

Estudo das alterações imunofenotípicas de populações linfocitárias em doentes com artrite reumatóide

S Leite¹, C Reis², C Magalhães², M Cardoso², M Sousa^{1,3} & T Guimarães^{2,4}

¹Área Científica de Análises Clínicas e Saúde Pública, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Vila Nova de Gaia, PORTUGAL

² Departamento de Patologia Clínica, Hospital de São João, EPE, Porto, PORTUGAL

³ Centro de Investigação de Saúde e Ambiente, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Vila Nova de Gaia, PORTUGAL

⁴Serviço de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, PORTUGAL

sara_leite15@hotmail.com

¹ www.estsp.ipp.pt ² www.hsjoao.min-saude.pt

RESUMO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença auto-imune que devido às suas características tornam por si só os indivíduos afectados susceptíveis a infecções; imunocomprometimento que por vezes ainda é agravado por terapêuticas imunomodulatórias usadas para o seu tratamento.

Este estudo tem como objectivo analisar, as populações/sub-populações de linfócitos conjuntamente com a análise das imunoglobulinas G e M, apresentando como factores discriminatórios, a idade, o sexo e a presença de terapêutica imunomodulatória, nos doentes com AR.

Os resultados sugerem uma depleção significativa dos linfócitos B e um aumento dos T, os quais dão indícios para um aumento da susceptibilidade a infecções.

Palavras-Chave: Artrite Reumatóide, terapêuticas imunomodulatórias, linfócitos, imunoglobulinas

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that due to their characteristics make itself affected individuals susceptible to infections, immunosuppression which sometimes is still aggravated by immunomodulatory therapies used to treat it.

This study has as objective analyze the populations/sub-populations of lymphocytes together with the analysis of immunoglobulins G and M, presenting as discriminatory factors age, sex and the presence of immunomodulatory therapy in patients with RA.

The results suggest a significant depletion of B cells and an increase in T, which give clues to an increased susceptibility to infections.

Keywords: Rheumatoid arthritis, immunomodulatory therapies, lymphocytes, immunoglobulins.

1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatóide (AR), é uma doença inflamatória crónica progressiva, que se caracteriza principalmente por poliartrite periférica simétrica e que afecta cerca de 1% da população mundial. Pode surgir em qualquer idade, contudo, a faixa etária dos 40-50 anos é a mais atingida com uma incidência três vezes superior nas mulheres (Queiroz 2002; Silman, & Pearson, 2002; Worthington & John, 2006). Apesar da sua etiologia ainda ser desconhecida, estes indivíduos apresentam elevados níveis de auto-anticorpos, sendo assim considerada uma doença auto-imune sistémica (Edwards *et al* 2004; Queiroz 2002). Acomete em geral as estruturas articulares e periarticulares, causando a sua destruição e deformidade, podendo, no entanto afectar o tecido conjuntivo de qualquer parte do organismo (György *et al* 2008; Queiroz 2002; Song & Kang 2010). É uma patologia com elevada comorbilidade e mortalidade que, quando não tratada precocemente, acarreta graves consequências para os doentes, entre as quais se destaca a incapacidade funcional (Edwards *et al* 2004; Silman and Pearson 2002; Worthington and John, 2006).

O sistema imunitário, compreende todos os mecanismos pelos quais um organismo multicelular se defende dos agentes agressores (Song & Kang 2010). Estes mecanismos, subdividem-se em não específicos/inatos e específicos/adaptativos (Paul 2003). Dos inespecíficos, fazem parte a pele e barreiras mucosas, as células *natural killer* (NK), as polimorfonucleares e mononucleadas e o sistema complemento. Por outro lado, o sistema imunitário específico/adaptativo, é constituído pelos linfócitos T, B e imunoglobulinas (Ig's) (Lerner 2003; Paul 2003; Pinchuk 2002; Song & Kang 2010).

