JOSÉ MANUEL BAPTISTA CABEDA

O RECEPTOR DA CÉLULA T NA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

PORTO
1995

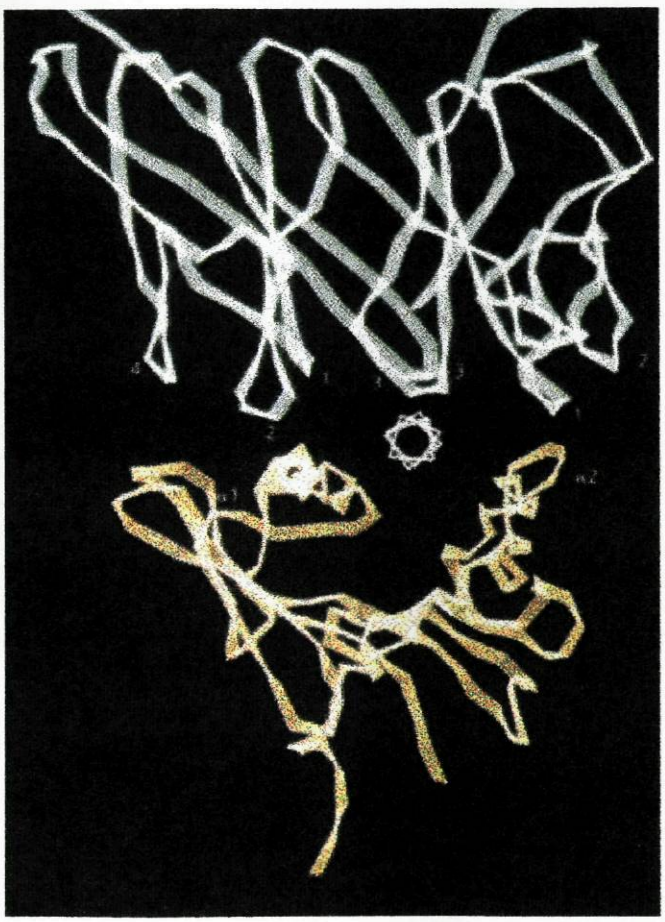
D

JOSÉ MANUEL BAPTISTA CABEDA

O RECEPTOR DA CÉLULA T

NA

HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA



PORTO

1995

José Manuel Baptista Cabeda

O RECEPTOR DA CÉLULA T

NA

HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE IMUNOLOGIA, APRESENTADA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

ORIENTADOR: Prof. Doutora Maria de Sousa

CO-ORIENTADOR: Prof. Doutora Maria João Saraiva

PORTO, 1995

Nesta tese são incluídos os seguintes trabalhos, nos quais e em obediência ao nº 2 do artigo 8º do decreto-lei nº 388/70 fui responsável pela ordenação e execução dos trabalhos, pela interpretação, discussão e redacção dos resultados apresentados.

Cabeda JMB., da Silva BM, Barbosa IL, Porto G. & de Sousa M Anomalies of the TCR repertoire in Idiopathic Hemochromatosis: an MHC class I linked genetic disease of iron overload. Arquivos de Medicina 7 ,1994 (Abstract)

Cabeda JMB., Porto G., Lacerda R., Jeddi-Tehrani M., Martins-da-Silva B., Gigliotti D., Hultcrantz R., Andersson R., Wigzell H., & de Sousa M. Anomalies of the CD8 population in Genetic Hemochromatosis: characterization of the T-cell-Receptor repertoire. FASEB J. 9(3):A527, 1995 (Abstract)

Cabeda JMB O Receptor da Célula T: da Biologia Molecular à aplicação clínica. Arquivos de Medicina. 1995 (in Press) (Art. Revisão)

Porto G., Arosa F., **Cabeda JM**, Lacerda R. and de Sousa M. Review of $CD8^+$ T lymphocyte anomalies in GH: correlation with the clinical expression. Clin. Lab. Haem., 17 (Abstract) (in press)

Cabeda JMB., Porto G., Lacerda R., Martins-da-Silva B., Gigliotti D., Andersson R., Wigzell H. & de Sousa M. HLA-A3 dependent homeostasis of $V\beta6.7^+CD8^+$ peripheral blood lymphocytes of normal individuals. (submetido para publicação)

Cabeda JMB., Porto G., Lacerda R., Jeddi-Tehrani M., Martins-da-Silva B., Gigliotti D., Hultcrantz R., Andersson R., Wigzell H. & de Sousa M. The T-cell repertoire in Hemochromatosis: an additional immunological abnormality linked to clinical expression of the disease. (submetido para publicação)

Cabeda JMB, Porto G., Lacerda R., Gigliotti D., Hultcrantz R., Andersson R., Wigzell H., de Sousa M. Relative proportions of CD4 and CD8 T-lymphocytes help explain the iron stores heterogeneity of Swedish hemochromatosis patients. (submetido para publicação)

Cabeda JMB, Porto G., Lacerda R., Martins da Silva B., Gigliotti D., Hultcrantz R., Andersson R. A, Posnett DN., Wigzell H., de Sousa M. TCR-Vß6.7 genotypes in hemochromatosis patients (submetido para publicação).

Aos meus Pais

À Esmeralda e José Eduardo

"Pela beleza e grandeza das criaturas pode-se, por analogia chegar ao conhecimento do seu autor."
(Sab 13,5).

AGRADECIMENTOS

Uma carreira cientifica só se faz de experiência. E quem não a tem, de alguém a tem que aprender. Por isso, não posso deixar de transmitir um profundo obrigado aos que com o seu apoio feito de exemplo, exigência, profissionalismo e amizade, tornaram possível levar a bom termo o trabalho aqui apresentado: à Prof. Doutora Maria de Sousa pela orientação directa dos trabalhos desta dissertação e à Prof. Doutora Maria João Saraiva pela generosidade com que aceitou ser co-orientadora desta tese.

Gostaria ainda de agradecer a todos os que no Mestrado de Imunologia, com generosidade me foram treinando a capacidade de pensar, planear, testar e analisar. Uma palavra especial para a Doutora Graça Porto pelo acompanhamento na fase de planeamento de experiências e análise dos resultados. Em segundo lugar não posso deixar de mencionar o Doutor António Silva, pelo apoio que permitiu fundar os alicerces da futura construção. À D. Rosa Lacerda, o meu obrigado pelo sempre presente e eficiente apoio no laboratório. Finalmente à Doutora Berta Martins e à D. Helena Branco o meu agradecimento pelo trabalho de tipagem HLA.

À Prof. Doutora Maria de Sousa quero ainda expressar o meu agradecimento pelas oportunidades que me proporcionou de trabalhar com alguns dos melhores grupos científicos na área do repertório da célula T. Aos directores desses grupos Doutores David Posnett, Hans Wigzell e Rolf Hultcrantz, o meu agradecimento, por me terem aceite nos seus laboratórios, ensinando-me técnicas e métodos de trabalho sem os quais esta tese seria certamente diferente. Uma palavra especial ainda para a Doutora Dude Gigliotti e o Dr. Rolland Andersson, que de muito perto me apoiaram no meu trabalho em Estocolmo.

Gostaria ainda de agradecer a todos os que colaboraram na elaboração do texto da presente dissertação: à Prof. Doutora Maria de Sousa e à Doutora Graça Porto, pelas repetidas e muito produtivas sessões de discussão do trabalho, resultados e suas implicações, bem como pelas inúmeras vezes que se dignaram realizar uma leitura critica do manuscrito. Na leitura critica do manuscrito colaboraram ainda a Dr.ª Luciana Pinho e o Dr. Fernando Arosa. Finalmente, gostaria de agradecer à Dr.ª Margarida Ribeiro, pela tradução do resumo da dissertação para a língua francesa.

Mas a ciência é em ultima análise uma forma de cultura. Uma cultura com valores próprios que importa alimentar desde muito cedo. A cultura cientifica não é no entanto apanágio apenas de cientistas, mas de todos os que têm como valor supremo a verdade, e como ambição a sua descoberta. Assim, não posso deixar de considerar que o caminho que me conduziu até esta dissertação só foi possível graças ao extraordinário trabalho educativo que os meus pais desenvolveram. Primeiro, ensinando-me a considerar a verdade como um bem essencial, depois apoiando-me até ás ultimas consequências no caminhar por terrenos que não podiam compreender, apenas apoiar, e finalmente por terem sabido partilhar a minha excitação por cada passo dado nesse percurso de interrogações feito. Neste aspecto, os meus agradecimentos vão também para os meus irmãos, e sobretudo a Esmeralda. Sem o seu apoio, tantas vezes incondicional, esta tese não estaria ainda certamente terminada.

O presente trabalho teve o apoio financeiro da JNICT, do Dr. Peter Oppenheimer, Fundo APBR, e programas Ciência e Praxis XXI. Ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, quero agradecer por me ter facultado os meios físicos para a realização de parte dos trabalhos laboratoriais.

ÍNDICE

RESUMO / SUMMARY / RÉSUMÉ **5**

PARTE 1 - INTRODUÇÃO **9**

1 - HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: UM MODELO EXPERIMENTAL NO ESTUDO DA INTERACÇÃO ENTRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO E O METABOLISMO DO FERRO 11

1.1 - O ferro e o sistema imunológico *11*

1.2 - A Hemocromatose Hereditária *12*

1.2.1 - O Modelo em estudo para a interacção entre o sistema imunológico e o metabolismo do ferro *13*

1.2.2 - Validação do modelo *14*

2 - O RECEPTOR DA CÉLULA T: FERRAMENTA PARA O ESTUDO DA INTERACÇÃO ENTRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO E O METABOLISMO DO FERRO 18

2.1 - Introdução *18*

2.2- Aspectos genéticos *18*

2.2.1 - Estrutura somática dos genes do TCR *18*

2.2.2 - Mecanismo de rearranjo somático dos genes do TCR *19*

2.3 - O TCR na população normal *21*

2.3.1 - Polimorfismos do TCR *21*

2.3.2 - O repertório do TCR nas células CD4 e CD8 ..... *22*

2.3.3 - O MHC e o repertório do TCR *23*

2.4 - O TCR em situações patológicas *23*

3 - OBJECTIVOS DO PRESENTE TRABALHO 27

PARTE 2 - RESULTADOS **29**

4 - ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4 E CD8 EM DOENTES COM HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA E INDIVÍDUOS CONTROLO DA REGIÃO DE ESTOCOLMO 31

4.1 - Influência da idade no nível de depósitos de ferro na HH *31*

4.2 - Influencia da razão CD4/CD8 nos depósitos de ferro em doentes com HH *32*

4.3 - Ponto da situação *33*

5 - ESTUDO DOS VALORES NORMAIS DO REPERTÓRIO DAS CÉLULAS T: NOVA RELAÇÃO ENTRE O FENÓTIPO HLA-A3 E OS NÍVEIS DE LINFÓCITOS Vß6.7^{+}CD8^{+} NO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS NORMAIS 34

5.1 - Expansões e uso preferencial em células CD4^{+} ou CD8^{+} *34*

5.2 - Influência da frequência relativa das células CD4 e CD8, e do HLA na homeostasia do repertório do TCR *36*

6 - O REPERTÓRIO DO TCR NA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: ANOMALIA IMUNOLÓGICA RELACIONADA COM A EXPRESSÃO CLÍNICA DA DOENÇA 42

6.1 - O repertório do TCR-Vαβ na HH *42*

6.2 - O repertório TCR-Vαβ e o MHC *43*

6.3 - O repertório TCR-Vαβ e a expressão clínica da HH *43*

6.4 - Expressão de genes TCR-Jß e a severidade clínica da HH *45*

6.5 - O repertório do TCR-Vαβ em indivíduos heterozigóticos para a hemocromatose hereditária *45*

7 - A EXPRESSÃO DE TCR-Vß6.7 NAS CÉLULAS CD8 DE DOENTES COM HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMO GENÉTICO 47

7.1 - Influência de polimorfismo genético na expressão de TCR-Vß6.7 nas células CD8 de indivíduos controlo *47*

7.2 - Influencia relativa de polimorfismo genético e da heterogeneidade clínica na expressão de TCR-Vß6.7 nas células CD8 de doentes com HH *48*

PARTE 3 - DISCUSSÃO **51**

8 - O SISTEMA IMUNOLÓGICO NO CONTROLO DA HOMEOSTASE INTERNA DO ORGANISMO 53
9 - IMPLICAÇÕES CLÍNICAS 58
10 - CONCLUSÕES 59
11 - PERSPECTIVAS FUTURAS 60

PARTE 4 - MATERIAIS E MÉTODOS **61**

12 - MATERIAIS E MÉTODOS 63
12.1 - INDIVÍDUOS ESTUDADOS 63
12.2 - ESTUDO DO REPERTÓRIO DOS GENES Vß DO TCR POR CITOMETRIA DE FLUXO 64
12.3 - NOMENCLATURA PARA A APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS DE FREQUÊNCIAS DE REGIÕES VARIÁVEIS 64
12.4 - CALCULO DOS DEPÓSITOS DE FERRO 65
12.5 - ESTUDO DO REPERTÓRIO DOS GENES Jß DO TCR POR PCR 65
12.6 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE Cß1 E Cß2 66
12.7 - GENOTIPAGEM DE Vß6.7 66
12.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA 66

PARTE 5 -BIBLIOGRAFIA **69**

13 - BIBLIOGRAFIA 71

LISTA DE ABREVIATURAS

4Fe-4S - Grupo prostético contendo 4 átomos de Ferro e 4 átomos de enxofre

APC - Célula apresentadora do antigénio

bp - pares de bases

C - Constante

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CV - coeficiente de variação

D - Diversidade

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - deoxi-nucleotidil trifosfato

eALAS - Sintetase do 5-aminolevulinato

HH - Hemocromatose Hereditária

HLA - Antigénios leucocitários humanos

IFN-γ - Interferão gama

IRE - Elemento de resposta ao ferro

IRP - Proteína de resposta ao ferro

J - Junção

MHC - Complexo major de histocompatibilidade

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

PBMC - Células mononucleares de sangue periférico

SD - desvio padrão

TCR - Receptor da célula T

Tdt - Transferase terminal de deoxinucleotidil

TNF-α - Factor de Necrose tumoral alfa

V - Variável

V(D)J - Recombinação dos elementos génicos do TCR

RESUMO

Tendo como pano de fundo, a emergência de novos paradigmas em Imunologia, os quais atribuem ao Sistema Imunológico uma função de auto-vigilância "fisiológica" do organismo, e não apenas a função de uma vigilância dirigida predominantemente contra invasores, torna-se importante testar novos modelos teóricos desta auto-vigilância. Nesta dissertação foi adoptado um modelo teórico, que deriva directamente do postulado formulado em 1978 por Maria de Sousa, o qual atribuía às células do sistema imune um papel na protecção da toxicidade do ferro. Este modelo teórico, implicando a existência de subgrupos de células directamente responsáveis pelo reconhecimento e regulação do metabolismo do ferro, foi passível de verificação experimental, dada a existência de uma patologia humana caracterizada por uma desregulação do metabolismo do ferro (hemocromatose hereditária ou HH), a qual se desenvolve em estreita associação com o MHC-I.

Trabalho prévio realizado pelo nosso grupo revelou a existência de uma ligação fisiológica entre os níveis de sobrecarga de ferro observados em doentes Portugueses com HH e as proporções relativas de células CD4 e CD8 no sangue periférico destes doentes. Estes resultados não foram no entanto até ao momento confirmados por outros grupos, nem em outras populações. Assim, o presente trabalho teve como primeiro objectivo a verificação destes resultados em doentes com HH provenientes de uma outra população (região de Estocolmo; Secção 4). Os dados obtidos permitiram não só confirmar a associação da razão CD4/CD8 com o nível de sobrecarga de ferro, como permitiram concluir que esta variável tem uma influência estatisticamente mais significativa que a própria idade (Secção 4). Uma vez que um balanço anormal das células CD4 e CD8 no sangue periférico está relacionado com a sobrecarga de ferro, procuramos definir subpopulações de células CD4 e CD8 (de acordo com o TCR expresso) que pudessem estar directamente associadas a este fenómeno. Para tal foi necessário realizar um extenso estudo de definição dos valores normais da população (Secção 5), durante o qual foi possível identificar a existência de uma associação, estatisticamente significativa, entre o fenótipo HLA-A3 e um nível baixo de expressão de Vß5.3 e Vß6.7 nas células $CD8^+$ do sangue periférico de indivíduos normais (Secção 5.2).

O estudo da expressão do TCR em hemocromatóticos (Secção 6) permitiu observar uma menor expressão de TCR-Vß6.7 nas células $CD8^+$ de doentes quando comparada com a de indivíduos normais. Verificou-se ainda que esta reduzida expressão de Vß6.7 estava associada à expressão clínica da doença, sendo mais pronunciada nos indivíduos com expressão clínica mais grave. Nos mesmos doentes foi ainda encontrada uma menor expressão de Jß1.6 nas células $CD8^+$. Uma vez que a frequência de expressão de TCR-Vß6.7 é influenciada por um polimorfismo genético bem caracterizado, foi estudada a influência deste polimorfismo nos resultados acima descritos (secção 7). Os resultados permitem concluir, que ainda que o genótipo tenha um efeito na expressão geral de TCR-Vß6.7 tanto em hemocromatóticos, como na população controlo, por si só não explica as diferenças observadas entre controlos e doentes.

Estes resultados sugerem a existência de subpopulações de células $CD8^+$ ($CD8^+$ $Vß6.7^+$ $Jß1.6^+$) directamente envolvidas na regulação do metabolismo do ferro pelo sistema imunológico, confirmando as previsões do modelo de estudo adoptado. O presente trabalho constitui assim evidência experimental apoiando um dos paradigmas emergentes em Imunologia.

SUMMARY

The last years have seen the slow, but steady emergence of new paradigms in Immunology which envisage the Immune System with a function in the surveillance of the self, as opposed with the old view that considered that the only function of the immune system is to protect the self against the non-self. With the emergence of these new paradigms it becomes important to test new theoretical models of this self surveillance. In the present work, a theoretical model was adopted which derives directly from the postulate first put forward by Maria de Sousa in 1978, which considered that the immune system cells could have a role in the protection against iron toxicity. This theoretical model, implicating the existence of subpopulations of lymphocytes directly responsible for iron recognition and the regulation of iron metabolism, was particular prone to laboratorial testing in hereditary hemochromatosis, a Human pathology characterised by a deregulation of the iron metabolism, and a close relationship to the HLA-I genetic locus.

Previous work by our group had shown the existence of abnormal relative proportions of CD4 and CD8 T lymphocytes in the peripheral blood of some HH patients. However, these data has not been independently confirmed by other groups or in other patient populations. Therefore, our first aim in the present work was to test these results in patients from an unrelated geographical region (Stockholm, Sweden; see section 4). The data gathered allowed us not only to confirm the association of the CD4/CD8 ratiosto the iron stores of HH patients, but showed that the CD4/CD8 ratio has a statistically more significant influence on the iron stores than age per se (section 4). Since abnormally high CD4/CD8 ratios are correlated to increased iron stores in HH patients, we then moved into finer characterisations of the T-lymphocyte subpopulations in HH patients, by assessing the TCR repertoire both in CD4 and CD8 T lymphocytes. For that purpose, we first characterised the TCR repertoire in a large control population (section 5) as a way of defining the normal range of the TCR repertoire. By doing so, we were able to define a statistically significant association between the HLA-A3 phenotype and a low expression of Vß5.2+5.3 and Vß6.7 in the $CD8^+$ peripheral blood lymphocytes of control donors (section 5.2).

The study on the hemochromatosis patients (section 6), unravelled the existence of a lower expression of TCR-Vß6.7 in the $CD8^+$ peripheral blood lymphocytes of patients when compared to the controls. Furthermore, this reduced level of expression was associated with the most severe clinical expression of the disease. In the same patients it was also possible to detect a lower expression of Jß1.6 in the $CD8^+$ lymphocytes. Since the frequency of TCR-Vß6.7 is influenced by a well characterised genetic polymorphism, we studied the influence of this polymorphism in the above described low expression of Vß6.7 in the CD8 cells of some HH patients. The results allowed us to conclude that although this polymorphism has a clear effect in the expression of TCR-Vß6.7, it cannot explain neither the difference between patients and controls, nor the difference between the CD4 and CD8 populations.

The described results suggest the existence of subpopulations of $CD8^+$ cells ($CD8^+Vß6.7^+Jß1.6^+$) directly involved in the regulation of iron homeostasis, thus supporting the theoretical model under study and the emerging paradigms in Immunology.

RÉSUMÉ

Aux dernières années, en Immunologie, il est émergé de nouveaux paradigmes qui attribuent au Système Immunologique une fonction d'autosurveillance "physiologique" de l'organisme et non plus une seule fonction de surveillance contre des envahisseurs. Dans le cadre de l'émergence de ces nouveaux paradigmes, il devient important de tester de nouveaux modèles théoriques de cette autosurveillance. Le modèle théorique adopté dans cette dissertation dérive directement du postulat formulé en 1978 par Maria de Sousa, selon lequel les cellules du système immunitaire joueraient un rôle dans la protection contre la toxicité du fer. Ce modèle théorique, impliquant l'existence de sous-groupes de cellules directement responsables de la reconnaissance et du règlement du métabolisme du fer, fut passible de vérification expérimentale, étant donné l'existence d'une pathologie humaine caractérisée par un dérèglement du métabolisme du fer (hémochromatose héréditaire ou HH), se développant en association étroite avec le MHC-I.

C'est ainsi qu'un travail préalable mené par notre équipe révéla l'existence d'une liaison physiologique entre les niveaux de surcharge de fer observés chez des malades portugais ayant HH et les proportions relatives de cellules CD4 et CD8 dans le sang périphérique des mêmes malades. Ces résultats ne furent cependant pas confirmés jusqu'ici ni par d'autres équipes ni dans d'autres populations. Ainsi donc, notre premier objectif dans le travail présent, ce fut la vérification de ces résultats chez des malades ayant HH et provenant d'une autre population (région de Stockholm, Suède; section 4). Les données obtenues nous permirent non seulement de confirmer l'influence de la raison CD4/CD8 dans le niveau de surcharge de fer, mais aussi de conclure que cette variable a une influence statistiquement plus significative que l'âge même des individus (section 4). Une fois qu'un bilan anormal des cellules CD4 et CD8 dans le sang périphérique est en rapport avec la surcharge de fer, on chercha à définir des sous-populations de cellules CD4 et CD8 (d'accord avec le TCR exprimé) qui puissent être directement associées à ce phénomène. À cette fin, il nous fallut réaliser une vaste étude de définition des valeurs normales de la population (section 5) et pendant cette étude-là il nous fut possible d'identifier l'existence d'une association statistiquement significative, entre le phénotype HLA-A3 et un bas niveau d'expression de Vß5.3 et Vß6.7 dans les cellules $CD8^+$ du sang périphérique d'individus normaux (section 5.2).

L'étude de l'expression du TCR chez des malades d'hémochromatose (section 6) permit d'observer une expression plus faible de TCR-Vß6.7 dans les cellules $CD8^+$ de malades par comparaison avec celle d'individus normaux. On vérifia encore que cette expression réduite de Vß6.7 était associée à l'expression clinique de la maladie, se montrant plus prononcée chez les individus dont l'expression clinique était plus grave. Chez les mêmes malades on trouva encore une expression plus légère de Jß1.6 dans les cellules $CD8^+$. Une fois que la fréquence d' expression de TCR-Vß6.7 est influencée par un polymorphisme génétique bien caractérisé, on étudia l'influence de ce polymorphisme sur les résultats déjà exposés (section 7). Les résultats permettent de conclure que bien que le génotype produise un effet sur l'expression générale de TCR-Vß6.7, chez des malades d'hémochromatose autant que dans la population contrôle, lui tout seul il n'explique pas les différences observées entre contrôles et malades.

Ces résultats suggèrent l'existence de sous-populations de cellules $CD8^+$ ($CD8^+Vß6.7^+Jß1.6^+$) directement engagées dans le règlement du métabolisme du fer par le système immunologique, en confirmant les prévisions du modèle d'étude adopté. Le présent travail constitue donc une évidence expérimentale à l'appui d'un des paradigmes émergents en Immunologie.

PARTE 1

INTRODUÇÃO

1 - HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: UM MODELO EXPERIMENTAL NO ESTUDO DA INTERACÇÃO ENTRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO E O METABOLISMO DO FERRO

1.1 - O ferro e o sistema imunológico

A função do sistema imunológico tem sido considerada como estando ligada exclusivamente à vigilância e controlo de invasões por agentes externos ao organismo, os quais seriam potencialmente patogénicos (Roitt et al.,1994). A exclusividade da função de defesa contra agentes patogénicos, e particularmente infecciosos, tem constituído a base de estudo da imunologia desde sempre, mas apesar de evidencia a seu favor, tem vindo a ser posto em causa nos últimos anos. Com efeito, ainda que seja indubitável que o sistema imunológico tenha uma constante função de protecção do organismo contra o mundo externo, algumas descobertas têm vindo a contestar a posição de que esta seja a sua única função.

Estes trabalhos, consistiram na descoberta de um papel do sistema imunológico na eliminação de pelo menos alguns tumores (Orntoft et al., 1985; Lin et al., 1985; Parmiani et al., 1986), e a descoberta da existência fisiológica de auto-anticorpos (Marchalonis, 1994), e de células T auto-reactivas (Schönrich et al., 1991). A existência destas capacidades auto-reactivas por parte do sistema imunológico parece indicar a existência de uma função de auto-vigilância, e não apenas de uma vigilância dirigida contra "invasores externos". O aparecimento da SIDA veio de certo modo reforçar este ponto de vista , já que um dos possíveis sinais da infecção é o aparecimento de tumores habitualmente tão benignos que eram uma ocorrência rara antes desta doença (Steis et al., 1985; Mitsuyasu et al., 1986; Constantino et al., 1987). Assim, parece que uma das primeiras consequências nocivas de uma perturbação grave do equilíbrio imunológico *in vivo* se revela por desregulações de delicados balanços internos.

Tendo por pano de fundo a emergência deste novo paradigma assume assim particular importância o postulado formulado em 1978 por Maria de Sousa, de que o sistema imune poderia ter um papel no controle da toxicidade do ferro no organismo (de Sousa, 1978). Este postulado possui atractivos evidentes para todos os que conhecem as consequências da presença de ferro livre para a química do oxigénio. Com efeito, estes dois elementos químicos, tão necessários para a vida dos mamíferos, são a um tempo uma bênção, e uma bomba relógio. A capacidade do ferro para catalisar a formação de radicais livres de oxigénio originou a necessidade biológica de o manter sequestrado em proteínas transportadoras, e de armazenamento, por forma a utilizar as suas qualidades em prol do metabolismo do organismo, sem risco da criação de radicais livres de oxigénio, potencialmente tóxicos para todas as membranas biológicas (Wills et al., 1969).

Visto deste prisma, o equilíbrio metabólico do ferro constitui algo de absolutamente essencial para a integridade do organismo, que importa manter e vigiar. E que melhor sistema que o imunológico para executar essa tarefa? Em primeiro lugar, a permanente circulação das células que o compõem permite que teoricamente o estado redox em qualquer ponto do organismo possa ser controlado. Em segundo lugar, o envolvimento do ferro como co-factor de enzimas que participam na síntese de DNA (Hoofbrand et al., 1976; Larsson, 1986), cadeia respiratória, e ciclo do ácido cítrico (Lenhinger, 1986), explicando a sua necessidade como elemento nutricional essencial para a manutenção de culturas de linfócitos (Bryan et al., 1981), e de agentes patogénicos, coloca este metal numa posição central na competição proliferativa entre linfócitos e agentes patogénicos. Finalmente a capacidade de produção de Lactoferrina pelas células polimorfonucleares e do seu receptor pelos monócitos (de Sousa et al., 1988), a presença de transferrina em monócitos (de Sousa et al., 1988) e linfócitos T $CD4^+$ (Nishiya et al., 1980; Lum et al., 1986), e de ferritina em diferentes tipos de células do sistema imunológico (de Sousa et al., 1982), poderiam torná-lo sensível à presença de ferro nos tecidos para onde migram. Em particular a expressão de ferritina pelas células do sistema imunológico parece sofrer uma regulação imunológica curiosa, já que indivíduos com fenótipo HLA-A3 parecem possuir uma menor percentagem de PBMC produtoras desta molécula, quando comparados por exemplo com indivíduos HLA-A2 (Martins da Silva et al., 1982). Esta associação é tanto mais curiosa quanto o fenótipo HLA-A3 está presente em muito maior frequência nos indivíduos com hemocromatose hereditária (73%) do que nos indivíduos normais (25%) (Simon et al., 1975, 1977a, 1977b).

1.2 - A Hemocromatose Hereditária

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença genética de transmissão autossómica recessiva. Contrariamente ao que se pensava, sabemos hoje que a hemocromatose não é uma doença rara, já que a sua frequência é comparável à da anemia da "Sickle cell", fibrose cística ou distrofia muscular (Nichols & Bacon, 1989). Foi estimado que só nos Estados Unidos devem existir entre 600,000 e 1,000,000 de doentes, bem como cerca de 27,000,000 de indivíduos portadores do gene (Nichols & Bacon, 1989).

A HH é caracterizada por uma falha na regulação da absorção do ferro da dieta, mantendo-se a absorção mesmo na presença de altos níveis de ferro armazenado (Alper et al., 1951; Cox & Peters, 1978; Williams et al., 1986; Lynch et al., 1989; Whittaker et al., 1989). Os indivíduos com HH possuem depósitos de ferro superiores a 4 g, não sendo raros indivíduos com depósitos superiores a 20 g, contrastando assim com os habituais 500-1000 mg nos indivíduos normais (Nichols & Bacon, 1989). O quadro completo de HH envolve a deposição de ferro em vários órgãos, nomeadamente: fígado, resultando em cirrose hepática; coração com diminuição da função cardíaca e perturbação do ritmo; articulações com formação de poliartropatia; pele,

com formação de pigmentação dérmica característica; e glândulas endócrinas, originando falhas endócrinas como diabetes e gonadopatias (Milder et al., 1980).

A hemocromatose hereditária, não sendo uma doença para a qual exista uma cura é no entanto facilmente tratável por flebotomias (Bomford & Williams., 1976; Niederau et al., 1985). O tratamento ainda que seja meramente correctivo, e por isso exija intervenção durante toda a vida do doente, é bastante eficaz, consistindo numa primeira fase em 1 a 2 flebotomias semanais (tratamento intensivo), a que se seguem, após a depleção dos depósitos de ferro, flebotomias mensais ou trimestrais (tratamento de manutenção). Uma vez que a sobrecarga de ferro é passível de correcção, a hemocromatose hereditária, como modelo de estudo da interacção entre o metabolismo do ferro e o sistema imunológico, tem a grande vantagem de nos fornecer dados sobre a direcção das interacções. Com efeito, se a sobrecarga de ferro exercer um efeito fisiologicamente relevante no sistema imunológico destes indivíduos, a remoção da sobrecarga deverá corrigir esse defeito. Inversamente, se o sistema imunológico tiver uma acção relevante na homeostase do ferro, então esta deverá preceder a sobrecarga de ferro, não sendo corrigida com a remoção de ferro.

