

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**OS RECEPTORES DO LINFÓCITO T VBETA03 E VBETA20  
E A SUSCETIBILIDADE AO  
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

**JOÃO ADALBERTO MARASCA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS TAVARES BRENOL  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ARTUR BOGO CHIES**

**TESE DE DOUTORADO**

**- 2006 -**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**OS RECEPTORES DO LINFÓCITO T VBETA03 E VBETA20  
E A SUSCETIBILIDADE AO  
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

**JOÃO ADALBERTO MARASCA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS TAVARES BRENOL  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ARTUR BOGO CHIES**

**TESE DE DOUTORADO**

**- 2006 -**

## **AGRADECIMENTOS**

- Aos meus colegas do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Departamento de Genética da UFRGS pelo apoio e auxílio sempre prestosos.

- Ao Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol pelo exemplo de vida e de profissional, constante estímulo ao aprimoramento profissional e intelectual, fundamental apoio na redação da tese e, principalmente, pelo carinho e amizade.

- Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier pelo estímulo ao método científico, busca de evidências, redação dos artigos e exemplo de dedicação ao trabalho científico.

- Ao Prof. Dr. José Artur Bogo Chies pelo constante apoio junto ao laboratório de genética e pelo auxílio na redação dos artigos.

- A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

*À minha família  
João Batista, Elsa,  
João Luís “in memoriam” e  
Ariana*

“A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”

*Carlos Drummond de Andrade*

## ÍNDICE

1 – Lista de abreviaturas.....	07
2 – Lista de tabelas.....	09
3 – Lista de figuras.....	11
4 – Resumo.....	13
5 – Abstract.....	15
6 – Introdução.....	17
7 – Revisão da literatura.....	19
8 – Objetivos.....	34
9 – Referências bibliográficas.....	35
10 – Artigo 1 em inglês.....	47
11 – Artigo 2 em inglês.....	63
12 – Artigo 1 em português.....	77
13 – Artigo 2 em português.....	93
14 – Considerações finais.....	109
15- Apêndices.....	110

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

ACR – *American College of Rheumatology* – Colégio Americano de Reumatologia

C - constante

CD – *cluster designation* – designação de grupo (marcador de superfície de linfócitos T)

CDR3 – *complementary determining region 3* – terceira região determinante da complementaridade

D – diversidade

DNA – *desoxyribonucleic acid* – ácido desoxiribonucléico

FAN – fator antinuclear

HLA – *human leukocyte antigen* – antígeno leucocitário humano

J – junção

LES – lúpus eritematoso sistêmico

MHC – *main histocompatibility complex* – complexo de histocompatibilidade principal

pb – pares de bases

PCR – *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

RFLP – *restriction fragment length polymorphism* – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

RNA – *ribonucleic acid* – ácido ribonucléico

RSS – *recombination signal sequence* – seqüência de sinal de recombinação

RT-PCR – *reverse transcription polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa

T – timócitos, linfócitos T

TCR – *T cell receptor* – receptor de células T

TCRBV – segmento gênico codificador de cadeia variável beta do receptor de célula T