Os **linfócitos T**, são os principais efectores da imunidade mediada por células, desenvolvendo-se ao nível do timo, a partir de precursores indiferenciados da medula óssea (Queiroz 2002). Existem diferentes sub-grupos de linfócitos T, dos quais fazem parte os T auxiliares (*helper*) e os T citotóxicos (Lerner 2003; Paul 2003). O papel modulador destas células na imunidade celular efectua-se, essencialmente, através da libertação de citoquinas e de citotoxinas, respectivamente (Pinchuk 2002). As citoquinas induzem a quimiotaxia de neutrófilos, a activação de macrófagos e complemento, a proliferação de linfócitos B e, conseqüentemente, a secreção de anticorpos. As citotoxinas, por outro lado, são responsáveis pela destruição de células víricas e células tumorais (Pinchuk 2002; Queiroz 2002).

Os **linfócitos B**, são produzidos na medula óssea, desempenhando as suas funções ao nível da imunidade humoral, através da apresentação de antígenos às células T e da produção de anticorpos/imunoglobulinas, quando activados e diferenciados em plasmócitos. Existem diferentes classes de imunoglobulinas, consoante o tipo de cadeia pesada que as constitui, localização funcional, propriedades biológicas e estruturais. São, em geral, responsáveis pela opsonização de antígenos, neutralização de toxinas e destruição celular auxiliada pelo sistema complemento. Duas das principais Ig's no soro são a G e M (Lerner 2003; Paul 2003).

As **células NK**, desenvolvem-se a partir do progenitor linfóide que dá origem também aos linfócitos B e T. Actua da mesma forma que os linfócitos T citotóxicos, através de grânulos citoplasmáticos, que promovem a apoptose de células tumorais e células infectadas por vírus (Lerner 2003; Queiroz 2002).

Estas diferentes células constituintes do sistema imunitário, durante o seu desenvolvimento sofrem diferentes processos de maturação dando origem a células bem diferenciadas contendo à sua superfície ou intracelularmente moléculas que as caracterizam, designadas na sua maioria de *Cluster Differentiation* (CD). Para além desta diferenciação, as células passam por mecanismos de indução de tolerância, de forma a eliminar células potencialmente auto-reactivas. No entanto, por vezes, ocorrem falhas nestes mecanismos, dando origem a **doenças auto-imunes** (Paul 2003; Pinchuk 2002).

Assim, a AR caracteriza-se por distúrbios ao nível da imunidade humoral e celular. Dado o importante papel desempenhado por cada uma das células do sistema imunitário e a sua complexa interligação, qualquer tipo de desordem pode aumentar a susceptibilidade destes indivíduos a infecções. Segundo *Bingham et al* (2010), este estado imunodeprimido, pode ainda ser agravado por terapêuticas imunomodulatórias usadas para o tratamento da patologia, dada a sua acção ao nível das populações linfocitárias e por vezes também nas Ig's. A acrescentar a isto é também de salientar o processo de imunosenescência, ou seja, envelhecimento imunológico, com início, segundo a literatura, após os 60 anos de idade e com influência também nos componentes do sistema imunitário (Silva and Palmer 2009).

Este estudo tem como objectivo analisar imunofenotipicamente, as populações e sub-populações de linfócitos conjuntamente com a análise das imunoglobulinas G e M, apresentando como factores discriminatórios, a idade, o sexo e a presença de terapêutica imunomodulatória, nos doentes com diagnóstico de AR do serviço de Imunologia do Hospital de S. João, no ano de 2009.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipo de Estudo

Observacional, descritivo, transversal.

2.2 População/Amostra

A população alvo são os registos dos dados laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de AR, efectuados no serviço de Imunologia do Hospital de S. João. A amostra, seleccionada por amostragem de conveniência, foi constituída por todos os dados cujos registos pertenciam ao período de tempo entre Agosto e Dezembro de 2009. Foram excluídos da amostra os dados dos pacientes que possuíam outras patologias registadas que poderiam interferir com as variáveis em estudo.

