10 recidive in 8 pazienti che ottenevano una nuova remissione dopo RTX.

Questi risultati concordano con la maggior parte delle piccole casistiche presenti in letteratura che hanno riportato remissioni complete o parziali (definite generalmente come un BVAS di 0 o non superiore ad 1) in quasi il 90% dei pazienti trattati (52-73) e con i risultati di due recenti trials randomizzati e controllati (48, 49).

'Rituximab versus Cyclophosphamide for ANCA-associated Vasculitis' (RAVE) è un trial multicentrico, randomizzato e controllato disegnato per valutare l'efficacia del RTX nelle forme severe di AAV all'esordio od a una recidiva in confronto con la terapia standard (CYC). Sono stati inclusi 197 pazienti con forme severe di GW o MPA (3:1): 63 pazienti (64%) nel braccio del RTX vs 52 pazienti nel braccio della CYC ottenevano l'endpoint primario definito come un BVAS/WG di 0 in assenza di terapia steroidea a 6 mesi dal trattamento. Il 71% dei pazienti trattati con RTX vs il 62% di quelli trattati con CYC ottenevano l'endpoint secondario definito come una remissione clinica con un dosaggio di PD inferiore a 10 mg a 6 mesi dal trattamento. L'analisi per sottogruppi mostrava una efficacia superiore del RTX vs CYC nei pazienti trattati per recidiva (48).

Il secondo trial randomizzato e controllato, 'Rituximab versus Cyclophosphamide in ANCA Associated Renal Vasculitis' (RITUXVAS) includeva 44 pazienti con AAV di nuova diagnosi (GW o MPA) ed interessamento vasculitico renale. I pazienti venivano randomizzati

3:1 a ricevere oltre alla dose standard di steroide il trattamento con RTX (375 mg/m² ev settimanalmente per 4 settimane) più due boli endovenosi di CYC in concomitanza con la prima e terza dose di RTX (33 pazienti) o la terapia convenzionale con CYC (boli endovenosi per 3-6 mesi) seguita da una terapia di mantenimento con AZA per via orale (11 pazienti).

La percentuale di remissioni sostenute (definite come un BVAS di 0 per 6 mesi) ad un anno era simili nei due bracci (76% vs 82%).

Nel RITUXVAS, il 15% dei pazienti del braccio RTX vs il 10% di quelli del braccio CYC presentava una recidiva durante un follow-up medio di 12 mesi. Ad un follow-up di due anni solo 7/33 (21%) pazienti del braccio RTX (che non assumevano nessuna terapia immunosoppressiva di mantenimento) vs 2/11 (18%) di quelli del braccio CYC (che assumevano AZA come terapia di mantenimento) presentavano una recidiva (49).

Anche nel RAVE le recidive a 6 mesi erano comparabili nei due bracci. A 18 mesi di follow-up il 36% dei pazienti nel braccio RTX mantenevano la remissione senza alcuna terapia immunosoppressiva vs il 31% di quelli del braccio CYC che assumevano AZA come terapia di mantenimento.

Va sottolineato che in entrambi questi trials i pazienti assegnati al braccio CYC ricevevano una terapia immunosoppressiva di mantenimento con AZA, mentre i pazienti del braccio RTX ricevevano placebo. Essendo i risultati fra i due bracci comparabili sembra evidente un potenziale vantaggio del RTX vs CYC nel mantenere una remissione prolungata in assenza di altre concomitanti terapie immunosoppressive. Questo vantaggio risulta più evidente nel RITUXVAS dove i pazienti (prevalentemente con MPA all'esordio ad interessamento renale) presentavano un rischio di recidiva minore rispetto alla popolazione inclusa nel RAVE (prevalentemente pazienti con GW e recidive granulomatose). Infatti nel RITUXVAS a 2 anni di follow-up il 79% dei pazienti del braccio RTX mantenevano la remissione senza terapia immunosoppressiva vs il 36% a 18 mesi di follow-up nel RAVE.

Nella nostra casistica di 51 pazienti i 15 trattati all'esordio di malattia sono comparabili per

caratteristiche con la popolazione inclusa nel RITUXVAS (pazienti con MPA all'esordio ad interessamento prevalentemente renale), mentre i 36 pazienti trattati ad una recidiva sono comparabili con la popolazione del RAVE (prevalentemente pazienti con GW e recidive granulomatose) per definizione a maggior rischi di recidiva. A 20,1 mesi di follow-up abbiamo osservato complessivamente 11 recidive in 9 pazienti con GW (18%): un paziente con recidiva granulomatosa (1/15, 7%) nel gruppo trattato all'esordio di malattia (follow-up medio di 8,5 mesi) ed 8 pazienti (8/36, 22%) nel gruppo trattato ad una recidiva di malattia (follow-up medio 24,9 mesi). Non abbiamo osservato nessuna recidiva nei pazienti con MPA. Nella maggior parte dei nostri pazienti trattati all'esordio di malattia veniva mantenuta in terapia solo con basse dosi di PD dopo il ciclo di RTX (11/15, 74%) mentre la maggior parte dei 36 trattati ad una recidiva manteneva un altro immunosoppressore (AZA o MTX) oltre al PD dopo il RTX (28/36, 78%). La diversa scelta nel trattamento immunosoppressivo di mantenimento post-RTX fra i due gruppi era determinata proprio dal diverso rischio di recidiva dei pazienti (minore per quelli con MPA). I diversi risultati in termini di remissione senza terapia di mantenimento riportati dai due trials vanno quindi interpretati considerando le differenti popolazioni incluse. Questi dati suggeriscono che dopo il trattamento con RTX nei pazienti con GW e manifestazioni granulomatose andrebbe probabilmente mantenuto in terapia un altro farmaco immunosoppressore (MTX o AZA) oltre al PD, considerato l'elevato rischio di recidiva.