Th – *T helper* – linfócito T auxiliar

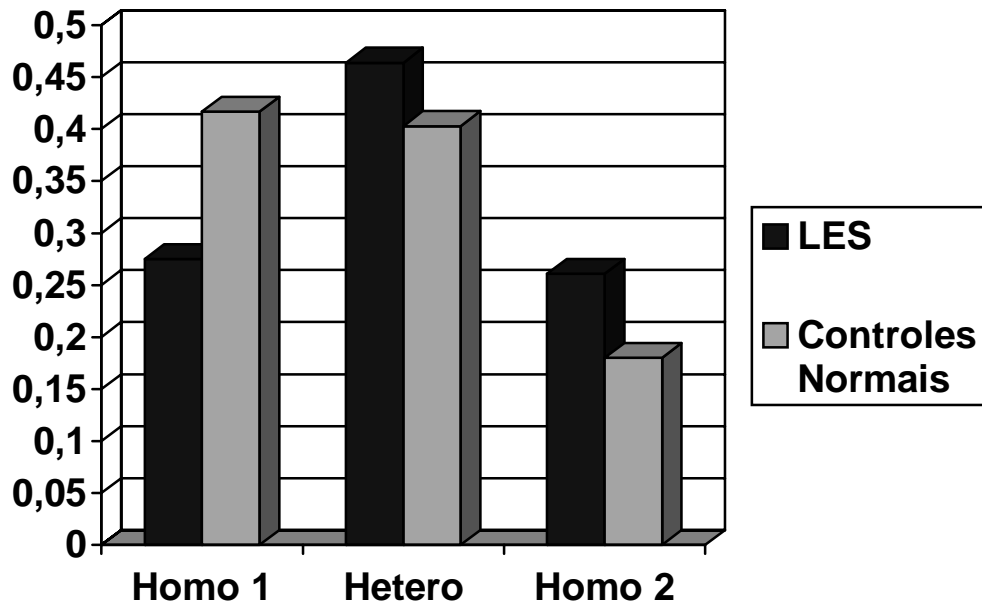
V – variável

V $\beta$ 20 – cadeia variável beta 20

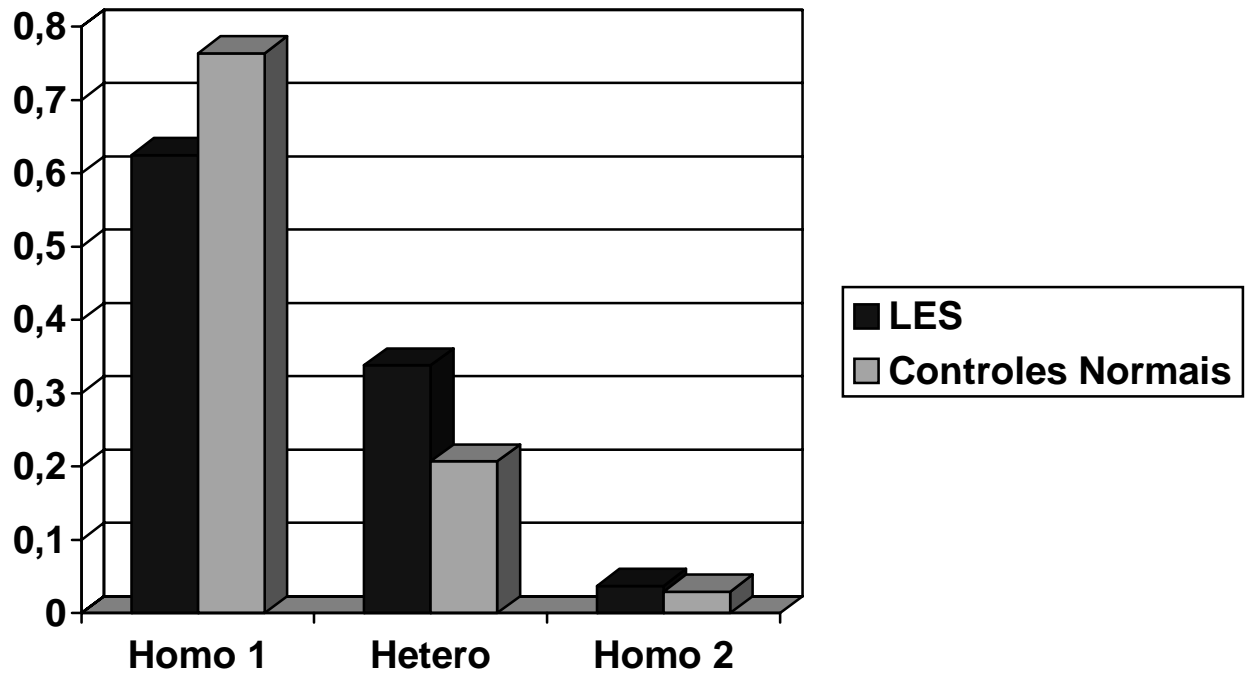


## 2. TABELAS

### 2.1 TCRBV03S1 frequência genotípica



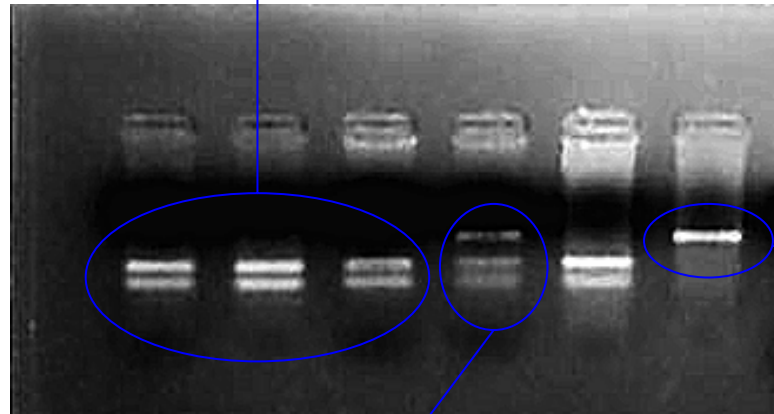
## 2.2 TCRBV20S1 frequência genotípica



### 3. FIGURAS

#### 3.1 Visualização do PCR do TCRVB20S1 em gel de agarose 3%

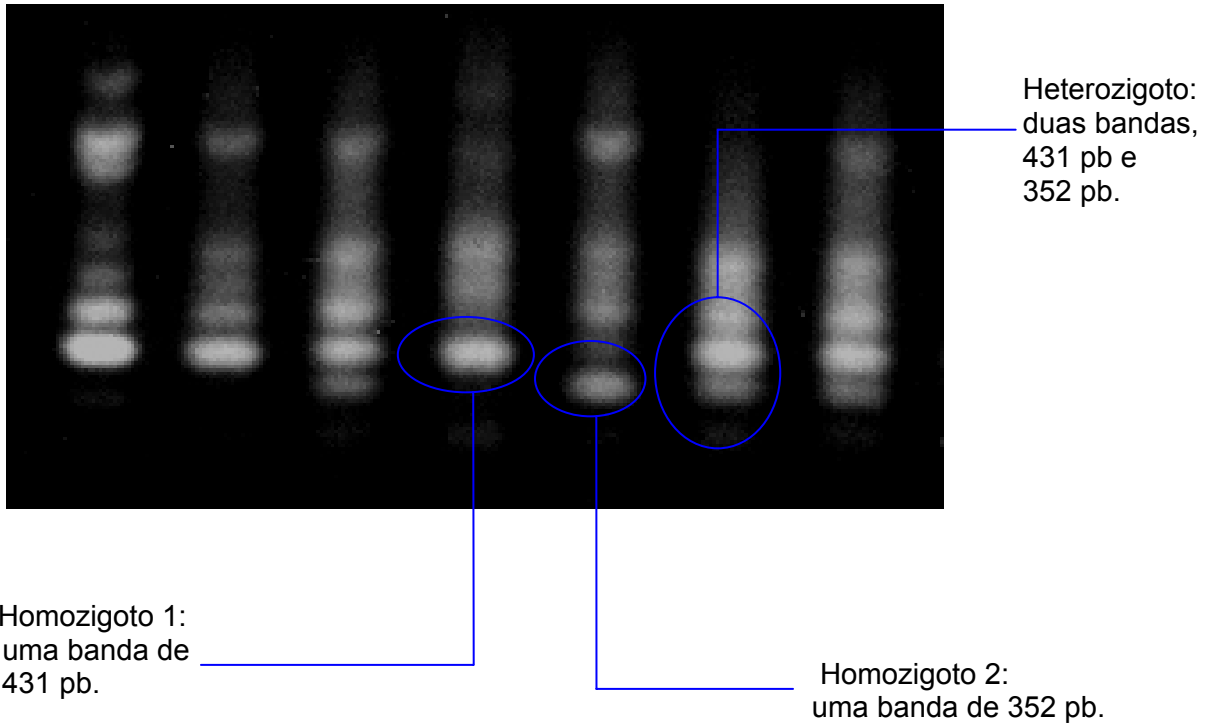
homozigotos para o alelo selvagem apresentavam duas bandas de 100pb e 135pb;



heterozigotos possuíam três bandas: 235pb, 100pb e 135 pb.

homozigotos para o alelo nulo apresentavam uma banda única de 235pb

### 3.2 Visualização do PCR do TCRVB03 em gel de agarose 1%



#### 4. RESUMO

O repertório de linfócitos T de um dado indivíduo reflete uma amostra selecionada de receptores do linfócito T (TCR) composta por todas variáveis que existem numa linhagem de DNA. Durante o desenvolvimento da célula T, as variáveis do TCR se combinam para formar cadeias alfa e beta que são responsáveis pela interação com o peptídeo e o complexo de histocompatibilidade principal, e desta forma, modelar respostas imunes específicas. Considerando o envolvimento do TCR no desenvolvimento de respostas imunes, vários estudos foram direcionados para analisar polimorfismos de certos genes do TCR e suas associações com condições patológicas.

Neste estudo foram descritas as frequências alélicas e genótípicas de dois segmentos variantes do TRCBV (TCRBV3S1 e TCRBV20) num grupo de 138 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Os resultados foram comparados com o grupo controle (indivíduos de diferentes grupos étnicos e previamente hígidos). Já foi sugerido que alguns genes do TCRBV são preferencialmente expressados por células T infiltrando os rins em pacientes com nefrite lúpica, e polimorfismos genéticos de citocinas e, provavelmente, do TCR, podem contribuir para desregular a atividade do linfócito T. Ambos polimorfismos analisados estão relacionados com a expressão de segmentos na superfície do linfócito T. A variante TCRBV3S1 se correlaciona com o número de linfócitos T usando este segmento gênico no sangue periférico, e um dos alelos do TCRBV20 determina um segmento não funcional do TCRBV; provocando, em indivíduos homozigotos, uma falha no repertório dos linfócitos T periféricos. Desta forma, modificaria a capacidade de um certo indivíduo desenvolver uma resposta imune.

Embora a frequência alélica destes dois segmentos gênicos difira de acordo com o grupo étnico analisado, não houve correlação das variantes estudadas com o desenvolvimento de lúpus ou nefrite lúpica. Não está claro se a ausência de certos segmentos gênicos do TCR tem significado funcional. A hipótese que polimorfismos genéticos do TCR possam determinar se os linfócitos T vão provocar uma doença auto-imune ainda é discutida.

## 5. ABSTRACT

The peripheral T cell repertoire present in a given individual reflects a selected sample of the potential repertoire, composed from all TCR variable segments that exist in germline configuration at the DNA. During T cell development, the TCR variable segments rearrange to form alpha and beta chains that, as an heterodimer, are responsible by the interaction with the peptide-MHC complex and can, consequently, shape specific immune responses. Considering the TCR involvement in the development of immune responses, several studies are directed to the analysis of TCR gene segment polymorphisms and association of allelic variants with pathological conditions. Here we describe the allelic and genotypic frequencies of biallelic variants of two TCRBV gene segments (TCRBV3S1 and TCRBV20) in a sample of 138 systemic lupus erythematosus patients comparing with data from control samples obtained from human populations with different ethnic backgrounds. It was already suggested that some TCRBV gene segments are preferentially expressed by T cells infiltrating the kidneys of patients with lupus nephritis, and that genetic polymorphisms of cytokines and, perhaps, of the TCR may contribute to deregulate lymphocyte activity. Both analysed polymorphisms are related to the expression of the segment at the T cell surface (the TCRBV3S1 variants correlates with the number of T cells using the relevant gene segment at the peripheral pool, and one of the TCRBV20 alleles codes a non-functional TCRBV segment, leading in homozygous individuals to the presence of a “gap” in the peripheral T cell repertoire) thus modifying the capacity of a given individual to develop an immune response. Although allelic frequencies of these both TCRBV gene segments differs according to the ethnic group analysed, there were no correlation of the variants studied and development of lupus and lupus nephritis. It is not yet well established whether the absence of certain TCRBV

gene segments has functional significance. The suggestion that genomic polymorphisms of TCR genes (along with the correct HLA alleles) determine whether T cells can direct a pathogenic autoimmune response is discussed.



## 6. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, de acometimento multissistêmico e etiologia desconhecida, caracterizada basicamente por arterite de vasos de pequeno e médio calibre (1). Afeta principalmente mulheres jovens e pode se apresentar clinicamente de várias maneiras.