2.3 Procedimento

Os dados referentes às variáveis primárias (*linfócitos CD45⁺ em células/mm³, %linfócitos CD19⁺, %linfócitos CD3⁺, %linfócitos CD4⁺, %linfócitos CD8⁺, %linfócitos CD16⁺ e CD56⁺, IgG e IgM em mg/dL, sexo, idade e terapêutica imunomodulatória*), necessários para a realização deste estudo, foram obtidos por recolha de registos através de uma exportação da base de dados do laboratório de Imunologia do Hospital de S. João utilizando o programa *Clinidata XXI*.

2.4 Estatística

O tratamento/análise dos dados, foi efectuado através de estatística descritiva uni/bivariada, com recurso ao software *Microsoft Office Excel[®] 2007* e *Statistical Package for Social Sciences[®] (SPSS), versão 17.0*.

De modo a poder estudar a influência da idade no processo de imunosenescência foram definidos 2 grupos etários semelhantes aos estabelecidos em alguns estudos (Silva and Palmer 2009): um com os indivíduos entre 28 e 60 anos (grupo 1) e o outro com os indivíduos entre os 61 e 77 anos (grupo 2), onde a imunosenescência é mais provável.

3. RESULTADOS

Fizeram parte deste estudo 51 doentes, 48 (94,1%) do sexo feminino e 3 (5,9%) do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 28 e os 77 anos, inclusive. Do grupo etário 1 fizeram parte 32 indivíduos correspondendo a 62,7% da amostra, enquanto que o grupo etário 2 foi constituído por 19 indivíduos correspondendo a 37,3% da amostra. Todos os indivíduos em estudo encontravam-se, no momento de análise das amostras de sangue periférico, sob o efeito de terapêutica imunomodulatória para a AR.

Os resultados, apresentados através das medidas amostrais média, desvio-padrão, mínimo e máximo, para cada população/sub-população de linfócitos e imunoglobulinas G e M são discriminados a seguir. Para tal utilizam-se tabelas e gráficos de barras com a representação do respectivo intervalo de valores normais/referência de modo a facilitar a sua visualização e posterior análise crítica. Por outro lado, as frequências de indivíduos com valores baixos, normais e elevados nas diferentes populações/sub-populações de linfócitos e imunoglobulinas G e M para cada grupo etário são apresentadas sob a forma de gráficos circulares.

3.1 Linfócitos Totais

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão dos linfócitos totais, representados através da variável n° *linfócitos CD45⁺*, foi de $1494,25 \pm 863,65$ células/mm³, enquanto que no grupo etário 2, foi de $1159,89 \pm 802,53$ células/mm³, o que corresponde a uma diferença de 22,38% (Tabela 1 e Gráfico 1).

A frequência de indivíduos com linfócitos totais baixos, normais e elevados, no grupo 1 foi de 28,1%, 62,5% e 9,4%, respectivamente. No grupo 2 foi de 68,4%, 26,3% e 5,3%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

Tabela 1. Estatística descritiva para as populações e sub-populações linfocitárias e imunoglobulinas G e M de acordo com os grupos etários.

Grupo etário	Média		Desvio-padrão		Mínimo		Máximo	
	1	2	1	2	1	2	1	2
n°	1494,25	1159,89	863,65	802,53	337	241	4279	3343
linfócitosCD45 ⁺ (células/mm ³)								
%linfócitosCD19 ⁺	1,26	4,13	2,63	8,04	0	0	8,87	30,92
%linfócitosCD3 ⁺	87,11	78,84	5,99	8,75	70,08	56,84	95,54	91,41
%linfócitosCD4 ⁺	62,37	56,12	9,45	11,54	27,38	32,48	77,65	76,23
%linfócitosCD8 ⁺	23,89	22,69	8,66	9,56	13,28	12,93	57,91	45,37
%linfócitosCD16 ⁺ eCD56 ⁺	11,30	16,62	6,22	7,84	4,23	5,48	29,34	39,48
IgG (mg/dL)	1246,19	982,89	394,21	163,30	694	730	1940	1270
IgM (mg/dL)	137,51	118,72	59,46	70,55	45,3	33,1	265	232