Una questione controversa e discussa è il possibile utilizzo del RTX come terapia di mantenimento.

Un recente studio retrospettivo ha valutato 39 pazienti con AAV in remissione completa o parziale trattati con 1 gr di RTX ogni 4 mesi (utilizzato come farmaco di mantenimento), ad un anno nessun paziente presentava recidive maggiori (70). Un altro autore ha trattato 72 pazienti con AAV refrattaria con RTX (1 gr per due somministrazioni a distanza di 2 settimane poi ogni 6 mesi per due anni) ottenendo una remissione completa nel 97%, a 6 mesi solo 4 pazienti assumevano ancora una concomitante terapia immunosoppressiva (67). Cartin-Ceba ha riportato

i dati di 53 pazienti con GW refrattaria di lunga data trattati con RTX come terapia di mantenimento. Avendo osservando nella sua casistica che tutte le recidive erano precedute da una ricomparsa dei linfociti B CD20+ periferici e, tutte eccetto una anche dalla ricomparsa degli ANCA, questo autore ha adottato (con successo) la ricomparsa dei linfociti BCD20+ periferici o la successiva ricomparsa degli ANCA quali criteri per utilizzare il RTX come terapia di mantenimento (85).

Nella nostra casistica il 91% dei pazienti presentava degli ANCA positivi pre-RTX ed in tutte le 11 recidive post-RTX gli ANCA risultavano positivi (in 3 casi a basso titolo): in 8 casi gli ANCA non si erano mai negativizzati dopo RTX, in 3 casi si erano ripositivizzati a distanza dal primo trattamento.

Queste casistiche suggeriscono che il RTX è efficace nel prevenire le recidive di malattia anche se rimangono da chiarire il timing ed i dosaggi ottimali da utilizzare.

Sia nel RAVE che nel RITUXVAS venivano inclusi pazienti con malattia severa ed ANCA positivi. Vi sono solo poche segnalazioni che suggeriscono che il RTX possa essere efficace anche nei casi di vasculite ANCA negativi o nelle forme limitate di malattia (68). Sarebbero quindi necessari ulteriori studi per verificare l'efficacia del RTX in questi pazienti, in particolare comparato con il MTX.

Nella nostra casistica la maggior parte dei pazienti ricevevano il classico schema di somministrazione del RTX : 4 somministrazioni da 375 mg/m² di superficie corporea a cadenza settimanale (in media 3 dosi, range 1-4), con un dosaggio medio di 765 mg (range 400-1000). Sia nel RITUXVAS che nel RAVE veniva utilizzato il medesimo schema sulla base dei dati presenti in letteratura al momento del disegno dei trials. Tuttavia alcuni studi osservazionali hanno suggerito che risultati simili potrebbero essere ottenuti con due somministrazioni di RTX da 1 gr a distanza di due settimane (il dosaggio approvato dalla FDA per i casi di artrite reumatoide resistenti ai farmaci anti-TNF) (51, 65, 67).

Ad oggi non è chiaro se questo schema con dose fissa di RTX possa essere considerato

equivalente alle 4 dosi settimanali nell'indurre la remissione nelle forme severe di AAV, così come non vi è accordo sul dosaggio di RTX da utilizzare nelle recidive meno severe. Sulla base di queste considerazioni e dell'esperienza maturata nel corso del 2011 abbiamo deciso di non adottare uno schema rigido nell'utilizzo del RTX per le recidive ma di somministrare una o due dosi di RTX a seconda della gravità della recidiva e del rischio infettivo del singolo paziente.

Nella nostra casistica ad un follow-up medio di 20,1 mesi abbiamo osservato 4 decessi (4/51, 8%), 3 (3/15, 20%) nel gruppo di pazienti con nuova diagnosi di malattia (follow-up medio 8,5 mesi), un solo decesso fra i pazienti trattati ad una recidiva (1/36, 3%, follow-up medio 24,9 mesi). Questa differenza di mortalità è giustificata probabilmente dalla maggiore gravità di malattia (vedi BVAS 2003) e dalla maggiore età media dei pazienti (62 vs 50 anni) del gruppo con nuova diagnosi. Infatti quasi metà dei pazienti con nuova diagnosi dovevano essere sottoposti a plasmateresi (7/15, 47%) e 3 venivano anche trattati con boli di steroide per via endovenosa. Questi dati di mortalità sono in linea con quelli riportati nel RITUXVAS (18% di mortalità) e del RAVE (1,5%). Anche nel RITUXVAS rispetto al RAVE i pazienti erano mediamente più anziani e con malattia più grave. Non è comunque escludibile che la differenza di mortalità registrata nei due trials sia almeno in parte riferibile ad una eccessiva immunosoppressione indotta nel RITUXVAS con l'associazione di RTX e CYC.