O LES é considerado o protótipo da doença auto-imune. Tem evolução crônica, caracterizada por períodos de atividade e remissão. Há uma desordem na resposta imune humoral e celular que leva a produção de auto-anticorpos (2). Alguns desses auto-anticorpos, direcionados contra antígenos intra e extra celulares e contra o núcleo da célula, podem determinar lesões em diferentes órgãos e sistemas, variando de paciente para paciente. As diferentes apresentações clínicas da doença estão relacionadas com a interação de diversos fatores: genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos (3). Um dos principais desafios para o melhor conhecimento da etiopatogenia do LES é a melhor identificação das relações entre suscetibilidade genética e a expressão da doença (4).

Vários estudos evidenciam o papel central do linfócito T na patogênese do LES e nefrite lúpica (5,6,7,8,9,10,11,12,13). Disfunções imunológicas das células T têm sido consideradas como o evento primário no surgimento da doença. Estudos prévios mostraram alterações na resposta de células T de pacientes LES em reconhecer peptídeos antigênicos associados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II. Isto sugere a possibilidade que defeitos funcionais no linfócito T estejam associados a uma sinalização incorreta do receptor do linfócito T (TCR) (14, 15, 16, 17). Embora seja evidente que o papel do linfócito T seja crítico

para o desenvolvimento da doença, o grau de participação genética que determina a anormalidade na sua função ainda não está claro.

Durante o desenvolvimento do linfócito T, os segmentos variáveis do TCR podem se rearranjar na forma de cadeia alfa ou beta, que são responsáveis pela interação com o MHC, modulando respostas imunes específicas. Vários estudos foram direcionados para analisar o polimorfismo de segmentos de genes do TCR e associação de variantes alélicas com condições patológicas. Já foi sugerido que algumas famílias de TCR beta são preferencialmente expressadas por linfócitos T infiltrando os rins em pacientes com nefrite lúpica (7, 10, 11, 17, 18, 19,20). Também já foram demonstradas associações de alguns polimorfismos gênicos das cadeias dos receptores do linfócito T com outras doenças auto-imunes como a síndrome de Sjögren e artrite reumatóide (21,22,23).

Dois polimorfismos em especial são objetos do nosso estudo. Ambos são relacionados com a expressão genética de segmentos no receptor do linfócito T. A variante TCRBV3S1 está relacionada com o número de células T utilizando esse segmento gênico no sangue periférico. O alelo TCRBV20S1 tem um segmento não funcional que pode levar indivíduos homocigotos a não expressarem este receptor. Desta maneira, esses polimorfismos poderiam influenciar a capacidade de certo indivíduo em desenvolver determinada resposta imune.

Recentes avanços no diagnóstico e manejo dos pacientes com LES têm melhorado substancialmente o prognóstico da doença. As taxas de morbidade e mortalidade têm diminuído; entretanto, muito ainda precisa ser feito para se elucidar a patogênese do LES e proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes lúpicos.

## 7. REVISÃO DA LITERATURA

### 7.1 Conceito, epidemiologia e apresentação clínica do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença pouco comum e que acomete principalmente mulheres jovens. É uma doença inflamatória crônica e multissistêmica, caracterizada basicamente pela arterite de vasos de pequeno e médio calibre. Causa dano tecidual como resultado da ação de anticorpos e depósitos de imunocomplexos. Pode se apresentar clinicamente de várias formas, com evolução caracterizada por remissões e exacerbações. As alterações imunológicas, com as conseqüentes manifestações clínicas, estão associadas à suscetibilidade genética e fatores ambientais tais como irradiações, infecções, medicamentos, etc. (24).

Os critérios para o diagnóstico do LES são padronizados pelo ACR (*American College of Rheumatology*), criados em 1971 e atualizados em 1982 com base em estudos epidemiológicos (25, 26). Em 1997 houve a inclusão dos anticorpos antifosfolípidios nos critérios diagnósticos (apêndice 1) (27).

O LES teve um grande aumento na incidência a partir da clássica descrição da célula LE por Hargraves em 1948 (28) e da primeira identificação de auto-anticorpo contra o núcleo celular por Friou em 1957 (29). O LES, até então considerado uma doença rara, transformou-se numa enfermidade freqüentemente vista em enfermarias gerais de hospitais de ensino (30). A incidência de doenças do tecido conjuntivo, através do número de admissões de pacientes no *Hospital Medical Center*, em Los Angeles, evidenciou o crescente aumento do número de casos de LES por ano desde 1928: 1928 nenhum caso; 1938, 4 casos; 1948, 9 casos; 1958, 36 casos; 1968, 97 casos; 1978, 149 casos; 1982, 211 casos (31).

A prevalência nos Estados Unidos varia de 14,6 a 122 casos por 100.000 habitantes (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39). Outros estudos para estimar a prevalência foram conduzidos na Suécia (40, 41), Finlândia (42), Islândia (43, 44), Nova Zelândia (45, 46), Malásia (47), Inglaterra (48, 49, 50, 51), China (52), Japão (53), Curaçao (54) e Irlanda do Norte (55). Destes estudos feitos em países de populações predominantemente brancas e amarelas, a prevalência variou de 12,5 a 39 casos por 100.000 habitantes. Esta variação pode ser devida a diferentes metodologias empregadas nos estudos.

A incidência do LES foi avaliada em vários estudos, variando de 1,8 a 7,6 casos por 100.000 habitantes/ano nos Estados Unidos (32, 33, 34, 35, 36). Outros estudos internacionais da Islândia (44), Suécia (41), Reino Unido (49, 50, 56), Japão (53) e Curaçao (54) mostraram taxas de incidência semelhantes. Em estudos de coorte realizados nos Estados Unidos registrou-se um aumento na incidência entre os anos de 1950 e 1992, elevando de 1,5 para 5,56 por 100.000 habitantes/ano (37). As possíveis explicações para o aumento na incidência são o diagnóstico de formas mais brandas da doença, aumento da utilização de terapias hormonais e a maior exposição a raios ultravioleta relacionada à diminuição da camada de ozônio.

O LES já foi considerado uma doença rara e fulminante que ocorria em mulheres jovens com o clássico eritema malar, levando ao óbito em alguns meses. Atualmente é conceituado como uma doença crônica de natureza pleomórfica. Não existe mais um padrão clássico, e o diagnóstico deve ser baseado nos aspectos clínicos, com auxílio dos exames complementares laboratoriais, histopatológicos, de imagem e outros (57).

Os pacientes com LES podem apresentar uma grande diversidade de manifestações clínicas, desde sintomas constitucionais como febre, perda de peso,

fraqueza, cansaço, até envolvimento de vários órgãos e sistemas. Pode se apresentar de uma maneira mais branda, com envolvimento apenas da pele e articulações; bem como de uma forma mais agressiva, com comprometimento de órgãos internos, como pulmão, cérebro, rins e coração (58, 59).

## **7.2 A nefrite lúpica**

Os estudos com biópsias e autopsia de pacientes com LES têm mostrado que o envolvimento renal é uma séria complicação da doença (60), sendo o rim um dos órgãos mais comumente afetado (3). Com o uso da microscopia óptica, microscopia eletrônica e imunofluorescência, pequenas alterações podem ser encontradas na biópsia renal de quase todos os pacientes (61, 62). Aproximadamente 75% das biópsias renais apresentadas em vários estudos foram classificadas como glomerulonefrites proliferativa focal, proliferativa difusa ou membranosa (63).

Houve um grande avanço no entendimento da patogênese de nefrite lúpica nas últimas décadas. A utilização destes conhecimentos aperfeiçoaram a interpretação das biópsias renais, proporcionando uma melhor correlação com as manifestações clínicas e a mais adequada abordagem terapêutica. A Organização Mundial da Saúde desenvolveu uma classificação para a nefrite lúpica (apêndice 2), facilitando a interpretação e aplicação clínica dos achados da biópsia renal (64).

A localização de imunocomplexos no rim parece ser o evento desencadeante para o surgimento da nefrite lúpica. São características no LES a presença de auto-anticorpos que reagem com DNA e outros componentes celulares, embora nem todos sejam nefritogênicos (3).