A origem precisa do erro na regulação da absorção do ferro na HH constitui ainda hoje um mistério, tal como o é a identidade do gene ou genes responsáveis pela doença. No entanto, e dada a aparente falta de relação entre a doença e perturbações da função imunológica clássica (ocorrência de infecções, a já descrita estreita associação entre o fenótipo HLA-A3 e o caractere hemocromatose (Simon, 1975, 1977a, 1977b) tem vindo a ser interpretado pelos geneticistas como indicador da estreita ligação física entre o locus HLA-A e o gene da hemocromatose(Simon, 1977a; Worwood, 1994).

Tabela 1.1 -Resíduos "ancora" conhecidos em diferentes molécula MHC

	Posição no péptido								
Molécula	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
K^{d} [1]		Y							L/I
D^{b} [1]					N				M
K^{b} [1]					F/Y			L	
K^{k} [1]		E						I	
K^{km1} [1]								I	
HLA-A2.1 [1,2,3,4]		L							V
HLA-A*0205 [1,5]									L
HLA-B27 [1]		R							
HLA-A3 [5]		L							Y/K

1) Revisto em Rammensee et al., 1993
2) Parker et al., 1992
3) Hunt et al., 1992
4) Rötzscke et al., 1992
5) DiBrino et al., 1993

1.2.1 - O Modelo em estudo para a interacção entre o sistema imunológico e o metabolismo do ferro

As moléculas do MHC podem ser consideradas como receptores para péptidos (Rammensee et al., 1993). À semelhança de muitos outros receptores, estas moléculas apresentam uma selectividade para os ligandos, a qual começou a ser esclarecida há relativamente pouco tempo (para revisão ver Rammensee et al., 1993). Tipicamente, os péptidos capazes de se ligarem às moléculas de MHC-I são compostos por 8 ou 9 resíduos, dos quais, habitualmente 2 têm função de ancoragem, sendo

por isso denominados "âncora" (Rammensee et al., 1993). Tipicamente, estas posições só podem ser ocupadas por 1 ou 2 tipos de aminoácidos (tabela 1.1). A especificidade das moléculas do MHC é de tal ordem que mesmo moléculas muito semelhantes (por exemplo HLA-A2.1 e A*0205, as quais diferem em apenas 4 aminoácidos) possuem especificidades relacionadas, mas diferentes (tabela 1.1). Estas diferenças de especificidade podem ser observadas, mesmo quando as posições dos aminoácidos dissemelhantes estão localizadas internamente na molécula de HLA (Chen et al., 1993), influenciando a capacidade de reconhecimento pela célula T (Boehncke et al., 1993). À luz destes dados não é de estranhar que o MHC possua não só um papel central na apresentação de péptidos, mas que em consequência deste papel, os polimorfismos HLA possam até certo ponto determinar o repertório das células T de cada indivíduo (Akolkar et al., 1993; Davey et al., 1994). É assim possível que a associação de uma doença com um determinado tipo de molécula HLA possa ser, não só um "acaso" resultante de uma proximidade física dos respectivos genes, mas também uma consequência com representação patológica de uma alteração do processo fisiológico de selecção de células T. Segundo este prisma, a presença de um determinado antigénio HLA (no caso que nos interessa o A3 ou um seu subtipo) poderia originar uma selecção deficiente em um tipo de células T, criando anomalias no universo de péptidos visíveis e consequentemente na capacidade de auto-vigilância do sistema imunológico. Quando tal característica, resultante meramente do polimorfismo HLA, se associa a uma outra característica genética, perturbadora da regulação da entrada de ferro, originar-se-ia uma situação de sobrecarga, não controlada pelo sistema imunológico, que portanto tenderia a manter-se e agravar-se ao longo da vida do doente. Por outras palavras, originar-se-ía uma situação clínica indistinguível da hemocromatose hereditária.

1.2.2. Validação do modelo

O modelo de estudo acima descrito, e pela primeira vez esboçado no projecto que serviu de base ao trabalho da presente dissertação, conduz às seguintes deduções passíveis de estudo experimental:

a) A frequência de indivíduos heterozigóticos

A primeira consequência do modelo proposto seria a existência de dois tipos de "falsa heterozigotia":

i) indivíduos com uma selecção normal de células T, mas com o gene desregulando a absorção. Neste caso, um aumento da absorção seria mensurável, mas o sistema imunológico "cumpriria o seu papel", impedindo o ferro de provocar danos no organismo, logo não se originando patologia.

ii) indivíduos com deficiente selecção de células T, mas sem o gene originando o aumento de absorção. Neste caso, o sistema imunológico não seria capaz de "fiscalizar" os danos mediados pelo ferro, mas a falta de absorção aumentada permitiria ao indivíduo permanecer saudável.

Esta possibilidade, ainda que só passível de verificação experimental após a identificação molecular de ambos os defeitos genéticos, é no entanto teoricamente aceitável, face ao que se conhece da frequência da HH. Com efeito, sempre pareceu existir uma discrepância entre os valores calculados para a frequência do gene da HH, baseados na tipagem HLA, e a frequência de homozigóticos realmente encontrada, sendo o primeiro valor superior ao segundo (para revisão ver Porto 1993). Segundo o modelo proposto, esta poderia ser a consequência directa do facto de não haver um único gene envolvido, mas dois, o que como já foi descrito elevaria o número de portadores saudáveis.

b) As proporções relativas de células CD4 e CD8

Se o ferro ou os seus efeitos são passíveis de detecção por alguns linfócitos T, então a omnipresença do ferro no organismo deve influenciar o número de células CD8 (capazes de responder a péptidos endógenos) mas não de CD4 (prioritariamente reactivas a péptidos exógenos), com implicações na abundância relativa destas células. Esta influência, não se deve fazer sentir nos casos em que o repertório das células CD8 não possuir as especificidades necessárias para detectar os efeitos da presença de ferro. Assim, nestas condições pode prever-se a existência de menor abundância de células CD8 (relativamente às células CD4) do que na situação anterior.

Esta previsão pode servir de modelo explicativo da observada anormal proporção de células CD4 e CD8 na hemocromatose hereditária. Com efeito, na hemocromatose hereditária, observou-se a presença de uma menor %CD8 que em indivíduos controlo, a qual não era corrigida com o tratamento (Reimão et al., 1991; Porto et al., 1994). Assim, na hemocromatose hereditária podemos estar em presença de uma incapacidade de origem genética para expandir a subpopulação de células CD8 reactiva ao ferro. O mesmo parece ser confirmado por estudos da p56lck (um enzima envolvido na activação de células T), cuja actividade parece estar diminuída nas células CD8 dos doentes com HH (Arosa et al., 1994). De igual modo, os resultados obtidos com animais transgénicos para o gene da ß2-microglobulina, nos quais este gene foi inactivado por recombinação homologa, apoiam esta hipótese. Estes animais, não sendo capazes de expressar MHC-I não possuem células CD8 maduras no sangue periférico (Zijlstra et al., 1990; Koller et al., 1990). Nestes animais, está documentada uma sobrecarga de ferro histológicamente semelhante à observada na hemocromatose hereditária (de Sousa, 1994). Se a este facto adicionarmos a recente descoberta de que animais "Knock-Out" para o CD8 não apresentam espontaneamente depósitos de ferro anormais, mas que animais RAG "Knock-Out" desenvolvem sobrecarga de ferro induzida (M. Santos, comunicação pessoal), podemos talvez concluir que a relação entre as células T e o metabolismo do ferro deve envolver o CD8, o MHC-I e o repertório do TCR.

c) Anomalias funcionais em outras células do sistema imunológico

Sendo o sistema imunológico altamente interdependente e interactivo nos seus vários componentes, as alterações da abundância relativa de células CD4 e CD8 devem originar a desregulação dos sinais enviados por estas células para as que lhe são funcionalmente dependentes, como é o caso dos macrófagos.

Com efeito, é desde longa data considerado o maior paradoxo na hemocromatose hereditária que a par da sobrecarga de ferro existente em vários órgãos, o sistema reticulo-endotelial, habitualmente o órgão mais sensível às variações do nível de ferro sérico, permaneça livre de depósitos deste metal (Charlton et al., 1973). Se a aliar a este facto tivermos presente que após exaustivos estudos funcionais dos macrófagos de hemocromatóticos, não foi encontrada nenhuma alteração nestas células, poderemos admitir que o referido paradoxo deve resultar de anomalias dos sinais reguladores recebidos por estas células. Esta hipótese foi recentemente reforçada com a identificação de mecanismos potenciais de regulação do metabolismo do ferro em macrófagos, com origem em sinais provenientes dos linfócitos. Estes trabalhos, partindo da existência no mRNA de sinais reguladores denominados IRE encontraram mecanismos moleculares através dos quais as citoquinas IFN-γ e TNF-α podem originar alterações no metabolismo do ferro das células alvo.

Os IRE (do inglês Iron Responsive Elements) são sequências existentes nos mRNA do receptor da transferrina, ferritina, aconitase mitocondrial e eALAS (5-aminolevulinato sintetase). Trata-se de sequências muito conservadas na evolução (95% entre o homem, o rato e a galinha no caso do receptor da transferrina), e que possivelmente permitem a formação de 1 estrutura no mRNA em forma de "loop" (Kühn, 1994). Estas sequências são as principais responsáveis pela regulação pós-translacional dos genes a que pertencem, conferindo-lhes a capacidade de se modularem dependendo da concentração intracelular de ferro (Kühn, 1994). Esta regulação é mediada por uma proteína citoplasmática denominada IRP (do Inglês Iron Responsive Protein), mas previamente também conhecida como IRF, IRE-BP e FRP (Müllner et al., 1989; Rouault et al., 1988; Walden et al., 1988).

O efeito regulador do IRE (e consequentemente da IRP) depende da localização do IRE no mRNA. No mRNA do receptor da transferrina, os 5 IREs estão presentes na região 3' não traduzida, pelo que a ligação da IRP aumenta a estabilidade do mRNA, prolongando o seu tempo de semi-vida (Kühn, 1994). No caso do mRNA dos genes da ferritina, da aconitase mitocondrial e da eALAS, o IRE encontra-se situado na região 5' não traduzida do mRNA, a curta distância da sequência CAP, pelo que a ligação da IRP bloqueia a iniciação da tradução pelos ribossomas (Kühn, 1994).

A IRP é uma proteína bi-funcional (Klausner et al., 1993; Hirling et al., 1994). Na presença de ferro, a sua capacidade de ligar aos IRE é mínima, o que pode derivar da incorporação de 1 grupo 4Fe-4S na proteína. Nestas condições, a IRP é

capaz de funcionar como aconitase citoplasmática, catalisando a formação de isocitrato (Emery-Goodman et al., 1993). Pelo contrário, na ausência de ferro, a IRP liga-se com grande especificidade aos IRE, perdendo a actividade de aconitase.

O sistema imunológico parece utilizar este duplo papel do IRP para controlar a sua actividade, e assim controlar o metabolismo intracelular do ferro. Experiências descritas em 1993 por Drapier et al., comprovam a existência de efeitos reguladores de citoquinas, nomeadamente do IFN-γ e TNF-α na indução da ligação de IRP a IRE em macrófagos em cultura devido à modulação da síntese de óxido nítrico proveniente da via da L-arginina (Drapier et al., 1993). O óxido nítrico, mercê da sua reduzida dimensão tem acesso directo ao núcleo 4Fe-4S da IRP, onde induz a sua degradação (Kühn, 1994). Assim, a presença de óxido nítrico (regulada pelo IFN-γ e TNF-α) é um factor tendente a aumentar a "pool" de IRP capaz de ligar ao IRE, diminuindo a "pool" capaz de funcionar como aconitase (Kühn, 1994).

d) Anormal representação de subpopulações de células CD8 na HH

Finalmente é passível de determinação experimental um elemento central no modelo: a existência de perturbações no repertório das células T em indivíduos com hemocromatose hereditária. A verificação deste facto, constituindo o ponto central da presente dissertação, será abordada directamente nos próximos capítulos, com o estudo do repertório do receptor da célula T (TCR) em doentes com hemocromatose hereditária.

2 - *O Receptor da Célula T: ferramenta para o estudo da interacção entre o sistema imunológico e o metabolismo do ferro*

2.1 - Introdução

Durante a evolução do sistema imunológico para funções de reconhecimento específico, a natureza teve que resolver o problema gigantesco de codificar num genoma limitado, um número suficiente de genes capaz de reconhecer o mundo exterior e interior do organismo. A solução encontrada é, se bem que económica, complexa, como o revela o facto de não ser ainda possível construir sistemas de recombinação *in vitro* isentos de células. Os receptores para antigénios são de 2 tipos: 1) as imunoglobulinas, capazes de reconhecer o antigénio na forma nativa, são produzidas pelos linfócitos B, e existem na forma solúvel e na forma membranar; 2) o receptor da célula T reconhece o antigénio depois de processado por células apresentadoras do antigénio, e apresentado no contexto do MHC dessa célula, existe fisiologicamente apenas na forma membranar.

2.2- Aspectos genéticos

Dos dois tipos de linfócitos, a célula T é a responsável pela resposta imunológica dita celular. Para tal, estas células estão equipadas à sua superfície com um receptor para o antigénio (TCR do inglês T-Cell-Receptor), através do qual a célula madura recebe um estímulo de activação quando encontra o antigénio para o qual é específica. Este receptor é composto por um de dois tipos de heterodímeros ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$). São portanto 4 os genes do TCR, dos quais apenas 2 estarão a ser transcritos em cada célula T. Cada um dos genes é composto por um máximo de 4 tipos de segmentos (V ou variável, D ou de diversidade, J ou de junção, C ou constante). Cada um destes segmentos é composto por mais que um elemento génico, dos quais cada clone celular escolherá um e apenas um para ser utilizado no TCR que irá expressar. As células T diferem assim de todas as restantes células do organismo (com excepção dos linfócitos B), pois o conteúdo genético da célula madura é diferente do de qualquer outra célula que não pertença ao mesmo clone.

2.2.1 - Estrutura somática dos genes do TCR

Os genes do TCR, tal como os das imunoglobulinas possuem uma configuração somática, igual em todas as células não linfóides. Nos linfócitos, a configuração destes genes é alterada no processo denominado recombinação, para dar origem a um gene funcional.

Os 4 genes do TCR existem em 3 locus cromossómicos, já que o gene δ está localizado no interior do gene α (Fig. 2.1). Os locus ß e δ possuem 4 classes de segmentos (V,D,J,C), e os locus α e γ apenas 3 (V,J,C). Como se pode ver na Fig. 2.1, no Homem, a organização básica dos locus do TCR é que tem sido denominada "extended", em que os vários tipos de segmentos

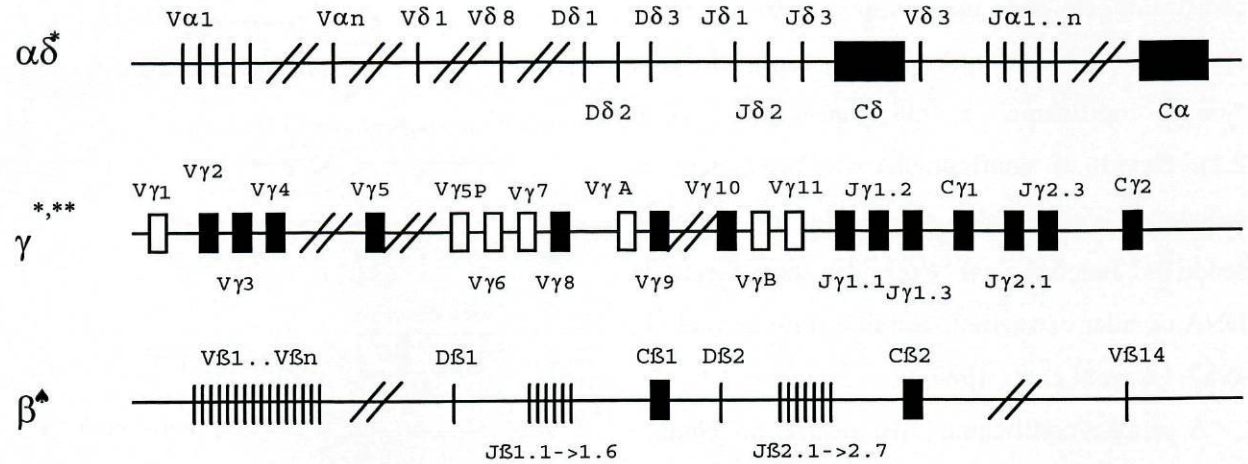


Fig. 2.1 - Diagrama simplificado da estrutura somática dos genes do TCR humano. Os elementos génicos representados por caixas brancas são pseudogenes (Adaptado de : ♠ Toyonaga et al., 1985; ** LeFranc et al., 1989;* Yoshikai, 1991).

se organizam separadamente no genoma (V.V. (etc.) .D.D. (etc.) .J.J. (etc.)). No caso do locus αδ, uma variação a esta configuração permite ao gene δ partilhar segmentos V com o gene α (Lewis, 1994).

2.2.2 - Mecanismo de rearranjo somático dos genes do TCR

O mecanismo de rearranjo somático dos genes do TCR não é diferente do observado para as imunoglobulinas. Na verdade, foi possível clonar células B com os genes do TCR rearranjado (O'Connor et al., 1985), sugerindo que ambos os receptores são substractos do mesmo conjunto de enzimas. O processo de recombinação quer do TCR quer das imunoglobulinas (doravante denominada recombinação V(D)J) depende primariamente de sequências sinal que flanqueando os segmentos a recombinar constituem todos os elementos necessários para indicar aos componentes enzimáticos onde efectuar a recombinação (Lewis et al., 1985; Akira et al., 1987; Hesse et al., 1987). Estes sinais de junção variam em sequência, mas seguem de muito perto o consenso heptâmero-espaçador-nonâmero, em que as sequências consenso do heptâmero e do nonâmero são respectivamente CACAGTG e ACAAAAACC. O espaçador tem uma sequência muito variável, mas o seu comprimento tem 12 ou 23 pares de bases (bp) (Max et al., 1979; Sakano et al., 1979,1981; Kurosawa et al., 1981). A regra base que dita a orientação dos rearranjos é a de que apenas podem rearranjar elementos com espaçadores diferentes, isto é, um elemento com uma sequência sinal composta por um espaçador de 12 bp apenas rearranja com uma outra cujo espaçador for de 23 bp e vice-versa. Desta forma rearranjos envolvendo elementos do mesmo grupo (V com V; J com J) são impedidos. O mecanismo molecular que origina esta restrição é no entanto ainda hoje desconhecido (Lewis, 1994).

Quando dois segmentos génicos se envolvem no processo de recombinação, é feito um corte na fronteira entre a sequência sinal e a sequência

codificante, em cada um. As quatro extremidades assim formadas são então ligadas formando uma "junção codificante", e uma "junção sinal" (Fig. 2.2). Devido à configuração cromossómica, as sequências codificantes são retidas no genoma, sendo as "Junções sinal" excisadas sob a forma de DNA circular extracromossómico (Fujimoto et al., 1987; Okazaki et al., 1987).

A junção codificante, não ocorre no entanto sempre numa posição fixa. Por um lado a quantidade de material genético com que cada elemento contribui pode variar em até 10 nucleótidos (Max et al, 1979; Sakano et al 1979; Weigert et al 1980). Por outro lado, resíduos extra não incluídos na configuração "germline", podem ser incluídos (Sakano et al., 1981; Lafaille et al., 1989; McCormack et al., 1989). Estes resíduos extra podem ser de dois tipos fundamentais: os "resíduos N" (do Inglês Non-germline-regions) e os "resíduos P" (de Palindromicos).

Os "resíduos N" têm tipicamente um elevado conteúdo G/C (Alt et al., 1982; Roth et al., 1989), não ultrapassam os 15 nucleótidos, e ocorrem mais frequentemente nas junções codificantes que nas junções de sinal (Lewis, 1994). Estes resíduos são adicionados pela enzima TdT (do Inglês Terminal deoxynucleotidil transferase) como o demonstram os modelos de animais transgénicos com inactivação do gene desta enzima (Gilfillan et al, 1993; Komori et al., 1993). No entanto, o facto de estes modelos resultarem em uma muito grande, mas não completa abolição da frequência de "resíduos N" parece indicar a existência de um mecanismo alternativo, independente da expressão

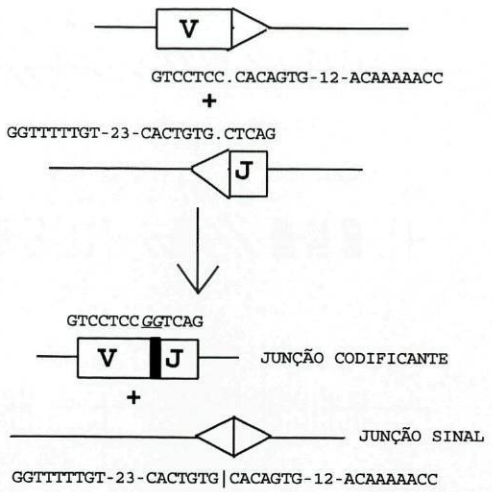


Fig. 2.2 - Equação padrão para a recombinação V(D)J. Os sinais de junção são indicados por triângulos e os segmentos codificantes por quadrados (Extraído de Lewis, 1994)

de TdT (Lewis, 1994). A regulação de TdT na ontogenia, origina a menor frequência de "resíduos N" no período fetal ou neonatal, possivelmente para permitir o domínio de alguns receptores com especificidades necessárias numa fase mais precoce da ontogenia (Gu et al., 1990; Feeney, 1991, 1992).

Os "resíduos P" parecem ter origem numa molécula intermediária tipo "hairpin" gerada (após o corte na sequência sinal) pela ligação covalente das duas cadeias da dupla hélice do DNA, a qual seria posteriormente clivada num ponto diferente do inicial (Fig. 2.3.; Lieber, 1991; Roth et al., 1992).

O agente ou agentes de recombinação permanecem ainda largamente desconhecidos, ou incompletamente caracterizados e purificados (Lewis, 1994). A tendência actual é no entanto no sentido de aceitar que a recombinação V(D)J se realiza não por um factor, mas por uma colecção

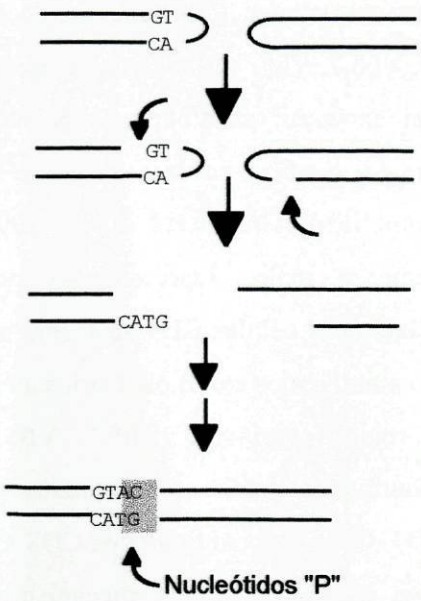


Fig. 2.3 - Mecanismo proposto para a origem dos nucleótidos P (Adaptado de Lewis, 1994).

de factores com actividades pouco relacionadas. Os factores já identificados incluem RAG-1 e RAG-2 (do inglês Recombination activating Gene; Schatz et al., 1988, 1989; Oettinger et al., 1990;), NBP (do inglês nonamer binding protein; Halligan et al., 1987; Li et al., 1989), T-160 (Shirakata et al., 1991), Rc (Wu et al, 1993), RBP-Jk (Hamaguchi et al., 1989), Rp (do inglês recognition protein; Muegge et al., 1993). Dos factores identificados com base na sua capacidade para produzir cortes no DNA, nenhum apresentava a especificidade necessária (Desiderio et al, 1984; Kataoka et al., 1984; Hope et al., 1986). Apenas um factor foi identificado com base na sua actividade de ligase, tendo sido denominado VDJP (do inglês V(D)J Joining Protein; referido em Lewis, 1994). A actividade de ligase desta proteína só pôde ser observada em fragmentos contendo sinais de ligação, pelo que possui a especificidade necessária para estar envolvida na recombinação V(D)J (Lewis, 1994).

2.3 - O TCR na população normal

2.3.1 - Polimorfismos do TCR

As delecções de regiões variáveis foram dos primeiros polimorfismos a serem detectados no genoma do TCR, tanto em murganhos de laboratório (Behlke et al, 1986; Haqqi et al., 1989a., 1989b) como em murganhos selvagens (Pullen et al., 1990; Jouvin-Marche et al., 1989). Polimorfismos mais pontuais foram no entanto também detectados no gene de Vß17 de ratinho, verificando-se que as 2 substituições de aminoácidos afectavam a especificidade final do receptor (Cazenave et al., 1990).

No Homem, apenas uma delecção de Vß foi documentada, consistindo na delecção de Vß6.2 (mas não de qualquer outro dos genes de Vß testados) num único indivíduo venezuelano pertencente à tribo índia waraos (Concanon et al., 1987). No entanto os polimorfismos das regiões variáveis do TCR parecem ser quase universalmente representados, ainda que não frequentes na população (Concanon et al., 1987). Com efeito, uma busca sistemática por RFLP indicou a existência de polimorfismos em 12 das 14 famílias de Vß estudadas (Concanon et al., 1987). Alguns destes polimorfismos podem constituir variações silenciosas, como é o caso de um polimorfismo encontrado em Vß12.2 (Day et al, 1992), outras no entanto afectam a expressão do gene em linfócitos T maduros, como são os

casos dos polimorfismos de Vß1 (Robinson, 1989), Vß18 (Charmley et al., 1993), Vß3 (Posnett et al., 1994a) e Vß6.7 (Posnett et al., 1986; Li et al., 1990; Prashar et al., 1991). Este último com a particularidade de ser detectável com um anticorpo (Posnett et al., 1986), o que permitiu mapear o epítope de ligação do anticorpo numa zona de possível ligação a superantigénios (Prashar et al., 1991). Também o polimorfismo descrito para Vß3 é único, já que este polimorfismo se localiza no espaçador, constituindo assim, o único exemplo conhecido de uma mutação numa zona não codificante do TCR, que afecta a expressão do respectivo gene (Posnett et al., 1994a). Finalmente, a variação alélica identificada no Vß18 é a única que introduz um codão stop, originando um "buraco" no repertório presente em 11% dos indivíduos estudados (Charmley et al., 1993).

Estes dados indicam que mesmo variações moderadas de apenas 1 ou 2 pares de bases nas sequências codificantes ou não codificantes do genoma do TCR podem ter repercussões significativas no repertório do TCR (Vissinga et al., 1994).

2.3.2 - O repertório do TCR nas células CD4 e CD8

É hoje normalmente aceite que o repertório das células CD4 e das células CD8 não é semelhante. Este conhecimento provem do estudo comparativo do repertório do TCR nas células CD4 e CD8, quer em termos da utilização dos segmentos génicos Vß quer dos segmentos génicos Jß. Assim na população sueca e em termos de repertório de regiões variáveis algumas encontram-se mais representadas nas células CD4 que nas células CD8 (Vß5.1, Vß6.7, Vß8, Vß12; Grunewald et al., 1991a). Com excepção da Vß8, este desvio de representação foi também encontrado em células do cordão umbilical (Grunewald et al., 1991a), sugerindo que a maior representação destas regiões variáveis nas células CD4 se forma antes da exposição a antigénios externos. Curiosamente, as mesmas regiões variáveis (Vß5.1, Vß6.7 e Vß12) encontram-se mais representadas em timócitos CD4+CD8- que em timócitos $CD8^{+}CD4^{-}$, sugerindo a existência de um mecanismo de selecção timica como causa provável deste desvio (Grunewald et al., 1991b). Um estudo independente realizado aproximadamente na mesma altura por um grupo italiano, confirmou a maior utilização de Vß6.7 pelos linfócitos CD4 do sangue periférico, não encontrando no entanto o mesmo fenómeno para as restantes cadeias (Cossarizza et al., 1991), o que sugere que indivíduos de "background" genético diferente podem apresentar diferenças no repertório do TCR.

O repertório Jß para os receptores utilizando a região Vß5.1 foi analisado pelo grupo de Wigzell em Estocolmo, tendo sido encontrado idêntico desvio ao descrito para os genes variáveis. Assim, ainda que todos os genes Jß estivessem representadas, Jß1.3, Jß1.4, Jß1.6, Jß2.5 e Jß2.6 eram mais utilizados pelas células CD4 que pelas células CD8, enquanto as células CD8 utilizavam Jß2.7 mais frequentemente que as CD4 (Grunewald et al., 1992a). Um estudo mais recente

efectuado pelo mesmo grupo em que foram estudadas as frequências de associação de cada um dos 13 genes Jß com 6 genes Vß (Vß3, Vß6.1-6.3, Vß8, Vß9, Vß12 e Vß18), revelou uma vez mais que não há combinações proibidas, já que todos os Jß foram encontrados associados a todos os Vß estudadas (Jeddi-Tehrani et al., 1994). Ficou ainda confirmada a existência de maior representatividade de alguns Jß nas células CD4 ou CD8, dependendo do Vß associado. Assim, Jß1.3 e Jß1.6 estavam sempre mais representadas nas células CD4 que nas CD8, mas Jß2.1 estava marcadamente mais representado nas células CD8 quando estas utilizavam Vß8 ou Vß9 (Jeddi-Tehrani et al., 1994).

2.3.3 - O MHC e o repertório do TCR

O rearranjo somático do TCR é um processo que habitualmente falha (Lewis, 1994). Apesar deste facto, este é um processo que funciona, produzindo diariamente milhões de células maduras. Tal é em parte devido à selecção quer positiva quer negativa a que um timócito é sujeito antes de completar o seu programa de maturação. Os detalhes destes processos de selecção, permanecem ainda em grande parte desconhecidos. Sabe-se no entanto que esta selecção ocorre no contexto do MHC. Com efeito, vários grupos apresentaram já evidencia experimental implicando o fenótipo MHC no repertório do TCR (Gulwani-Akokar et al., 1991; Akolkar et al., 1993; Davey et al., 1994; Dersimonian et al., 1991), muito embora as células CD8 aparentem ser menos restritas pelo MHC, sendo mais divergentes em gémeos monozigóticos (Davey et al., 1994).