Diversi altri piccoli studi riportati in letteratura (53, 60, 63) hanno utilizzato il RTX per trattare recidive di AAV (molte di tipo granulomatoso) associandolo solo con basse dosi di steroide come farmaco di mantenimento. E' possibile che la migliore percentuale di remissione rilevata nelle recidive granulomatose (100%) nella nostra casistica rispetto a quelle riportate in letteratura (circa 86%) possano derivare anche da un sinergismo fra farmaci in grado di interferire con steps diversi del processo autoimmunitario. Considerando la complessità e la molteplicità di interazioni cellulari presenti all'interno del granuloma sembrerebbe logico utilizzare una terapia in grado di bloccare selettivamente diversi segnali di attivazione autoimmunitaria.

Il granuloma dei pazienti con GW risulta costituito per il 50/70% da cellule T CD4+CD28- e per il 30-50% da cellule di derivazione monocitica (macrofagi, cellule giganti multinucleate, fibroblasti) e da granulociti polimorfonucleati. All'interno dei granulomi si formano anche delle aree ricche di linfociti B CD20+ (limphoid-like) dove a seguito dell'interazione con i linfociti T e con altre cellule presentanti l'antigene i linfociti B andrebbero incontro ad una maturazione antigene guidata, trasformandosi in plasmacellule capaci di produrre anticorpi diretti contro la PR3 (41-45). Oltre alla produzione di autoanticorpi le cellule B CD20+ autoreattive possono contribuire al mantenimento del processo autoimmunitario attraverso molti altri meccanismi: funzionando come cellule presentanti l'antigene (altamente specializzate) ai linfociti T, producendo diversi tipi di citochine in grado di influenzare l'attivazione di varie altre cellule del sistema immunitario, infiltrando direttamente gli organi target, costituendo una memoria autoantigenica di lunga durata (cellule memoria autoreattive a prolungata sopravvivenza) in grado di riattivare il processo autoimmunitario anche dopo una lunga fase di remissione.

I linfociti B CD20+ sarebbero quindi determinanti non solo per il passaggio dalla fase granulomatosa localizzata alla fase vasculitica sistemica, ma giocherebbero anche un ruolo centrale nella costituzione e nel mantenimento della struttura granulomatosa.

Utilizzare il RTX, che selettivamente blocca uno dei “motori” del processo autoimmunitario, in associazione con farmaci capaci di interferire con la funzione delle altre cellule che costituiscono il granuloma dovrebbe garantire quindi i migliori risultati nello spegnimento dell'infiammazione.

Esistono modelli murini che evidenziano la diversa efficacia del RTX nel determinare la deplezione dei linfociti B CD20+ periferici (di oltre il 99%) rispetto a quelli residenti negli organi linfoidei (deplezione del 40-70% con notevole variabilità inter-individuale): in questi modelli le cellule marginali linfoideali venivano eliminate radicalmente dopo che erano state mobilizzate con anticorpi anti-integrine $\alpha 1$ ed $\alpha 4$ (12, 24). Questo risultato è solo un esempio dei sinergismi terapeutici che si potrebbero ottenere con diverse terapie di associazione.

La maggior parte dei nostri pazienti trattati ad una recidiva presentava recidive granulomatose di GW e dopo trattamento con RTX tutti i pazienti ottenevano una remissione di malattia, remissione definita da un azzeramento dello score BVAS 2003 e da una stabilizzazione o risoluzione radiologica delle lesioni granulomatose. Il timing di remissione era difficile da definire con precisione in tutti i pazienti ma a 6 mesi nessun paziente presentava una malattia attiva. Ad un follow-up medio di 24,9 mesi (range 3-71) 9 pazienti presentavano una recidiva di malattia che rispondeva ad un nuovo trattamento con RTX, due presentavano una ulteriore recidiva nuovamente trattata con successo con RTX.

La definizione di remissione risulta abbastanza agevole per le manifestazioni vasculitiche, più complessa è invece la valutazione per le forme granulomatose che possono non presentare una risoluzione radiologica completa per esiti fibro-cicatriziali.

Infatti nella nostra casistica la valutazione radiologica delle lesioni granulomatose non ne ha evidenziato in tutti i casi una completa risoluzione dopo trattamento. In particolare i pazienti con ROG presentavano una riduzione (a volte lieve) delle lesioni visualizzate alla RMN a fronte di un miglioramento clinico molto evidente con azzeramento dello score BVAS 2003 (scomparsa della proptosi, della diplopia e del dolore). Così anche alcuni pazienti trattati per noduli polmonari mostravano un miglioramento radiologico iniziale modesto con ulteriore riduzione volumetrica o scomparsa completa dei noduli nei mesi successivi.