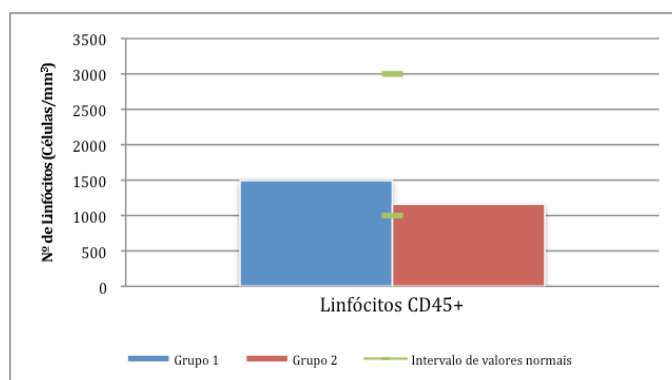


Gráfico 1. Média do n° de linfócitos CD45⁺ no grupo etário 1 e 2, juntamente com a representação gráfica do intervalo de valores normais (CD45⁺: 1000-3000 células/mm³)

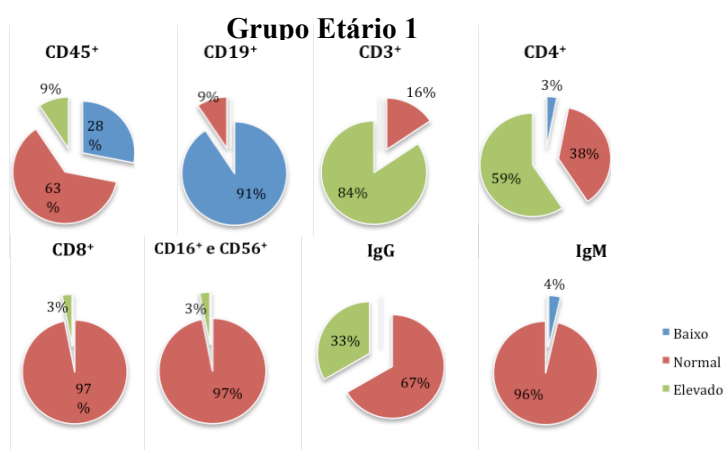


Gráfico 2. Frequência de indivíduos do grupo etário 1, com valores baixos, normais e elevados nas diferentes populações e sub-populações de células e imunoglobulinas G e M.

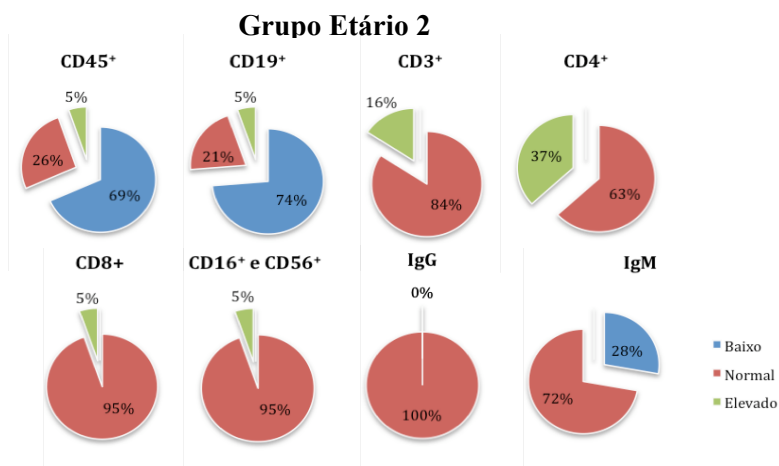


Gráfico 3. Frequência de indivíduos do grupo etário 2, com valores baixos, normais e elevados nas diferentes populações e sub-populações de células e imunoglobulinas G e M.