2.4 - O TCR em situações patológicas

Qualquer processo que induza rearranjos cromossómicos tem o potencial de desorganizar o genoma de forma nociva. Desde muito cedo se reconheceu que o sistema de recombinação V(D)J poderia ter um papel pelo menos em alguns casos de malignidade de células T e B (Tycko & Sklar, 1990; Reis et al., 1991; Korsmeyer, 1992; Lieber, 1993). Uma possibilidade de mecanismo consiste na participação da maquinaria de rearranjo no potenciar de rearranjos oncogénicos (Boehm & Rabbitts, 1989; Tycko & Sklar, 1990), quer por reconhecimento indevido de alvos de recombinação imperfeitos ou crípticos (Aplan et al., 1990; Brown et al., 1990), quer pela doação de um terminal de uma cadeia de DNA correctamente cortada (Bakhshi et al., 1987). Exemplos de ambas as hipóteses existem (Lewis, 1994), tornando difícil o estabelecimento de um mecanismo único de envolvimento da maquinaria de rearranjo V(D)J na geração de malignidade. A sua implicação parece no entanto indubitável em alguns casos de leucemias linfoblásticas das células T (Lewis et al., 1994), bem como em muitos outros tumores linfóides (Tycko & Sklar, 1990; Rabbitts, 1991, Reis et al., 1991; Sawyers et al., 1991; Korsmeyer, 1992; Magrath, 1992).

O carácter monoclonal do rearranjo dos genes do TCR e das imunoglobulinas, permitiu que as técnicas de análise destes genes se tornassem ferramentas úteis na identificação de tumores de células T e B (Rabbitts et al., 1985; O'Connor et

al., 1985; Paslier et al., 1987; Rambaldi et al., 1985; Tawa et al., 1987; Loughran et al., 1988a, 1988b; Furoni et al., 1989; Flug et al., 1985), particularmente na definição da linhagem (O'Connor et al., 1985; Hare et al., 1989), avaliação da progressão da doença e recidiva (Minden et al., 1985; Minden & Mak, 1986; Griesser et al., 1989; Lee et al., 1987). Dois tipos de abordagens foram utilizados: a utilização de anticorpos idiotípicos, reconhecendo na sua maioria epítopes das regiões variáveis do TCR (Royer et al., 1987; Smith et al., 1992; Janson et al., 1991); e a detecção de rearranjos clonais por Southern Blotting (Flug et al., 1985), o que permite a detecção de clones representando pelo menos 1% da população celular em análise (Griesser et al., 1989; Minden et al., 1985). Em alguns casos, como a investigação da linhagem em leucemias linfoblásticas, parece mesmo haver vantagem na utilização conjugada de ambas as técnicas (Hare et al., 1989). Refira-se no entanto que a identificação de monoclonalidade não deve ser imediatamente interpretada como sinónimo de malignidade. Com efeito, em casos de hiperlinfocitoses CD8 com curso benigno foi possível encontrar monoclonalidade (Minden & Mak, 1986; Griesser et al., 1989; Cabeda e Porto, resultados não publicados) sem que tal significasse uma posterior evolução maligna. Alguns autores sugerem mesmo que esta patologia possa ter inicialmente uma expressão policlonal evoluindo posteriormente para uma situação monoclonal (Minden & Mak, 1986) não se observando no processo qualquer sinal de evolução para malignidade (Cabeda e Porto resultados não publicados). No entanto, a detecção de uma população clonal de células em proliferação pode ajudar a discriminar entre um processo reactivo e uma lesão neoplásica ou pré-neoplásica (Griesser et al., 1989).

As mesmas técnicas utilizadas na investigação de clonalidade em doenças linfoproliferativas, têm sido aplicadas à investigação de doenças autoimunes (Tabela 2.1).

Em alguns destes estudos foram encontradas anomalias do repertório devidas quer a diminuição quer a aumento da frequência de utilização de determinados genes variáveis (tabela 2.1). No entanto, nos casos em que a mesma patologia foi investigada por mais que um laboratório, os resultados nem sempre foram concordantes (tabela 2.1). Este facto, de profundas consequências no significado dos resultados, e mesmo das estratégias desenvolvidas, pode ter várias causas, às quais não é certamente alheia a expectativa de encontrar notáveis expansões monoclonais em indivíduos com doenças auto-imunes. Assim, os estudos foram desenvolvidos no sentido de encontrar expansões, descurando os cuidados necessários para controlar todas as variáveis que poderiam estar envolvidas. Com efeito, o numero de indivíduos estudados foi na maior parte dos casos reduzido (tabela 2.1), chegando mesmo alguns autores a apresentar resultados do estudo de um (Uematsu et al., 1991), dois (Santamaria et al., 1994; Conrad et al., 1994) ou três doentes (Oksenberg et al., 1993; Sottini et al., 1991). Se tivermos em consideração a variabilidade

encontrada em indivíduos normais (Posnett et al., 1994), em que foram mesmo encontradas expansões monoclonais (Posnett et al., 1994b; Grunewald et al., 1992b), facilmente se percebe que estudar uma reduzida população de doentes, aumenta largamente a probabilidade de se obter resultados não fiáveis. Pode ainda ver-se na tabela 2.1 que poucos trabalhos tiveram a preocupação de analisar separadamente o repertório em células CD4 e CD8. Este facto, traduz-se, em nossa opinião, numa deficiência já que o repertório destes dois tipos de células é notoriamente diferente (ver secção 2.3.2), e as proporções relativas destas células não são necessariamente as mesmas em indivíduos diferentes (a razão CD4/CD8 dos nossos controlos varia entre 1 e 2.9). Assim, se atendermos a que algumas doenças autoimunes provocam desequilíbrios entre as duas populações T nos locais da lesão (ex. sarcoidose pulmonar) facilmente se compreende que o mero estudo do repertório total das células T pode conduzir a conclusões dependentes meramente das representações relativas das células CD4 e CD8 em determinados indivíduos, não sendo representativa de uma população de doentes. Este factor é tanto mais grave, quando, como já vimos, o número de indivíduos estudados é reduzido, pelo que os resultados podem também não ser representativos das proporções relativas de células CD4 e CD8 numa dada patologia. Finalmente, poucos estudos consideraram o factor HLA como sendo de relevo na definição do repertório das células T em doentes com doenças auto-imunes (tabela 2.1). Esta é uma falha tanto mais grave, quando está amplamente demonstrada não só a influência do HLA no repertório de células T (Gulwani-Akokar et al., 1991; Akolkar et al., 1993; Davey et al., 1994; Dersimonian et al., 1991), mas também a maior frequência de determinados fenótipos HLA em certas doenças autoimunes (Tiwari & Terasaki, 1985). Assim, algumas das diferenças observadas entre os vários estudos citados na tabela 2.1 podem dever-se a diferentes frequências de determinados fenótipos HLA quer na população controlo quer na população doente. Finalmente, há a referir o facto de muitos dos trabalhos incluídos na tabela 2.1 se terem socorrido de tecnologia de PCR semiquantitativo, a qual é notavelmente sensível a pequenas alterações, requer enormes cuidados na sua realização, não se encontrando suficientemente padronizada para assegurar a reprodutibilidade em diferentes laboratórios.

Tendo em atenção estes pontos, o presente trabalho foi planeado e elaborado por forma a que fosse analisado o repertório tanto nas células CD4 como nas células CD8 de um número tão grande quanto possível de controlos e doentes. Os indivíduos envolvidos no estudo foram ainda, sempre que possível, tipados para o HLA.

Tabela 2.1 - Resumo dos estudos do repertório do TCR em doenças autoimunes

Patologia	Material	Trabalho	Repertório T	# doentes	CD4 CD8[a)]	HLA
Doença de Chron	PBMC & LN Humano	Posnett et al., 1990	↑Vß8	24	sim	não
	PBL de gémeos monozigóticos	Gulwani-Akolkar et al., 1994	gémeos discordantes para a doença têm repertório idêntico	4	não	não[b]
Doença de Kawasaki	PBTC Humano	Abe et al., 1992	↑Vß2 e Vß8.1	19	não	não
	PBMC Humano	Pietra et al., 1994	policlonal	28	sim	não
Miastenia Gravis	LNC ratinho	Infante et al., 1992	↑Vß6 em CD4	-	não	-
EAE	TCL de ratinho	Urban et al., 1988	↑Vß8.2 e Vß13 (em clones)	-	não	-
	TLC de cérebro de Lewis rats	Sun et al., 1994	policlonal	-	não	-
	Lewis rats TCC	Gold et al., 1991	↑Vß8.2$^+$CD4$^+$	-	sim	-
Doença Tiroideia Autoimune	TIL Humano	Davies et al., 1992	varia com o doente; ↑Vα	10	não	não
	PBMC & LN Humano	Posnett et al., 1988		n.m.	não	DR3
	TIL Humano	McIntosh et al., 1993	policlonal	12	não	não
Trombocitopenia Púrpura Idiopática	PBMC & LN Humano	Posnett et al., 1988		n.m.	não	não
Psoriase	PBMC & LN Humano	Posnett et al., 1988		n.m.	não	não
IDDM	PBMC & LN Humano	Posnett et al., 1988		n.m.	não	não
	HIIT	Santamaria et al., 1994	↑Vß3	2	sim	não
	HIIT	Conrad et al., 1994	↑Vß7	2	não	não
"Coeliac Disease"	Intestino Humano	Falk et al., 1994	↓ Vδ3		não	não
X-CID	PBMC Humano	Goldman et al., 1992	↓Vα2, Vß5.2+5.3, Vß12 em CD8	6	sim	não
Artrite Reumatóide	PBMC Humano	Posnett et al., 1988	↓Vß5 (não significativa)	n.m	não	não
	Fluido sinovial Humano	Uematsu et al., 1991	↑Vß2.1; Vß3.1	1	não	DR4
	Fluido sinovial Humano	Howell et al., 1991	↑Vß3; Vß14; Vß17	5	não	DR
	Fluido sinovial Humano	Zagon et al., 1994	↑Vß17	49	não	não
	Fluido sinovial Humano	Zwillich et al., 1994	↑Vα28, Vα10, Vα17, Vα18; ↓Vα15	9	não	não
	Fluido e tecido sinovial Humano	Gudmundsson et al., 1992	varia com o individuo	18	sim	não
	Fluido e tecido sinovial Humano	Goronzy et al., 1994	↑ Vß3, Vß14, Vß17 em CD4, depende do HLA	5	sim	sim
	Fluido sinovial Humano + PBMC	Sottini et al., 1991	varia com o doente	3	não	não
	LNC + ST de ratinho	Haqqui et al., 1992	↑Vß6; Vß8.2 ↓Vß2; Vß6; Vß7; Vß8.2; Vß9; Vß18	-	sim	-
	TCC de C577BL/6	Pierce et al., 1994	↑ Vß6 com motivo conservado no CDR3	-	não	-
	ST de DA rats	Erlandsson et al., 1994	↑Vß6, Vß8.2, Vß5 em infiltrados precoces	-	não	-
Esclerose Múltipla	TCC Humanas	Ben-Nun et al., 1991	varia c/ o doente	5	não	não
	TCL Humanas	Wucherpfennig., 1990	↑Vß17; Vß12	n.m.	não	sim
	TCL Humanas	Wucherpfennig., 1994	expansões clonais persistentes	7	não	sim
	Lesões Humanas	Oksenberg et al., 1993	↑Vß5.2 dependente do HLA	3	não	sim
	PBMC + fluido cerebroespinal humano	Droogan et al., 1994	↓Vδ1; Vδ2	127	não	não
	PBMC + fluido cerebroespinal humano	Nick et al., 1995	↓Vδ1		não	não
Lupus eritematoso	clones de ratinho	Mao et al., 1994	Vα policlonal; características comuns em CDR3	-	não	-
	murganhos new zealand	Rozzo et al., 1994	pop. T policlonal em CD4 e em CD8	-	Sim	não
	PBMC Humano	Okubo et al., 1994	↑Vß1; Vß3; Vß4; Vß5.2; Vß16	8	não	não
Sarcoidose pulmonar	PBMC Humano	Tamura et al., 1991	↑Cß1 (no pulmão)	18	não	não
	BAL Humano	Grunewald et al., 1992c	↑Va2.3 mas depende do HLA	11	sim	sim
	BAL Humano	Grunewald et al., 1995	expansões nas células CD8		sim	sim
	BAL Humano	Forrester et al., 1994	varia com o doente		não	não
	BAL & PBMC Humano	Forman et al., 1994	↑Vß5; Vß8; Vß15; Vß16; Vß18		não	não

TIL = Linfócitos infiltrantes no timo ("Thyroid infiltrating lymphocytes")
TCL = Linhas celulares T ("T cell lines")
HIIT = células T Humanas infiltrantes nos "islets" ("Human islets infiltrating T cells")
PBMC = células mononucleares de sangue periférico
PBTC = Células T de sangue periférico ("peripheral blood T cells")
X-CID = X-linked combined imunodeficiency disease
LNC = células de nódulos linfáticos
BAL = Lavado bronco-alveolar
ST = tecido sinovial
EAE=encefalomielite autoimune experimental
IDDM = Diabetes melitus insulino dependente
LN = nódulos linfáticos
LNC = células de nódulos linfáticos
n.m. = não mencionado
TCC = clones de células T

a) Sim = foi estudado separadamente o repertório do TCR nas células CD4 e CD8
Não = o repertório foi estudado globalmente em todos os linfócitos T
b) Uma vez que o estudo foi realizado em gémeos monozigóticos, o efeito do HLA pode ser excluído

3 - OBJECTIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Face à evidencia de que as células T podem ter uma função na regulação do metabolismo do ferro, à associação da HH com o MHC-I, à possível importância das células T $CD8^+$ na homeostase do meio interno, este trabalho teve como objectivo analisar o repertório das células CD4 e CD8 em doentes com HH e indivíduos normais tipados para o HLA. Procurou-se atingir este objectivo geral, esclarecendo os pontos seguintes:

1) Alargar o estudo das subpopulações CD4 e CD8 a doentes com HH de uma outra região geográfica (secção 4, pag. 31).
2) Respondendo às insuficiências reveladas pelo estudo comparativo de vários trabalhos de análise do TCR (tabela 2.1), o segundo objectivo consistiu num estudo exaustivo do repertório numa população alargada de indivíduos controlos, quer de origem Portuguesa, quer de origem Sueca (secção 5, pag. 34), tipados para o HLA.
3) Satisfeitos os dois objectivos anteriores, consideramos estar então aptos a atingir o 3º objectivo: analisar o repertório das células T de doentes com HH (secção 6). Face à considerável variação fenotípica da HH (Niederau et al., 1994; Crawford et al., 1993), constituiu uma preocupação nesta fase, a verificação de possíveis relações entre o repertório das células T e a heterogeneidade clínica da HH (secção 6, pag. 42).
4) Como ultimo objectivo, foi nossa preocupação verificar se as anomalias do repertório T observadas na HH se relacionavam directamente com os polimorfismos genéticos já descritos para as regiões variáveis estudadas (secção 7, pag. 47).

PARTE 2

RESULTADOS

4 - Estudo das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 em doentes com hemocromatose hereditária e indivíduos controlo da região de Estocolmo

Trabalho prévio realizado pelo nosso grupo revelou a existência de uma ligação fisiológica entre os níveis de sobrecarga de ferro observados em doentes com hemocromatose hereditária e as proporções relativas de células CD4 e CD8 no sangue periférico destes doentes (Reimão et al., 1991; Porto et al., 1994). Estes resultados não foram no entanto até ao momento confirmados por outros grupos, nem em outras populações. Assim, o presente trabalho teve como primeiro objectivo a verificação destes resultados em doentes com hemocromatose da região de Estocolmo.

Para tal foram estudados 21 doentes com hemocromatose hereditária, diagnosticados segundo critérios universalmente aceites (ver materiais e métodos), ao cuidado do Dr. Hultcrantz, no Hospital Karolinska em Estocolmo. Um grupo de 17 indivíduos aparentemente saudáveis constituiu o grupo controlo.

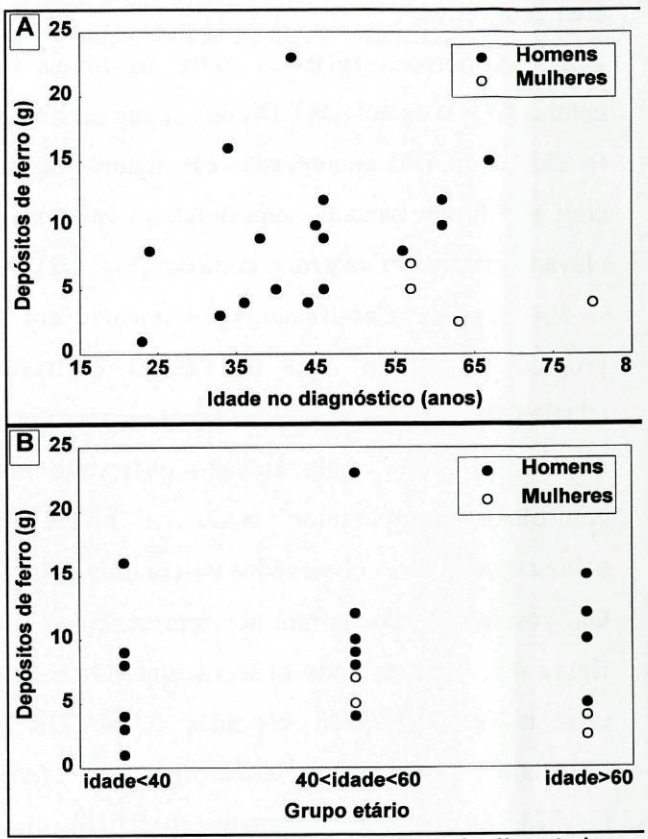


Fig. 4.1 Relação entre a idade na altura do diagnóstico e os níveis de depósitos de ferro na mesma data, em doentes com HH. Indivíduos do sexo masculino são indicados por círculos fechados e os doentes do sexo feminino por círculos abertos.

4.1 - Influência da idade no nível de depósitos de ferro na HH

Uma vez que a HH é uma doença cumulativa, em que tanto os depósitos de ferro, como a sintomatologia clínica se agravam com o tempo (Cox & Lord, 1989), procuramos determinar a influencia da idade dos doentes nos níveis de depósitos de ferro. Como se pode observar na figura 4.1A, apesar de uma ligeira tendência, não foram observadas correlações significativas entre a idade no diagnóstico e os depósitos de ferro, mesmo após exclusão das 4 pacientes do sexo feminino.

Na figura 4.1B separamos os doentes em 3 grupos de acordo com a sua idade (grupo 1: menos de 40 anos; grupo 2: entre 40 e 60 anos; grupo 3 indivíduos com mais de 60 anos de idade). Embora se possa observar um pequeno aumento dos níveis de ferro acumulado com o aumento da idade de cada grupo, este aumento não é no entanto estatisticamente significativo.

4.2 - Influencia da razão CD4/CD8 nos depósitos de ferro em doentes com HH

Procedemos então à análise das subpopulações de linfócitos T nestes doentes, comparando-as com as observadas em indivíduos controlo da mesma área geográfica.

As proporções relativas entre os níveis de células CD4 e de células CD8 do sangue periférico (razão CD4/CD8) encontradas em alguns doentes com HH foram bastante superiores ao valor mais elevado observado no grupo controlo (Fig. 4.2).

Em seguida classificamos os doentes em 2 grupos, de acordo com os valores da razão CD4/CD8: razão inferior a 3 e igual ou superior a 3 (3 foi o valor mais elevado observado nos controlos). Comparamos então os níveis de sobrecarga de ferro observados nestes dois grupos. Os resultados encontram-se representados na figura 4.3, onde se pode observar que os doentes com razões CD4/CD8 elevadas (CD4/CD8≥3) possuíam níveis de sobrecarga de ferro (11.57±5.56) significativamente ($p<0.036$) mais elevados que os indivíduos com razões normais (6.54±4.43).

Utilizamos então a razão CD4/CD8 como factor discriminatório entre os doentes, perguntando então se a evolução dos depósitos de ferro com a idade é diferente nos dois grupos de doentes. Para tal, calculamos a correlação entre a idade no diagnóstico, e os depósitos de ferro nos dois grupos de doentes. Como se pode observar na figura 4.4, os doentes com razões CD4/CD8 normais (<3) apresentaram um significativo aumento progressivo dos depósitos de ferro com a idade no diagnóstico. Já os doentes com razões elevadas apresentaram depósitos de ferro elevados, independentemente da idade em que a doença havia sido detectada.

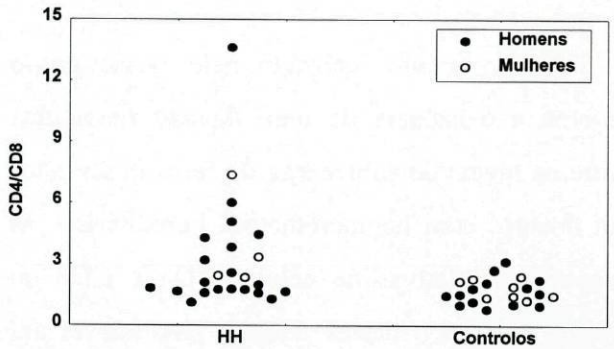


Fig. 4.2 - Razões CD4/CD8 em controlos e doentes com HH. Note-se que alguns doentes apresentam razões bastante superiores ao valor máximo observado nos controlos (3.12).

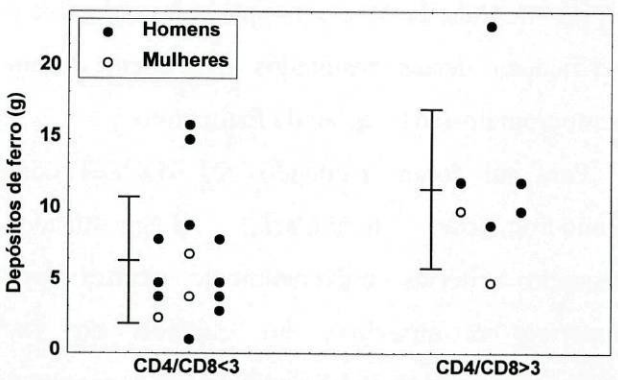


Fig. 4.3 - Depósitos de ferro em doentes com HH com razões CD4/CD8 normais (<3) e elevadas (>=3). Os doentes com razões elevadas apresentam depósitos de ferro significativamente mais elevados que os indivíduos com razões normais.

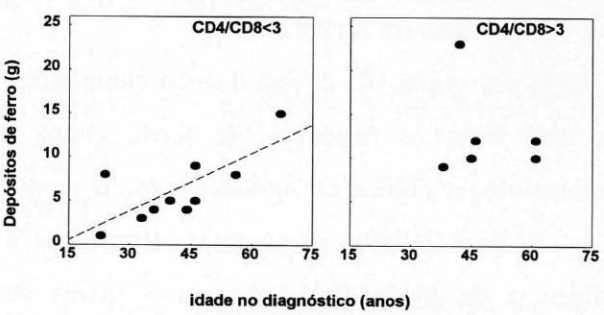


Fig. 4.4 - Depósitos de ferro em doentes do sexo masculino com razões CD4/CD8 normais (<3) e elevadas (>=3), em função da idade no diagnóstico. Ao contrário dos doentes com razões elevadas, os doentes com razões normais apresentam uma correlação significativa entre a idade e os depósitos de ferro ($R=0.74$; $p<0.014$)

4.3 - Ponto da situação

Dos resultados descritos neste capítulo, pode concluir-se que os resultados previamente publicados por Reimão et al (1991) e Porto et al. (1994) são extensíveis aos hemocromatóticos suecos. Assim, parece haver uma relação entre os depósitos de ferro observados em doentes com hemocromatose e a proporção de células CD4 e CD8 existente no sangue periférico destes doentes. O presente trabalho permite verificar que esta relação não se restringe a populações discretas, já que foi observada em duas populações europeias não relacionadas.

Os dados do presente trabalho sugerem ainda que a relação geralmente aceite entre a idade e o nível dos depósitos de ferro na hemochromatose hereditária é dependente da razão CD4/CD8. Com efeito, se esta relação era estatisticamente significativa nos indivíduos com razões CD4/CD8 inferiores a 3, não foi observada qualquer correlação entre estas duas variáveis nos indivíduos com razões CD4/CD8 superiores a 3.

5 - *Estudo dos valores normais do repertório das células T: Nova relação entre o fenótipo HLA-A3 e os níveis de linfócitos Vß6.7$^+$CD8$^+$ no sangue periférico de indivíduos normais*

Uma vez confirmada a existência, em doentes com hemocromatose, de um balanço anormal das células CD4 e CD8 no sangue periférico e sua relação com a sobrecarga de ferro, procuramos analisar se era possível definir subpopulações de células CD4 e CD8 (de acordo com o TCR expresso) associadas a este fenómeno.

Para tal foi necessário realizar um extenso estudo de definição dos valores normais da população. Neste estudo foi analisado o repertório de 12 produtos de genes Vαβ do TCR em 83 indivíduos saudáveis (61 Portugueses e 22 Suecos). Dos 83 indivíduos estudados 56 foram fenotipados para o HLA (A3$^+$=32%; A2$^+$=48%).

5.1 - Expansões e uso preferencial em células CD4$^+$ ou CD8$^+$

Os resultados obtidos para a frequência de expressão de cada produto génico TCR-Vαβ estudado nos 83 indivíduos analisados foram utilizados para compilar uma tabela de valores de referência para as populações Portuguesa e Sueca. Dada a inexistência de diferenças significativas entre as duas populações, os indivíduos de ambas as nacionalidades foram analisados num único grupo (tabela 5.1). Estes valores de referência foram então utilizados para definir expansões pontuais. Foram consideradas expansões os valores que excedessem a média 1.96 x SD. (limite superior para 95% dos valores de uma distribuição normal).

Como pode ser observado na tabela 5.2, foi encontrado um total de 29 expansões, ocorrendo a maioria nas células CD8 (n=18). Nestas, os

Tabela 5.1 - Expressão dos genes TCR-Vαβ estudados

	CD4 a)c)		CD8 b)c)	
Vα2.	3.58±1.86 - 7.23	(57)	4.31±4.43 - 12.97	(58
Vα12.	2.74±1.07 - 4.84	(14)	6.93±3.38 - 13.57	(15
Vß	8.58±3.11 - 14.68	(18)	5.40±2.80 - 10.89	(17
Vß	3.11±2.17 - 7.36	(24)	5.18±4.54 - 14.08	(25
Vß5.	5.28± 3.87 - 12.87	(60)	3.64±5.70 - 14.81	(58
Vß5.2+5.	2.85±0.73 - 4.30	(60)	3.57±3.12 - 9.69	(59
Vß5.	1.36±0.90 - 3.12	(67)	1.71±2.73 - 7.06	(74
Vß6.	4.41± 1.66 - 7.66	(74)	2.17±1.53 - 5.17	(72
Vß	5.57± 2.44 - 10.35	(65)	5.04±3.83 - 12.53	(66
Vß1	2.21±0.83 - 3.84	(68)	2.70±4.02 - 10.58	(66
Vß1	2.74±1.41 - 5.50	(16)	2.57±1.68 - 5.86	(15
Vß1	6.22± 1.23 - 8.63	(17)	6.43±4.15 - 14.56	(18

a) Percentagem das células CD4 que expressam cada um dos TCR-Vαβ indicados (% relativa; ver materiais e métodos)
b) Percentagem das células CD4 que expressam cada um dos TCR-Vαβ indicados (% relativa; ver materiais e métodos)
c) média ± 1 SD - limite máximo para 95% de confiança (numero de indivíduos testados). O limite máximo para 95% de confiança foi calculado como a média + 1.96 SD.

Tabela 5.2 - Frequência de expansões TCR-Vαβ em células CD4 e CD8 de indivíduos normais

	CD4		CD8	
	na)	idade b)	na)	idade b)
Vα2.3	2/57	86 (83 - 89)	4/59	72 (28 - 89)
Vα12.1	0		1/15	40
Vß2	0		0	
Vß3	0		1/15	82
Vß5.1	1/60	32	1/59	32
Vß5.2+5.3	1/59	92	2/59	58 (28 - 88)
Vß5.3	2/78	92 (88 - 96)	1/80	88
Vß6.7	1/74	89	3/76	87 (84 - 89)
Vß8	2/65	55 (45 - 66)	3/66	49 (45 - 52)
Vß12	2/68	90 (84 - 96)	1/68	81
Vß13	0		0	
Vß19	0		1/18	38
Total	11		18	

a) número de indivíduos com utilização de TCR-Vß superior ao valor máximo indicado na tabela 4.1 / número total de indivíduos estudados.
b) idade média (idade mínima e máxima) dos indivíduos com as expansões indicadas.

Tabela 5.3 - Variabilidade da expressão de genes TCR-Vαβ segundo a idade

	CD4			CD8		
	idade < 40 [b]	40 < idade < 60 [b]	idade >60 [b]	idade < 40 [b]	40 < idade < 60 [b]	idade >60 [b]
Vα2.3	2.95 ± 0.95 [32%] (19)	2.97 ± 1.05[35%] (12)	3.86 ± 1.71[44%] (12)	2.57 ± 1.30[51%] (18)	3.49 ± 2.61[75%] (14)	3.53 ± 3.088[88%] (11)
Vα12.1	2.60 ± 0.66[25%] (4)	2.26 ± 1.05[46%] (5)	2.80 (1)	7.73 ± 3.25[42%] (4)	4.96 ± 3.14[63%] (5)	5.00 (1)
Vß2	7.02 ± 1.40[20%] (6)	8.37 ± 4.47[53%] (6)	8.90 (1)	3.33 ± 2.37[71%] (6)	7.02 ± 1.52[22%] (5)	2.10 (1)
Vß3	3.63 ± 2.12[58%] (6)	3.04 ± 1.92[63%] (5)	2.10 ± 2.25[107%] (9)	3.05 ± 2.36[77%] (6)	5.43 ± 3.79[70%] (6)	4.89 ± 5.68[116%] (8)
Vß5.1	4.40 ± 1.41[32%] (19)	4.31 ± 2.03[47%] (13)	6.07 ± 1.48[24%] (14)	2.10 ± 0.97[46%] (19)	2.77 ± 2.08[75%] (12)	3.86 ± 3.11[83%] (14)
Vß5.2+5.3	2.82 ± 0.48[17%] (20)	2.55 ± 0.75[29%] (12)	2.77 ± 0.70[25%] (13)	3.10 ± 1.29[42%] (17)	2.81 ± 2.03[72%] (14)	2.79 ± 1.49[53%] (13)
Vß5.3	1.12 ± 0.42[38%] (26)	1.06 ± 0.29[27%] (18)	1.27 ± 0.62[50%] (14)	1.19 ± 0.71[60%] (26)	1.10 ± 1.07[97%] (21)	1.75 ± 1.33[76%] (14)
Vß6.7	4.33 ± 1.59[37%] (25)	4.15 ± 1.83[44%] (18)	4.51 ± 1.32[29%] (12)	1.56 ± 0.73[47%] (26)	2.03 ± 1.24[61%] (19)	1.95 ± 1.29[66%] (11)
Vß8	4.79 ± 1.23[26%] (21)	5.33 ± 1.47[28%] (17)	5.46 ± 1.88[34%] (8)	3.90 ± 1.97[51%] (21)	4.02 ± 2.09[52%] (14)	5.46 ± 3.23[59%] (10)
Vß12	1.88 ± 0.41[22%] (25)	2.16 ± 0.69[32%] (14)	2.22 ± 0.71[32%] (12)	1.29 ± 0.44[34%] (25)	2.38 ± 2.16[91%] (15)	3.59 ± 2.88[80%] (12)
Vß13	3.16 ± 1.63[52%] (5)	2.30 ± 0.61[27%] (5)	1.6 (1)	3.00 ± 1.91[64%] (4)	2.18 ± 0.96[44%] (5)	0.50 (1)
Vß19	5.75 ± 0.92[16%] (6)	6.32 ± 1.82[29%] (5)	5.00 (1)	6.46 ± 2.88[45%] (5)	5.42 ± 3.71[68%] (6)	1.70 (1)
CV médio (intervalo)	31% (16-58)	38% (27-63)	43% (24-107)	53% (34-77)	66% (22-97)	78% (53-116)

a) note-se que as expansões foram excluídas destes dados.
b) são indicadas a média ± 1 SD.., coeficiente de variação[] e número de observações().

produtos de genes variáveis mais frequentemente expandidos foram Vα2.3 (4 casos), Vß6.7 (3 casos) e Vß8 (3 casos). A maioria das expansões foram observadas em indivíduos idosos (>80 anos).