A reatividade cruzada dos auto-anticorpos anti-DNA com antígenos da superfície celular do glomérulo, bem como com componentes normais da

membrana basal e matriz mesangial, provavelmente promove a formação de imunocomplexos e influencia a localização destes depósitos no glomérulo (65). Assim, fatores que levam ao depósito de muitos imunocomplexos pro-inflamatórios na região subendotelial da parede capilar do glomérulo, adjacente à circulação, são provavelmente indutores (através da liberação de componentes do complemento, citocinas e outros fatores) da proliferação celular, resposta inflamatória, necrose e, finalmente, fibrose (66). Além disso, discute-se se um subtipo de auto-anticorpos pode penetrar as células glomerulares, ligar-se ao núcleo e contribuir para a proliferação glomerular e proteinúria (67). O dano à parede capilar do glomérulo parece ser induzido pela ativação do complemento e formação do complexo de ataque à membrana, C5b-9, que tem sido associado com este tipo de lesão mediada por imunocomplexos (68).

### **7.3 Imunopatogenia do LES**

No LES o dano tecidual é mediado por auto-anticorpos, imunocomplexos, células T, citocinas, quimiocinas e outras moléculas pró-inflamatórias como radicais de oxigênio e complemento. Indivíduos que desenvolvem a doença têm duas características principais: 1) podem ativar células T e produzir subtipos de auto-anticorpos patogênicos com formação de imunocomplexos; e 2) alteração na capacidade de regular e eliminar adequadamente estes auto-anticorpos, imunocomplexos e células T ativadas (69).

Existem inúmeras teorias para explicar o desencadeamento das alterações auto-imunes no LES. O mais provável é que múltiplos genes de susceptibilidade interajam com fatores ambientais para promover e perpetuar a ativação dos linfócitos T e B, o que leva à produção de auto-anticorpos e imunocomplexos patogênicos. A infiltração direta nos tecidos por células T, macrófagos e monócitos

também têm um importante papel na doença. Pacientes com a doença são mais suscetíveis aos danos por auto-anticorpos e imunocomplexos. Isso pode ser resultado da capacidade de produção de subclasses de anticorpos patogênicos e ou da incapacidade de regulação da hiperatividade das células B e T *helper* e seus produtos (70).

As características estruturais e propriedades fisiológicas de muitos auto-anticorpos e imunocomplexos patogênicos já são conhecidas, mas se as diferenças entre pacientes com LES e indivíduos saudáveis é quantitativa ou qualitativa ainda não está bem definido. Virtualmente toda rede regulatória que influencia a produção de anticorpos ou imunocomplexos está alterada em pacientes com LES, à semelhança do que ocorre em experimentos com modelo animal. Assim, a patogênese da doença pode depender de anormalidades na imunorregulação, associadas a fatores genéticos e ambientais (69).

#### **7.4 A base genética para o surgimento do LES**

A compreensão da natureza e do significado da base genética da susceptibilidade ao LES permanece um dos maiores desafios ao conhecimento médico. Contudo, a completa expressão clínica do LES parece ser um evento final numa série de anormalidades que levam à doença. Os genes responsáveis pelo LES atuam definindo um estado de susceptibilidade genética caracterizada por penetrância incompleta, com concordância em gêmeos idênticos de 24-69% (71). O desenvolvimento da doença pode levar anos, como demonstrado por estudos familiares e de gêmeos, nos quais o longo acompanhamento resultou numa grande concordância para a expressão da doença. Também foram propostos quatro estágios no desenvolvimento da doença, começando com uma fase de predisposição e terminando com uma fase de dano tecidual (72).

O surgimento do LES está sob marcante controle genético, com maior ou menor participação de efeitos ambientais. É bastante provável que os fatores ambientais interajam com os genes de suscetibilidade modulando seus efeitos (73). Os efeitos ambientais estão mais provavelmente associados com a exposição a organismos ou moléculas que afetam ou modulam a formação do repertório de células T e B. Certas infecções podem fortemente modular o repertório das células T, provocando a expansão clonal das células B e levando a um aumento na produção de imunoglobulina, estimulados pela presença de um superantígeno ou através de efeito direto sobre as células linfóides. A ativação da célula B pode alterar a apresentação de auto-antígenos em decorrência de anormalidades no nível basal de processamento. A fase de ativação policlonal do linfócito B pode resultar numa alteração celular promovendo a expressão de um receptor para uma estrutura própria, provocando uma ativação clonal de células T que resultaria em quebra de tolerância imunológica.

### **7.5 Fatores ambientais e medicamentosos no surgimento do LES**

A exacerbação ou indução à atividade do LES pela exposição solar (raios UVB principalmente) está relacionada com a injúria tecidual determinada pela radiação no local. A luz ultravioleta leva a uma apoptose dos queratinócitos, promovendo a expressão na superfície celular de material nucleossomal. Esta expressão dos antígenos na superfície celular de indivíduos portadores de anticorpos anti-DNA e/ou anti-Ro (SSA), associados às células T que reconheçam estes peptídeos de superfície, desencadearia a ativação global da doença resultando na dermatite lúpica (74).

A ingestão de medicamentos como procainamida, fenotiazida, isoniazida e hidralazina, dentre outros, podem induzir o surgimento de uma síndrome lúpus



relacionada à droga em uma pequena proporção das pessoas expostas. Entretanto essa síndrome é geralmente diferente do lúpus espontâneo e desaparece quando o medicamento indutor é retirado (75).

## **7.6 Fisiopatogenia do LES**

A estrutura dos auto-anticorpos é provavelmente importante na patogênese do LES. Há consideráveis evidências que os anticorpos contra o DNA que se ligam a estruturas da membrana basal do glomérulo são patogênicos (76, 77). Há evidências que o anti-DNA esteja associado com a nefrite lúpica. Muitos auto-anticorpos do lúpus podem ser marcadores da doença e não geradores de lesão tissular diretamente. Entretanto, os anticorpos anti-DNA, antifosfolípide, antineuronal, anti-Ro, antieritrócito, antilinfócito, e antiplaqueta parecem ter participação direta nas manifestações clínicas da doença. Outra observação da importância dos auto-anticorpos no LES é a recente descoberta que peptídeos gerados pela degradação dos auto-anticorpos parecem ativar as células T, promovendo a produção adicional de auto-anticorpos (75).

O LES tem uma grande incidência em mulheres, particularmente na idade reprodutiva. Isto sugere que genes regulados por fatores dependentes do sexo, como hormônios gonadais, ou genes relacionados com o cromossomo X em expressão dupla estejam envolvidos. A fase da vida das mulheres em que a incidência do LES é aumentada coincide com a maior produção de hormônios femininos. O estrogênio e a testosterona têm mostrado efeito oposto na produção de auto-anticorpos, o que poderia contribuir para a diferença na incidência entre os sexos (78, 79). Além disso, os receptores de hormônios gonadais têm domínios DNA-ligante, que podem regular a transcrição de vários genes (80).

Outros hormônios, como glicocorticóides e prolactina, também têm efeitos imunomoduladores. Glicocorticóides, que também são produzidos no timo, podem ter um papel na seleção positiva ou negativa ou na tolerância de auto-antígenos (81, 82). Há, também, evidência de efeito parácrino pró-inflamatório do hormônio liberador de corticotrofina produzido no sítio da inflamação (83). Outros hormônios e neuro-hormônios ainda não estudados em doenças auto-imunes, como o LES, que poderiam estar envolvidos na modulação da doença, como as  $\beta$ -endorfinas ou catecolaminas (84, 85).

### **7.7 O papel do linfócito T e do receptor do linfócito T (TCR) no LES**

O linfócito T tem um papel principal na etiopatogenia do lúpus. Alguns estudos prévios sugerem uma maior prevalência de alelos  $V\beta$  nos portadores de LES, sugerindo uma resposta antígeno dirigida (86). Análises genômicas identificaram uma cadeia alfa de receptores de células T (TCR – *T cell receptors*) com polimorfismo constante associado com o LES em norte-americanos, mas não em mexicanos (87). Outros estudos não mostraram associação entre o polimorfismo dos genes das cadeias  $TCR\alpha$  (88) - $\beta$  (89,90) ou - $\gamma$  (89) com o lúpus eritematoso sistêmico.