Il paziente con la porpora cutanea granulomatosa ed i tre pazienti con episclerite ottenevano invece una risoluzione completa delle lesioni granulomatose. Questa discrepanza fra punteggio del BVAS 2003 e valutazione radiologica esprime la difficoltà clinica nel definire lo stato di remissione di malattia. Remissione significa non attività di malattia e quindi il BVAS 2003, essendo uno score costruito per assegnare un punteggio solo alle manifestazioni di malattia attiva, sarebbe teoricamente lo strumento migliore per valutare la remissione. Il BVAS 2003 è stato ideato per essere compilato al letto del malato e solo pochi "item" richiedono una valutazione radiologica o specialistica: se questo da un lato è di estrema praticità nel follow-up

dei pazienti dall'altro ne costituisce il più evidente limite, soprattutto quando viene applicato a pazienti con forme prevalentemente granulomatose. Molte di queste lesioni vengono considerata attive dal BVAS 2003 quando sono di primo riscontro (ad esempio i noduli polmonari) o provocano manifestazioni cliniche (proptosi o diplopia secondari ad un granuloma retro-orbitario), successivamente (dopo tre mesi) le lesioni granulomatose “sub-cliniche” non vengono più valutate in quanto considerate arbitrariamente inattive. Questo tipo di valutazione è però assai grossolano e poco sensibile nel predire il rischio di recidiva e quindi anche nell'indicare il corretto atteggiamento clinico e terapeutico nei diversi pazienti.

Le lesioni che permangono solo “radiologicamente” evidenti potrebbero rappresentare tessuto sclerotico/cicatriziale o essere sede di tessuto infiammatorio ancora in fase attiva: nel primo caso il paziente andrebbe probabilmente definito in remissione completa, nella seconda situazione sarebbe forse più opportuno definirlo in remissione parziale ed andrebbe pertanto considerato a maggior rischio di recidiva. Giudicare un paziente a maggior rischio di recidiva o comunque non in remissione completa implica una modifica dell'atteggiamento clinico e terapeutico (con controlli più ravvicinati e maggior cautela nell'alleggerimento della terapia immunosoppressiva).

Una distinzione fra fibrosi ed infiammazione richiederebbe una valutazione istologica che spesso il clinico non ha a disposizione, perciò in questi pazienti la definizione di remissione completa o parziale dovrebbe essere un giudizio a posteriori, fatto cioè dopo un adeguato periodo di follow-up clinico e strumentale. I pazienti che permangono in remissione a lungo senza aumento dimensionale o con regressione delle lesioni granulomatose sono probabilmente quelli in remissione completa. E' difficile definire quale sia il periodo adeguato oltre il quale le lesioni possono essere considerate inattive.

In letteratura non vi è completo accordo nel definire la remissione ed il tempo oltre il quale il paziente può essere definito in remissione: la maggior parte degli autori si sono limitati a far coincidere il concetto di remissione con un punteggio BVAS di 0 (52-54, 59-62, 64).

Brihaye ha considerato come remissioni solamente parziali le situazioni di due pazienti che presentavano un BVAS di 0 ma senza una completa risoluzione radiologica dei noduli polmonari ritenendoli, secondo la sua esperienza, a maggior rischio di recidiva. Successivamente un paziente ha ottenuto una risoluzione radiologica completa a distanza di 15 mesi dal trattamento con RTX, l'altro ha evidenziato una netta riduzione dell'unico nodulo residuo a 24 mesi, suggerendo che la risposta radiologica delle forme granulomatose può richiedere anche parecchi mesi (58). Lo stesso autore ha considerato fallimenti i casi di due pazienti trattati per granulomi retro-orbitari senza risoluzione radiologica completa delle lesioni dopo RTX, pur avendo ottenuto un miglioramento clinico (scomparsa del dolore e riduzione della proptosi).

Una casistica in particolare (57) riporta dei risultati negativi in controtendenza rispetto al resto della letteratura ed evidenzia molte delle variabili che possono rendere difficile una valutazione dello stato di attività di malattia e dell'efficacia del trattamento. L'autore ha trattato con RTX otto pazienti con GW refrattari sia alla CYC che a farmaci bloccanti il TNF α che presentavano manifestazioni prevalentemente granulomatose (tutti avevano un interessamento delle alte vie respiratorie, cinque un granuloma retro-orbitario, due una stenosi subglottica ed uno dei noduli polmonari). Ad un mese dalla fine del ciclo solo 2/8 (25%) erano in remissione (BVAS=0) e 5/8 (63%) non avevano risposto. Questi risultati negativi si prestano a diverse possibili interpretazioni:

- l'autore aveva adottato uno schema diverso di somministrazione del RTX (una dose ogni 4 settimane anziché ogni settimana). La somministrazione mensile invece che settimanale del RTX può aver determinato un sotto-trattamento di alcuni pazienti che erano tutti veri refrattari sia alla CYC che a molti altri immunosoppressori utilizzati senza successo precedentemente.
- Quattro settimane di follow-up dall'ultima dose di RTX sono probabilmente un periodo troppo breve per poter valutare l'effetto del RTX verso le manifestazioni granulomatose che può richiedere anche mesi (58).

- Alcuni dei pazienti definiti refrattari al RTX hanno successivamente risposto a boli endovenosi di AZA suggerendo un possibile effetto sinergico del RTX nell'ottenimento della remissione.