Excluindo o efeito das expansões, foi observada uma maior variação interindividual nas células CD8 que nas células CD4, a qual aumentava com a idade (tabela 5.3), como é notório das médias dos coeficientes de variação (fundo da tabela 5.3). Note-se ainda que o coeficiente de variação global mais baixo observado no repertório das células CD8 (53% no grupo com menos de 40 anos) era mais elevado que o mais alto coeficiente de variação observado para o repertório das células CD4 (43% no grupo com mais de 60 anos; tabela 5.3). Se utilizarmos como limite o valor do coeficiente de variação (CV) global mais baixo nas células CD8 (53%), pode observar-se que nas células CD4, apenas o Vß3 ultrapassa este limite em todos os grupos etários. Já nas células CD8, o numero de genes Vαβ cuja variação interindividual é superior a 53% é de: 4 em 12 nos indivíduos com menos de 40 anos (Vß2, Vß3, Vß5.3 e Vß13), 9 em 12 nos indivíduos com idades compreendidas entre 40 e 60 anos (Vα2.3, Vα12, Vß3, Vß5.1, Vß5.2+5.3, Vß5.3, Vß6.7, Vß12 e Vß19), 7 em 8 nos indivíduos com mais de 60 anos (a única excepção é o Vß5.2+5.3 que tem precisamente 53%).

Como pode observar-se na tabela 5.4 e figura 5.1, os repertórios das células CD4 e CD8 são diferentes. Com efeito, alguns produtos de genes TCR-Vαβ foram encontrados com maior frequência nas células CD4 que nas CD8 (Vß2, Vß5.1, Vß6.7 e Vß8), enquanto outros eram mais frequentes nas células CD8 que nas células CD4 (Vα12.1 e Vß3).

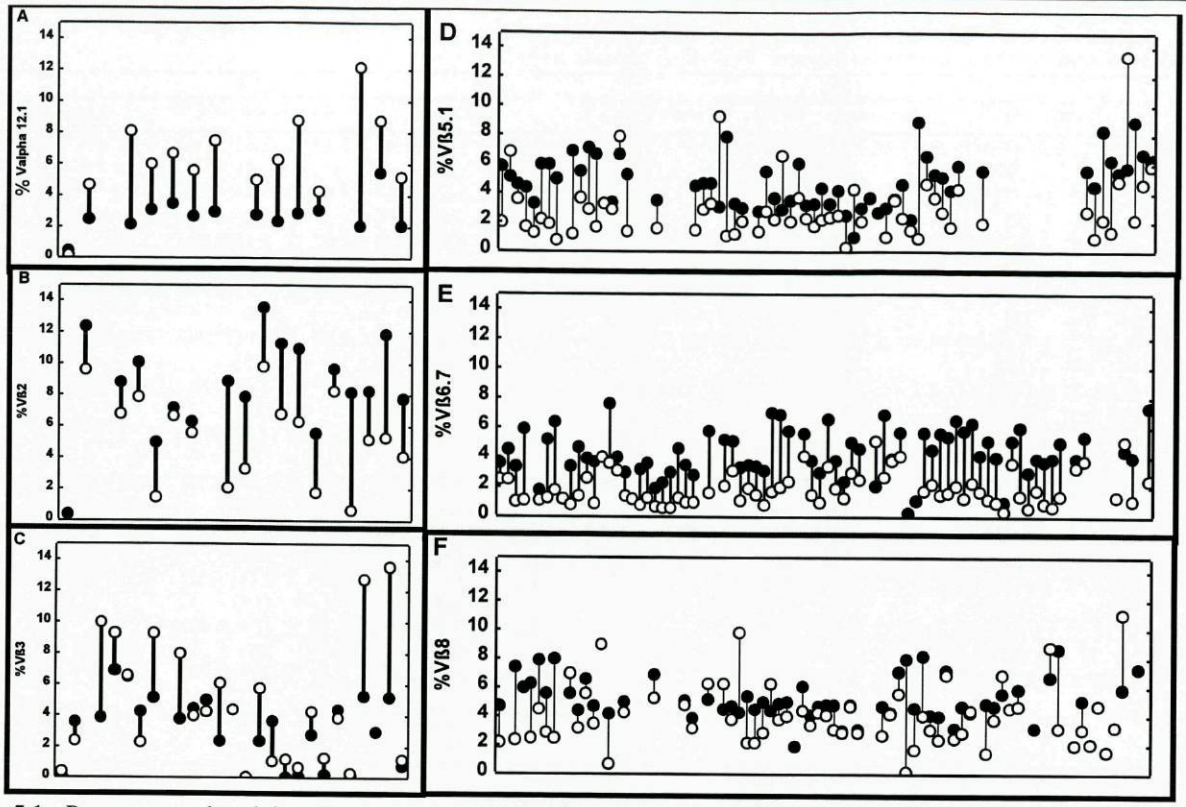


Fig. 5.1 - Percentagem de células CD4 (círculos cheios) e CD8 (círculos abertos) que expressam Va12.1 (A), Vß2 (B), Vß3 (C), Vß5.1(D), Vß6.7 (E) e Vß8 (F) nos vários indivíduos testados (eixo horizontal).

5.2 - Influência da frequência relativa das células CD4 e CD8, e do HLA na homeostasia do repertório do TCR

A existência de uma maior variação interindividual na frequência de produtos génicos de TCR-Vαβ entre as células CD8, poderá entre outras causas resultar de: a) variações nas percentagens de células CD8 e não de CD4; b) variações nas células CD8 e não nas CD4 relacionadas com a presença de determinados fenótipos HLA.

a) Variações na percentagem total de células CD8

O coeficiente de variação para a percentagem total de células CD8 observado (30%) foi superior ao encontrado para a percentagem total de células CD4 (17%). No intuito de analisar se esta variabilidade pode influenciar a fracção das células que expressam genes TCR-Vαβ calculamos para cada indivíduo a percentagem total de linfócitos T ($CD3^+$) simultaneamente positivos para CD8 (ou CD4) e cada um dos TCR-Vαβ estudados. Os resultados foram comparados entre indivíduos com percentagens de CD4 menores ou maiores que 50% (tabela 5.5) e entre indivíduos com percentagens de CD8 maiores ou menores que 20% (tabela 5.6). Como se pode ver

Tabela 5.4 - Expressão diferencial de produtos de genes TCR Vαβ entre as células CD4 e CD8 de indivíduos normais.

	a) p	
Vα2.3	n.s.	
Vα12.1	0.000251	mais expresso em células CD8
Vß2	0.000001	mais expresso em células CD4
Vß3	0.013749	mais expresso em células CD8
Vß5.1	0.000002	mais expresso em células CD4
Vß5.2+5.3	n.s.	
Vß5.3	n.s.	
Vß6.7	0.0000001	mais expresso em células CD4
Vß8	0.000324	mais expresso em células CD4
Vß12	n.s	
Vß13	n.s.	
Vß17	n.s.	

a) nível de significância num teste t de Student
n.s. - Não significante.

Tabela 5.5 - Influência da %CD4 na percentagem de linfócitos T ($CD3^+$) simultaneamente positivos para CD4 e os TCR-V estudados (percentagem total)

	TODOS[a)]	CD4<50%[a)]	CD4≥50%[a)]
Vα2.3	2.2 ± 1.43 (58)	2.3 ± 1.51 (45)	1.8 ± 1.06 (13)
Vα12.1	1.4 ± 0.51 (13)	1.3 ± 0.47 (11)	2.0 ± 0.30 (2)
Vß2	5.0 ± 1.98 (20)	4.7 ± 2.00 (16)	6.4 ± 1.28 (4)
Vß3	1.8 ± 1.43 (26)	1.7 ± 1.33 (22)	2.6 ± 1.92 (4)
Vß5.1	3.0 ± 1.14 (59)	3.0 ± 1.05 (46)	3.0 ± 1.48 (13)
Vß5.2+5.3	1.8 ± 0.59 (55)	1.8 ± 0.51 (42)	1.9 ± 0.78 (13)
Vß5.3	0.8 ± 0.32 (74)	0.8 ± 0.34 (57)	0.8 ± 0.26 (17)
Vß6.7	2.8 ± 0.94 (65)	2.8 ± 0.87 (51)	2.9 ± 1.19 (14)
Vß8	3.3 ± 1.17 (57)	3.1 ± 0.98 (45)	4.0 ± 1.61 (12)
Vß12	1.3 ± 0.41 (64)	1.3 ± 0.40 (50)	1.5 ± 0.39 (14)
Vß13	1.5 ± 0.79 (17)	1.4 ± 0.63 (13)	1.6 ± 1.31 (4)
Vß19	3.5 ± 0.94 (18)	3.3 ± 0.88 (15)	4.6 ± 0.21 (3)

a) são indicadas a média± 1 SD. (n). Note-se que não foram encontradas diferenças significativas entre os indivíduos com CD4<50% e os indivíduos com CD4≥50%.

Tabela 5.6 - Influência da %CD8 na percentagem de linfócitos T ($CD3^+$) simultaneamente positivos para CD4 e os TCR-V estudados (percentagem total)

	TODOS[a)]	CD8<20%[a)]	CD8≥20%[a)]
Vα2.3	1.12± 0.62 (55)	0.98± 0.80 (13)	1.16± 0.56 (42)
Vα12.1	2.74± 1.50 (14)	1.63 (1)	2.82± 1.53 (13)
Vß2	2.07± 1.03 (19)	2.16 (1)	2.06± 1.06 (18)
Vß3	1.58± 1.36 (26)	1.81± 1.44 (5)	1.53± 1.37 (21)
Vß5.1	1.02± 0.70 (58)	0.98± 0.88 (14)	1.04± 0.65 (44)
Vß5.2+5.3	1.06± 0.65 (56)	0.78± 0.30 (13)	1.15± 0.71 (43)
Vß5.3	0.49± 0.40 (72)	0.38± 0.23 (18)	0.53± 0.44 (54)
Vß6.7	0.69± 0.36 (67)	**0.49± 0.34 (16)**[b)]	**0.70± 0.37 (51)**[b)]
Vß8	1.43± 0.84 (55)	1.27± 0.79 (12)	1.47± 0.85 (43)
Vß12	0.72± 0.73 (65)	0.72± 0.52 (17)	0.72± 0.80 (48)
Vß13	0.85± 0.47 (16)	0.61 (1)	0.86± 0.49 (15)
Vß19	2.37± 1.32 (19)	1.22 (1)	2.44± 1.33 (18)

a) são indicadas a média±SD. (n)
b) diferença significativa ($p<0.03$) entre os indivíduos com CD8<20% e os indivíduos com CD8≥20%

na tabela 5.5, o repertório das células CD4 nos indivíduos com CD4<50% ou CD4>50% eram indistinguíveis. Já o repertório das células CD8 apresentava diferenças entre os indivíduos com CD8<20% e os indivíduos com CD8>20%. Com efeito, a expressão de TCR-Vβ6.7 era significativamente ($p<0.03$) menor nos indivíduos com CD8<20% (tabela 5.6).

b) Variações nas células CD8 relacionadas com o fenótipo HLA-A3

Dividimos então a população controlo de acordo com a presença do fenótipo HLA-A3 (dada a sua relevância no estudo da hemocromatose hereditária) e HLA-A2 (utilizado como controlo uma vez que está presente em quase 50% da população). Como pode ser observado na tabela 5.7, não foram observadas diferenças significativas nas percentagens de linfócitos T $CD4^+$-TCR-V^+ relacionadas quer com o fenótipo HLA-A3 quer com o fenótipo HLA-A2 (tabela 5.7). Em contraste, quer a %$CD8^+$Vß5.3^+ quer a %$CD8^+$Vß6.7^+ eram significativamente menores nos indivíduos HLA-$A3^+$ que nos indivíduos HLA-$A3^-$ (tabela 5.8). A divisão dos

Tabela 5.7 - Influência do fenótipo HLA e %CD4 na percentagem de linfócitos T ($CD3^+$) simultaneamente positivos para CD4 e os TCR-Vαβ estudados (percentagem total)

		A2			A3		
		+	-	p	+	-	p
TODOS	Vα2.3	1.47±0.39 (13)	1.64±0.61 (13)	n.s.	1.59±0.52 (10)	1.52±0.52 (16)	n.s.
	Vα12.1		1.38±1.12 (2)	n.s.	1.93 (1)	0.35 (1)	n.s.
	Vβ2	1.48±1.74 (2)	4.76±1.21 (3)	n.s.	2.72 (1)	3.64±2.46 (4)	n.s.
	Vβ3	1.82±2.42 (2)	1.23±0.77 (3)	n.s.	3.53 (1)	0.95±0.84 (4)	n.s.
	Vβ5.1	2.66±0.92 (14)	2.34±0.84 (13)	n.s.	2.62±0.91 (11)	2.43±0.88 (16)	n.s.
	Vβ5.2+5.3	1.76±0.42 (14)	2.00±0.64 (11)	n.s.	1.79±0.69 (11)	1.93±0.39 (14)	n.s.
	Vβ5.3	0.78±0.18 (17)	0.83±0.25 (20)	n.s.	0.76±0.18 (18)	0.83±0.25 (20)	n.s.
	Vβ6.7	2.64±1.01 (18)	2.99±0.87 (18)	n.s.	2.59±0.91 (17)	3.01±0.93 (20)	n.s.
	Vβ8	3.49±1.33 (15)	3.16±0.92 (15)	n.s.	3.29±0.60 (11)	3.35±1.37 (19)	n.s.
	Vβ12	1.25±0.32 (17)	1.40±0.31 (17)	n.s.	1.26±0.33 (16)	1.37±0.31 (18)	n.s.
	Vβ13	1.62±0.46 (2)	1.95±1.45 (3)	n.s.	1.95 (1)	1.78±1.22 (4)	n.s.
	Vβ19	2.92±0.63 (2)	3.62±1.12 (3)	n.s.	2.47 (1)	3.56±0.93 (4)	n.s.
CD4<50%	Vα2.3	1.48±0.42 (11)	1.63±0.66 (8)	n.s.	1.75±0.54 (6)	1.45±0.51 (13)	n.s.
	Vα12.1		1.38±1.12 (2)	n.s.	1.93 (1)	0.35 (1)	n.s.
	Vβ2	1.48±1.74 (2)	4.24±1.12 (2)	n.s.	2.72 (1)	2.91±2.43 (3)	n.s.
	Vβ3	1.82±2.41 (2)	0.85±0.57 (2)	n.s.	3.52 (1)	0.60±0.59 (3)	n.s.
	Vβ5.1	2.63±0.97 (12)	2.34±0.77 (8)	n.s.	2.64±0.73 (7)	2.45±0.98 (13)	n.s.
	Vβ5.2+5.3	1.67±0.39 (12)	2.03±0.25 (6)	n.s.	1.67±0.43 (7)	1.87±0.35 (11)	n.s.
	Vβ5.3	0.79±0.18 (16)	0.79±0.29 (13)	n.s.	0.725±0.15 (12)	0.84±0.27 (17)	n.s.
	Vβ6.7	2.73±1.04 (16)	2.95±0.91 (12)	n.s.	2.53±1.01 (11)	3.01±0.93 (17)	n.s.
	Vβ8	3.22±0.73 (13)	3.05±1.00 (10)	n.s.	3.18±0.62 (7)	3.13±0.93 (16)	n.s.
	Vβ12	1.18±2.82 (15)	1.34±0.34 (11)	n.s.	1.15±0.30 (11)	1.31±0.31 (15)	n.s.
	Vβ13	1.62±0.46 (2)	1.12±0.27 (2)	n.s.	1.95 (1)	1.18±0.22 (3)	n.s.
	Vβ19	2.92±0.63 (2)	3.01±0.57 (2)	n.s.	2.47 (1)	3.13±0.45 (3)	n.s.
CD4≥50%	Vα2.3	1.38±0.15 (2)	1.65±0.60 (5)	n.s.	1.36±0.46 (4)	1.84±0.52 (3)	n.s.
	Vα12.1			n.s.			n.s.
	Vβ2		5.81 (1)	n.s.		5.81 (1)	n.s.
	Vβ3		1.98 (1)	n.s.		1.98 (1)	n.s.
	Vβ5.1	2.84±0.78 (2)	2.33±1.05 (5)	n.s.	2.56±1.31 (4)	2.34±0.26 (3)	n.s.
	Vβ5.2+5.3	2.30±0.11 (2)	1.97±0.77 (5)	n.s.	1.99±1.07 (4)	2.16±0.51 (3)	n.s.
	Vβ5.3	0.66 (1)	0.90±0.16 (7)	n.s.	0.85±0.21 (6)	0.82±0.14 (3)	n.s.
	Vβ6.7	1.95±0.27 (2)	3.09±0.85 (6)	n.s.	2.69±0.76 (6)	2.99±1.13 (3)	n.s.
	Vβ8	5.30±3.28 (2)	3.37±0.79 (5)	n.s.	3.48±0.60 (4)	4.50±2.81 (3)	n.s.
	Vβ12	1.71±0.27 (2)	1.50±0.23 (6)	n.s.	1.51±0.26 (5)	1.63±0.09 (3)	n.s.
	Vβ13		3.60 (1)	n.s.		3.60 (1)	n.s.
	Vβ19		4.83 (1)	n.s.		4.83 (1)	n.s.

são indicadas a média±SD. (n)

indivíduos em 2 grupos, de acordo com a percentagem de células CD8 circulantes, revelou que esta diferença era apenas significativa entre os indivíduos com baixa %CD8 (<20%; tabela 5.8).

Apesar de os valores médios da expressão de Vα2.3 serem diferentes nos indivíduos $A3^-$ e $A3^+$, a variação observada foi frequentemente da mesma ordem de grandeza da média, pelo que as diferenças observadas não atingiram significado estatístico (tabela 5.8).

No intuito de verificar se o factor determinante nesta diferença eram os números de células CD8 circulantes, calculamos a fracção das células CD8 que expressavam cada um dos TCR-Vαβ estudados (percentagem relativa; ver nomenclatura em materiais e métodos), e calculamos a correlação entre esta variável e a percentagem de células CD8 circulantes. Os resultados estão representados nas figuras 5.2 e 5.3, onde se pode ver que a %CD8 se relaciona inversamente com a

Tabela 5.8 - Influência do fenótipo HLA e %CD8 na percentagem de linfócitos T ($CD3^+$) simultaneamente positivos para CD8 e os TCR-Vαβ estudados (percentagem total)

		A2			A3		
		+	-	p	+	-	p
TODOS	Vα2.3	0.98±0.78 (13)	0.94±0.57 (13)	n.s.	0.62±0.59 (10)	1.30±0.79 (15)	n.s.
	Vα12.1			n.s.		1.59±2.14 (2)	n.s.
	Vß2	0.70 (1)	1.72±0.21 (3)	n.s.		1.14±0.62 (2)	n.s.
	Vß3	1.63±2.07 (2)	0.73±0.52 (3)	n.s.		1.51±1.46 (3)	n.s.
	Vß5.1	0.91±0.60 (13)	0.77±0.59 (12)	n.s.	0.89±0.60 (10)	0.81±0.60 (14)	n.s.
	Vß5.2+5.3	1.35±0.76 (13)	0.83±0.29 (13)	n.s.	0.84±030 (9)	1.23±0.75 (16)	n.s.
	Vß5.3	0.43±0.23 (18)	0.36±0.18 (20)	n.s.	**0.32±0.15 (18)**	**0.43±0.23 (22)**	**0.03**
	Vß6.7	0.60±0.29 (18)	0.54±0.23 (19)	n.s.	**0.41±0.24 (18)**	**0.70±0.25 (22)**	**0.02**
	Vß8	1.54±0.77 (14)	1.14±0.57 (14)	n.s.	1.43±0.94 (11)	1.39±0.63 (20)	n.s.
	Vß12	0.53±0.15 (17)	0.47±0.14 (17)	n.s.	0.44±0.09 (16)	0.54±0.18 (7)	n.s.
	Vß13	0.88 (1)	0.83±0.50 (3)	n.s.		1.08±0.32 (2)	n.s.
	Vß19	2.88±2.17 (2)	2.64±0.63 (3)	n.s.		2.55±1.63 (3)	n.s.
CD8<20%	Vα2.3	0.86±0.60 (3)	0.83±0.90 (4)	n.s.	0.66±0.92 (4)	1.07±0.39 (3)	n.s.
	Vα12.1			n.s.			n.s.
	Vß2			n.s.			n.s.
	Vß3			n.s.			n.s.
	Vß5.1	0.55±0.24 (2)	1.01±0.96 (4)	n.s.	1.02±0.93 (4)	0.48±0.31 (2)	n.s.
	Vß5.2+5.3	1.07±0.32 (3)	0.66±0.24 (3)	n.s.	0.61±0.20 (3)	1.09±0.27 (3)	n.s.
	Vß5.3	0.45±0.32 (5)	0.34±0.14 (7)	n.s.	**0.24±0.07 (6)**	**0.45±0.25 (8)**	**0.02**
	Vß6.7	0.52±0.40 (5)	0.42±0.24 (7)	n.s.	**0.27±0.20 (7)**	**0.55±0.29 (8)**	**0.05**
	Vß8	1.64±1.10 (3)	0.95±0.43 (4)	n.s.	0.78±0.30 (4)	1.39±0.74 (6)	n.s.
	Vß12	0.45±0.99 (4)	0.50±0.11 (5)	n.s.	0.44±0.10 (5)	0.50±0.11 (4)	n.s.
	Vß13			n.s.			n.s.
	Vß19			n.s.			n.s.
CD8≥20%	Vα2.3	1.01±0.85 (10)	0.99±0.42 (9)	n.s.	0.60±0.34 (6)	1.36±0.86 (12)	n.s.
	Vα12.1			n.s.		1.59±2.14 (2)	n.s.
	Vß2	0.70 (1)	1.77±0.21 (3)	n.s.		1.13±0.62 (2)	n.s.
	Vß3	1.63±2.07 (2)	0.73±0.52 (3)	n.s.		1.51±1.46 (3)	n.s.
	Vß5.1	0.97±0.63 (11)	0.65±0.32 (8)	n.s.	0.81±0.33 (6)	0.87±0.63 (12)	n.s.
	Vß5.2+5.3	1.44±0.84 (10)	0.89±0.29 (10)	n.s.	0.96±0.29 (6)	1.26±0.80 (13)	n.s.
	Vß5.3	0.41±0.20 (13)	0.37±0.20 (13)	n.s.	0.36±0.16 (12)	0.42±0.22 (14)	n.s.
	Vß6.7	0.63±0.25 (13)	0.60±0.20 (12)	n.s.	0.49±0.23 (11)	0.61±0.20 (14)	n.s.
	Vß8	1.52±0.73 (11)	1.22±0.62 (10)	n.s.	1.80±1.00 (7)	1.39±0.61 (14)	n.s.
	Vß12	0.56±0.16 (13)	0.46±0.16 (12)	n.s.	0.44±0.10 (11)	0.56±0.20 (13)	n.s.
	Vß13	0.88 (1)	0.83±0.50 (3)	n.s.		1.08±0.32 (2)	n.s.
	Vß19	2.88±2.17 (2)	2.64±0.63 (3)	n.s.		2.55±1.63 (3)	n.s.

são indicadas a média±SD. (n)

fracção das células CD8 que expressam Vß5.3 ou Vß6.7 nos indivíduos HLA-$A3^-$, mas não nos indivíduos HLA-$A3^+$. Desta forma, independentemente do número de células CD8 circulantes, as percentagens totais de células $CD8^+Vß5.3^+$ e $CD8^+Vß6.7^+$ são mantidas a níveis idênticos nos indivíduos HLA-$A3^-$, mas não nos indivíduos HLA-$A3^+$ (tabela 5.9). Não foi observado qualquer relação similar relacionada com o fenótipo HLA-A2 (figuras 5.2 e 5.3)

Tabela 5.9 - Sumário dos dados relevantes da tabela 5.8

		% CD8 [a]		
	HLA	<20%	≥20%	p [b]
$\%CD8^+Vß5.3^+$	$A3^+$	0.24±0.07 (6)	0.45±0.25 (8)	0.02
	$A3^-$	0.49±0.23 (11)	0.61±0.20 (14)	n.s.
$\%CD8^+Vß6.7^+$	$A3^+$	0.27±0.20 (7)	0.49±0.23 (11)	0.05
	$A3^-$	0.55±0.29 (8)	0.61±0.20 (14)	n.s.

a) média±1 SD (numero de indivíduos)
b) valor de significância em teste T de Student
n.s. = não significativo

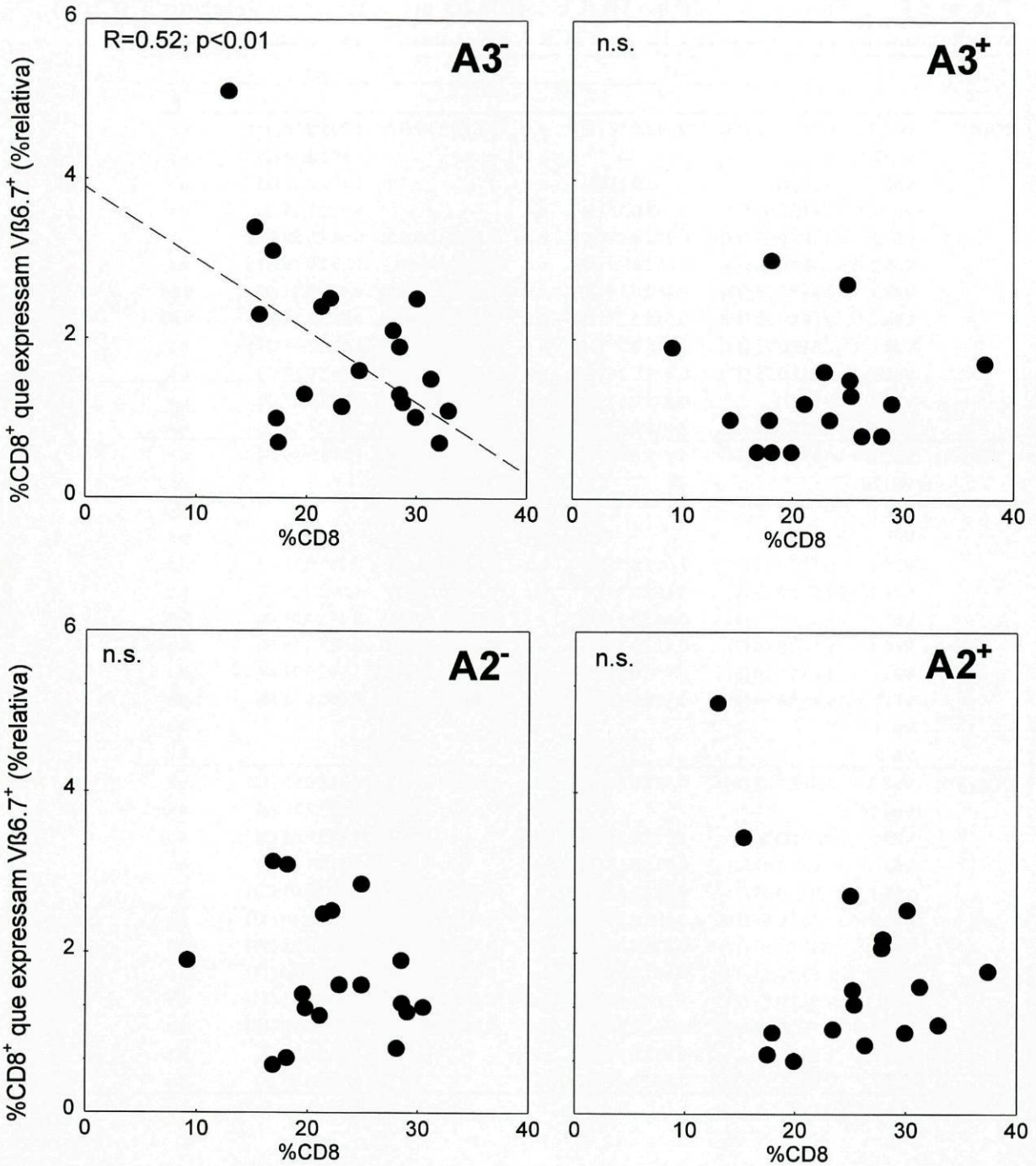


Fig. 5.2 - Correlação entre a percentagem das células CD8 que expressam Vß6.7 (percentagem relativa) e a percentagem de linfócitos $CD8^+$ circulantes. São indicadas separadamente as correlações para os indivíduos $A3^-$, $A3^+$, $A2^-$, e $A2^+$. Os coeficientes de correlação (R) e nível de significância (p) são os indicados. n.s.= não significante.