A literatura até hoje tem poucos estudos com receptores da célula T em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, nenhum sendo conclusivo. Não temos nenhum dado sobre a população sul-americana ainda. Portanto, quanto maior o entendimento sobre vias que regulam a formação do repertório dos TCR mais provavelmente estaremos aptos para entender o seu papel na doença, incluindo a autoimunidade (86).

Uma das características marcantes do sistema imunológico é a imensa diversidade dos receptores antigênicos em linfócitos T e B. Como em qualquer

sistema exibindo diversidade genética - dentro de um indivíduo, população, espécie ou grupos maiores - os mecanismos que geram, selecionam e mantêm esta diversidade operam em diferentes níveis hierárquicos. Seu estudo não apenas tem sido altamente enriquecedor com relação ao conhecimento básico da Genética como tem contribuído para uma melhor compreensão do sistema imune em situações normais e patológicas.

### **7.8 A geração da diversidade dos TCR**

Os receptores antigênicos (TCR em linfócitos T e as imunoglobulinas ou Ig em linfócitos B) são codificados por famílias de genes que sofrem rearranjos durante a diferenciação celular e apresentam distribuição clonal nos linfócitos. O estabelecimento do repertório de Ig e TCR depende de mecanismos operando em diferentes pontos do desenvolvimento de linfócitos B e T.

Os processos geradores da diversidade de TCR e Ig são muito semelhantes. Estes mecanismos incluem: (a) um grande número de segmentos gênicos localizados em diferentes cromossomos; (b) o rearranjo destes segmentos gênicos por recombinação somática, envolvendo participação de enzimas como recombinases e ligases; (c) diversidade de junção, com variações ao acaso ou com adição ou deleção de nucleotídeos nas extremidades envolvidas nestes rearranjos; (d) combinação ao acaso de cadeias polipeptídicas menores (leves) e maiores (pesadas) para formação da unidade tetramérica básica das imunoglobulinas ou combinação das cadeias alfa e beta ou gama e delta no caso do receptor de células T; (e) variedade adicional é introduzida durante o desenvolvimento da resposta imune por mutações somáticas nos genes de Ig e na cadeia beta do TCR.

Além da diversidade resultante dos mecanismos acima citados, quando comparamos diferentes indivíduos, populações ou grupos étnicos é importante

salientar a existência de variações ao nível do DNA que codifica os diferentes segmentos gênicos do TCR humano. Certo número de diferentes alelos de segmentos Vbeta do TCR humano já foram identificados como sendo polimórficos, com alelos diferindo entre si por uma ou poucas substituições de aminoácidos. Estas variações ao nível do DNA podem ter uma grande importância na modulação do repertório imune de células T sendo bastante úteis na análise da diversidade de populações humanas e subsequente comparação entre estas populações.

As moléculas principalmente envolvidas com a diversidade que caracteriza o sistema imune são os receptores antigênicos: imunoglobulinas (Ig) em linfócitos B e receptores de células T (*T cell receptors* ou TCR) nestes linfócitos. O estabelecimento do repertório de receptores, num total de cerca de  $10^9$  e  $10^{12}$ , respectivamente para linfócitos B e T, é regulado por mecanismos semelhantes, que operam em vários pontos do desenvolvimento destas células. O processo é mais bem conhecido para células B. Inicialmente os segmentos gênicos VH, DH e JH são rearranjados para a construção da região variável da cadeia pesada (IgH). Este rearranjo ocorre em duas etapas, começando pela união dos segmentos DH e JH e sendo seguido pela junção do segmento VH ao complexo DHJH. Estas junções são imprecisas, com a adição ou deleção de nucleotídeos ao nível da extremidade dos segmentos VH, DH e JH. Os nucleotídeos adicionados durante este processo de rearranjo e que não estejam codificados ao nível da linhagem germinal são denominados adições N. Uma outra classe de nucleotídeos compõe-se dos nucleotídeos P (91). Estes são inseridos nas extremidades dos segmentos gênicos V, D ou J durante o processo de rearranjo e constituem seqüências palíndromas a estas extremidades.

As junções imprecisas, através da formação da região hipervariável CDR3, contribuem no estabelecimento da região de ligação entre antígeno e anticorpo e,

portanto, para a diversidade dos anticorpos. Um outro mecanismo de estabelecimento da diversidade das imunoglobulinas e da cadeia beta do TCR é o de mutações somáticas (92). Em contraste, alguns mecanismos podem restringir a diversidade das Ig e do TCR. Os rearranjos gênicos podem ocorrer através de recombinação preferencial entre seqüências nucleotídicas idênticas ou complementares presentes nas extremidades dos segmentos gênicos V, D e J.

Assim como os linfócitos B, as células T apresentam um grande potencial de variabilidade. O receptor das células T é formado por duas cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$  ou  $\gamma$  e  $\delta$ ) que, assim como as Ig nas células B, são o produto do rearranjo de segmentos gênicos (por exemplo, a cadeia  $\beta$  é composta pelos segmentos  $V\beta$ , D,  $J\beta$  e  $C\beta$ , sendo assim denominados por analogia aos genes das imunoglobulinas). Diferentes mecanismos são utilizados na recombinação dos segmentos V(D)J gerando a diversidade do TCR. Uma primeira fonte de variabilidade provém da existência de famílias multigênicas V, D e J ao nível germinal (93,94). A princípio, qualquer segmento D pode-se ligar a qualquer segmento J e, do mesmo modo, qualquer segmento V pode-se ligar a qualquer conjunto DJ (figura 1). O mecanismo de recombinação dos segmentos gênicos que devem formar as imunoglobulinas procede de modo que as cadeias pesadas (H) rearranjam antes das cadeias leves (L). Considerando-se as cadeias pesadas, inicialmente um segmento D é rearranjado a um segmento JH, e após isto um segmento VH é rearranjado ao conjunto DJH. As células T são responsáveis pela resposta imunitária citotóxica e auxiliar e compreendem diferentes repertórios que evoluem visando o reconhecimento e tolerância dos antígenos próprios assim como o reconhecimento e reação imune contra os antígenos externos.