3.2 Linfócitos B

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão dos linfócitos B, representados através da variável %linfócitos $CD19^+$, foi de $1,26 \pm 2,63\%$, enquanto que a do grupo etário 2, foi de $4,13 \pm 8,04\%$, o que corresponde a uma diferença de 2,87% e a uma depleção de cerca de 95,3% dos linfócitos B no grupo 1 e 84,7% no grupo 2 (Tabela 1 e Gráfico 4).

A frequência de indivíduos com linfócitos B baixos, normais e elevados, no grupo 1 foi de 90,6%, 9,3% e 0%, respectivamente. No grupo 2 foi de 73,7%, 21% e 5,3%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

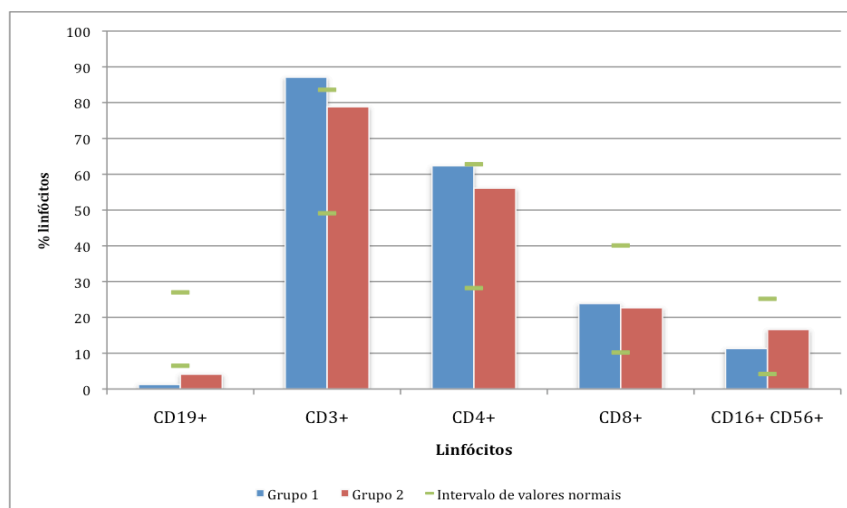


Gráfico 4. Média das populações e sub-populações de linfócitos no grupo etário 1 e 2, juntamente com a representação gráfica do intervalo de valores normais ($CD19^+$: 6,5-27,0%; $CD3^+$: 49,1-83,6%; $CD4^+$: 28,2-62,8%; $CD8^+$: 10,2-40,1%; $CD16^+$ e $CD56^+$: 4,2-25,2%;).

3.3 Linfócitos T

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão dos linfócitos T, representados através da variável %linfócitos $CD3^+$, foi de $87,11 \pm 5,99\%$, enquanto que a do grupo etário 2, foi de $78,84 \pm 8,75\%$, o que corresponde a uma diferença de 8,27% (Tabela 1 e Gráfico 4).

A frequência de indivíduos com linfócitos T baixos, normais e elevados, no grupo 1 foi de 0%, 15,6% e 84,4%, respectivamente. No grupo 2 foi de 0%, 84,2% e 15,8%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

3.4 Linfócitos T helper

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão dos linfócitos T helper, representados através da variável %linfócitos $CD4^+$, foi de $62,37 \pm 9,45\%$, enquanto que a do grupo etário 2, foi de $56,12 \pm 11,54\%$, o que corresponde a uma diferença de 6,25% (Tabela 1 e Gráfico 4).

A frequência de indivíduos com linfócitos T helper baixos, normais e elevados, no grupo 1 foi de 3,1%, 37,5% e 59,4%, respectivamente. No grupo 2 foi de 0%, 63,2% e 36,8%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

3.5 Linfócitos T citotóxicos

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão dos linfócitos T citotóxicos, representados através da variável %linfócitos $CD8^+$, foi de $23,89 \pm 8,66\%$, enquanto que a do grupo etário 2, foi de $22,69 \pm 9,56\%$, o que corresponde a uma diferença de 1,2% (Tabela 1 e Gráfico 4).