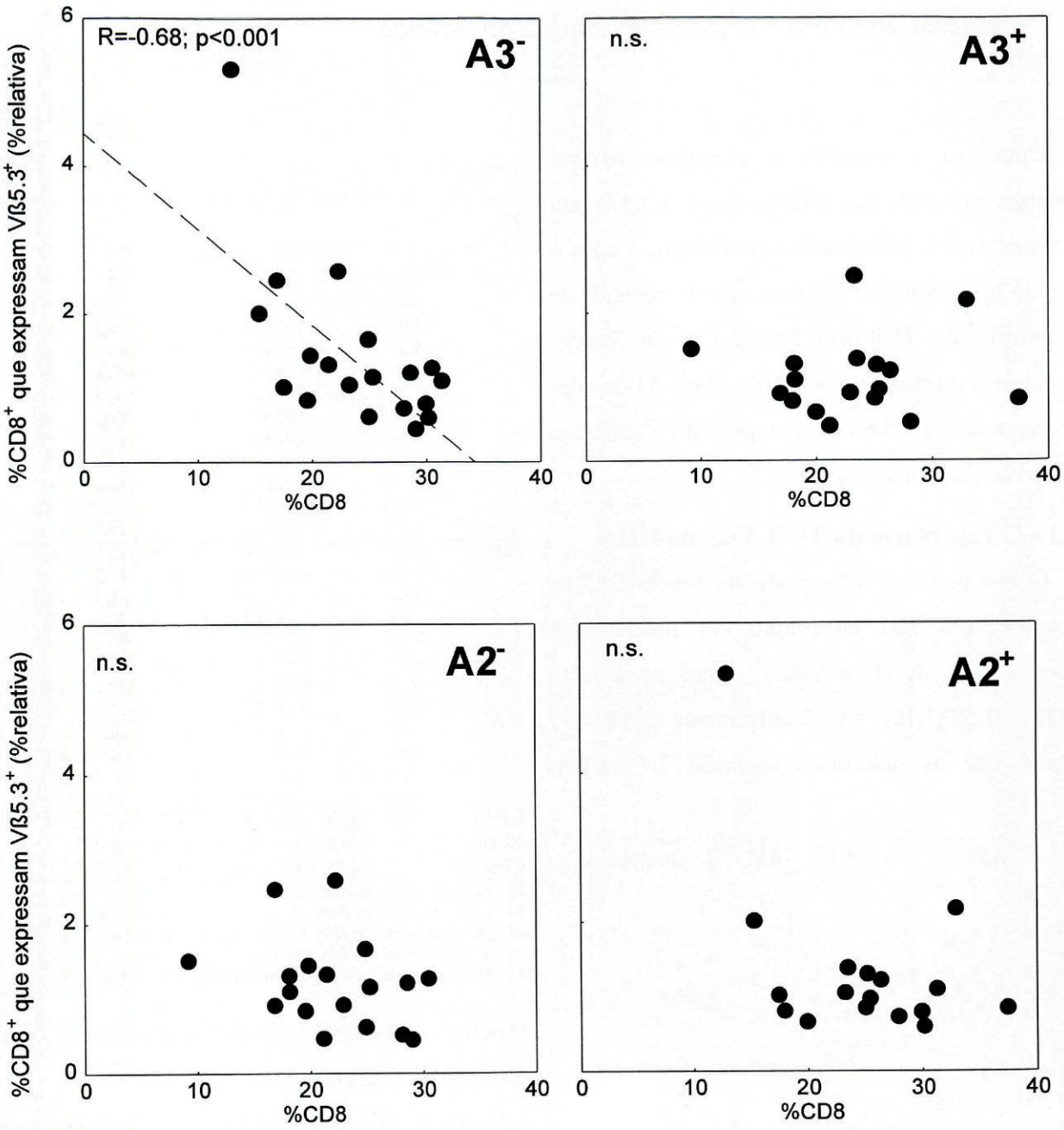


Fig. 5.3 - Correlação entre a percentagem das células CD8 que expressam Vß5.3 (percentagem relativa) e a percentagem de linfócitos $CD8^+$ circulantes. São indicadas separadamente as correlações para os indivíduos $A3^-$, $A3^+$, $A2^-$, e $A2^+$. Os coeficientes de correlação (R) e nível de significância (p) são os indicados. n.s.= não significante.

6 - O repertório do TCR na hemocromatose hereditária: anomalia imunológica relacionada com a expressão clínica da doença

Uma vez confirmada a existência de um balanço anormal das células CD4 e CD8 em doentes com hemocromatose hereditária, e após o estudo que permitiu definir os valores normais do repertório do TCR em Portugal e na Suécia, estudamos o repertório do TCR-αβ em 53 doentes portugueses e suecos, comparando-o com o observado na população controlo.

6.1 - O repertório do TCR-Vαβ na HH

Como pode ser observado na tabela 6.1, os doentes com HH mostraram em média uma percentagem de TCR-Vß6.7$^+$ entre as células CD8$^+$ (1.58±1.10) significativamente (p<0.009) menor que os indivíduos normais (2.17±1.53).

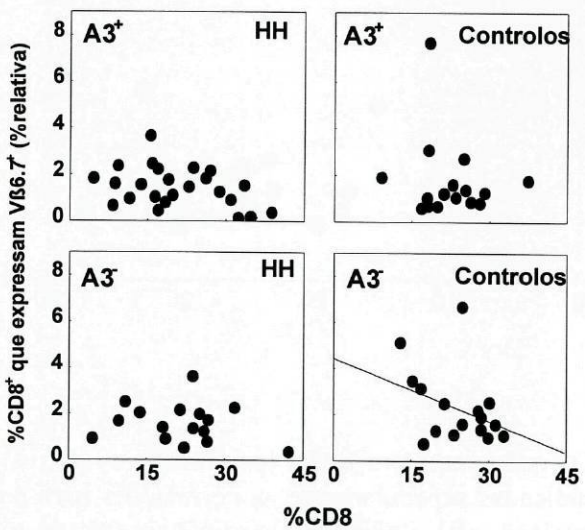


Fig 6.1 - Correlação entre a percentagem das células CD8 que expressam Vß6.7 (percentagem relativa) e a percentagem de linfócitos CD8$^+$ circulantes em doentes (HH) e controlos. São indicadas separadamente as correlações para os indivíduos A3$^-$, A3$^+$, A2$^-$, e A2$^+$. Ver gráfico 5.2 para pormenores das estatísticas referentes à correlação observada para os controlos A3$^-$.

Tabela 6.1 - Expressão de produtos dos genes TCR-Vαβ estudados, em células CD4 e CD8 de controlos e doentes com HH.

		CONTROLOS[a]		HH[a]	
CD4	Vα2.3	3.58±1.86	(57)	3.01±1.39	(37)
	Vα12.1	2.74±1.07	(14)	2.61±1.05	(16)
	Vß2	8.58±3.11	(18)	8.51±2.36	(19)
	Vß3	3.11±2.17	(24)	4.28±2.71	(15)
	Vß5.1	5.28± 3.87	(60)	4.44±2.68	(36)
	Vß5.2+5.3	2.85±0.73	(60)	2.74±0.45	(38)
	Vß5.3	1.36±0.90	(67)	1.07±0.30	(49)
	Vß6.7	4.41± 1.66	(74)	4.52±1.85	(50)
	Vß8	5.57± 2.44	(65)	4.76±1.13	(41)
	Vß12	2.21±0.83	(68)	1.96±0.51	(45)
	Vß13	2.74±1.41	(16)	2.66±1.79	(17)
	Vß17	6.22±1.23	(17)	5.83±1.17	(18)
CD8	Vα2.3	4.31±4.43	(58)	3.11±2.61	(37)
	Vα12.1	6.93±3.38	(15)	5.73±4.01	(16)
	Vß2	5.40±2.80	(17)	5.12±2.37	(19)
	Vß3	5.18±4.54	(25)	4.30±2.56	(16)
	Vß5.1	3.64±5.70	(58)	2.96±3.02	(37)
	Vß5.2+5.3	3.57±3.12	(59)	4.01±6.16	(38)
	Vß5.3	1.71±2.73	(74)	1.02±0.59	(49)
	Vß6.7	**2.17±1.53**	**(72)**	**1.58±1.10**	**(50)[b]**
	Vß8	5.04±3.83	(66)	3.79±2.30	(39)
	Vß12	2.70±4.02	(66)	1.57±0.98	(46)
	Vß13	2.57±1.68	(15)	3.31±4.00	(17)
	Vß17	6.43±4.15	(18)	6.87±5.10	(18)
%CD4		**45.5±7.5**	**(75)**	**50.1±9.5**	**(53)[c]**
%CD8		**24.6±7.1**	**(75)**	**21.6±9.1(53)[d]**	
CD4/CD8		**2.05±0.88**	**(75)**	**3.14±2.51(53)[e]**	

a) são indicados a média ± SD. (n).
b) significativamente diferente dos controlos (p<0.009)
c) significativamente diferente dos controlos (p<0.026)
d) significativamente diferente dos controlos (p<0.037)
e) significativamente diferente dos controlos (p<0.0007)

Todos os restantes produtos de genes Vαβ estudados, apresentaram uma frequência nas células de HH indistinguível da observada nos indivíduos controlo (tabela 6.1).

De seguida, testamos a influência da percentagem total de células CD4 e CD8 no repertório Vαβ em HH. Contrariamente ao observado na população controlo (ver secção 5.2), não foi detectada nenhuma correlação entre a %CD8 e a fracção destas células que expressavam Vß6.7 (Fig 6.1). Este facto foi observado

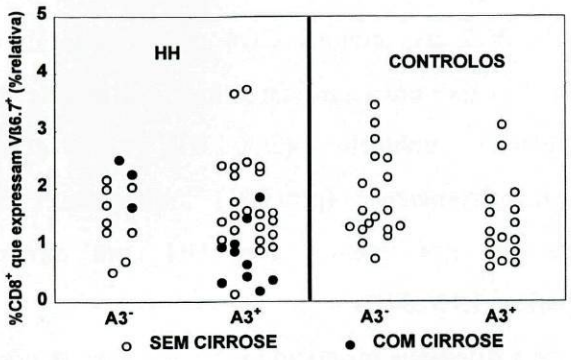


Fig. 6.2 - Expressão de TCR-Vß6.7 em doentes com HH e controlos, de acordo com o fenótipo HLA e a presença de cirrose hepática.

6.3 - O repertório TCR-Vαβ e a expressão clínica da HH

A hemocromatose é uma doença com uma notória heterogeneidade clínica. Alguns doentes tendem a desenvolver rapidamente sintomas severos da sobrecarga de ferro, enquanto em outros a situação clínica permanece ligeira durante muito tempo, sendo mesmo em alguns casos apenas detectada a presença da patologia devido à execução de testes bioquímicos de rotina.

Procuramos assim, estudar uma possível independentemente do fenótipo HLA dos doentes. De igual modo, nenhum dos restantes produtos de genes Vαβ estudados apresentou uma correlação significativa com as %CD4 ou %CD8 nos doentes com HH.

6.2 - O repertório TCR-Vαβ e o MHC

Contrastando com o repertório dos controlos, a baixa expressão de TCR-Vß6.7 nos doentes com HH não se relaciona com o fenótipo HLA-A3. Como pode ser observado na Fig. 6.2, ao contrário dos controlos, foram encontrados valores baixos de TCR-Vß6.7 nas células CD8 de doentes com HH tanto HLA-A3$^+$ como HLA-A3$^-$.

Tabela 6.2 - Expressão de produtos dos genes TCR-Vαβ estudados em células CD4 e CD8 de sangue periférico de controlos e doentes com HH.

		CONTROLOS [a]	HH [a) b)]	
			assintomáticos	com cirrose
CD4	Vα2.3	3.58±1.86 (57)	3.05±1.28 (22)	2.88±1.69 (13)
	Vα12.1	2.74±1.07 (14)	2.68±0.96 (11)	2.26±1.47 (4)
	Vß2	8.58±3.11 (18)	8.03±2.81 (12)	9.46±1.01 (6)
	Vß3	3.11±2.17 (24)	4.44±3.04 (10)	3.89±2.50 (4)
	Vß5.1	5.28± 3.87 (60)	4.75±3.20 (22)	3.88±1.58 (12)
	Vß5.2+5.3	2.85±0.73 (60)	2.80±0.41 (23)	2.69±0.54 (13)
	Vß5.3	1.36±0.90 (67)	1.08±0.23 (27)	1.08±0.34 (13)
	Vß6.7	4.41± 1.66 (74)	4.79±1.91 (28)	4.27±1.97 (13)
	Vß8	5.57± 2.44 (65)	4.82±0.98 (23)	4.65±1.47 (13)
	Vß12	2.21±0.83 (68)	2.05±0.58 (27)	1.80±0.39 (13)
	Vß13	2.74±1.41 (16)	2.41±1.06 (11)	3.32±3.03 (5)
	Vß17	6.22±1.23 (17)	5.66±1.34 (11)	6.19±0.92 (6)
CD8	Vα2.3	4.31±4.43 (58)	3.14±2.05 (22)	2.78±3.46 (13)
	Vα12.1	6.93±3.38 (15)	6.51±4.54 (11)	3.95±2.14 (4)
	Vß2	5.40±2.80 (17)	5.24±2.35 (12)	5.28±2.63 (6)
	Vß3	5.18±4.54 (25)	3.95±1.89 (10)	5.48±3.62 (5)
	Vß5.1	3.64±5.70 (58)	2.68±2.89 (23)	3.76±3.42 (12)
	Vß5.2+5.3	3.57±3.12 (59)	4.91±7.50 (23)	2.76±3.15 (13)
	Vß5.3	1.71±2.73 (74)	1.13±0.60 (28)	0.80±0.46 (13)
	Vß6.7	**2.17±1.53 (72)**	**1.90±1.18 (29)**	**1.06±0.76 (13)** [c)d)]
	Vß8	5.04±3.83 (66)	3.70±1.30 (23)	2.90±1.44 (13)
	Vß12	2.70±4.02 (66)	1.67±0.99 (28)	1.32±1.01 (13)
	Vß13	2.57±1.68 (15)	3.82±4.61 (11)	2.66±2.86 (5)
	Vß17	6.43±4.15 (18)	5.79±3.87 (11)	8.53±7.20 (6)

a) são indicadas a média ± 1 SD. (n).
b)os doentes foram agrupados de acordo com a severidade clínica da doença.
c) significativamente diferente da população controlo ($p<0.005$)
d) significativamente diferente dos doentes assintomáticos ($p<0.018$)

relação entre o repertório do TCR em cada doente, e a heterogeneidade clínica da HH. Para tal, analisamos separadamente doentes assintomáticos e doentes com envolvimento do fígado originando cirrose hepática.

Como se pode ver na tabela 6.2, os resultados obtidos permitiram verificar que a diferença entre indivíduos controlo e doentes com HH descrita na secção 6.1, se deve aos valores muito baixos de células CD8 que expressam TCR-Vß6.7 nos doentes com cirrose. Os doentes assintomáticos não apresentaram diferenças significativas relativamente à população controlo (tabela 6.2).

Uma vez que a HH é uma doença que resulta de uma acumulação de ferro, cuja sintomatologia se agrava com a idade, e o repertório do TCR não parece ser o mesmo em diferentes escalões etários (ver secção 5.1), decidimos comparar a frequência do produto do gene TCR-Vβ6.7 num grupo de doentes com idades superiores a 35 anos e menores que 65 anos. Os resultados neste subgrupo de doentes indicam que os doentes com cirrose hepática possuem uma frequência de expressão de TCR-Vß6.7 nas células CD8 (1.16±0.84) significativamente ($p<0.05$) menor que a observada em doentes assintomáticos (1.79±0.78).

A pergunta seguinte consistia então em saber se a cirrose hepática seria por si só suficiente para explicar a menor expressão de Vß6.7 em células CD8. Para tal analisamos o repertório das células CD8 em 7 doentes com cirrose alcoólica, sem evidência de hemocromatose demonstrada em biopsia hepática. Os resultados obtidos indicam que a frequência de expressão do produto do gene TCR-Vß6.7 nas células CD8 destes indivíduos (3.6±2.3) não era significativamente diferente da população controlo (2.3±1.63), mas era significativamente ($p<0.001$) diferente da observada nos doentes com HH com cirrose hepática (1.18±0.82).

Se a diferença observada entre os doentes com HH e os indivíduos normais fosse devida aos depósitos de ferro, seria de esperar que fosse sendo corrigida com o tratamento, e desaparecesse após a completa remoção dos depósitos de ferro (momento do fim do tratamento intensivo). Para testar se de facto assim acontecia, foram estudados doentes em momentos diferentes do tratamento. Não foi detectada qualquer diferença entre os doentes em tratamento intensivo isto é, com

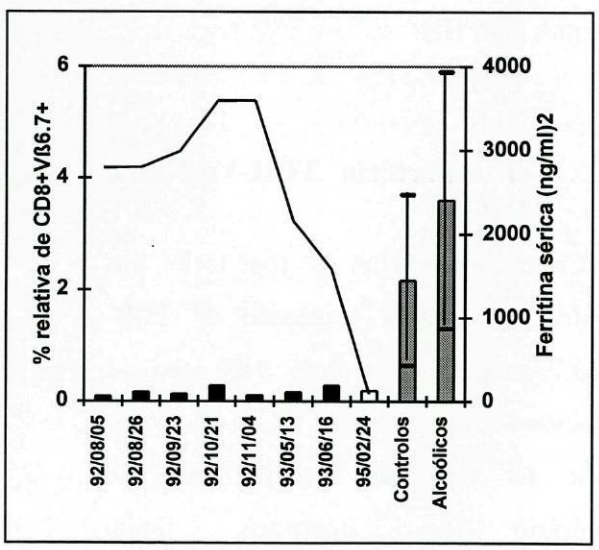


Fig 6.3 -Exemplo de determinações seriadas da expressão de TCR-Vß6.7 num doente com HH e baixa expressão do produto deste gene. Como se pode observar, o padrão de expressão não varia nem durante o tratamento intensivo(barras cheias), nem após o fim deste (barra aberta).São ainda indicados como referencia as médias obtidas para a população controlo e para os indivíduos com cirrose alcoólica (barras cinzentas), bem como os valores da ferritina sérica (linha).

Tabela 6.3 - Expressão dos genes TCR-Jß e TCR-Cß em células CD4 e CD8 de controlos e doentes com HH.

		Controlos[a]	HH[a]	
			assintomáticos	com cirrose
		(n=11)	(n=14)	(n=8)
CD4	Jß1.1	9.92±5.99	8.79±2.95	9.13±2.87
	Jß1.2	6.62±4.12	8.59±4.86	7.38±4.00
	Jß1.3	1.80±1.44	1.75±1.46	1.25±1.00
	Jß1.4	2.73±1.73	4.48±3.23	1.99±0.75
	Jß1.5	5.47±2.87	7.30±4.11	6.87±3.33
	Jß1.6	2.97±1.55	4.81±3.35	2.34±0.78
	Jß2.1	**16.41±4.57**	**9.33±3.44[bc]**	**15.08±2.83**
	Jß2.2	7.87±2.89	10.77±8.38	7.50±2.27
	Jß2.3	9.82±2.61	8.71±3.68	11.77±3.70
	Jß2.4	3.15±2.47	2.81±1.68	2.48±1.41
	Jß2.5	9.67±3.80	11.93±5.53	9.74±5.47
	Jß2.6	2.61±1.47	2.50±1.96	3.22±1.53
	Jß2.7	21.48±4.88	22.03±6.65	21.24±4.84
	Cß1	29.51±10.17	33.08±14.53	28.98±7.30
	Cß2	70.48±10.17	66.92±14.53	71.02±7.30
CD8	Jß1.1	10.88±5.91	9.31±4.88	6.75±4.07
	Jß1.2	7.28±2.92	8.67±4.79	7.17±4.26
	Jß1.3	1.74±1.24	2.31±3.11	0.84±0.76
	Jß1.4	3.77±3.44	3.86±2.64	2.69±1.97
	Jß1.5	6.59±5.03	5.35±3.15	6.78±4.54
	Jß1.6	**2.84±1.82**	**2.40±1.43**	**1.19±0.91[de]**
	Jß2.1	15.49±6.02	13.66±7.88	17.94±12.37
	Jß2.2	5.55±1.97	9.07±7.28	3.98±1.85
	Jß2.3	9.03±6.14	8.02±4.58	5.45±3.70
	Jß2.4	2.99±3.65	1.31±1.34	1.04±0.97
	Jß2.5	9.67±5.58	8.79±4.75	14.33±12.43
	Jß2.6	1.69±1.20	2.78±2.20	2.72±2.25
	Jß2.7	22.73±7.02	26.12±8.93	29.77±23.53
	Cß1	32.85±9.37	30.66±10.87	24.92±9.76
	Cß2	67.15±9.37	69.34±10.87	75.08±9.76

a) são indicados a média ± SD. (n).
b) significativamente diferente do grupo controlo ($p<0.0004$)
c) significativamente diferente dos doentes com cirrose ($p<0.002$)
d) significativamente diferente do grupo controlo($p<0.045$)
e) tendência para ser diferente dos doentes assintomáticos ($p=0.07$)

depósitos de ferro (1.52±0.76) e doentes em tratamento de manutenção, isto é, sem depósitos de ferro (1.19±0.87). Dois doentes que foram estudados em vários momentos ao longo do tratamento intensivo e de manutenção, não apresentaram também qualquer variação significativa quer ao longo do tratamento intensivo, quer na passagem entre o tratamento intensivo e o tratamento de manutenção (Fig. 6.3).

6.4 - Expressão de genes TCR-Jß e a severidade clínica da HH

No intuito de obter uma imagem da distribuição completa do repertório do TCR, analisamos a utilização do painel completo de genes TCR-Jß, o qual, ao contrário dos genes Vß, é conhecido na integra e está completamente caracterizado. Como é patente na tabela 6.3, a expressão de Jß2.1 nas células CD4 dos doentes assintomáticos é significativamente menor que a observada na população controlo. Por outro lado, os doentes com cirrose revelaram possuir uma menor expressão de Jß1.6 nas células CD8 que os controlos.

Como forma de obter uma aproximação da utilização relativa das cadeias Cß1 e Cß2 nos hemocromatóticos, procedemos à soma da frequência dos elementos Jß associados no genoma a cada gene Cß. Esta aproximação permitiu-nos concluir da inexistência de diferenças significativas entre os controlos e os doentes com HH em qualquer dos grupos clínicos (tabela 6.3).

6.5 - O repertório do TCR-Vαβ em indivíduos heterozigóticos para a hemocromatose hereditária

De seguida fomos estudar o repertório do TCR em indivíduos heterozigóticos para a hemocromatose hereditária. Como está ilustrado na Figura 6.4, foram encontrados indivíduos heterozigóticos para a hemocromatose (segundo a tipagem HLA), que, apesar da ausência de sinais clínicos, apresentavam uma frequência de TCR-Vß6.7 nas células CD8 semelhantes aos observados nos doentes hemocromatóticos com cirrose hepática (Fig. 6.4).

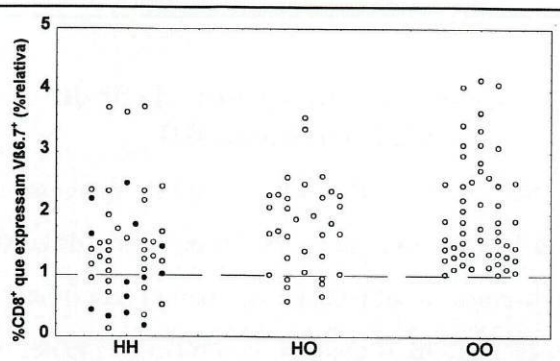


Figura 6.4 - Percentagem de células CD8 que expressam Vß6.7 (percentagem relativa), em doentes com hemocromatose hereditária (HH), familiares classificados como heterozigóticos por tipagem HLA (HO), e indivíduos normais (OO). Os doentes com cirrose são indicados por símbolos cheios.

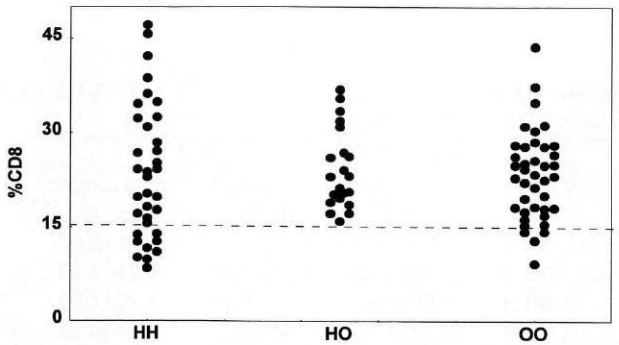


Figura 6.5 - 1 Percentagem de células $CD8^+$ circulantes em doentes com hemocromatose hereditária (HH), familiares classificados como heterozigóticos por tipagem HLA (HO), e indivíduos normais (OO).

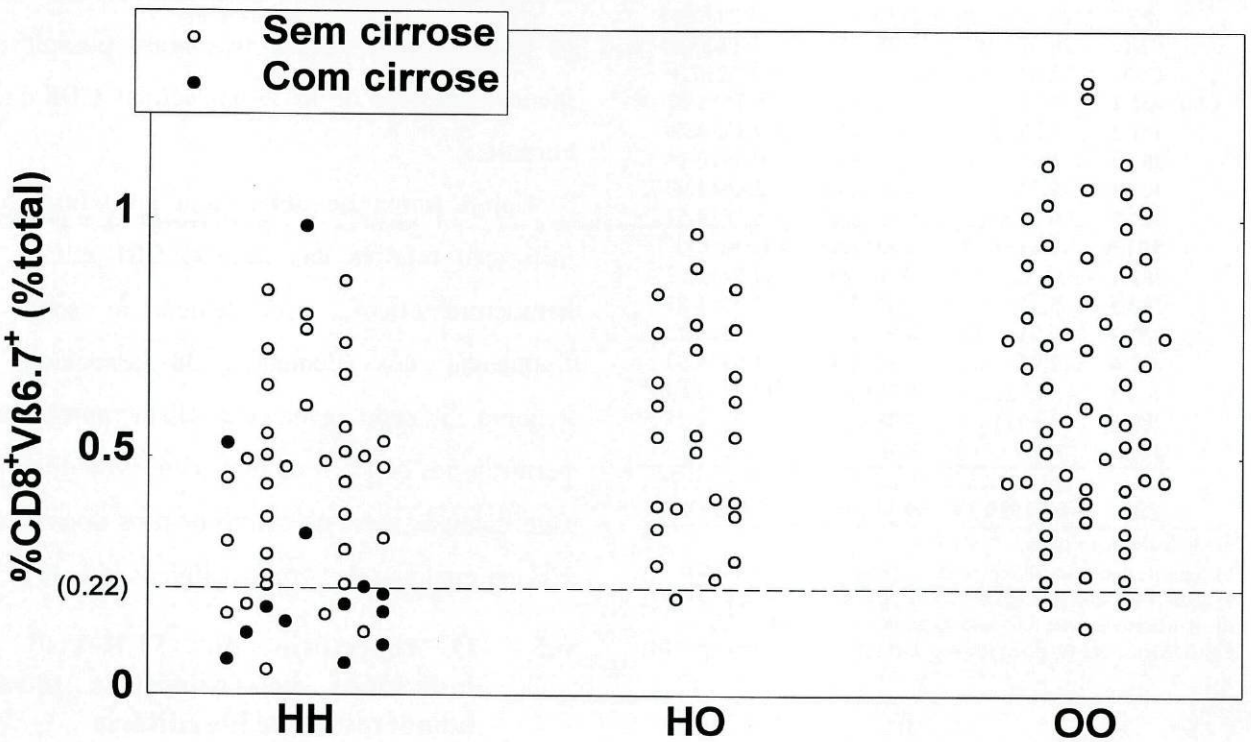


Figura 6.6- Percentagem de células T ($CD3^+$) duplamente positivas para CD8 e Vß6.7 (percentagem total), em doentes com hemocromatose hereditária (HH), familiares classificados como heterozigóticos por tipagem HLA (HO), e indivíduos normais (OO). Os doentes com cirrose são indicados por símbolos cheios.

Contudo, e uma vez que não existiam indivíduos heterozigóticos com valores baixos de células CD8 (Fig. 6.5), calculamos a percentagem total dos linfócitos T ($CD3^+$) que expressava simultaneamente CD8 e Vß6.7 (percentagem total). Como se pode ver na figura 6.6, esta variável, incorporando simultaneamente as variações das células CD8, e as de Vß6.7 nas células CD8, distingue os indivíduos com HH associada a cirrose dos indivíduos heterozigóticos, e dos indivíduos controlo.

7 - A expressão de TCR-Vß6.7 nas células CD8 de doentes com Hemocromatose Hereditária: influência de polimorfismo genético

Uma vez que a frequência de expressão de TCR-Vß6.7 é influenciada por um polimorfismo genético bem caracterizado, e tendo em atenção as diferenças por nós observadas na expressão de TCR-Vß6.7 na hemocromatose, foi estudada a influência deste polimorfismo nos resultados acima descritos.

7.1 - Influência de polimorfismo genético na expressão de TCR-Vß6.7 nas células CD8 de indivíduos controlo

O polimorfismo de Vß6.7 descrito por Posnett (1986) influencia a frequência de utilização deste produto génico em linfócitos $CD3^+$. No intuito de verificar se este facto era também válido nas subpopulações $CD3^+CD8^+$ e $CD3^+CD4^+$, estudamos a expressão de Vß6.7 nestas subpopulações linfocitárias de indivíduos normais (n=17).

Os resultados obtidos permitiram estender os resultados de Posnett et al.(1986), tanto às células CD8 como às células CD4 da população portuguesa. Com efeito, como é visível na tabela 7.1 e nas Figuras 7.1A e 7.1B, os indivíduos controlo com genótipo b/b revelaram possuir percentagens de células CD8 e de células CD4 expressando Vß6.7 significativamente menor que os indivíduos com genótipo a/a (tabela 7.1).

De igual modo, as percentagens totais de linfócitos T ($CD3^+$) simultaneamente positivos para CD4 ou CD8 e Vß6.7, revelaram-se sujeitas à mesma regulação genética (Figura 7.2, e tabela 7.2) nos indivíduos controlo.

Tabela 7.1 - Percentagem relativa de células CD8 e CD4 expressando TCR-Vß6.7$^+$ em controlos genotipados para Vß6.7.

	genótipo	%Vß6.7$^+$ a)		p b)
CD8	a/a	**2.02 ± 0.97**	**(9)**	-
	a/b	1.08 ± 0.38	(4)	n.s.
	b/b	**0.89 ± 0.24**	**(6)**	**0.016**
CD4	a/a	**5.71 ± 1.14**	**(8)**	-
	a/b	**3.42 ± 0.39**	**(3)**	**0.009**
	b/b	**3.20 ± 0.56**	**(6)**	**0.0003**

a) são indicadas a média ± SD. (n)
b)nível de significância da diferença para a população a/a de acordo com um teste T de Student
n.s - não significante

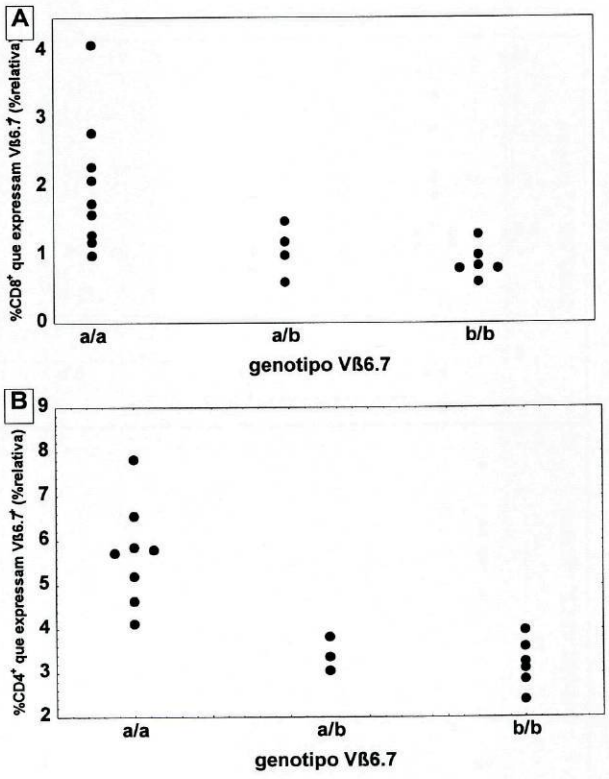


Fig 7.1 - Percentagem das células CD8(A) e CD4(B) que expressam Vß6.7 (percentagens relativas), e sua relação com o genótipo Vß6.7 em indivíduos normais.