E' anche ipotizzabile come sostiene lo stesso autore che alcune manifestazioni granulomatose ed in particolare i granulomi retro-orbitari, in virtù della loro struttura costitutiva (linfociti T, macrofagi, cellule giganti, neutrofili e follicoli linfoidei "protetti"), possano essere naturalmente resistenti al RTX. Da esperimenti su modelli murini ed in vitro (12, 24) è infatti evidente la differenza di sensibilità dei diversi pool di linfociti B nell'organismo: le diverse interazioni cellula-cellula e cellula matrice-extracellulare, influenzando la sensibilità dei linfociti B CD20+, potrebbero spiegare la resistenza al farmaco di alcune manifestazioni granulomatose. Complessivamente le principali casistiche riportate in letteratura evidenziano una risposta al RTX in circa il 64% dei granulomi retro-orbitari, ma variabili erano i criteri adottati per la definizione di remissione. In accordo con i nostri risultati una delle più recenti ed ampie casistiche ha riportato una remissione completa dopo RTX in tutti e 10 i pazienti che presentavano una recidiva granulomatosa a livello orbitario (65).

Nella nostra casistica 40 pazienti (40/44, 91%) presentavano una positività degli ANCA prima del trattamento ed in sedici successivamente si negativizzavano (16/40, 40%). Si osservava quindi una riduzione significativa del livello degli ANCA ($p < 0,01$) dopo RTX. Anche la maggior parte delle casistiche presenti in letteratura segnalano un calo uniforme degli ANCA dopo RTX coincidente con la riduzione del BVAS nella gran parte dei pazienti trattati (52, 53, 60, 85). Alcune casistiche comprendenti forme prevalentemente granulomatose non hanno evidenziato una risposta sierologica significativa (54, 57). Sono state inoltre segnalate recidive non precedute da un aumento degli ANCA (59, 64).

Le cellule produttrici degli ANCA potrebbero essere plasmacellule a breve emivita strettamente dipendenti dal pool CD20+ (in assenza di co-stimolazione T cellulare) e/o plasmacellule a lunga emivita prodotte dopo co-stimolazione T cellulare in grado di sintetizzare

anticorpi per mesi o anni senza dipendere dal ricambio fornito dal pool CD20+ (74-77). Le due possibilità non si autoescludono e potrebbero spiegare il differente comportamento degli ANCA dopo trattamento con RTX riscontrato nelle diverse casistiche.

Se gli ANCA fossero prodotti da plasmacellule a breve emivita ci si dovrebbe aspettare dopo RTX una deplezione degli ANCA con una velocità proporzionale all'emivita delle IgG (21 giorni), se fossero invece prodotti da plasmacellule a lunga emivita non si dovrebbe osservare una riduzione dei valori degli ANCA (così come non frequentemente si osserva una riduzione significativa dei livelli delle altre immunoglobuline).

Attualmente non vi è consenso generale nel considerare il livello degli ANCA isolato e la ricomparsa dei linfociti B CD20+ su sangue periferico criteri sufficienti per modificare la strategia terapeutica in assenza di un corrispettivo clinico o strumentale indicativo di recidiva: il significato del monitoraggio degli ANCA e dei linfociti B CD20+ dovrebbe probabilmente essere quello di un'informazione da integrare nel contesto clinico del singolo paziente.

Nella nostra casistica solo in una minoranza di pazienti veniva eseguita la tipizzazione linfocitaria su sangue periferico per monitorizzare i livelli di linfociti B CD20+ post RTX, ed in tutti i testati si osservava una completa deplezione dei linfociti B CD20+.

Il livello della PCR è significativamente ($p < 0,01$) e rapidamente calato in tutti i pazienti dopo RTX. Abbiamo osservato una concordanza fra andamento della PCR e del BVAS 2003. La PCR è un indice laboratoristico sensibile ma aspecifico e per questo di non facile interpretazione nel follow-up dei pazienti. L'atteggiamento terapeutico verso una recidiva di malattia è diametralmente opposto rispetto a quello verso un'infezione e la PCR da sola non consente una distinzione fra le due possibilità (che possono anche essere concomitanti).

E' importante poi considerare che non tutti i pazienti con forme granulomatose localizzate attive presentano un aumento degli indici infiammatori, come evidenziato nella nostra casistica da otto pazienti (8/51, 16%) con manifestazioni granulomatose che non presentavano un aumento della PCR in corso di recidiva.

Utilizzare farmaci immunosoppressori selettivi significa limitare l'entità degli effetti collaterali che sono uno dei maggiori limiti delle terapie attuali, in particolare della CYC.

La GW è una patologia recidivante che nel suo corso richiede ripetuti trattamenti con rischio di tossicità farmacologica cumulativa (2, 6, 7).

Nella nostra casistica tutti i pazienti trattati con RTX per recidiva avevano avuto recidive precedenti e molti erano stati esposti a dosi cumulative elevate di CYC. Cinque pazienti (5/51, 10%) erano anche risultati resistenti alla CYC. È evidente che la disponibilità di un farmaco alternativo alla CYC risulta particolarmente utile in questi pazienti refrattari al trattamento convenzionale e nei pazienti giovani a rischio di numerose recidive e quindi maggiormente esposti agli effetti collaterali a lungo termine della CYC (infertilità, rischio cancerogeno).

La complicanza più grave associata al RTX è lo sviluppo della leucoencefalopatia multifocale progressive (PML), riportata in pazienti con LES ed AR trattati con RTX (86) ed in pazienti con AAV trattati con CYC. Non sono riportati ad oggi casi di PML in pazienti con AAV trattati con il solo RTX.