A frequência de indivíduos com linfócitos T citotóxicos baixos, normais e elevados, no grupo 1 foi de 0%, 96,9% e 3,1%, respectivamente. No grupo 2 foi de 0%, 94,7% e 5,3%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

3.6 Linfócitos NK

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão dos linfócitos NK, representados através da variável %linfócitos $CD16^+$ e $CD56^+$, foi de $11,30 \pm 6,22\%$, enquanto que a do grupo etário 2, foi de $16,62 \pm 7,84\%$, o que corresponde a uma diferença de 5,32% (Tabela 1 e Gráfico 4).

A frequência de indivíduos com linfócitos NK baixos, normais e elevados, no grupo 1 foi de 0%, 96,9% e 3,1%, respectivamente. No grupo 2 foi de 0%, 94,7% e 5,3%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

3.7 IgG

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão das imunoglobulinas G, representados através da variável IgG, foi de $1246,19 \pm 394,21$ mg/dL, enquanto que a do grupo etário 2, foi de $982,89 \pm 163,30$ mg/dL, o que corresponde a uma diferença de 21,13% (Tabela 1 e Gráfico 5).

A frequência de indivíduos com IgG baixas, normais e elevadas, no grupo 1 foi de 0%, 66,7% e 33,3%, respectivamente. No grupo 2 foi de 0%, 100% e 0%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

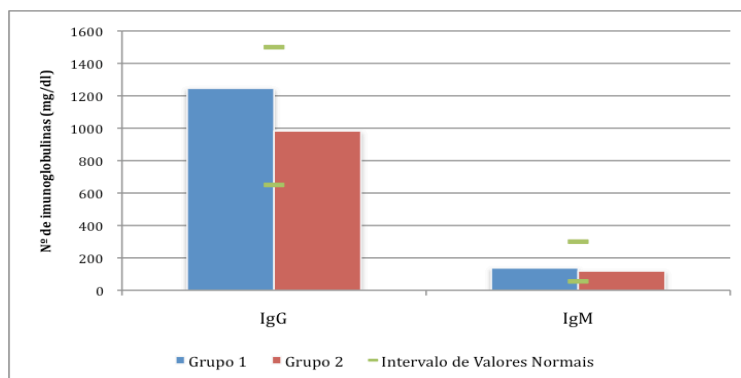


Gráfico 5. Média do nº de imunoglobulinas G e M no grupo etário 1 e 2, juntamente com a representação gráfica do intervalo de valores normais (IgG: 650-1500mg/dL; IgM: 55-300mg/dL).

3.8 IgM

No grupo etário 1, a média \pm desvio-padrão das imunoglobulinas M, representados através da variável *IgM*, foi de $137,51 \pm 59,46$ mg/dL, enquanto que a do grupo etário 2, foi de $118,72 \pm 70,55$ mg/dL, o que corresponde a uma diferença de 13,67% (Tabela 1 e Gráfico 5).

A frequência de indivíduos com IgM baixas, normais e elevadas, no grupo 1 foi de 3,7%, 96,3% e 0%, respectivamente. No grupo 2 foi de 27,8%, 72,2% e 0%, respectivamente (Gráfico 2 e 3).

4. DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

Como referido na literatura (Clair 2010; Keyston 2005; Nakou *et al* 2009; Quartuccio *et al* 2009) também neste estudo se observou uma depleção significativa no número de linfócitos B, devido ao facto de todos os indivíduos estarem sob o efeito de terapêutica imunomodulatória, para a patologia em questão. Destas terapêuticas, é de se destacar principalmente o *Rituximab*, cuja substância activa consiste num anticorpo monoclonal, dirigido contra o marcador celular CD20, encontrado à superfície de todos os linfócitos B (Pitashny and Shoenfeld 2005; Toussirot *et al* 2010). Dada a produção de imunoglobulinas ser feita por uma sub-população de linfócitos B, os plasmócitos, seria de esperar também uma diminuição no valor de imunoglobulinas. Valores de IgM, abaixo dos normais foram observados em cerca de 3,7% dos indivíduos do grupo 1 e 27,8% do grupo 2. Ao contrário destes, não foram encontrados valores baixos de IgG, mas sim elevados em cerca de 33,3% dos indivíduos do grupo 1. Resultado que pode ser explicado pelo anticorpo monoclonal do *Rituximab* pertencer à classe IgG (Pitashny and Shoenfeld 2005; Toussirot *et al* 2010).

No que se refere à população de linfócitos T, verifica-se que em cerca de 84,4% dos indivíduos do grupo 1 e 15,8% do grupo 2, eles encontram-se elevados, associado principalmente à sub-população de linfócitos T *helper*. Face ao papel preponderante destas células na patogénese da AR e das doenças auto-imunes em geral, este resultado vai de encontro ao que era esperado. Dado o papel desempenhado pelos linfócitos B como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T, é também de se esperar uma diminuição da estimulação destas células, constituindo este um efeito indirecto da depleção dos linfócitos B.

Relativamente à divisão por 2 grupos etários, constata-se que o grupo etário 2 apresenta uma média de valores sempre abaixo do grupo etário 1 (excepto nas populações de células B e NK), devido ao processo de imunosenescência aí decorrente, ou seja, envelhecimento imunológico. Segundo Ewers *et al* (2008), sugere-se que a principal população de células afectadas sejam os linfócitos T devido ao mecanismo de regressão orgânica do timo com o avançar da idade (Caruso *et al* 2009; Silva and Palmer 2009). Apesar de alguns autores também referirem a ocorrência de uma diminuição no número de linfócitos B com a idade, no presente estudo isso não foi comprovado (Caruso *et al* 2009). Este acontecimento pode dever-se à eficácia terapêutica ser afectada pela idade, ou seja, menor eficácia terapêutica no grupo etário 2 (Mangoni and Jackson 2003).

No que se refere às células NK, neste estudo verificou-se um aumento no grupo 2 em relação ao grupo 1. A literatura é incoerente quanto ao número de células desta população no processo de imunosenescência. Enquanto certos estudos defendem uma diminuição outros defendem um aumento ou até uma manutenção, no número destas células (Caruso *et al* 2009; Silva and Palmer 2009).

A análise das populações/sub-populações linfocitárias e imunoglobulinas utilizando o sexo como factor discriminatório não foi possível de efectuar, dado o reduzido número de indivíduos do sexo masculino na amostra. Para tal ser feito seria necessário um aumento da dimensão amostral, de modo a contemplar um maior número de indivíduos do sexo masculino. É de referir, no entanto, que a literatura aponta para um maior grau de severidade da patologia no sexo feminino quando comparado com o sexo masculino (Fairweather and Rose 2004; Sokka *et al* 2009; Whitacre 2001).

Através da análise de toda esta informação é assim possível concluir que nos doentes com AR existem alterações de elevada relevância clínica ao nível da imunidade celular e principalmente na imunidade humoral, devido a diferentes mecanismos como patogénese da patologia, terapêuticas imunomodulatórias e imunosenescência. Estas alterações tanto quantitativas, no que se refere ao número de células, como qualitativas, no que toca à interacção entre as diferentes populações de células, dão indícios para um aumento da susceptibilidade destes indivíduos no desenvolvimento de infecções. Segundo Cooper and Arnold (2010) eles encontram-se particularmente susceptíveis à reactivação dos vírus da hepatite B e JCV presente sob a forma latente em cerca de 80% da população adulta e responsável pela leucoencefalopatia multifocal progressiva. Assim tendo em conta os resultados obtidos neste e noutros estudos, de acordo com os dados laboratoriais de cada paciente o clínico poderá optar por implementar medidas de modo a diminuir este risco

elevado de infecções/reactivações, ou até medidas que auxiliem o sistema imunitário imunodeprimido a debelar uma infecção já instalada. Destas medidas é de se destacar a profilaxia anti-retroviral, a monitorização regular para detecção de uma possível reactivação e/ou infecção e administração de IGIV (Imunoglobulina Intravenosa) no caso de pacientes com infecção sintomática e concomitante hipogamaglobulinemia (Cooper and Arnold 2010).