Tabela 7.2 - Percentagem total de células CD8 e CD4 expressando TCR-Vß6.7$^+$ em controlos genotipados para Vß6.7.

	genótipo	%Vß6.7^{+} a)	p b)
CD8	a/a	**0.64 ± 0.22 (9)**	-
	a/b	0.41 ± 0.20 (4)	n.s.
	b/b	**0.28 ± 0.10 (6)**	**0.021**
CD4	a/a	**3.85 ± 1.00 (8)**	-
	a/b	**2.08 ± 0.13 (3)**	**0.02**
	b/b	**2.18 ± 0.31 (6)**	**0.0021**

a) são indicadas a média ± SD. (n)
b)nível de significância da diferença para a população a/a de acordo com um teste T de Student
n.s - não significante

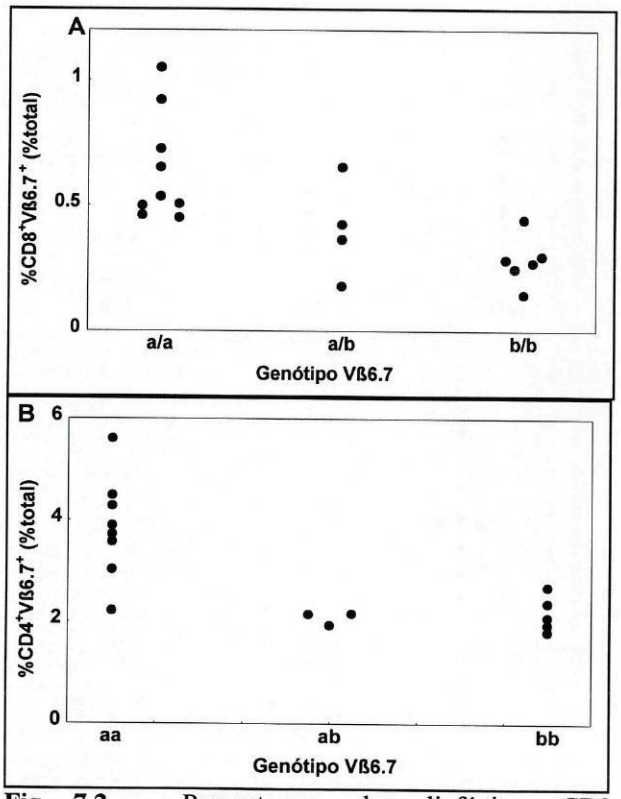


Fig 7.2 - Percentagem dos linfócitos CD3 simultaneamente CD8$^+$Vß6.7$^+$(A) ou CD4$^+$Vß6.7$^+$ (B) (percentagens totais), e sua relação com o genótipo Vß6.7 em indivíduos normais.

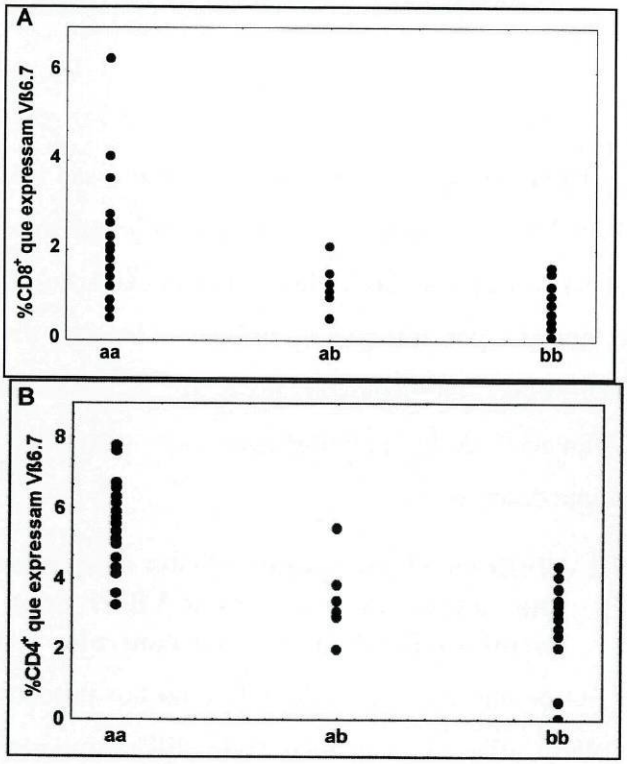


Fig 7.3 - Percentagem das células CD8(A) e CD4(B) que expressam Vß6.7 (percentagens relativas), e sua relação com o genótipo Vß6.7 em doentes com HH.

7.2 - Influencia relativa de polimorfismo genético e da heterogeneidade clínica na expressão de TCR-Vß6.7 nas células CD8 de doentes com HH

De seguida estudamos a expressão do produto do gene TCR-Vß6.7 em doentes com HH, caracterizando em paralelo o seu respectivo genótipo. Como é visível na figura 7.3, os doentes com genótipo b/b apresentaram os valores mais baixos de frequência de TCR-Vß6.7 tanto nas células CD8 como nas células CD4, enquanto os indivíduos com genótipo a/a apresentaram os valores mais elevados.

Uma análise mais cuidada, revelou no entanto, que a presença ou ausência de cirrose hepática

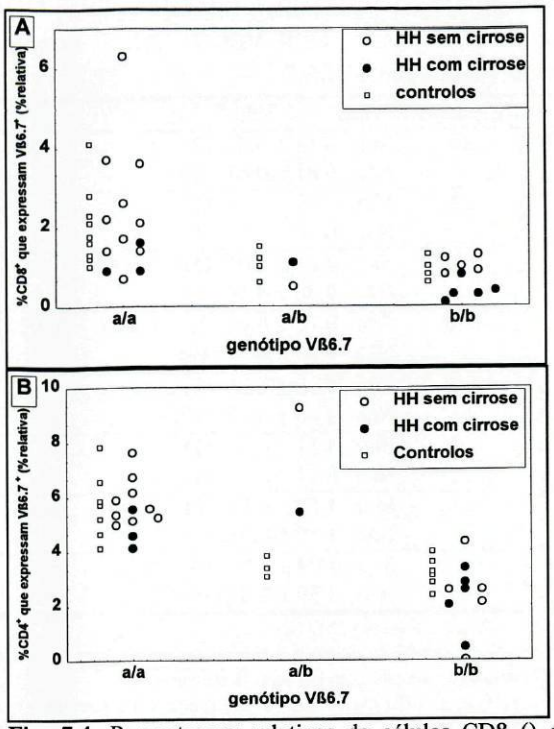


Fig. 7.4. Percentagens relativas de células CD8 () e CD4 (B) expressando Vß6.7 em função do genótipo Vß6.7 em controlos (), e doentes com (●) e sem (○) cirrose hepática.

Tabela 7.3 - Percentagem relativa de células CD8 positivas para TCR-Vß6.7 em doentes genotipados para Vß6.7.

	genótipo	cirrose	% Vß6.7^{+} a)		p b)	p c)
CD8	a/a	Sim	1.13 ± 0.40	(3)	n.s.	n.s.
		Não	2.57 ± 1.62	(10)		n.s
	a/b	Sim	1.10	(1)	-	-
		Não	0.50	(1)		-
	b/b	Sim	**0.38 ± 0.26**	**(5)**	**0.002**	**0.00**
		Não	**1.04 ± 0.21**	**(5)**		n.s.
CD4	a/a	Sim	4.75 ± 0.73	(3)	n.s.	n.s.
		Não	5.79 ± 0.84	(10)		n.s
	a/b	Sim	5.44	(1)	-	-
		Não	9.24	(1)		-
	b/b	Sim	2.27 ± 1.11	(5)	n.s	n.s
		Não	2.34 ± 1.54	(5)		n.s.

a) são indicados a média ±SD (n)
b) nível de significância para a diferença entre doentes com e sem cirrose, de acordo com um teste T de Student.
c) nível de significância para a diferença relativamente aos controlos respectivos (ver tabela 7.1), de acordo com um teste T de Student
n.s. - não significante

constitui um segundo factor relacionado com a frequência de expressão deste produto génico na superfície das células CD8 (Fig 7.4A), mas não na das células CD4 (Fig 7.4B). Com efeito, os doentes com cirrose hepática foram os que apresentaram %CD8-Vß6.7^{+} mais baixas dentro de cada grupo genotípico (Fig. .7.4). De igual modo, os doentes com cirrose pertencentes ao grupo genotípico b/b apresentaram percentagens de células CD8 expressando Vß6.7 significativamente menores ($p<0.002$) que os do mesmo grupo genotípico sem cirrose (tabela 7.3). Finalmente, enquanto os doentes sem cirrose e com Vß6.7-b/b não apresentaram valores de %Vß6.7 diferentes dos do grupo controlo, os doentes com cirrose do mesmo grupo genotípico apresentaram percentagens de células CD8 expressando TCR-Vß6.7 significativamente mais baixas($p<0.008$) que as observadas nos respectivos controlos (tabela 7.3).

Uma vez que as percentagens totais discriminam melhor entre doentes, seus familiares e controlos (secção 5) que as percentagens relativas, estudamos a influência do genótipo na percentagem das células CD8^{+} que expressavam Vß6.7^{+}(%total). Apesar da influência do genótipo na % total-CD8^{+}Vß6.7^{+} nos indivíduos controlo (Fig 7.2), o mesmo não se verificou nos doentes com HH. Com efeito, nestes doentes, a presença de cirrose parece ser o factor que melhor discrimina entre indivíduos com valores baixos e indivíduos com valores normais de %total-CD8^{+}Vß6.7^{+} (Fig 7.5). Isto mesmo é ilustrado pelo facto de doentes com cirrose apresentam valores semelhantes independentemente do grupo genotípico a que pertencem, sendo estes valores significativamente menores que os dos respectivos

controlos ($p<0.008$), e que os doentes sem cirrose do mesmo grupo genotípico ($p<0.0008$; tabela 7.4). O factor cirrose teve uma tão grande capacidade discriminatória entre valores altos e baixos de %total-$CD8^+V\beta6.7^+$ que , mesmo classificando os doentes com cirrose num único grupo, independentemente da genotipagem, se observaram diferenças significativas quer entre os doentes com e sem cirrose, quer entre os doentes com cirrose e os indivíduos normais (tabela 7.4).

Como se pode observar na tabela 7.4, os resultados acima descritos são específicos para o repertório das células CD8, já que não foi observada nenhuma influência significativa da cirrose na %total-$CD4^+V\beta6.7^+$ (tabela 7.4).

Tabela 7.4 - Percentagem total de células CD8 positivas para TCR-Vß6.7 em doentes genotipados para Vß6.7.

	genótipo	cirrose	% $V\beta6.7^{+}$ a)	p b)	p c)
CD8	a/a	Sim	0.14 ± 0.76 (3)	n.s.	n.s.
		Não	0.81 ± 0.67 (10)		n.s
	a/b	Sim	0.23 (1)	-	-
		Não	0.16 (1)		-
	b/b	Sim	**0.11 ± 0.06 (5)**	**0.0008**	**0.00**
		Não	**0.38 ± 0.10 (5)**		n.s.
	todos	Sim	**0.13 ± 0.06 (9)**	**0.016**	**0.000**
		Não	**0.64 ± 0.57 (16)**		n.s.
CD4	a/a	Sim	4.17 ± 0.05 (3)	n.s.	n.s.
		Não	4.05 ± 0.67 (10)		n.s.
	a/b	Sim	4.31 (1)	-	-
		Não	6.24 (1)		-
	b/b	Sim	1.57 ± 0.84 (5)	n.s	n.s.
		Não	1.49 ± 0.98 (5)		n.s.
	todos	Sim	2.74 ± 1.56 (9)	n.s	n.s.
		Não	3.39 ± 1.60 (19)		n.s.

a) são indicados a média ±SD (n)
b) nível de significância para a diferença entre doentes com e sem cirrose, de acordo com um teste T de Student.
c) nível de significância para a diferença relativamente aos controlos respectivos (ver tabela 7.1), de acordo com um teste T de Student
n.s. - não significante

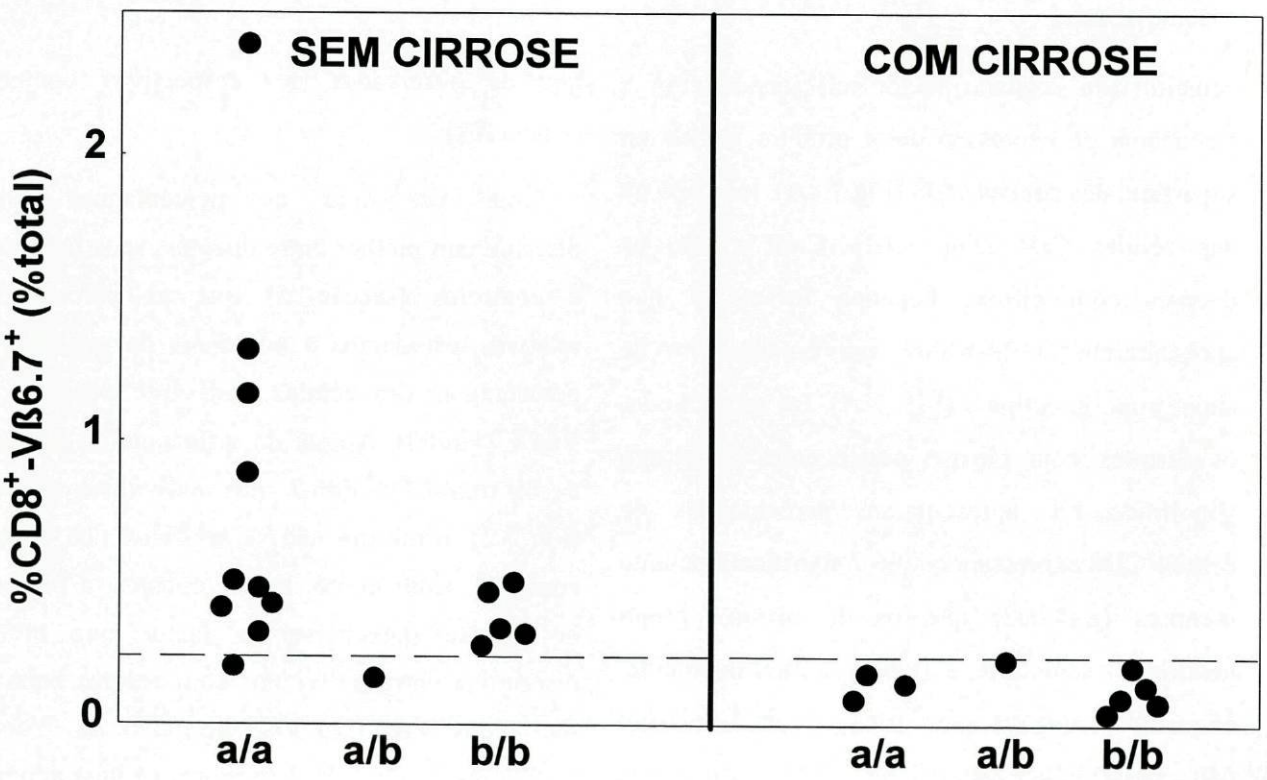


Fig 7.5 - Percentagem total de $CD8^+$-$V\beta6.7^+$ em doentes com HH, em função da presença ou ausência de cirrose hepática e genótipo TCR-Vß6.7.

PARTE 3

DISCUSSÃO

8 - O Sistema imunológico no controlo da homeostase interna do organismo

O sistema imunológico tem sido descrito como sendo composto de uma imunidade inata, e de uma imunidade "adaptativa" (Roitt et al., 1994). A imunidade inata é atribuída ao complemento, fagócitos e células "natural killer", enquanto a resposta "adaptativa" é atribuída aos anticorpos e linfócitos T e B (Roitt et al., 1994). As propriedades destes dois tipos de resposta imunológica são também diferentes, particularmente no que respeita à sua adaptabilidade. Como o próprio nome indica, a imunidade devida aos linfócitos é a que é capaz de se adaptar e aprender, bem como adquirir memória (Roitt et al., 1994).

A resposta imunológica desencadeada pelos linfócitos pode também ser dividida em dois grandes grupos: a resposta humoral e a resposta celular, as quais possuem também propriedades diferentes. A resposta humoral, devida aos linfócitos B é mediada pela acção das imunoglobulinas, as quais sendo factores solúveis podem actuar à distância, ainda que a sua presença seja naturalmente dependente das células que as produzem. Uma segunda característica deste tipo de resposta é a sua capacidade para reconhecer antigénios intactos, isto é, reconhece apenas as características dos antigénios exteriores na sua estrutura tridimensional (Male et al., 1987). Em contraste, a resposta desencadeada pelos linfócitos T, actua apenas a curta distância, por intermédio das citoquinas, e responde apenas a antigénios previamente processados (Male et al., 1987). Esta ultima característica faz das células T as únicas, no sistema imunológico, capazes de reconhecer determinantes antigénicos "escondidos" no interior da estrutura tridimensional dos antigénios. No caso de organismos celulares, esta característica permite mesmo às células T reconhecer determinantes antigénicos pertencentes a proteínas não expressas à superfície da célula, e portanto "escondidas" de todos os restantes intervenientes numa resposta imunológica.

É ainda esta última característica que permite ao sistema imunológico vigiar o próprio organismo de que faz parte, já que permite às células T reconhecer determinantes antigénicos "internos" às próprias células do organismo. Esta capacidade, atribuída aos linfócitos T-CD8^{+}, por reconhecerem os péptidos no contexto do MHC-I, o qual se encontra habitualmente carregado com os péptidos endógenos (para revisão ver Monaco 1992; Yewdell & Bennink, 1992), tem tradicionalmente sido considerada útil na fiscalização das infecções víricas. No entanto, e face ao paradigma emergente na imunologia, estas células podem também ser as únicas células do sistema imunológico com a capacidade de reconhecer perturbações nos delicados equilíbrios homeostáticos do organismo, sejam eles de natureza maligna, ou outros.

Esta hipótese ganha suporte à luz dos dados que indicam a existência de uma maior variação

interindividual no repertório das células CD8 que no das células CD4, e que essa variação parece aumentar com a idade (Posnett et al., 1994b e secção 5). Com efeito, se Posnett atribuiu esta variação ao acumular de memória relativa a infecções víricas, esta interpretação não parece ser muito consistente, já que não explica a diferença entre as células CD4 e as CD8. Se, por outro lado, se interpretar este facto à luz da atribuição às células CD4 de uma função de vigilância dirigida ao "mundo exterior", e às células CD8 a função de vigiar o "mundo interno", então uma outra interpretação dos resultados emerge. Com efeito, o mundo exterior não é muito diferente de indivíduo para indivíduo, e isto é tanto mais verdade quanto os estudos tendem a concentrar-se em determinadas zonas geográficas. Este facto tenderia assim a tornar o repertório das células CD4 não muito diferente entre os vários indivíduos estudados, ao contrário do que se passaria com o repertório das células CD8, já que o mundo interno, e seus delicados equilíbrios têm maiores variações de indivíduo para indivíduo. Por outro lado, esta interpretação permitiria também compreender o agravamento da diferença interindividual no repertório das células CD8 com a idade, já que os equilíbrios homeostáticos tendem a perturbar-se com o tempo. Da mesma forma se poderia interpretar o aparecimento não patológico de expansões oligo e monoclonais nas células CD8. Segundo esta interpretação, estes clones poderiam representar células a responder no intuito de restabelecer equilíbrios internos afectados.

Neste contexto, a confirmação da existência de anomalias nas proporções relativas de células CD4 e CD8 (secção 4) numa patologia (HH) em que um equilíbrio fundamental (homeostase dos níveis de ferro) está perturbado, tem particular interesse. Com efeito, a associação entre a HH e o fenótipo HLA-A3, numa patologia em que a imunidade parece não estar afectada, tem levado os investigadores a procurarem razões não imunológicas para esta relação. No entanto, a hipótese acima descrita, volta a colocar o sistema imunológico como um potencial interveniente nesta doença, se não como o causador, pelo menos como um regulador, o que a descoberta de anomalias na frequência de células CD8 parece confirmar.

Que relação pode então ter o MHC com as células CD8 na HH ? Desde logo, uma estreita relação parece existir entre o facto de nesta doença ser a abundância das células CD8 que está afectada, e existir uma grande incidência do fenótipo HLA-A3. Com efeito, este fenótipo é devido a um gene do MHC-I, cujos produtos são os responsáveis pela apresentação de péptidos endógenos às células T CD8. Por outro lado, o MHC parece estar estreitamente implicado no processo que selecciona as células que emergem do timo para a circulação periférica, pelo que determina o repertório das células T-CD8 maduras na periferia (Gulwani-Akolkar et al., 1991;

Akolkar et al., 1993). Se alguns dados indicadores deste facto são de análise estatística algo complexa (Gulwani-Akolkar et al., 1991; Akolkar et al., 1993), os nossos resultados, implicando uma estreita associação entre a frequência relativa de células CD8 que expressam o TCR-Vß6.7, e a presença do antigénio HLA-A3 (secção 5), indicam claramente que o MHC-I, e em particular o HLA-A3 tem um papel importante no estabelecimento do repertório periférico das células T-$CD8^+$. Com efeito, no nosso estudo foi possível demonstrar que nos indivíduos HLA-$A3^+$, a fracção de células $CD8^+$ que expressam TCR-Vß6.7 ou TCR-Vß5.3 não se ajusta aos níveis de células CD8, pelo que indivíduos com poucos linfócitos CD8 verão o seu número de células $CD8^+Vß6.7^+$ e $CD8^+Vß5.3^+$ reduzido, relativamente a indivíduos com números normais ou elevados de linfócitos $CD8^+$. Em contraste com este facto, os indivíduos com outros fenótipos HLA, que não o A3, apresentaram claramente níveis totais de $CD8^+Vß6.7^+$ e $CD8^+Vß5.3^+$ semelhantes, e independentes do número de células CD8 circulantes, indicando que de algum modo os indivíduos com poucas células $CD8^+$, compensavam este facto, aumentando a proporção destas que expressavam este produto génico.

Se este efeito "homeostático" do número de células $CD8^+Vß6.7^+$ e $CD8^+Vß5.3^+$ é curioso, à luz da grande frequência do fenótipo HLA-A3 nos indivíduos com HH, torna-se particularmente curioso no caso das células $CD8^+Vß6.7^+$ já que a análise do repertório dos indivíduos com HH revelou a existência de anomalias na frequência destas mesmas células (secção 6). Desta feita, a associação entre a baixa frequência de Vß6.7 não se verificou com o HLA, mas com a heterogeneidade clínica da HH: os indivíduos com envolvimento mais severo eram os que apresentavam as mais marcadas reduções nos níveis destas células. Este facto pode sugerir a existência de características comuns no HLA dos hemocromatóticos, que de algum modo produzam o mesmo efeito que o fenótipo HLA-A3 ao nível da selecção timica destas células. Uma outra alternativa consistiria na existência de defeitos a nível do processamento do antigénio, que ocasionassem de igual forma a incapacidade para apresentar o(s) péptido(s) relevantes.

Uma possível explicação para a presença de níveis baixos de células $CD8^+Vß6.7^+$ no sangue de hemocromatóticos com cirrose hepática seria a eventual migração destas células para o fígado, em consequência da cirrose, com consequente diluição nos restantes compartimentos. O facto de em situações crónicas de hepatite B e C, os níveis de células $CD8^+TCR\text{-}\alpha\beta^+$ estarem aumentados no fígado (Lohr et al., 1994) poderia reforçar esta hipótese. No entanto, ao contrário do que acontece na HH, naquelas patologias os níveis destas células também se encontram aumentados no sangue periférico. De igual modo, os estudos efectuados no intuito de encontrar expansões nos linfócitos T do fígado e do sangue periférico em

doentes com hepatites B ou C resultaram infrutíferos (Moebius et al., 1990; Wang et al., 1995), possivelmente indicando a existência de proliferação policlonal de células CD8, e não uma migração oligoclonal para o fígado. Similarmente, os estudos efectuados em doentes com carcinoma hepatocelular, revelaram a utilização preferencial de alguns genes variáveis da cadeia ß do TCR, mas o Vß utilizado variava com o doente, não envolvendo em nenhum dos casos descritos o Vß6.7 (Weidmann et al., 1992). Assim, nenhum outro estudo de patologias do fígado parece sugerir a possibilidade da existência de migração maciça de linfócitos T $CD8^+$ para este órgão, e em particular, não foi descrita qualquer relação entre as células $CD8^+Vß6.7^+$ e patologias do fígado. Finalmente, o facto de o repertório do sangue periférico de indivíduos com cirrose não relacionada com a HH não ter revelado a existência de níveis reduzidos de células $CD8^+Vß6.7^+$, leva-nos a concluir que o fenómeno observado na HH não resulta directamente da cirrose hepática, antes sendo característico da cirrose no contexto dos depósitos de ferro observados na HH. Torna-se assim importante determinar se a reduzida expressão de Vß6.7 nas células $CD8^+$ resulta directamente dos depósitos de ferro, ou se precede estes. O estudo seriado dos doentes ao longo do tratamento, bem como a comparação de grupos de doentes em diferentes fases do tratamento, demonstrando a inexistência de variação no nível de células $CD8^+Vß6.7^+$ com a variação dos depósitos de ferro (secção 6), parecem indicar que estamos perante uma variável determinada pela própria constituição do indivíduo, e não resultante da acção directa dos depósitos de ferro. Também o facto de termos encontrado casos de baixa expressão de Vß6.7 nas células CD8 de indivíduos que por tipagem HLA foram considerados como heterozigóticos para a hemocromatose (partilham apenas um dos haplótipos HLA do probando), parece indicar que a existência desta "anomalia" precede o desenvolvimento da sobrecarga de ferro, podendo eventualmente constituir um factor de risco para o desenvolvimento de um quadro clínico mais grave, se a sobrecarga não for rapidamente controlada. Note-se, no entanto, que em praticamente todos os casos observados, os indivíduos heterozigóticos possuíam níveis totais de células CD8 que lhes permitiam manter as percentagens totais de linfócitos $CD8^+Vß6.7^+$ dentro dos valores encontrados nos indivíduos normais. Desta forma, parece existir uma associação entre os níveis totais de células CD8 e a percentagem destas células que exprimem o TCR-Vß6.7, sendo a conjugação de ambas as variáveis que melhor diferencia entre os hemocromatóticos com a forma mais grave da doença e os restantes indivíduos (controlos, heterozigóticos e hemocromatóticos sem cirrose).

Os resultados de Sunder-Plassmann et al (1992) revelando a existência de uma maior frequência de Vß6.7 no sangue periférico de doentes em

hemodiálise crónica assume neste contexto importância particular. Com efeito, vários estudos parecem indicar uma elevada frequência de sobrecarga de ferro entre estes doentes (Carrera et al., 1988; Yaouanq et al., 1988; Nichols & Bacon 1989), pelo que é possível que esta população celular resulte de uma resposta do sistema imune a uma sobrecarga secundária de ferro. Neste caso, estaríamos portanto em presença de doentes sem a "anomalia" de selecção linfocitária discutida na introdução (secção 1.2.1, pag. 13), e que portanto seriam capazes de controlar os danos mediados pelo ferro.

Poder-se-ía argumentar que a característica intrínseca de alguns doentes para apresentarem uma baixa expressão de TCR-Vß6.7 nas células CD8, poderia ser explicada pela existência de um polimorfismo genético que assim o determinasse. Dos poucos polimorfismos humanos do TCR identificados, um é precisamente neste gene (Li et al., 1990; Posnett et al., 1986), pelo que foi estudada a sua influência nos resultados acima descritos. No entanto, os resultados revelando, como seria de esperar, uma acção do genótipo na frequência de expressão do gene, demonstraram que a associação por nós descrita entre a baixa frequência de Vß6.7 nas células CD8 e a presença de cirrose hepática nos doentes com HH não podia ser explicada apenas pelo genótipo (secção 7), constituindo a presença de um factor cumulativo ao genótipo na determinação da frequência de expressão de Vß6.7 nas células CD8.

O estudo do repertório do TCR tal como efectuado por nós para os genes variáveis do TCR está limitado, por razões de natureza experimental, a uma estreita janela que apenas permite visualizar parte do universo de regiões variáveis do organismo. No intuito de obviar a esta limitação, e dada a aparente incoerência dos resultados obtidos com PCR semiquantitativo para as regiões variáveis (ver tabela 2.1), optamos por estudar o repertório das regiões Jß, o qual, sendo reduzido e inteiramente conhecido, permite a elaboração de uma estratégia experimental de confiança. Os resultados assim obtidos, permitiram-nos identificar uma região Jß cuja expressão se encontra preferencialmente diminuída nas células $CD8^+$ dos mesmos indivíduos para os quais havia sido identificada diminuição da frequência de células $Vß6.7^+$. Assim, e uma vez que não foi identificada qualquer anomalia a nível da frequência das regiões constantes, as anomalias encontradas centram-se precisamente a nível das estruturas do TCR que participam na interacção com o determinante MHC-péptido (Figura 8.1; Davis & Bjorman, 1988; Claverie et al., 1989; Nalefski et al., 1992), pelo que os resultados parecem confirmar os pressupostos do modelo em estudo, isto é que o processo fisiológico de selecção de células T pode ter implicações patológicas em situações tradicionalmente não consideradas do foro imunológico.