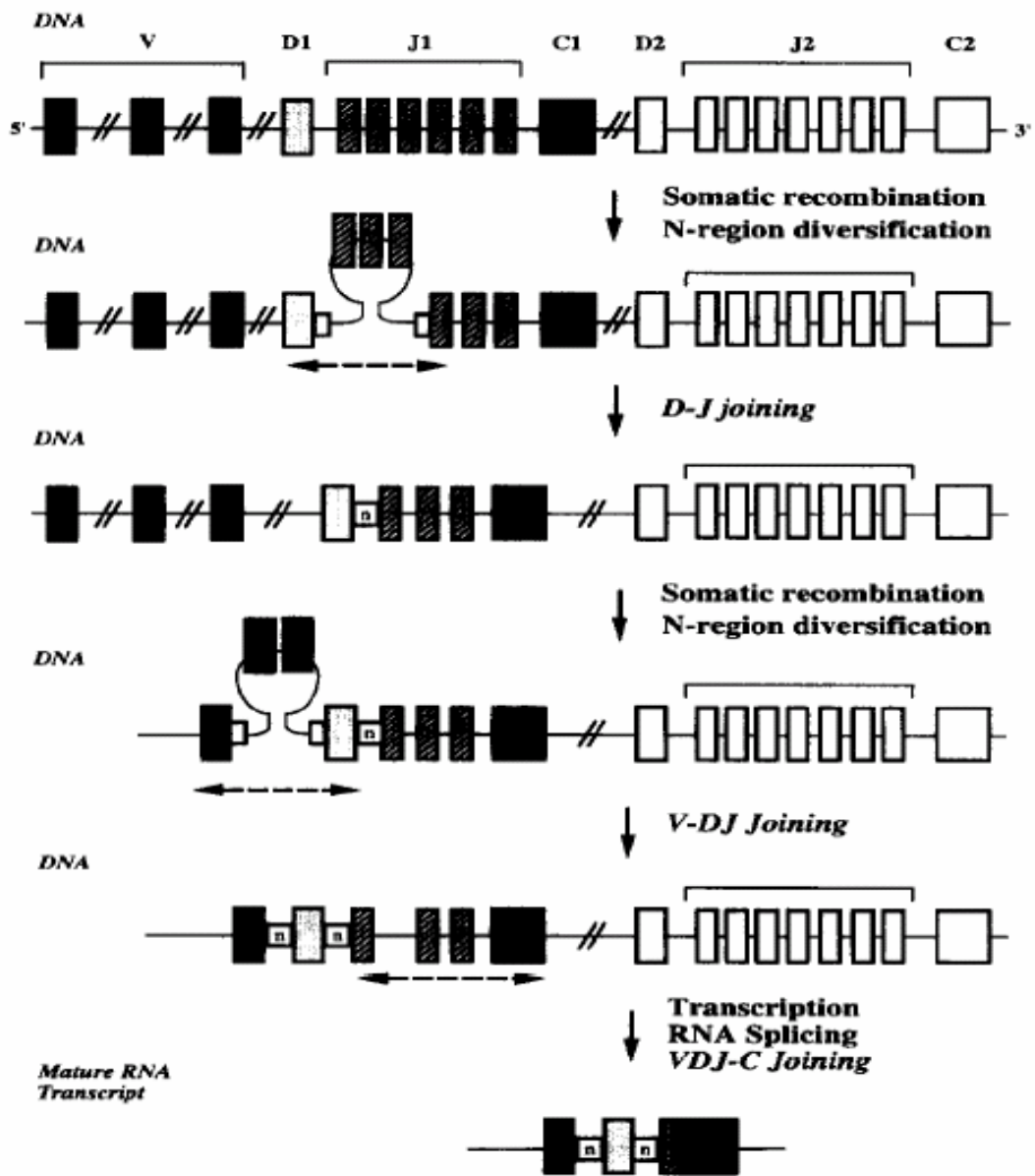


Figura 1. Rearranjo e recombinação dos segmentos gênicos V, D J e C. Fonte: LaRoque e Robinson (105).

### 7.9 O repertório de receptores de células T nas doenças auto-imunes

Variações ao nível do DNA que codifica os diferentes segmentos gênicos do TCR humano podem ter uma grande importância na modulação do repertório imune

de células T (91). Um certo número de diferentes alelos de segmentos Vbeta do TCR humano já foram identificados como sendo polimórficos, com alelos diferindo entre si por uma ou poucas substituições de aminoácidos (89). Considerando-se o pouco conhecimento que temos da estrutura do TCR, bem como dos exatos mecanismos de sua interação com os antígenos e a molécula do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), fica difícil estabelecer a significância destas substituições. No entanto, como salientado anteriormente, sabe-se que o repertório dos segmentos do TCR codificado ao nível germinal (seja referente às cadeias beta ou às cadeias alfa), pode alterar a capacidade de certos indivíduos de uma determinada população em montar uma resposta imune contra determinados antígenos (93,94).

Diferentes trabalhos já abordaram esse problema através da análise de expressão e identificação de alelos “nulos” de segmentos gênicos do TCR (95). A homozigose para estes alelos nulos resulta no aparecimento de um potencial “buraco” no repertório de células T, ou seja, os indivíduos homozigotos para o alelo nulo não são capazes de montar uma resposta imune utilizando estes segmentos e, portanto, não estão aptos a responder contra antígenos reconhecidos por estes segmentos gênicos. Apesar deste “inconveniente imunológico” a existência de alelos nulos de segmentos do TCR parece ser bastante comum. Foi descrita a existência de um alelo nulo do gene Vbeta18 humano que se encontrava em homozigose em 11% da população analisada (95). Um outro exemplo foi a identificação de dois alelos nulos (TCRVB6S1\* 2P e \*3P) referentes ao segmento de TCR Vbeta6S1 em uma amostra de 203 indivíduos de diferentes etnias cujas freqüências foram iguais a 12 e 16%, respectivamente (96). Outros fatores que alteram a expressão do repertório de células T correspondem a polimorfismos na

região do RSS (sinal de recombinação do TCR) (97) e em regiões não-codificadoras próximas aos genes da cadeia beta do TCR (98).

Atualmente, baseados na existência de diferentes alelos de segmentos gênicos do TCR, vários grupos de estudo estão utilizando análises de polimorfismo de tamanho de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP's) para tentarem estabelecer correlações de frequência de certos fragmentos gênicos ou alelos de genes do TCR (tanto das cadeias alfa e beta quanto gama e delta) com doenças hereditárias. Assim, diversas situações patológicas em diferentes grupos étnicos já foram analisadas, podendo-se citar a febre reumática em indivíduos maoris ou europeus (99), lúpus eritematoso sistêmico (100), diabetes tipo-I em caucasóides (101), artrite reumatóide em caucasóides e índios Tlingit do Alaska (102) e artrite reumatóide juvenil em caucasóides (103).

#### **7.10 TCRBV20S1 e TCRBV3S1 no LES**

O presente trabalho propõe-se a realizar um estudo em nível molecular da presença e frequência de diferentes alelos polimórficos de genes relacionados ao TCR em indivíduos portadores de LES. Dentre os diferentes polimorfismos a serem analisados podemos citar o alelo nulo do gene Vbeta20 humano e alelos que levam à diferença no nível de expressão do TCR, como o descrito por Posnett e colaboradores para o gene Vbeta03 (97).

A variante TCRBV3S1 altera a frequência de células T V $\beta$ 3.1+ e o alelo nulo do TCRBV20S1 em homozigose pode resultar em ausência total de células V $\beta$ 20+ no sangue periférico. O interessante é que mesmo resultando numa brecha no repertório das células T, alelos nulos do TCR podem ser encontrados em altas frequências em algumas populações humanas. Charmley et al (104) descreveram uma população caucasóide com 11% de homozigose para o alelo nulo TCRBV20S1;



e TCRBV6S1 \*2P e \*3P, ambos alelos nulos, mostraram frequências tão altas quanto 0.12 e 0.16 numa amostra de 203 indivíduos (10). Estes trabalhos sugerem que alelos nulos podem conferir alguma vantagem em dadas circunstâncias. Foi descrito em ratos que a deleção de genes codificadores do TCR resultaram em proteção contra o desenvolvimento de uma doença auto-imune (artrite induzida) (96).

## 8. OBJETIVOS

### 8.1 GERAL

Analisar a frequência dos alelos polimórficos Vbeta3 e Vbeta20, genes relacionados ao receptor de célula T, em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

### 8.2 ESPECÍFICOS

8.2.1 Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos alelos do TCRBV20S1 em pacientes e controles e calcular a razão de chances (*odds ratio*) da presença do alelo nulo do TCRBV20S1 para o desenvolvimento do LES.

8.2.2 Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos alelos do TCRBV3S1 em pacientes e controles e calcular a razão de chances (*odds ratio*) da presença do alelo 1 do TCRBV3S1 para o desenvolvimento do LES.

8.2.3 Estudar as associações das variantes alélicas do TCRBV20S1 e do TCRBV3S1 com formas mais graves da doença como nefrite lúpica.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grossman JM, Kalunian KC. Definition, classification, activity, and damage indices. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. Dubois' Lupus Erythematosus. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 19-32.
2. Dayal AK, Kammer GM. The T cell enigma in lúpus. *Arthritis Rheum* 1996; 39:23-33.
3. Boumpas DT, Fessler BJ, Austin III HA, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: Emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease. *Ann Inter Med* 1995; 122:940-950.
4. Marasca JA. Receptor de Quimiocina CCR5 e a Suscetibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico. Porto Alegre, 2002. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
5. Craft J, Peng S, Fuji T, Okada M, Fatenejad S: Autoreactive T cells in murine lupus: origins and roles in autoantibody production. *Immunol Res* 19:245–257,1999.
6. Hahn BH, Datta SK: Characteristics of T-cells that participate in the pathogenesis of SLE. *Lupus* 6:330–332, 1997.
7. Massengill SF, Goodenow MM, Sleasman JW: SLE nephritis is associated with an oligoclonal expansion of intrarenal T cells. *Am J Kidney Dis* 31(3):418-26,1998.
8. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T: T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38(5): 339-46, 2005.
9. Nambiar MP, Krishnan S, Tsokos GC: T-cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Med* 102:31-47, 2004.