Il rischio infettivo associato all'utilizzo del RTX anche per più cicli non sembra essere significativamente diverso da quello degli altri immunosoppressori comunemente utilizzati. Sia nel RAVE che nel RITUXVAS non si è rilevata una differenza significativa nelle complicanze infettive fra i due bracci (RTX vs CYC).

Nella nostra casistica solo 4 pazienti (4/51, 8%) hanno dovuto sospendere il ciclo di trattamento con RTX per complicanze infettive che si sono successivamente risolte. In letteratura sono segnalati pochi casi di gravi infezioni insorte post-RTX che spesso era stato associato ad altri farmaci citotossici nel trattamento di forme linfomatose (64).

“Late-onset” neutropenia è un effetto collaterale riportato in circa il 5% dei pazienti con malattie autoimmuni trattati con RTX. Spesso questo fenomeno si autolimita ma può favorire infezioni e richiedere il trattamento con GM-CSF. In un centro è stata segnalata una frequenza maggiore nei pazienti con GW, LES ed AR (86).

Nella nostra casistica abbiamo osservato un solo caso di “late-onset” neutropenia in una giovane donna con GW tre mesi dopo un ciclo di RTX per GNRP. La neutropenia si risolveva rapidamente dopo la somministrazione di GM-CSF senza complicanze infettive.

In conclusione nella nostra casistica il RTX si è dimostrato efficace e sicuro nel trattamento delle forme severe vasculitiche e granulomatosi di AAV sia all’esordio di malattia che in corso di recidiva. Le manifestazioni vasculitiche (microematuria, febbre, calo ponderale, artromialgie, porpora cutanea) si sono risolte tutte entro il primo mese; al contrario alcune manifestazioni granulomatosi hanno richiesto più tempo per migliorare, in particolare una parte dei pazienti con ROG, stenosi subglottica e noduli polmonari hanno richiesto fino a 6 mesi per ottenere una remissione completa. Il RTX si è dimostrato efficace anche nei 5 pazienti refrattari alla CYC.

Considerato l’elevato rischio di recidiva osservato nei pazienti con GW, probabilmente sarebbe opportuno proseguire una terapia immunosoppressiva di mantenimento post-RTX in questi pazienti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hamour S, Salama AD, Pusey CD. Management of ANCA-associated vasculitis: Current trends and future prospects. *Ther Clin Risk Manag.* 2010; 6: 253–64.
- 2) Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, et al. Wegener Granulomatosis: an analysis of 158 patient. *Ann Intern Med* 1992; 116: 488–498.
- 3) Bacon P. The Spectrum of Wegener's Granulomatosis and Disease Relapse. *N Engl J Med* 2005; 352: 330–332.
- 4) Walton E. Giant cell granuloma of the respiratory tract: Wegener's granulomatosis. *Br Med J* 1958; 2: 265–270.
- 5) Fauci A, Wolff S. Wegener's granulomatosis: studies in eighteen patients and a review of the literature. *Medicine* 1973; 52: 535–561.
- 6) Talar-Williams C, Hijazi YM, Walther MM, Linehan WM, Hallahan CW, Lubensky I, et al. Cyclophosphamide-induced cystitis and bladder cancer in patients with Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1996; 124: 477–484.
- 7) Booth A, Harper L, Hammad T, et al. Prospective study of TNFalpha blockade with infliximab in anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated systemic vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 717–721.
- 8) Jayne D, Rasmussen N, Andrassy K, Bacon P, Tervaert JW, Dadoniene J, et al, and the European Vasculitis Study Group. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N Engl J Med* 2003; 349: 36–44.
- 9) Sneller MC, Hoffman GS, Talar-Williams C, Kerr GS, Hallahan CW, Fauci AS. An analysis of forty-two Wegener's granulomatosis patients treated with methotrexate and prednisone. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 608–613.
- 10) Langford CA, Talar-Williams C, Barron KS, Sneller MC. Use of a cyclophosphamide-

- induction methotrexate-maintenance regimen for the treatment of Wegener's granulomatosis: extended follow-up and rate of relapse. *Am J Med* 2003; 114: 463–469.
- 11) de Groot K, Harper L, Jayne DR, Flores Suarez LF, Gregorini G, Gross WL, Luqmani R, Pusey CD, Rasmussen N, Sinico RA, Tesar V, Vanhille P, Westman K, Savage CO; EUVAS (European Vasculitis Study Group). Pulse versus daily oral cyclophosphamide for induction of remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2009; 150(10): 670–80.
 - 12) Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83: 435–445.
 - 13) Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980; 125: 1678–1685.
 - 14) O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics* 1998; 48: 125–132.
 - 15) Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J* 1988; 7: 711–717.
 - 16) Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994; 15: 450–454.
 - 17) Kanzaki M, Shibata H, Mogami H, Kojima I. Expression of calcium-permeable cation channel CD20 accelerates progression through the G1 phase in Balb/c 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 13099–13104.
 - 18) Golay JT, Clark EA, Beverley PC. The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. *J Immunol* 1985; 135: 3795–3801.
 - 19) Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA, Martin PJ, Zarling J, Kidd P, et al. Monoclonal

- antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood* 1987; 69: 584–591.
- 20) Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6: 443–446.
 - 21) Alas S, Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res* 2001; 61: 5137–5144.
 - 22) Deans JP, Schieven GL, Shu GL, Valentine MA, Gilliland LA, Aruffo A, et al. Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20: induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2. *J Immunol* 1993; 151: 4494–4504.
 - 23) Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dorken B, Mapara MY. Anti-CD20 and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res* 2000; 60: 7170–7176.
 - 24) Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L, Lin WY, Hu Z, et al. Importance of Cellular Microenvironment and Circulatory Dynamics in B Cell Immunotherapy. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 817–826.
 - 25) Looney RJ. B cells as a therapeutic target in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2005; 44 (Suppl 2): 13–17.
 - 26) Cheson BD, Leonard PJ. Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 613–626.
 - 27) Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1484–1492.
 - 28) Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with

- recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 1994; 84: 2457–2466.
- 29) Tobinai K, Kobahashi Y, Narabayashi M, et al. Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, Rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 1998; 9: 527–534.
 - 30) Vieira CA, Agarwal A, Book BK, et al. Rituximab for reduction of anti-HLA antibodies in patients awaiting renal transplantation: safety, pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Transplantation* 2004; 77: 542–548.
 - 31) Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G. B lymphocyte depletion therapy with rituximab in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30: 393–403.
 - 32) Ng CM, Bruno R, Combs D, Davies B. Population pharmacokinetics of rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in rheumatoid arthritis patients during a phase II clinical trial. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 792–801.
 - 33) Ghilmini M, Rufibach K, Salles G, et al. Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system. A study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Ann Oncol* 2005; 16: 1675–1682.
 - 34) Emery P, Filipowicz-Sosnowska A, Szczepanski L, et al. Primary analysis of a double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate (DANCER TRIAL). *Ann Rheum Dis* 2005; 64 (Suppl 3): 434.
 - 35) Pescovitz MD. Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action. *Am J Transplant* 2006; 6: 859–866.
 - 36) Voswinkel J, Mueller A, Kraemer JA, Lamprecht P, Herlyn K, Holl-Ulrich K, Feller AC, Pitann S, Gause A, Gross WL. B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 859–864.

- 37) Pendergraft WF, Preston GA, Shah RR, et al. Autoimmunity is triggered by cPR-3 (105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* 2004; 10: 72–79.
- 38) Gilligan HM, Bredy B, Brady HR, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming. *J Exp Med* 1996; 184: 2231–2241.
- 39) Yang JJ, Tuttle RH, Hogan SL, et al. Target antigens for antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) are on the surface of primed and apoptotic but not unstimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 165–172.
- 40) Patry YC, Trewick DC, Gregoire M, et al. Rats injected with syngenic rat apoptotic neutrophils develop antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1764–1768.
- 41) Rauova L, Gilburd B, Zurgil N, et al. Induction of biologically active antineutrophil cytoplasmic antibodies by immunization with human apoptotic polymorphonuclear leukocytes. *Clin Immunol* 2002; 103: 69–78.
- 42) Kallenberg CG. Pathogenesis of PR3-ANCA associated vasculitis. *J Autoimmun* 2008; 30: 29–36.
- 43) Lamprecht P, Gross WL, Kabelitz D. T Cell alterations and lymphoid neogenesis favoring autoimmunity in Wegener’s granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1725–1727.
- 44) Lamprecht P. Off balance: T-cells in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 201–210.
- 45) Voswinkel J, Müller A, Lamprecht P. Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener’s granulomatosis lesions? *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2005; 1051: 12–19.
- 46) Csernok E, Ai M, Gross WL, Wicklein D, Petersen A, Lindner B, et al. Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* 2006; 107: 4440–4448.

- 47) Lamprecht P, Gross WL. Current knowledge on cellular interactions in the WG-granuloma. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25 (Suppl): 49–51.
- 48) Jones RB, Tervaert JW, Hauser T, et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 2010; 363: 211–220.
- 49) Stone JH, Merkel PA, Spiera R, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2010; 363: 221–232.
- 50) Specks U, Stone JH, RAVE Research Group. Long-term efficacy and safety results of the RAVE trial [abstract]. *Clin Exp Immunol* 2011; 164 (Suppl 1): 65.
- 51) Mansfield N, Hamour S, Marie-Habib A, et al. Prolonged disease-free remission following rituximab and low-dose cyclophosphamide therapy for renal ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3280–3286.
- 52) Keogh KA, Wylam ME, Stone JH, Specks U. Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 262–268.
- 53) Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Carlson KA, Schroeder DR, Specks U. Rituximab for refractory Wegener’s granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 180–187.
- 54) Eriksson P. Nine patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis successfully treated with rituximab. *J Intern Med* 2005; 257: 540–548.
- 55) Gottenberg JE, Guillevin L, Lambotte O, Combe B, Allanore Y, Cantagrel A, et al. Tolerance and short term efficacy of rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 913–920.
- 56) Omdal R, Wildhagen K, Hansen T, Gunnarsson R, Kristoffersen G. Anti-CD20 therapy of treatment resistant Wegener’s granulomatosis: favourable but temporary response. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 229–232.
- 57) Aries PM, Hellmich B, Voswinkel J, Both M, Nolle B, Holl-Ulrich K, et al. Lack of