O facto de a análise ao repertório Jß ter ainda identificado anomalias na frequência de Jß2.1

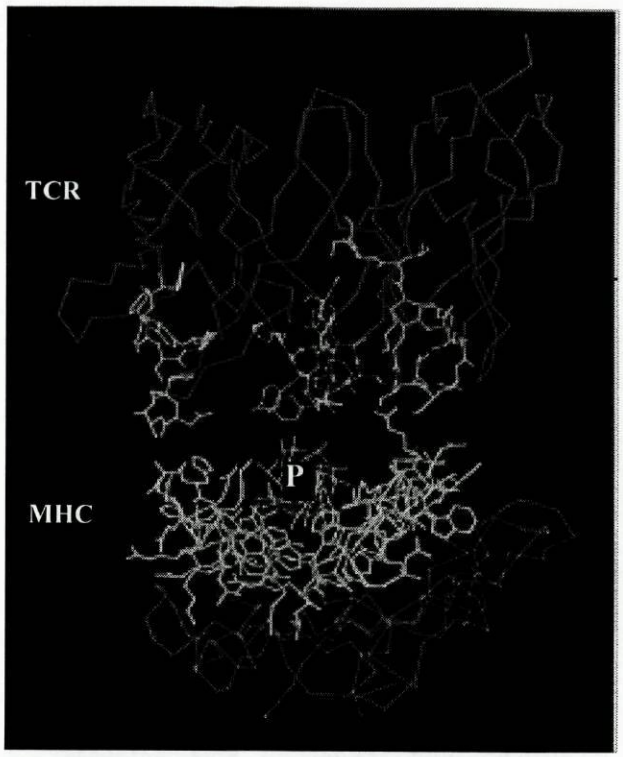


Fig. 8.1 - Modelo da interacção do TCR com o complexo MHC-péptido. O péptido está indicado pela letra P. As zonas do TCR representadas em tom claro indicam os CDR (complementary determining regions; adaptado de Davis & Bjorkman, 1988)

surge como particularmente interessante à luz de resultados recentemente obtidos indicando a preferencial utilização desta cadeia em clones de linfócitos que expressam o Vß6.7 (Raaphorst et al., 1994). O facto de a diminuída expressão desta cadeia ter ocorrido entre as células CD4 pode indicar que as anomalias das populações linfocitárias dos doentes com HH não se limitam às células $CD8^{+}V\beta6.7^{+}J\beta1.6^{+}$, antes existindo várias anomalias, às quais poderão estar associadas expressões clínicas diferentes. Por este facto é nossa convicção que a extensão do presente estudo poderá ter consideráveis implicações clínicas.

9 - Implicações Clínicas

Uma vez que a sobrecarga de ferro nos doentes com razões CD4/CD8 elevadas era significativamente superior à encontrada nos restantes doentes, este dado tem interesse não meramente académico, mas eventuais implicações clínicas. Com efeito, já os dados de Porto et al. (1994), assim o faziam prever, uma vez que os doentes com razões elevadas foram por estes autores conotados com os doentes que, após a depleção total dos depósitos de ferro, mais rapidamente os recuperavam (Porto et al., 1994). Assim, o nosso grupo tem vindo a utilizar a razão CD4/CD8 como indicadora da frequência aconselhável das flebotomias para o tratamento de manutenção.

Já a observação de valores baixos de Vß6.7 nas células CD8 (<1%), e particularmente de baixas percentagens totais de linfócitos $CD8^{+}V\beta6.7^{+}$ (<0.2%), parece à luz dos nossos dados, ser indicador de tendência para desenvolver formas mais graves da doença, em resposta à sobrecarga de ferro. Por tal motivo, estes dados podem ter importância clínica como indicador da maior ou menor necessidade de seguir indivíduos supostamente heterozigóticos (e por tal motivo sem indicação para o tratamento), mas que possuem saturações da transferrina elevadas e/ou níveis altos de ferritina sérica.

10 - Conclusões

O propósito central que nos colocamos no inicio deste trabalho consistiu em analisar a existência de anomalias nas subpopulações de células T de indivíduos com hemocromatose hereditária. Os resultados obtidos permitiram-nos esclarecer os seguintes aspectos:

- O repertório das células CD8 na população normal apresenta uma variabilidade interindividual superior ao das células CD4, e esta variabilidade cresce com a idade. Estes resultados confirmam o trabalho de Posnett et al. (1994b), extendendo-o às populações portuguesa e sueca.
- A frequência de expansões mono ou oligoclonais na população normal é superior nas células CD8 que nas células CD4, e aumenta com a idade. Também estes resultados confirmam o trabalho de Posnett et al. (1994b), extendendo-o às populações portuguesa e sueca.
- O MHC-I influencia o repertório dos linfócitos T-$CD8^+$. Particularmente o fenótipo HLA-A3 está associado a anomalias na "homeostase" dos níveis de $CD8^+V\beta5.3^+$ e $CD8^+V\beta6.7^+$.
- Existem anomalias na razão CD4/CD8 de doentes com HH na região de Estocolmo, o que confirma os resultados da população portuguesa (Reimão et al., 1991, Porto et al.,1994). Estas anomalias estão relacionadas com os níveis de depósitos de ferro observados nos doentes.
- Nos doentes com HH, valores baixos de células $CD8^+V\beta6.7^+J\beta1.6^+$ estão associados com as formas clínicas mais graves.

  A menor frequência destas células :

  - não é consequência da presença de cirrose, podendo no entanto ser um factor de risco de desenvolvimento de cirrose, na presença de elevados níveis de ferro hepático.
  - não é consequência da sobrecarga de ferro, já que não é corrigida com a remoção dos depósitos de ferro.
  - não é consequência do polimorfismo genético conhecido no gene Vß6.7.
  - pode ser encontrada em indivíduos supostamente heterozigóticos para a hemocromatose (heterozigotia definida por fenotipagem HLA). No entanto os indivíduos heterozigóticos estudados parecem ser capazes de compensar a menor proporção de $V\beta6.7^+$ nas células CD8, aumentando a proporção de células CD8 circulantes.

11 - Perspectivas futuras

Como habitualmente acontece, no processo da investigação cientifica, a resposta às perguntas que nos colocamos no inicio deste trabalho, trouxe outras tantas questões que aguardam resposta. Assim, se por um lado demonstramos que o repertório dos doentes com HH é deficiente em algumas especificidades, o mecanismo molecular preciso que permitirá explicar o envolvimento dessas células no controle do metabolismo do ferro permanece elusivo. Para o esclarecer será necessário iniciar estudos funcionais dos linfócitos T, incluindo a produção e secreção de citoquinas, particularmente de IFN-γ e TNF, já que estas citoquinas controlam o metabolismo do NO celular e este influencia o metabolismo do ferro (ver .secção 1.2.2.c).

No intuito de determinar qual ou quais os factores envolvidos no desenvolvimento das anomalias do repertório do TCR descritos na presente dissertação, posteriores estudos deverão procurar caracterizar o processamento e apresentação de péptidos em condições de sobrecarga de ferro, e sua relação com o fenótipo e estrutura do MHC.

Um outra questão consiste em determinar o eventual envolvimento de anomalias do repertório em outras patologias do metabolismo do ferro. De igual modo, se o mecanismo envolvido for um processo generalizado de verificação dos equilíbrios homeostáticos, deverá ser possível encontrar fenómenos semelhantes aos descritos nesta dissertação em outras patologias de sobrecarga, pelo que deverá ser futuramente alargada a caracterização do repertório de células T, quer em outras patologias do metabolismo do ferro, quer em outras doenças genéticas de sobrecarga.

Finalmente, o trabalho recente de M. Santos em modelos animais, torna possível a verificação dos dados do presente trabalho em experiências de repopulação de ratinhos RAG Knock out. Estes ratinhos, não tendo a capacidade de recombinar o TCR (e as Imunoglobulinas) não desenvolvem linfócitos maduros. Os resultados preliminares de M. Santos indicam que estes animais desenvolvem sobrecargas de ferro induzidas, pelo que experiências de repovoamento selectivo de subtipos de células T (de acordo com o TCR-Vαβ expresso) surgem como uma consequência natural do trabalho da presente dissertação.

PARTE 4

MATERIAIS E MÉTODOS

12 - MATERIAIS E MÉTODOS

12.1 - Indivíduos estudados

Foram estudados um total de 83 indivíduos normais (61 Portugueses e 22 suecos) e 55 doentes com HH (32 Portugueses e 21 suecos). Adicionalmente, na secção 6 descrevem-se resultados obtidos em 7 doentes com cirrose hepática de origem alcoólica. Análises a biopsias destes 7 doentes não revelaram qualquer sinal da presença de HH. Os 83 indivíduos normais incluídos nestes estudos foram seleccionados com base na inexistência de sinais bioquímicos de sobrecarga de ferro.

O diagnóstico de hemocromatose foi baseado nos critérios bioquímicos de sobrecarga de ferro previamente publicados (saturação da transferrina e ferritina sérica anormalmente elevadas; Vicente et al., 1990; Porto et al., 1992) e confirmada por biopsia hepática (demonstrando excesso de ferro intrahepatocitário; Schever et al., 1980) e determinação do conteúdo em ferro do fígado por Ressonância Magnética (Vasconcelos et al., 1994). Foram excluídos todos os doentes que apresentaram doença hemolítica (mesmo que associada com HH), ou quaisquer outras anemias indutoras de sobrecarga de ferro, porfiria cutânea tarda, sobrecarga de ferro por transfusão, doença hepática crónica com marcadores de hepatite B ou C, ou a presença de menos de 4 g de ferro armazenados. Não foram excluídos indivíduos com história de consumo exagerado de álcool. Dos 55 doentes, 13 apresentavam no momento do diagnóstico uma forma severa de hemocromatose com cirrose hepática associada a outras manifestações da doença como diabetes, pigmentação dérmica, cardiomiopatia, ou hipogonadismo. Os restantes 42 doentes não apresentavam quaisquer manifestações clínicas da doença, nem sinais de cirrose em biopsia hepática. Estes doentes foram diagnosticados por estudos familiares, de screening populacional, ou testes de rotina, apresentando níveis elevados de enzimas hepáticas, ou níveis elevados de ferro, ou simplesmente identidade fenotípica HLA concordante com o probando da família em estudo.

Do total de indivíduos testado foram utilizados os seguintes números, nos vários trabalhos descritos nesta dissertação:

Secção 4: 21 doentes com HH (21 suecos)
17 indivíduos normais (17 suecos)

Secção 5: 83 indivíduos normais (61 Portugueses; 22 suecos)

Secção 6: 55 doentes com HH (33 Portugueses; 21 suecos)
75 indivíduos normais (53 Portugueses; 22 suecos)

Secção 7: 23 doentes com HH (23 portugueses)
17 indivíduos normais (17 portugueses)

Como em nenhuma das experiências relatadas foram encontradas diferenças entre os indivíduos Portugueses e Suecos, são apresentados os resultados obtidos tratando as duas populações em conjunto.

Todos os indivíduos deram permissão para serem estudados. O conselho ético do Hospital Karolinska aprovou os estudos descritos.

12.2 - Estudo do repertório dos genes Vß do TCR por citometria de fluxo

a) Anticorpos utilizados

Vários produtos de genes TCR-Vαβ foram testados em células CD4 e CD8 por marcação dupla em FACS, utilizando marcação directa e indirecta. Foram utilizados os seguintes anticorpos dirigidos contra as regiões variáveis do TCR:

- de T cell Sciences: 1C1-FITC(Vß5.2+5.3), W112-FITC (Vß5.3), LC4-FITC (Vß5.1), 16G8-FITC (Vß8), S511-FITC (Vß12), OT145-FITC (Vß6.7a), F1 - FITC (Vα2.3);
- de imunotech: 1232-FITC (Vß2), 1328-FITC (Vß3), 1330-FITC (Vß13.6), 1234-FITC (Vß17).

Foram ainda utilizados os seguintes anticorpos dirigidos contra outras estruturas de superfície de células T:

- CD4 PE - MT310 (Dakopatts);
- CD8 PE - DK25 (Dakopatts); 347314 (Becton & Dickinson);
- CD3 FITC - F818 (Dakopatts);
- Rabitt anti Mouse FITC - F313 (Dakopatts).

b) Preparação e marcação de células

Três mililitros de sangue heparinizado foram primeiro fixados em igual volume de formaldeído (0.4% em PBS) durante 4 minutos a 37°C. As células vermelhas foram então lisadas por adição de 50 ml de solução de lise pré-aquecida (10 mM Tris, 0.15M NH4Cl, pH 7.4) durante 10 minutos a 37°C. As células foram lavadas duas vezes em PBS suplementado com 0.1% de azida de sódio e 0.2% de BSA (PBS-BSA). As células foram então marcadas em placas de 96 poços de fundo redondo (Greiner cat. No. 6501) num volume total de 100 µl. Para tal em cada poço foram aplicados 25 µl de cada anticorpo devidamente diluído, após o que se incubou em gelo, no escuro e com agitação suave por um período de 20 minutos. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS-BSA e fixadas num volume final de 500 µl de PBS contendo 0.5% de paraformaldeido e 0.1% de azida sódica.

Nos casos em que se realizou marcação indirecta, a primeira incubação (20 min em gelo) foi realizada com o anticorpo não conjugado, seguindo-se uma incubação idêntica com o anticorpo secundário, e finalmente com os anticorpos directos conjugados. Entre incubações as células foram lavadas 2 vezes em PBS-BSA.

Pelo menos 20,000 linfócitos de cada reacção são analisados em FACScan (Becton & Dickinson).

12.3 - Nomenclatura para a apresentação de resultados de frequências de regiões variáveis

No intuito de discriminar os efeitos de variações nas proporções relativas de células CD4 ou CD8 e o efeito de variações de subpopulações de células CD4 ou CD8, os resultados da secção 5 foram analisados de 2 formas complementares:

Percentagens totais: estes valores representam a fracção das células $CD3^+$ que simultaneamente expressam um determinado TCR-Vαβ e CD4

ou CD8. Estes valores são por isso dependentes das proporções relativas de células CD4 e CD8.

Percentagens Relativas: estes valores representam a fracção das células CD4, ou das células CD8 que expressam um determinado TCR-Vαβ. Todas as células consideradas expressam ainda CD3. Estes valores não são por isso influenciados pela proporção relativa de células CD4 ou CD8, já que 100% representa em todos os casos a totalidade das células CD4 ou das células CD8 existentes.

12.4 - Calculo dos depósitos de ferro

Os depósitos de ferro foram considerados iguais à quantidade total de ferro removido pelas flebotomias, no final do tratamento intensivo. Este valor foi calculado através do valor total da hemoglobina removido pelas flebotomias, corrigido para o valor total de ferro absorvido durante o tratamento, o qual foi estimado em 3 mg diários (Haskins et al., 1952)

12.5 - Estudo do repertório dos genes Jß do TCR por PCR

A purificação de RNA total e produção de cDNA foi realizada de acordo com métodos previamente publicados (Grunewald et al. 1992a). Um controle negativo sem RNA foi utilizado durante todo o procedimento. A mistura de PCR foi composta por 1 x Tampão de PCR (10mM TrisCl pH 8.3, 50mM Hcl e 0.1% gelatina), 0.2mM dNTP, 2mM MgCl2, 0.5µM 5'Vß primer, 0.5µM 3'Cß primer e 2.5U/µl Taq polimerase. Os ciclos de temperatura a aplicar no PCR foram: desnaturação a 94°C por 30s; "annealing" a 55°C por 30s; extensão a 72°C por 30s, durante 36 ciclos, com um passo final de 9 min a 72°C. Os primers utilizados foram previamente publicados (Obata et al., 1993). A concentração de cDNA foi normalizada através da amplificação de Cß utilizando 2 primers específicos para a região constante ß do TCR. Controles negativos sem cDNA, bem como controles positivos (pool de cDNA de 6 indivíduos) foram incluídos em todas as experiências. Uma aliquota de 8µl do produto do PCR foi carregada num gel de agarose (1.6%) com brometo de etídio, para confirmar o tamanho esperado do produto de amplificação.

A quantificação das cadeias Jß foi feita de acordo com métodos previamente publicados (Grunewald et al. 1992a). Para tal, os produtos do PCR específicos para o TCR obtido acima foram diluídos em tampão TE, fervidos durante 10 min, arrefecidos em gelo e transferidos em slot para filtros Hybond-N (Amersham) usando uma unidade de microfiltração (Bio-Rad). Os filtros foram então incubados sucessivamente em tampão desnaturante e neutralisante (de acordo com as recomendações do fabricante), secos ao ar e incubados a 80°C durante 2 horas. As membranas assim obtidas foram então pré-hibridados durante 3-4h a 44°C em 2xSSPE (0.36M NaCl, 2mM NaH2PO4, 2mM Na2EDTA), 5x Denhardts (0.1% polivinil pirolidona, 0.1% ficol, 0.1% BSA) e 0.5%SDS. A hibridação é realizada durante a noite com sondas especificas para cada Jß (Grunewald et al., 1992a) marcados na extremidade 5' com γ-32P-ATP. Após a hibridação os filtros são lavados por 2 vezes a 44°C em 0.2x SSPE contendo 0.5%

SDS durante 10 min, e expostos a filme de auto-radiografia (Hyperfim MP - Amersham) a -70°C. A densidade do sinal obtido nos filmes expostos é medida em densitómetro laser (GelScan XL - Pharmacia), sendo os valores lidos utilizados para calcular a utilização relativa de cada elemento génico Vß de acordo com o método previamente publicado (Grunewald et al., 1992a).

12.6 - Quantificação relativa de Cß1 e Cß2

A quantificação relativa de Cß1 e Cß2 foi realizada assumindo que os genes Jß rearranjam apenas com o correspondente gene Cß. Assim, a soma de Jß1.1-1.6 e de Jß2.1-2.7 foi considerada como indicativa da utilização relativa de Cß1 e Cß2. Ainda que o pressuposto subjacente a este calculo não seja necessariamente correcto, não encontramos nenhuma sequência na base de dados EMBL que claramente indicasse rearranjos Cß1 e elementos Jß2, ou vice versa. Assim, pensamos que pelo menos na maior parte dos casos, os dados existentes não contrariam o pressuposto referido.

12.7 - Genotipagem de Vß6.7

A genotipagem de Vß6.7 foi realizada como previamente publicado (Vissinga et al., 1994). Resumidamente, o DNA foi preparado de 100µl de sangue periférico (Kawasaki et al., 1990) após a repetida lise dos eritrócitos em TE. O sedimento assim obtido foi incubado com proteínase K (tampão PCR contendo 0.5% tween 20 e 100mg/ml de proteínase K fresca). durante 60 minutos a 56°C. A proteínase K foi então inactivada a 94°C durante 10 min. Do DNA assim obtido, 10 µl foram utilizados em reacções de PCR com volume total de 100µl contendo 0.5µM de primers específicos (Vissinga et al., 1994), 2 unidades de Taq DNA polimerase (Boehringer Manheim), 0.2mM de cada dNTP, 1x tampão PCR (Boehringer Manheim). A reacção foi realizada num termociclador (Braun) em 36 ciclos consistindo de: desnaturação a 94°C durante 1 minuto; "annealing" a 60°C durante 1 minuto; polimerização a 72°C durante 1 minuto. Um passo final de 1 minuto a 72°C foi realizado para assegurar total polimerização dos produtos obtidos.

Do produto desta reacção, 30µl foram então digeridos com 50 unidades de Bam HI a 37°C no tampão fornecido pelo fabricante (Amersham). Os fragmentos assim obtidos foram então separados num gel de agarose (4% Nusieve 3:1; FMC Bioproducts) durante 1h a 100 V, num aparelho de eletroforese horizontal minigel (LKB). O gel foi fotografado com negativos Polaroid (Sigma), e o filme assim obtido submetido a densitometria laser para quantificar a intensidade relativa das bandas. Em alguns casos, a especificidade do produto foi confirmada por "blotting" e hibridização com sonda especifica (Li et al., 1990). Foi considerada heterozigotia apenas quando as bandas observadas possuíam intensidades relativas entre 40% a 60%.

12.8 - Análise estatística

O repertório dos produtos dos genes TCR-Vαβ foram determinados em momentos seriados para alguns indivíduos. Nestes casos, foram considerados para a análise estatística as medianas das várias determinações.

Os limites de confiança (95%) foram calculados como média ± 1.96 SD (derivando portanto a distribuição normal que melhor se ajusta aos dados). De acordo com o critério previamente definido por Callahan et al. (1993), os valores superiores ao limite máximo para 95% de confiança foram considerados expansões, e excluídos das análises.

A variabilidade interindividual foi medida pelos coeficientes de variação (CV) de cada variável estudada. Com o único objectivo de avaliar a variabilidade geral do repertório nas células CD4 ou CD8, foi calculada a média e intervalo dos CV apresentados por cada TCR-Vαβ em CD4 e em CD8.

Comparações entre doentes e controlos, entre dois grupos de doentes, ou entre o repertório nas células CD4 e CD8, foram realizadas por testes T de Student.

As correlações entre o repertório de TCR-Vαβ e os depósitos de ferro (secção 4) , as células CD4 e CD8 (secção 5) ou a razão CD4/CD8 (secção 6), foram realizadas por regressão linear.

O nível de significância nas análises estatísticas realizadas foi considerado a 0.05. No caso das correlações entre CD4/CD8 e o repertório TCR-Vαβ, foi imposto um nível de significância de 0.02.

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático "Statistica for Windows" (StatSoft, Inc.).

PARTE 5

BIBLIOGRAFIA

13 - BIBLIOGRAFIA

Abe J., Kotzin BL., Jujo K., Melish ME., Glode MP., Kohsaka T., Leung DYM. Selective expansion of T cells expressing T-cell-receptor variable regions Vß2 and Vß8 in Kawasaki disease. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1992; 89:4066-4070

Akira S., Okazaki K., Sakano H. Two pairs of recombinant signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. Science. 1987; 238:1134-1138

Akolkar PN., Gulwani-Akolkar B., Pergolizzi R., Bigler RD., Silver J. Influence of HLA-genes on T-cell-Receptor-V segment frequencies and expression levels in Peripheral Blood Lymphocytes. J.Immunol. 1993; 150:2761-2773

Alper T, Savage DV, Bothwell TH. Radioiron studies in a case of haemochromatosis. J.Lab.Clin.Med. 1951;37:665-75

Alt F., Baltimore D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments from a chromossome with evidence of three D-JH fusions. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1982;79:4118-4122

Aplan PD., Lombardi DP., Ginsberg AM., Cossman J., Bertness VL., and Kirsch IR. Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. Science 1990; 250:1426-1429

Arosa FA., da Silva AJ., Godinho IM., Ter Steege JCA., Porto G., Rudd CE., de Sousa M. Decreased CD8-p56lck Activity in Peripheral Blood T-Lymphocytes from Patients with Hereditary Haemochromatosis. Scand.J.Immunol. 1994. 39: 426-432

Bakhshi A., Wright JJ., Graninger W., Seto M., Owens J., Cossman J., Jensen JP., Goldman P., Korsmeyer SJ. Mechanism of the t(14;18) chromossomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1987; 84:2396-2400

Behlke M., Chou H., Huppi K., Loh D. Murine T cell receptor mutants with deletions of ß-chain variable genes. Proc. Natl.Acad.Sci. USA. 1986; 86:767-771

Ben-Nun A., Liblau RS., Cohen L., Lehmann D., Tournier-Lasserve E., Rozenzweig A., Jingwu Z., Raus JCM., Bach M. Restricted T-cell-receptor Vß gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: Predominant genes vary in individuals. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1991; 88:2466-2470

Boehncke WH., Takeshita T., Pendleton CD., Houghten RA., Sadegh-Nasseri S., Racioppi L., Berzofsky JA., Germain RN. The importance of dominant negative effects of amino acid side chain substitutions in peptide-MHC molecule interactions and T-cell recognition. J.Immunol. 1993; 150:331-341

Boehm T. and Rabbitts TH. The human T-cell receptor genes are targets for chromossomal abnormalities in T-cell tumours. FASEB J. 1989; 3:2344-2359

Bomford A., & Williams R. Long term results of venessection therapy in idiopathic Haemochromatosis. Q.J.Med. 1976; 45:611-623

Brown L., Cheng JT, Cheng Q., Siciliano MJ., Crist W., Buchanan G., Baer B. Site specific recombination of the tal-1 gene is a common occurence in human T-cell leukemia. EMBO J. 1990; 9:3343-3351

Bryan CF., Nishiya K., Pollack MS. Dupont B., & de Sousa M. Differential Inhibition of the MLR by Iron: Association with HLA Phenotype. Immunogenetics. 1981;12:1-12

Callahan JE., Kappler JW., Marrack P. Unexpected expantions of CD8 bearing cells in old mice. J.Immunol. 1993; 151:6657-6669

Carrera F., Andrade JCS., Silva FJ., Simões J. Serum ferritin and hemochromatosis alleles in chronic hemodialysis patients. Nephron. 1988; 50:196-198

Cazenave P., Marche PN., Jouvin-Marche E., Voegtlé D., Bonhomme F., Bandeira A., Coutinho A. Vß17 gene polimorphism in wild-derived mouse strains: two amino acid substitutions in the Vß17 region greatly affect T cell receptor specificity. Cell 1990; 63:717-728.

Charlton RW, Botwell TH, Seftel HC. Dietary iron overload. Clin. Haematol. 1973; 2:383-403

Charmley P., Wang K., Hood L., Nickerson DA. Identification and physical mapping of a polymorphic human T cell receptor Vß gene with a frequent null allele. J.Exp.Med. 1993; 177:135-143

Chen W., McCluskey J., Rodda S., Carbone R. Changes at peptide residues buried in the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Binding Cleft Influence T cell Recognition: A possible role for indirect conformation alterations in the MHC class I or bound peptide in determining T cell recognition. J.Exp.Med. 1993; 177:869-873

Claverie JM., Prochicka-Chalufour A., & Bourgueleret L. Implications of a Fab-like structure for the T cell receptor. Immunol. Today.1989; 10:10-14

Concanon P., Gatti RA., Hood LE. Human T cell receptor Vß gene polimorphism. J.Exp.Med. 1987; 165:1130-1140

Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriquez Rilo H, Finegold D,Trucco M: Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. Nature 1994;371:351-355

Constantino A., West TE., Gupta M., Loghmance F. Primary Cardiac lymphoma in a Patient with Aquired Immunodeficiency sindrome. Cancer. 1987; 60:2801-2805

Cossarizza A., Kahan M., Ortolani C., Franceschi C., Londei M. Preferential expression of Vß6.7 domain on human peripheral CD4+ T cells. Implication for positive selection of T cells in man. Eur.J.Immunol. 1991; 21:1571-1574

Cox TM., & Lord DK. Hereditary Haemochromatosis. Eur.J.Haematol. 1989; 42:113-125

Cox TM, Peters TJ. Uptake of iron by duodenal biopsy specimens from patients with hereditary hemochromatosis. Lancet 1978;1:123-4

Davey MP., Meyer MM., Blakke AC. T Cell Receptor Vß Gene Expression in monozygotic twins. Discordance in CD8 subsets and in disease states. J. Immunol. 1994; 152:315-321

Davies TF., Martin A., Concepcion ES., Graves P., Lahat N., Cohen WL. Ben-Nun A. Evidence for selective accumulation of intrathyroidal T Lymphocytes in Human autoimmune thyroid disease based on T cell receptor V gene usage. J.Clin.Invest. 1992; 89:157-162

Davis M & Bjorkman PJ. T Cell antigen receptor genes and T cell recognition. Nature. 1988; 334:395-402

Day CE., Zhao T., Robinson MA. Silent allelic variants of a T-cell receptor Vß12 gene are present in diverse human populations. Human Immunol. 1992; 34:196-202

de Sousa M., Smithyman A., Tan C. Suggested models of ecotaxopathy in lymphoreticular malignancy. Am. J. Pathol. 1978;90:497-520

De Sousa M., Martins da Silva B., Dörner M., Munn G., Nishiya K., Grady R., Silverstone A. Iron and the Lymphomyeloid System: Rationale for considering Iron as a Target of "immune survaillance". in Saltman P & Hegenauer J. (eds.). The Biochemistry and physiology of iron. 1982. Elsevier Biomedical. Amsterdam.

De Sousa M., Breedvelt F., Dynesius-Trentham R., Trentham D., Lum J. Iron, Iron-binding Proteins and Immune System Cells. Annals New York Acad.Sci., 1988; 310-322

de Sousa M., Reimão R., Lacerda R., Hugo P., Kaufman SHE., Porto G. Iron overload in ß2-microglobulin deficient mice. Immunology letters. 1994; 39:105-111

Dersimonian H., Band H., Brenner MB. Increased frequency of T cell Receptor V alpha 12.1 expression on CD8+ T cells: evidence that V alpha participates in shaping the peripheral T cell repertoire. J.Exp.Med. 1991; 174:639-648

Desiderio S., Baltimore D. Double-stranded cleavage by cell extracts near recombinational signal sequences of immunoglobulin genes. Nature. 1984; 308:860-862

DiBrino M., Parker KC., Shiloach J., Knierman M., Lukszo J., Turner RV., Biddison WE. & Coligan JE. Endogenous peptides bound to HLA-A3 possess a specific combination of potential antigenic peptides. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1993; 90:1508-1512

Drapier JC, Hirling H., Wietzerbin J., et al. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. EMBO J.1993; 12: 3643-3649

Droogan, AG., Crockard AD., Hawkins SA., and McNeill TA. Gamma delta T cell distribution in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. J. Neurol. Sci. 1994; 126:172-177

Emery-Goodman A, Hirling H, Scarpellino L et al. Iron regulatory factor expressed from recombinant baculovirus: conversion between the RNA binding apoprotein and Fe-S cluster containing aconitase. Nucleic Acids Research 1993; 21: 1457-1461

Erlandsson H, Mussener A, Klareskog L,Gold DP: Restricted T cell receptor usage in DA rats during early collagen-induced arthritis. Eur J Immunol 1994;24:1929-1932

Falk MC., NG G., Zhang GY., Fanning GC., Kamath KR., and Knight JF. Predominance of T cell receptor V delta 3 in small bowel biopsies from coeliac disease patients. Clin. Exp. Immunol. 1994;98:78-82.

Feeney AJ. Predominance of the prototypic TIS anti-phosphorylcholine junctional sequence in neonatal pre-B cells J.Immunol. 1991;147:4343-4350

Feeney AJ. Comparison of junctional diversity in the neonatal and adult immunoglobulin repertoires. Int.Rev.Immunol. 1992; 8:113-122

Flug F., Pelicci P., Bonetti F., Knowles II DM., Dalla-Favera R. T cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1985; 82:3460-3464

Forman JD., Klein JT., Silver RF., Liu MC., Greenlee BM., and Moller DR.. Selective activation and accumulation of oligoclonal V beta-specific T cells in active pulmonary sarcoidosis. J. Clin. Invest. 1994; 94:1533-1542

Forrester JM., Wang Y., Ricalton N., Fitzgerald JE., Loveless J., Newman LS., King TE., and Kotzin BL. TCR expression of activated T cell clones in the lungs of patients with pulmonary sarcoidosis. J. Immunol. 1994; 153:4291-4302.