10. Murata H, Matsumura R, Koyama A, et al: T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 46(8):2141-7, 2002.
11. Suttmuller M, Baelde HJ, Ouellette S, De Heer E, Bruijn JÁ: T-cell receptor Vbeta gene expression in experimental lupus nephritis. *Immunology* 95(1):18-25, 1998.
12. Ruiz PJ, Waisman A, Mozes E: Anti-T-cell receptor therapy in murine experimental systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 62(1):1-8,1998.
13. Mato T, Masuko K, Misaki Y, et al: Correlation of clonal T cell expansion with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 9(4):547-54, 1997.
14. Takeuchi T, Tsuzaka K, Pang M, et al: TCR $\zeta$  chain lacking exon 7 in two patients with systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 10(7):911-921, 1998.
15. Sierakowski S, Kucharz E, Lightfoot R, et al: Impaired T cell activation in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 9:469, 1989.
16. Biasini A, Stekman IL, Gonzales F, et al: T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus show increased response to interleukin-2 after costimulation with OKT3 monoclonal antibody and phorbol esters. *Clin Immunol*, 70:66, 1994.
17. Seery JP, Wang EC, Cattel V, et al: A central role for alpha beta T cells in the pathogenesis of murine lupus. *J Immunol*, 162(12):7241-8, 1999.
18. Diaz Gallo C, Jevnikar AM, Brennan DC, Florquin S, Pacheco-Silva A, Kelley VR: Autoreactive kidney infiltrating T-cell clones in murine lupus nephritis. *Kidney Int* 42:851–859,1992.
19. Adams S, Zordan T, SainisK, Datta S: T cell receptor V beta genes expressed by IgG anti-DNA autoantibody-inducing T cells in lupus nephritis: forbidden receptors and double-negative T cells. *Eur J Immunol* 20(7):1435-43, 1990.

20. Shivakumar S, Tsokos GC, Datta SK: T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol* 143(1):103-12, 1989.
21. Manavalan SJ, Valiando JR, Reeves WH, et al: Genomic absence of the gene encoding T cell receptor Vbeta7.2 is linked to the presence of autoantibodies in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 50(1):187-98, 2004.
22. Lawson CA, Donaldson IJ, Bowman SJ, et al: Analysis of the insertion/deletion related polymorphism within T cell antigen receptor beta variable genes in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 64(3):468-70, 2005.
23. Mu H, Charmley P, King MC, Criswell LA: Synergy between T cell receptor beta gene polymorphism and HLA-DR4 in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39(6):931-7, 1996.
24. Edworthy SM. Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. In: Harris Jr. ED editor. *Kelley's textbook of rheumatology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 1201-24.
25. Cohen AS, Reynolds WE, Franklin EC, et al. Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull Rheum Dis* 1971;21:643-48.
26. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
27. Hochberg Mc. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus (letter). *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
28. Hargraves MM, Richmond H, Morton R: Presentation of two bone marrow elements: the tart cell and the LE cell. *Mayo Clin Proc* 1948; 23: 25-28.

29. Friou GJ: Clinical application of lupus serum: nucleoprotein reaction using the fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957; 36:890.
30. Brenol JCT. Freqüência dos auto-anticorpos antinucleares e suas associações com manifestações clínico-laboratoriais, numa população de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1994. Tese de Doutorado em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
31. Dubois EL, Wallace DJ. Clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus. In: Dubois EL, Wallace DJ, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987: 317-449.
32. Michet CJ Jr, McKenna CH, Elveback LR. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue disease in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc* 1985;60:105-113.
33. Hochberg Mc, Perlmutter DL, Medsger TA. Prevalence of self-reported physician-diagnosed systemic lupus erythematosus in the USA. *Lupus* 1995;4:454-456.
34. Fessel WJ. Systemic lúpus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med* 1974; 134:1027-1035.
35. Kurland LT, Hauser WA, Ferguson RH. Epidemiologic features of diffuse connective tissue disorders in Rochester, Minn., 1951 through 1967, with especial reference to systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin Proc* 1969;44:649-663
36. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1973;3:1-54.
37. Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum* 1999;42:46-50.

38. Maskarinec G, Katz AR. Prevalence of systemic lupus erythematosus in Hawaii: is there a difference between ethnic groups? *Hawaii Med J* 1995; 54:406-409.
39. Lahita RG. Special report: adjusted lupus prevalence. Results of a marketing study by the Lupus Foundation of America. *Lupus* 1995; 54:406-409.
40. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:141-150.
41. Nived O, Sturfelt G, Wollheim F. Systemic lupus erythematosus in an adult population in southern Sweden: incidence, prevalence and validity of ARA revised classification criteria. *Br J Rheumatol* 1985;24:147-154.
42. Helve T. Prevalence and mortality rates of systemic lupus erythematosus and causes of death in SLE patients in Finland. *Scand J Rheumatol* 1985;1443-46.
43. Teitsson I, Thorsteinsson J. Systemic lupus erythematosus in Iceland. *Iceland Med J* 1978;64(suppl):116.
44. Gudmundsson S, Steinsson K. Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population. *J Rheumatol* 1990;17:1162-1167.
45. Meddings J, Grennan DM. The prevalence of systemic lupus erythematosus (SLE) in Dunedin. *NZ Med J* 1980;91:205-206.
46. Hart HH, Grigor RR, Caughey DE. Ethnic difference in the prevalence of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1983;42:529-532.
47. Frank AO. Apparent predisposition to systemic lupus erythematosus in Chinese patients in West Malaysia. *Ann Rheum Dis* 1980;39:266-269.
48. Samanta A, Roy S, Feehally J. The prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in whites and Indian Asian immigrants in Leicester city, UK. *Br J Rheumatol* 1992;31:679-682.

49. Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989-1990. *Br J Rheumatol* 1993;32:110-115.
50. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 1995;38:551-558.
51. Hochberg Mc. Prevalence of systemic lupus erythematosus in England and Wales, 1981-2. *Ann Rheum Dis* 1987;46:664-66.
52. Nai-Zheng C. Rheumatic diseases in China. *J Rheumatol* 1983;10 (suppl 10):41-44.
53. Iseki K, Miyasato F, Oura T. An epidemiologic analysis of end-stage lupus nephritis. *Am J Kidney dis* 1994;23:547-554.
54. Nossent JC. Systemic lupus erythematosus on the Caribbean island of Curacao: an epidemiological investigation. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1197-1201.
55. Gourley IS, Patterson CC, Bell AL. The prevalence of systemic lupus erythematosus in Northern Ireland. *Lupus* 1997;6:399-403.
56. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA Jr. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 1995;38:1260-1270.
57. Wallace DJ. The clinical presentation of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 621-628.
58. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, et al. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum* 1991;21:55-64.



59. Jacobsen S, Petersen J, Ullman S, et al. A multicentre study of 513 Danish patients with systemic lupus erythematosus: I. Disease manifestations and analyses of clinical subsets. *Clin Rheumatol* 1998;17:468-477.
60. Kashgarian M. Lupus nephritis: Pathology, pathogenesis, clinical correlations, and prognosis. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 1061-1076.
61. Pollak V, Pirani C. Renal histologic findings in systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin Proc* 1969;44:630-644.
62. Woolf A, Croker B, Osafsky S, et al. Nephritis in children and young adults with systemic lupus erythematosus and normal urinary sediment. *Pediatrics* 1979;64:678-685.
63. Golbus J, McCune WJ. Lupus nephritis. Classification, prognosis, immunopathogenesis, and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:213-42.
64. McCluskey R. Lupus nephritis. In: Summers SC, ed. *Kidney pathology*. New York: Appleton-Century Crofts, 1975:456-459.
65. Foster MH, Cizman B, Madaio MP. Nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus: immunochemical properties, mechanism of immune depositions, and genetic origins. *Lab Invest* 1993;69:494-507.
66. Couser WG. Pathogenesis of glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl* 1993;42:S19-26.
67. Vlabakos D, Foster MH, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP. Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:1345-54.