- efficacy of rituximab in Wegener's granulomatosis with refractory granulomatous manifestations. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 853–858.
- 58) Brihaye B, Aouba A, Pagnoux C. Adjunction of rituximab to steroids and immunosuppressant for refractory/relapsing Wegener's granulomatosis: a study on 8 patients. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 23–27.
- 59) Smith KG, Jones RB, Burns SM, et al. Long-Term Comparison of Rituximab Treatment for Refractory Systemic Lupus Erythematosus and Vasculitis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2970–2982.
- 60) Stasi R, Stipa E, Del Poeta G, et al. Long-term observation of patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis treated with rituximab. *Rheumatology* 2006; 45: 1432–1436.
- 61) Henes JC, Koch S, et al. Rituximab for treatment-resistant extensive Wegener's granulomatosis-additive effects of a maintenance treatment with leflunomide. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 1711–1715.
- 62) Sanchez-Cano D, Callejas Rubio JL, Ortego-Centeno N. Effect of rituximab on refractory Wegener's granulomatosis with predominant granulomatous disease. *J Clin Rheumatol* 2008; 14: 92–93.
- 63) Tamura N, Matsudaira R, Hirashima M, et al. Two cases of refractory Wegener's granulomatosis successfully treated with rituximab. *Intern Med* 2007; 46: 409–414.
- 64) Lovric S, Erdbruegger U, Kumpers P, et al. Rituximab as rescue therapy in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: single centre experience with 15 patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 1: 1–7.
- 65) Taylor SR, Salama AD, Joshi L, et al. Rituximab is effective in the treatment of refractory ophthalmic Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1540–1547.

- 66) Martinez Del Pero M, Chaudhry A, Jones RB, Sivasothy P, Jani P, Jayne D. B-cell depletion with rituximab for refractory head and neck Wegener's granulomatosis: a cohort study. *Clin Otolaryngol.* 2009; 34(4): 328–35.
- 67) Jones RB, Ferraro AJ, Chaudhry AN, et al. A multicenter survey of rituximab therapy for refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2156–2168.
- 68) Seo P, Specks U, Keogh KA. Efficacy of rituximab in limited Wegener's granulomatosis with refractory granulomatous manifestations. *J Rheumatol* 2008; 35: 2017–2023.
- 69) de Menthon M, Cohen P, Pagnoux C, Buchler M, Sibilia J, Détrée F, Gayraud M, Khellaf M, Penalba C, Legallicier B, Mouthon L, Guillevin L. Infliximab or rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: long-term follow up. A prospective randomised multicentre study on 17 patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2011; 29(1 Suppl 64): S63–71.
- 70) Rhee EP, Laliberte KA, Niles JL. Rituximab as maintenance therapy for antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1394–1400.
- 71) Roubaud-Baudron C, Pagnoux C, Méaux-Ruault N, Grasland A, Zoulim A, LE Guen J, Prud'homme A, Bienvenu B, et al.; French Vasculitis Study Group. Rituximab Maintenance Therapy for Granulomatosis with Polyangiitis and Microscopic Polyangiitis. *J Rheumatol.* 2012; 39(1): 125–30.
- 72) Roccatello D, Baldovino S, Alpa M, et al. Effects of anti-CD20 monoclonal antibody as a rescue treatment for ANCA-associated idiopathic systemic vasculitis with or without overt renal involvement. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26: S67–S71.
- 73) Ramos-Casals M, Garcia-Hernandez FJ, de Ramon E, et al. Off-label use of rituximab in 196 patients with severe, refractory systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 468–476.
- 74) Sneller MC. Rituximab and Wegener's granulomatosis: are B-cells a target in vasculitis

- treatment? *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1–5.
- 75) O'Connor BP, Gleeson MW, Noelle RJ, Erickson LD. The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease. *Immunol Rev* 2003; 194: 61–76.
- 76) Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, et al. Serologic changes following B-lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2146–2154.
- 77) Wong CF. Rituximab in refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: what is the current evidence? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 32–36.
- 78) Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon BA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffmann GS, Hunder GG, Kallenberg CGM, et al. Nomenclature of systemic vasculitides: the proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 187–192.
- 79) Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabrese LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RWJ, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1101–1107.
- 80) Merkel PA, Seo P, Aries P, Neogi T, Villa-Forte A, et al. Current status of outcome measures in vasculitis: focus on Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. Report from OMERACT 7. *J Rheumatol* 2005; 32: 2488–2495.
- 81) Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994; 87: 671–678.
- 82) Flossmann O, Bacon PA, De Groot K, et al. Development of comprehensive disease assessment in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 283–292.
- 83) Stone JH, Hoffman GS, Merkel PA, Min YI, Uhlfelder ML, Hellmann DB, Specks U, Allen NB, Davis JC, Spiera RF, et al. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides (INSSYS). A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 912–920.

- 84) Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 2006; 368: 404–418.
- 85) Cartin-Ceba R, Golbin J, Keogh KA, et al. Rituximab for remission induction and maintenance in ANCA-associated vasculitis: a single center ten-year experience in 108 patients. *Arthritis Rheum* 2010; 62: S283.
- 86) Carson KR, Evens AM, Richey EA, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood* 2009; 113: 4834–4840.
- 87) Tesfa D, Ajeganova S, Hagglund H, et al. Late-onset neutropenia following rituximab therapy in rheumatic diseases: association with B lymphocyte depletion and infections. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2209–2214.