Furoni L., Laffan M., Boehm T. Rabbitts T.H., Catovsky D., Luzzato L. Rearrangement of the T-cell receptor δ genes in Human T-cell Leukemias. Blood 1989; 73:559-565

Fujimoto S., Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha chain gene rearrangements. Nature. 1987; 327:242-243

Gilfillan S., Dierich A., Lemeur M., Benoist C., Mathis D. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. Science 1993; 261:1175-1178

Gold D., Offner H., Sun D., Willey S., Vandenbark AA.,Wilson DB. Analysis of T cell receptor beta chains in Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis: Conserved complementarity determining region 3. J.Exp.Med. 1991;174:1467-1476.

Goldman AS., Kimberly HP., Rudloff HE., Brooks EG. & Schmalstieg FC. Repertoire of Vα and Vß regions of T cell antigen receptors on $CD4^+$ and $CD8^+$ peripheral blood T cells in a novel X-linked combined immunodeficiency disease. Eur-J.Immunol. 1992; 22:1103-1106

Goronzy JJ, Bartz Bazzanella P, Hu W, Jendro MC, Walser Kuntz DR,Weyand CM: Dominant clonotypes in the repertoire of peripheral CD4+ T cells in rheumatoid arthritis. J Clin Invest 1994;94:2068-2076

Griesser H., Tkachuk D., Reis MD. Mak TW. Gene rearrangements and translocations in Lymphoproliferative diseases. Blood 1989; 73:1402-1415

Grunewald J., Janson CH., Wigzell H. Biased expression of individual T cell receptor V gene segments in CD4+ and CD8+ human peripheral blood T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 1991a; 21:819-822

Grunewald J., Shankar N., Wigzell H., Janson CH. An analysis of α/ß TCR V gene expression in the human thymus. International Immunol. 1991b; 3: 699-702

Grunewald J., Jeddi-Tehrani M., Pisa E., Janson CH., Andersson R., Wigzell H. Analysis of Jß gene segment usage by CD4+ and CD8+ human peripheral blood T lymphocytes. International Immunol. 1992a; 4: 643-650

Grunewald J., Jeddi-Tehrani M., Dersimonian H., Andersson R., Wigzell H. A persistent T cell expansion in the peripheral blood of a normal adult male: a new clinical entity? Clin.Exp.Immunol. 1992b; 89:279-284

Grunewald J., Janson CH., Eklund A., Ohrn M., Olerup O., Persson U., Wigzell H. Restricted Vα2.3 gene usage by $CD4^+$ T Lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid from sarcoidosis patients correlates with HLA-DR3. Eur.J.Immunol. 1992c;22:129-135

Grunewald J, Shigematsu M, Nagai S, Mikuniya T, Wigzell H, Izumi T,Eklund AG: T-cell receptor V gene expression in HLA-typed Japanese patients with pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:151-156

Gu H., Förster I., Rajewsky K. Sequence homologies, N-sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenic timing of ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. EMBO J. 1990; 9:2133-2140

Gudmundsson S., Ronnelid J., Karlsson-Parra A., Lysholm J., Gudbjoernsson B., Widenfalk B., Janson CH., Klareskog L. T-cell receptor V-gene usage in synovial fluid and synovial tissue from RA patients. Scand.J.Immunol. 1992;36:681-688

Gulwani-Akolkar B., Posnett DN., Jansson CH., Grunewald J., Wigzell H., Akolkar P., Gregersen PK., Silver J. T cell Receptor V-segment frequencies in Peripheral Blood T Cells Correlate with Human Leukocyte Antigen Type. J.Exp.Med. 1991; 174:1139-1146

Gulwani-Akolkar B, Shalon L, Akolkar PN, Fisher SE,Silver J: Analysis of the peripheral blood T-cell receptor (TCR) repertoire in monozygotic twins discordant for Crohn's disease. Autoimmunity 1994;17:241-248.

Halligan BD., Desiderio SV. Identification of a DNA binding protein that recognizes the nonameric recombination sequence of immunoglobulin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987; 84:7019-7023

Hamaguchi Y., Matsunami N., Yamamoto Y., Honjo T. Purification of a protein that binds to the recombination signal sequence of the immunoglobulin J kappa segment. Nucleic Acids Res. 1989; 17:9015-9026

Haqqui TM., Banerjee S., Andersson G., David CS. RIII S/J (H-2r). An inbred mouse strain with a massive deletion of T cell receptor Vß genes. J.Exp.Med. 1989a; 169:1903-1909

Haqqui TM., Banerjee S., Jones WL., Andersson G., Behlke MA., Loh DY., Luthra HS., David CS. Identification of T cell receptor Vß deletions mouse strain AU/ssJ (H-2q) which is resistant to collagen induced arthritis. Immunogenetics. 1989b; 29:180-185

Haqqui TM., Andersson GD., Banerjee S., David CS. Restricted heterogeneity in T-cell antigen receptor Vß gene usage in the lymph nodes and arthritic joints of mice. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1992; 89:1253-1255

Hare J., Benedict SH., Champagne E., Mak TW., Minden M., Gelfand EW. Relationship between rearrangement and transcription of the T-cell receptor α,β and γ genes in B-precursor Acute lymphoblastic leukemia. Blood 1989; 73: 500-508

Haskins P., Stevens ARJ., Finch S. & Finch CA. Iron Metabolism. Iron stores in man as measured by phlebotomy. J. Clin. Invest. 1952; 31:543-547

Hesse JE., Lieber MR., Gellert M., Mizuuchi K. Extrachromossomal DNA substrates in pre-B cells undergo inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals. Cell. 1987; 49:775-783

Hirling H, Henderson BR & Kühn LC. Mutational analysis of the 4Fe-4S cluster converting iron regulatory factor from its RNA binding form to cytoplasmic aconitase. EMBO J.1994; 13:453-461

Hoofbrand AV., Ganeshaguru K., Hooten JWL., & Tattersall MHN. Effect of iron deficiency and desferrioxamine in DNA synthesis in human cells. Brit.J.Haematology 1976 33, 517-526

Hope TJ., Aguilera RJ., Minie ME., Sakano H. Endonucleolytic activity that cleaves immunoglobulin recombination sequences. Science 1986; 231:1141-1145

Howell MD., Diveley JP., Lundeen KA., Esty A., Winters ST., Carlo DJ., Brostoff SW. Limited T-cell receptor ß-chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:10921-10925

Hunt DF., Henderson RA., Shabonowitz J., Sakaguchi K., Michel H., Sevilir N., Cox AL., Appella E., Engelhard VH. Characterization of peptides bound to the Class I MHC-Molecule HLA-A2.1 by Mass Spectrometry. Science. 1992; 255: 1261-1263

Infante AJ., Levcovitz H., Gordon V., Wall KA., Thompson PA., Krolick KA. Preferential use of a T cell receptor Vß gene by acetylcholine receptor reactive T cells from myastenia gravis-susceptible mice. J.Immunol. 1992; 148:3385-3390

Janson CH., Grunewald JG., Österborg A., Dersimonian H., Brenner MB., Mellstedt H., Wigzell H. Predominat T cell receptor V genes usage in patients with abnormal clones of B cells. Blood 1991; 77:1776-1780

Jeddi-Tehrani M., Grunewald J., Hodara V., Andersson R., Wigzell H. Nonrandom T-cell receptor Jß usage pattern in human CD4+ and CD8+ peripheral T cells. Human Immunol. 1994; 40:93-100

Jouvin-Marche E., Trede N.S., Bandeira A., Tomas A., Loh DY., Cazenave P. Different large deletions of T cell receptor Vß genes in natural populations of mice. Eur. J. Immunol. 1989; 19:1921-1926

Kataota T., Kondo S., Nishi M., Kodaira M., Honjo T. Isolation and characterization of endonuclease J: a sequence specific endonuclease cleaving immunoglobulin genes. Nucleic Acids Res. 1984; 12:5995-6010

Kawasaki ES. Sample preparation from Blood, cells and other fluids. in Innis M.A., Gelfand. D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds). PRC protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, 1990

Klausner RD, Rouault TA & Harford JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. Cell. 1993;72:19-28

Koller BH., Marrack P, Kappler JW. Normal development of mice deficient in ß-2-microglobuli, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. Science 1990; 248:1227-1230

Komori T., Okada A., Stewart V., Alt FW. Lack of N-regions in antigen receptor variable region genes of TdT deficient lymphocytes. Science 1993; 261,1171-1175

Korsmeyer SJ. Chromossomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. Annu.Rev.Immunol. 1992;10:785-807

Kühn LC, Molecular regulation of iron proteins. in Clinical disorders of iron metabolism. Bailliére's Clinical Haematology 1994; 7: 763-785.

Kurosawa Y., von Boehmer H., Haas W., Sakano H., Traunecker A., Tonegawa S. Identification of D-segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangements in T-lymphocytes. Nature. 1981; 290:565-570

Lafaille JJ., DeCloux A., Bonneville M., Takagaki Y., Tonegawa S. Junctional sequences of T-cell receptor gamma-delta genes: implications for gamma-delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. Cell. 1989; 59:859-870

Larsson A. Ribonucleotide reductase from regenerating rat liver. Eur.J.Biochem. 1986; 11, 113-121

Lee MS., Chang KS., Cabanillas F., Freireich EJ., Trujillo JM., Stass SA. Detection of minimal residual cells,carrying the t(14,18) by DNA sequence amplification. Science 1987; 237:175-178

LeFranc MP., and Rabbits TH. The Human T-cell receptor γ (TRG) genes. TIBS. 1989; 14/6: 214-218

Lenhinger AL. (eds.) Principles of Biochemistry. 1986; Worth Publishers; New York

Lewis S., Gilford A. Baltimore D. DNA elements are assymetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes. Science 1985; 228:677-685

Lewis SM. The Mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological and comparative analyses. Advances in Immunology. 1994; 56:27-150

Li M., Morzycka-Wroblewska E., Desiderio SV. NBP, a protein that specifically binds an enhancer of immunoglobulin gene rearrangement: purification and characterization. Genes Dev. 1989; 3:1801-1813

Li Y., Szabo P., Robinson MA., Dong B., Posnett DN. Allelic variations in the Human T cell receptor Vß6.7 gene products. J.Exp.Med. 1990; 171:221-230

Lieber MR. Site specifc recombination in the immune system. FASEB J. 1991; 4:2934-2944

Lieber MR.;in "The causes and consequences of chromossomal aberrations" (I.R.Kirsh, ed). 1993. 9 239. CRC Press Ann Arbor

Lin Y., Patek PQ., Collins JL., Cohn M. Analysis of immune surveillance of sequentially derived cell lines that differ in their tumorigenic potential. J.Natl.Cancer Inst. 1985; 74:1025-1030

Lohr HF., Schlaak JF., Gerken G., Fleischer B., Dienes HP., Meyer-zurn-Buschenfelde KH. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. Liver. 1994; 14:161-166

Loughran TP., Starkebaum G., Aprile JA. Rearrangement and expression of T-cell receptor genes in Large granular lymphocyte leukemia. Blood 1988a; 71:822-824

Loughran TP., Starkebaum G., Ruscetti FW. Similar rearrangements of T-cell receptor ß gene in cell lines and uncultured cells from patients with large granular lymphocyte leukemia. Blood 1988b; 72:613-615

Lum JB., Infante AJ., Makker DM., Yang F. & Bownan BH. Transferrin Synthesis by inducer T lymphocytes. J. Clin.Invest. 1986;77:841-849

Lynch SR, Skikne BS, Cook JD. Food Iron absorption in Idiopathic Haemochromatosis. Blood 1989;74:2187-2193

Magrath I. Molecular basis of lymphomagenesis. Cancer Res. 1992; 52:5529s-5540s

Male D., Champion B., Cooke A.(eds.) Advanced Immunology. 1987.Gower Medical Publishing. London

Mao C, Osman GE, Adams S,Datta SK: T cell receptor alpha-chain repertoire of pathogenic autoantibody-inducing T cells in lupus mice. J Immunol 1994;152:1462-1470

Marchalonis JJ., Shluter SF., Wang E., Dehghanpishen K., Lake D., Yocum DE., Edmunson AB., Winfield JB. Synthetic autoantigens of immunoglobulins and T-cell receptors: their recognition in aging, infection, and autoimmunity. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1994; 207:129-147

Martins da Silva B., Pollack MS., Dupont B., and de Sousa M. A study of ferritin secretion by human peripheral blood mononuclear cells in HLA-typed donnors. in Saltman P & Hegenauer J. (eds.). The Biochemistry and physiology of iron. 1982. Elsevier Biomedical. Amsterdam.

Max EE., Seidman JG. Leder P. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979; 76:3450-3454

McCormack WT., Tjoelker LW., Carlson LM., Petryniak B., Barth C., Humphries E., Thompson CB. Chiken Ig L gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single non-random nucleotides to both coding segments. Cell 1989; 56:785-791

McIntosh RS., Watson PF., Pickerill AP., Davies R., WeetmanAP. No restriction of intrathyroidal T cell receptor V alpha families in the thyroid of Graves' disease. Clin.Exp.Immunol. 1993;91:147-152

Milder MS, Cook JD, Stray S, Finch CA. Idiopathic Haemochromatosis, an interim report. Medicine (Baltimore) 1980;59:34-49

Minden MD., Toyonaga B., Ha K., Yanagi Y., Chin B., Gelfand E., Mak TW. Somatic rearrangement of T-cell antigen receptor gene in human T-cell malignancies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82:1224-1227

Minden MD., and Mak. TW. The structure of the T cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells. Blood 1986; 68:327-336

Mitsuyasu RT., Taylor JM., Glaspy J., Fahey JL. Heterogeneity of epidem,ic Kaposi's Sarcoma. Implications for therapy. Cancer. 1986; 57:1657-1661

Moebius U., Manns M., Hess G., Kober G., Büschenfelde KM., Meuer SC. T cell receptor gene rearrangements of T lymphocytes infiltrating the liver in chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis (PBC): oligoclonality of PBC–derived T cell clones. Eur.J.Immunol. 1990; 20:889-896

Monaco JJ. A molecular Model of MHC class I restricted antigen processing. Immunol. Today. 1992; 13:173-179

Muegge K., West M., Durum SK. Recombination sequence binding protein in thymocytes undergoing T-cell-receptor rearrangement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:4151-4155

Müllner EW, Neupert B & Kühn LC. A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. cell 1989; 58:373-382

Nalefski EA., Kasibhatla S., & Rao A. Functional analysis of the antigen binding site of the T-cell Receptor α chain. J.Exp.Med. 1992; 175:1553-1563

Nick S., Pileri P., Tongiani S., Uematsu Y., Kappos L., and de Libero G. T cell receptor gamma delta repertoire is skewed in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients: molecular and functional analyses of antigen-reactive gamma delta clones. Eur. J. Immunol. 1995; 25:355-363

Nichols GM, Bacon BR. Hereditary Hemochromatosys: Pathogenesis and Clinical Features of a Common Disease. Am.J. Gastroenter.1989;84:851-62

Niederau C., Fischer R., Sonnenberg A., Stremmel W., Trampish HJ., Stromeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and in non-cirrhotic patients with primary hemochromatosis. N-Engl.J.Med. 1985; 313:1256-62

Nishyia K., de Sousa M., Tsoi E., Bognacki JJ., & de Harven E. Regulation of expression of a Human Lymphoid cell surface marker by Iron. Cell.Immunol. 1980; 53:71-83

Obata F., Tsumoda M., Ito K., Ito I., Kaneko T., Pawlec G., Kashiwagi N. A single universal primer for the T cell receptor (TCR) variable region genes enables enzymatic amplification and direct sequencing of TCRß cDNA of various T cell clones. Human Immunol. 1993; 36:163-167

O'Connor NTJ., Weatherall DJ., Feller AC., Jones D., Pallesen G., Stein H., Wainscoat JS., Gatter KC., Isaacson P., Lennert K., Ramsey A., Wright DH. Rearrangement of the T-cell-receptor ß-chain gene in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. The Lancet 1985;8:1295-1297

Oettinger MA., Schatz DG., Gorka C., Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that sinergistically activate V(D)J recombination. Science 1990; 248: 1517-1523

Okazaki K., Davis DD., Sakano H. T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. Cell 1987; 49:477-485

Oksenberg, Panzara, Begovich, Mitchell, Erlich, Murray, Shimonkevitz, Sherritt, Rothbard,et al.: Selection for T-cell receptor V beta -D beta -J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. Nature 1993;-70

Okubo M., Kurokawa M., Ohto H., Nishimaki T., Nishioka K., Kasukawa R., & Yamamoto K. Clonotype analysis of peripheral blood T cells and autoantigen-reactive T cells from patients with mixed connective tissue disease. J. Immunol. 1994; 153:3784-3790

Orntoft TF., Mors NP., Eriksen G., Jacobsen NO., Poulsen HS. Comparative immunoperoxidase demonstration of T-antigens in Human colorectal carcinomas and morphologically abnormal mucosa. Cancer Res. 1985; 45:447-452

Parker KC., Bednarek MA., Hull LK., Utz U., Cunningham B., Zweerink HJ., Biddison WE. & Coligan JE. Sequence motifs important for peptide binding to the Human MHC class I molecule, HLA-A2. J.Immunol. 1992; 149:3580-3587

Parmiani G., Sensi ML., Balsari A., Colombo MP., Gambacorti-Passerini C., Grazioli L., Rodolfo M., Cascinelli N., Fossati G. Adoptive Immunotherapy of cancer with immune and activated lymphocytes: experimental and clinical studies. Ric.Clin.Lab. 1986; 16:1-20

Paslier DL., Chen Z., Loiseau P., Cohen D., Sigaux F. T cell rearranging gene γ: Diversity and mRNA expression in fresh cells from T cell acute lymphoblastic leukemia.Blood 1987; 70:637-646

Pierce JL, Zborowski KA, Kraig E,Infante AJ: Highly conserved TCR beta chain CDR3 sequences among immunodominant acetylcholine receptor-reactive T cells in murine myasthenia gravis. Int Immunol 1994;6:775-783

Pietra BA, De Inocencio J, Giannini EH,Hirsch R: TCR V beta family repertoire and T cell activation markers in Kawasaki disease. J Immunol 1994;153:1881-1888.

Porto G., Vicente C., Fraga J., Martins da Silva B., de Sousa M. Importance of establishing appropriate local reference values for the screenning of hemochromatosis: A study of three different control populations and 136 hemochromatosis family members. J.Lab.Clin.Med. 1992; 119:295-305

Porto G. Hemocromatose Idiopática: Um diagnóstico que não pode ser esquecido. in Hemocromatose Idiopática: Aspectos epidemiológicos, hematológicos e imunológicos. 1993; Tese de Doutoramento. ICBAS-UP. pp 5-8

Porto G., Reimão R., Gonçalves C., Vicente C., Justiça B., de Sousa M Hemochromatosis as a window into the study of the immunological system: A novel correlation between CD8+ lymphocytes and iron overload. Eur.J.Haematol. 1994; 52:283-290

Posnett DN., Wang C.Y., Friedman SM. Inherited polymorphism of the human T-cell antigen receptor detected by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986; 83:7888-7892

Posnett DN., Gottlieb A., Bussel JB., Friedman SM., Chiorazzi N., Li Y., Szabo P., Farid NR., Robinson MA. T cell antigen receptors in autoimmunity. J.Immunol.1988; 141:1963-1969

Posnett DN., Schmelkin I., Burton DA., August A., McGrath H., Mayer LF. T cell antigen receptor V gene Usage. Increases in Vß8+ T cells in Chron's disease. J.Clin.Invest. 1990; 85: 1770-1776

Posnett DN., Vissinga CS., Pambuccian C., Wei S., Robinson MA., Kostyu D., Concannon P. Level of Human TCRBV3S1 (Vß3) expression correlates with allelic polymorphism in the spacer region of the recombination signal sequence. 1994a. J.Exp.Med. 179:1707-1711

Posnett DN., Sinha R., Kabak S., & Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammapathy". J.Exp.Med. 1994b; 179:609-618

Prashar Y., Li Y., Kubinec JS., Jones N., Posnett DN. A monoclonal antibody (OT145) specific for the T cell antigen receptor Vß6.7a allele detects an epitope related to a proposed superantigen-binding site. J.Immunol. 1991; 147:3441-3444

Pullen AM., Potts W., Wakeland EK., Kappler J., Marrack P. Surprisingly uneven distribution of the T cell receptor Vß repertoire in wild mice. J.Exp.Med. 1990; 171:49-62

Raaphorst FM., Kaijzel EL., van Tol M.J., van den Elsen PJ. Non-random employment of V beta 6 and J beta gene elements and conserved amino acid usage profiles in CDR3 regions of human fetal and adult TCR beta chain rearrangements. Int.Immunol. 1994; 6:1-9

Rabbitts TH., Stinson A., Forster A., Foroni L., Luzzatto L., Catovsky D., Hammarström L., Smith CIE., Jones D., Karpas A., Minowada J., Taylor AMR. Heterogeneity of T-cell ß-chain gene rearrangements in human leukaemias and lymphomas. EMBO J.1985; 4:2217-2224

Rabbitts TH. Translocations, Master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. Cell 1991; 67:641-644

Rambaldi A., Pelicci P., Allavena P., Knowles II DM., Rossini S., Bassan R., Barbui T., Dalla-Favera R., Mantovani A. T cell receptor ß chain gene rearrangements in lymphoproliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells. J.Exp.Med. 1985; 162:2156-2162

Rammensee HG., Falk K., Rötzshke O. Peptides Naturally presented by MHC Class I Molecules. Annu.Rev.Immunol. 1993. 11:213-44

Reimão R., Porto G., de Sousa M. Stability of CD4/CD8 ratios in man: New correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic haemochromatosis patients. C.R.Acad.Sci. Paris, t. 1991; 313(III):481-487

Reis MD., Griesser H. & Mak TW. Antigen receptor genes in hemopoietic malignancies. Biochim. Biophys. Acta 1991; 1072:177-192

Robinson MA. Allelic sequence variations in the hypervariable region of a T-cell receptor ß chain: Correlation with restriction fragment length polymorphism in human families and populations. Proc. Natl Acad.Sci.USA 1989; 86:9422-9426

Roitt IM., Brostoff J., Male DK. (eds). Immunology. 1994. Gover Medical Publishing, London

Roth DB., Chang XB., Wilson J. Comparison of filler DNA at immune, non-immune and oncogenic rearrangements suggests multiple mechanisms of formation. Mol.Cell.Biol. 1989; 9:3049-3057

Roth DB., Menetski JP., Nakajima P., Bosma MJ., Gellert M. V-(D)-J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in SCID mouse thymocytes. Cell 1992; 70:983-991

Rötzshke O. Falk K., Stevanovic S., Jung G., Rammensee HG. Peptide motifs of closelly related HLA-class I molecules encompass substantial differences. Eur. J. Immunol. 1992; 22: 2453-2456

Rouault TA, Hentze MW, Haile DJ et al The iron-responsive element binding protein: a method for the affinity purification of a regulatory RNA-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 86:5768-5772

Royer HD., & Reinherz EL. T Lymphocytes: ontogeny, function, and relevance to clinical disorders. The New Engl. J. Med. 1987; 317: 1136-1142

Rozzo SJ., Drake CG., Chiang BL., Gershwin ME., & Kotzin BL.. Evidence for polyclonal T cell activation in murine models of systemic lupus erythematosus. J. Immunol. 1994; 153:1340-1351

Sakano H., Hüppi K., Heinrich G., Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light chain genes. Nature 1979; 280: 288-294

Sakano H., Kurosawa Y., Weigert M., Tonegawa S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. Nature 1981; 290:562-565

Santamaria P, Lewis C, Jessurun J, Sutherland DE,Barbosa JJ: Skewed T-cell receptor usage and junctional heterogeneity among isletitis alpha beta and gamma delta T-cells in human IDDM. Diabetes 1994;43:599-606

Sawyers CL., Denny CT., Witte ON. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. Cell 1991; 64:337-350

Schatz DG, Baltimore D. Stable expression of immunoglobulin gene V(D)J recombinase activity by gene transfer into 3T3 fibroblasts. Cell. 1988; 53:107-115

Schatz DG., Oettinger MA. Baltimore D. The V-(D)-J recombination activation gene RAG-1. Cell 1989; 59:1035-1048

Schever PJ. Liver biopsy interpretation. London: Baillière Tindal. 1980.

Schönrich G., Kalinke U., Momburg F., Malissen M., Schmitt Verhulst AM., Malissen B., Hämmerling GJ. & Arnold B. Down regulation of T cell receptors on self reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. Cell. 1991; 65:293-304

Shirakata M., Hüppi K., Usuda S., Okasaki K., Yoshida K., Sakano H. HMG-1 DNA binding protein isolated with V-(D)-J recombination signal probes. Mol.Cell.Biol. 1991; 11:4528-4536

Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Hemochromatose Idiopathique: Maladie associée à l'antiène tissulaire HLA-A3? Nouv. Presse Med. 1975; 4:1432

Simon M, Bourel M, Genetet B, Fauchet R. Idiopathci Haemochromatosis. Demonstration of a recessive transmission and early detection by family HLA typing. N.Engl.J.Med. 1977a; 297:1017-1021

Simon MJ, Alerandre JL, Bourel M. Heredity of idiopathic hemochromatosis: A study of 106 families. Clin. Genet. 1977b; 11:327-341

Smith JL., Lane AC., Hodges E., Reynolds WM., Howell WM., Jones DB., Janson CH. T cell receptor variable gene usage by lymphoid populations in T cell lymphoma. J.Pathol. 1992; 166:109-112

Sottini A., Imberti L., Gorla R., Cattaneo R., Primi D. Restricted expression of T cell receptor Vß but not Vα genes in rheumatoid arthritis. Eur.J.Immunol. 1991; 21:461-466

Steis RG., Broder S. Aquired immune deficiency sindrome and Kaposi's Sarcoma: clinical relatioship between immunodeficiency disease and cancer. Important Ad. Oncol. 1985: 141-169

Sun D, Hu XZ, Le J,Swanborg RH: Characterization of brain-isolated rat encephalitogenic T cell lines. Eur J Immunol 1994;24:1359-1364

Sunder-Plassmann G., Heinz G., Wagner L., Prychzy B.& Derfler K. T cell selection and T-cell receptor variable ß-chain usage in chronic hemodialysis patients. Clinical nephrology. 1992; 37:252-259

Tamura N., Moller DR., Balbi B., Crystal RG. Preferential usage of the T-cell antigen receptor ß-chain constant region Cß1 element by lung T-lymphocytes of patients with pulmonary sarcoidosis. Am.Rev.Respir.Dis. 1991; 143:635-639

Tawa A., Benedict SH., Hara J., Hozumi N., Gelfand EW. Rearrangement of the T cell receptor γ-chain gene in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1987; 70:1933-1939

Tiwari JL., Terasaki P. (eds) HLA and disease associations. Springer Verlag. New York. 1985

Toyonaga B., Yoshikai Y., Vadasz V., Chin B., Mak TW. Organization and sequence of the diversity, joining and constant regions of the human T-cell-receptor ß chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 8624-8628

Tycko B., and Sklar J. Chromossomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. Cancer Cells. 1990; 2:1-8

Uematsu Y., Wege H., Straus A., Ott M., Bannwarth W., Lanchbury J., Panayi G., Steinmetz M. The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1991; 88:8534-8538

Urban JL., Kumar V., Kono DH., Gomez C., Horvath SJ., Clayton J., Ando DG., Sercarz EE., Hood L. Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. Cell 1988; 54:577-592

Vasconcelos JC., & Porto G. Quantificação de sobrecarga hepática de ferro e detecção de hepatocarcinoma por ressonância magnética: aplicação no diagnóstico e avaliação do tratamento em doentes com hemocromatose. Acta Radiológica Portuguesa. 1994; 6:41-52

Vicente C., Porto G. and de Sousa M. Method for Establishing Serum Ferritin Reference Values Depending on Sex and Age. J. Lab. Clin. Med. 1990; 116: 779-784

Vissinga CS., Charmley P., Concannon P. Infuence of coding region polymorphism on the peripheral expression of a human TCR Vß gene. J. Immunol. 1994; 152:1222-1227

Walden WE, Daniels-McQueen S, Brown PH., Gaffield L., Russel DA., Bielser D., Bailey LC., Thach RE. Translational repression in eukariotes: partial purification and characterization of a repressor of ferritin mRNA translation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85:9503-9507

Wang CC., Hwang LH., Yang PM., Chiang BL., Chen PJ., Chen DS. Unbiased usage of T-cell receptor beta variable region genes in peripheral blood cells of hepatitis C patients: no correlation with superantigen effect. J.Med.Virol. 1995; 45:24-28

Weidmann E., Whiteside T.L., Giorda R., Herberman RB., Trucco M. The T-cell receptor Vß gene usage in tumor infiltrating lymphocytes nd blood of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Research. 1992; 52: 5913-5920

Whittaker P, Skikne BS, Covell AM. Duodenal Iron proteins in idiopathic haemochromatosis. J.Clin.Invest. 1989; 83:261-7

Williams R, Manenti F, Williams HS, Pitcher CS. Iron absorption in idiopathic haemochromatosis before, during and after venesection therapy. Br, J. Med. 1986;2:78-81

Wills ED. Lipid peroxide formation in microsomes: the role of non-haem iron. Biochem J 1969; 113:325-332

Worwood M. Genetics of hemochromatosis. in Clinical Disorders of iron metabolism. Bailliére's Clinical Haematology 1994; 7:903-919

Weigert M., Perry R., Kelley D., Hunkapiller T., Schilling J., Hood L. The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. Nature 1980; 283:497-499

Wu LC., Mak CH., Dear N., Boehm T., Foroni L., Rabbits TH. Molecular cloning of a zinc-finger protein which binds to the heptamer of the signal sequence for V-(D)-J recombination. Nucleic Acids Res.1993; 21:5067-5073

Wucherpfennig KW., Ota K., Endo N., Seidman JG., Rosenzweig A., Weiner HL., Hafler DA. Shared human T-cell-receptor Vß usage to immunodominat regions of myelin basic protein. Science 1990;248:1016-1019

Wucherpfennig KW, Zhang J, Witek C, Matsui M, Modabber Y, Ota K,Hafler DA: Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. J Immunol 1994;152:5581-5592

Yaouanq J., Simon M. HLA alleles, hemochromatosis Allele, and serum ferritin in hemodialysis patients. Nephron. 1988;50: 259-260

Yewdell JW., & Bennink JR. Cell Biology and antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. Adv.Immunol. 1992; 52:1-123

Yoshikai Y. γ/δ T cell receptor. Microbiol. Immunol. 1991; 35:493-506

Zagon G., Tumang JR., Li Y., Friedman SM., & Crow MK. Increased frequency of V beta 17-positive T cells in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1994; 37:1431-1440

Zijlstra M., Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H., Jaenish R. ß-2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolitic T-cells. Nature 1990; 344:742-746

Zwillich SH, Fang Q, Kieber Emmons T, Vonfeldt J, Monos D, Ramanujam T, Wang B, Weiner DB,Willams WV: V alpha gene usage in rheumatoid compared with osteoarthritic synovial tissue T cells. DNA Cell Biol 1994;13:923-931