A informação recolhida abre assim caminho para a realização de novos estudos, que contemplem um maior número de classes de imunoglobulinas e células imunes (ex. leucócitos polimorfonucleares, células dendríticas...), de diferentes localizações orgânicas (ex. medula óssea, gânglios linfáticos), conjuntamente com a recolha de informação à cerca do desenvolvimento de patologias infecciosas e evolução da patologia, constituindo estas as limitações do presente estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bingham, C. *et al* (2010). Immunization Responses in Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Rituximab. *American College of Rheumatology*, 62(1), 64-74.
- Caruso, C. *et al* (2009). Mechanisms of immunosenescence. *Immunity & Ageing*, 6 (10), 1-4.
- Clair, W. (2010). Good and Bad Memories Following Rituximab Therapy. *American College of Rheumatology*, 62(1), pp 1-5.
- Cooper, N. & Arnold, D. (2010). The effect of rituximab on humoral and cell mediated immunity and infection in the treatment of autoimmune diseases. *British Journal of Haematology*, 149, 3-13
- Edwards, J., *et al* (2004). Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 350, 2572-81.
- Ewers, I. Rizzo, L. V. & Filho, K. J. (2008). Aging and immunology. *Einstein*, 6 (1), S13-S20.
- Fairweather, D. & Rose, N. (2004). Women and Autoimmune Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (11), 2005-11.
- György B *et al* (2008). Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 10 (5), 1-12.
- Keyston, E. C. (2005). B cells in rheumatoid arthritis: from hypothesis to the clinic. *Rheumatology*, 44(2), ii8-ii12.
- Lerner, K. (2003). *World of Microbiology and Immunology: Vol I*. USA: Thomson Gale.
- Mangoni, A. & Jackson, D. (2003). Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57 (1), 6-14.
- Nakou, M. *et al* (2009). Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory cells correlates with clinical response. *Arthritis Research & Therapy*, 11, 1-8.
- Paul, W (2003). *Fundamental Immunology*. Fifth Edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Pinchuk, G. (2002). *Theory and Problems of Immunology*. USA: McGraw-Hill.
- Pitashny, M. & Shoenfeld, Y. (2005). B cell depletion in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity Reviews*, 4, 436-441.
- Quartuccio *et al* (2009). Long-Term Effects of Rituximab in Rheumatoid Arthritis. *Contemporary Challenges in Autoimmunity: Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1173, 692-700.
- Queiroz, M. (2002). *Reumatologia - Fundamentos da Reumatologia: Vol I*. Lisboa, Portugal: Lidel.
- Silman, A., & Pearson, J. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*, 4(3), S265-S272.
- Silva, A. & Palmer D. (2009). Is thymocyte development functional in the aged? *AGING*, 1 (2), 146 -153.
- Sokka, T. *et al* (2009). Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA Study. *Arthritis Research & Therapy*, 11 (1), 1-12
- Song, Y. W., & Kang, E. H (2010). Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *Q J Med*, 103, 139-146.
- Toussirot, E. *et al* (2010). Safety of rituximab in rheumatoid arthritis patients with a history of severe or recurrent bacterial infection: Observational study of 30 cases in everyday practice. *Joint Bone Spine*.
- Whitacre, C. C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunol*, 2, 777-80.
- Worthington, J. Barton, A. & John, S. L. (2006). The epidemiology of rheumatoid arthritis and the use of linkage and association studies to identify disease genes. *The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases*.