68. Kerjaschki D. The pathogenesis of membranous glomerulonephritis: from morphology to molecules. *Virchows Archiv B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990; 58:253-71.
69. Hahn BH. An overview of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 87-96.
70. Mohan C, Morel L, Yang P, et al. Genetic dissection of lupus pathogenesis: a recipe for nephrophilic autoantibodies. *J Clin Invest* 1999; 103:1683-1695.
71. Deapen DM, Escalante A, Weinrib AL, Horwitz DA, Mack TM. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35:311-318.
72. Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus: pathogenesis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and Allied Conditions, a Textbook of Rheumatology*. Baltimore Williams & Wilkins, 1997:1361-1391.
73. Gulko PS, Winchester RJ. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kammer GM, Tsokos GC, editors. *Lupus: Molecular and Cellular Pathogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 1999:101-123.
74. Sontheimer RD. Photoimmunology of lupus erythematosus and dermatomyositis: a speculative review. *Photochem Photobiol* 1996; 63:583-594.
75. Hahn BH. An overview of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:87-96.
76. Madaio MP. The role of autoantibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Semin Nephrol* 1999;19:48-56.
77. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Eng J Med* 1998;338:1359-68.

78. Cutolo M, Sulli A, Seriola B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:217-226.
79. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lúpus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1703-1711.
80. Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med* 1995;46:443-453.
81. Vacchio MS, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med* 1997;185:2033-2038.
82. Vacchio MS, Papadopoulos V, Ashwell JD. Steroi production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J Exp Med* 1995;179:1835-1846.
83. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL Chrousos GP. Autocrine and paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 1991; 254:421-423.
84. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human Interleukin-12 and Interleukin-10 production:clinical implications. *Proc Asso Am Physicians* 1996;108:374-381.
85. Panerai AE, Cacerdote P. Beta-endorphin in the immune system: a role at last? *Immunol Today* 1997;18:17-20.
86. Hahn BH, Karpouzas GA, Tsao BP. Pathogenesis of Systemic Lupus Erithematosus. In: Harris Jr. ED editor. *Kelley's textbook of rheumatology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: 1174-1200.
87. Winchester, R.J. Systemic lupus erythematosus: pathogenesis, in *Arthritis and Allied Conditions, a Textbook of Rheumatology*, 13 th edition, Williams & Wilkins, USA, 1997, pg 1361-1391.

88. Tebib, J.G., Alcocer-Varela, J., Alarcon-Segovia, D., and Schur, P.H., Association between T cell receptor restriction fragment length polymorphism and systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 86, 1990, pg 1961-1967.
89. Dunckley, H., Gatenby, P.A., and Serjeantson, S.W. T-cell receptor and HLA class II RFLP's in systemic lupus erythematosus. *Immunogenetics* 27, 393-395, 1988.
90. Fronck, Z., Lentz, D., Berliner, N., Duby, D. Systemic lupus erythematosus is not genetically linked to the beta chain of the T cell receptor. *Arthritis Rheum.* 29, 1023-1025, 1986.
91. Lafaille, J. J., A. DeCloux, M. Bonneville, Y. Takagaki and S. Tonegawa (1989) Junctional sequences of T cell receptor gd genes: implications for gd cell lineages and for a novel intermediate of V- (D)-J joining. *Cell* 59: 859.
92. Hinds-Frey, K. R., H. Nishikata, R. T. Litman and G. W. Litman (1993) Somatic variation precedes extensive diversification of germline sequences and combinatorial joining in the evolution of immunoglobulin heavy chain diversity. *J. Exp. Med* 178: 815.
93. Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575.
94. Hieter, P. A., Korsmeyer, S. J., Waldman, T. A. e Leder, P. (1981) Human immunoglobulin k light chain genes are deleted or rearranged in I-producing B-cells. *Nature* 290: 368.
95. Charmley, P., Wang, K., Hood, L., Nickerson, D. A. (1993) Identification and physical mapping of a polymorphic human T cell receptor V beta gene with a frequent null allele. *J Exp Med* 177:135.
96. Barron, K. S. and Robinson, M. A. (1994) The human T-cell receptor variable gene segment TCRBV6S1 has two null alleles. *Hum Immunol* 40:17.

97. Posnett, D. N., Vissinga, C. S., Pambuccian, C., Wei, S., Robinson, M. A., Kostyu, D., Concannon, P. (1994) Level of human TCRBV3S1 (V beta 3) expression correlates with allelic polymorphism in the spacer region of the recombination signal sequence. *J Exp Med* 179: 1707.
98. Kay, R. A., Snowden, N., Hajeer, A. H., Boylston, A. W., Ollier, W. E. (1994) Genetic control of the human V beta 13.2 T cell repertoire: importance of allelic variations outside the coding regions of the TCRBV13S2 gene. *Eur J Immunol* 24: 2863.
99. Abbott, W. G., Geursen, A., Peake, J. S., Simpson, I. J., Skinner, M. A., Tan, P. L. (1995) Search for linkage disequilibrium between alleles in the T cell receptor alpha and beta chain loci and susceptibility to rheumatic fever. *Immunol Cell Biol* 73: 369.
100. Huang, D. F., Siminovitch, K. A., Liu, X. Y., Olee, T., Olsen, N. J., Berry, C., Carson, D. A., Chen, P. P. (1995) Population and family studies of three disease-related polymorphic genes in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 95: 1766.
101. Bohem, B. O., Manfras, B. J., Rosak, C., Kuehnl, P., Schoffling, K., Trucco, M. (1990) TcR-alpha and TcR-beta diallelic RFLPs in insulin-dependent (type-1) caucasian diabetic patients. *Diabetes Res* 15:63.
102. Charmley, P., Nelson, J. L., Hansen, J. A., Branchaud, A., Barrington, R. A., Templin, D., Boyer, G., Lanier, A. P., Concannon, P. (1994) T-cell receptor polymorphisms in Tlingit Indians with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 19:247.
103. Maksymowych, W. P., Gabriel, C. A., Luyrink, L., Melin-Aldana, H., Elma, M., Giannini, E. H., Lovell, D. J., Van Kerckhove, C., Leiden, J., Choi, E., et al (1992) Polymorphism in a T cell receptor variable gene is associated with susceptibility to a juvenile rheumatoid arthritis subset. *Immunogenetics* 35: 257.

104. Hunemeier T, Neves AG, Nornberg IF, et al: T cell and chemokine receptor variation in South Amerindian populations. *American Journal of Human Biology* 17(4): 515-518, 2005.
105. LaRocque R, Robinson MA. Diversity in the human T cell receptor beta chain. *Hum Immunol* 1996;48(1-2):3-11.

## 10. VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO 1

## **T-cell receptor BV gene segment polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus**

João Adalberto Marasca, Ricardo Machado Xavier, José Artur Bogo Chies, João Carlos Tavares Brenol.

**Objective:** To investigate whether systemic lupus erythematosus (SLE) or lupus nephritis are associated with two variants of the TCRBV gene segments (TCRV3S1 and TCRBV20S1).

**Methods:** A total of 138 SLE patients (103 European-derived and 35 African-derived) and 140 healthy controls were genotyped for both TCRBV gene segment variants by restriction fragment length polymorphism preceded by PCR (PCR-RLFP). The obtained frequencies were compared between them. Lupus nephritis was present in 70 patients (54 European-derived and 16 African-derived).

**Results:** The allelic frequencies of the TCRVB3S1 gene segment were, in SLE and controls, 0.507 and 0.619 (allele 1) and 0.493 and 0.381 (allele 2) respectively. Allelic frequencies for the TCRBV20S1 gene segment were, for SLE and controls, 0.794 and 0.868 (allele 1) and 0.206 and 0.132 (allele 2) respectively. Neither allelic frequencies nor genotypic frequencies differ among SLE and healthy individuals. Moreover, there were no differences in the allelic frequencies when comparing groups classified according the presence or absence of nephritis, as well as WHO proliferative subtypes of nephritis (class III and IV).

**Conclusions:** Despite the described role of the TCR in inflammatory and autoimmune pathologies, the TCRV3S1 and TCRBV20S1 allelic variants do not appear to be involved in genetic susceptibility to SLE or lupus nephritis.



**Key words:** TCR polymorphism, systemic lupus erythematosus, TCRV3S1, TCRBV20S1, lupus nephritis.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Genética.

Universidade de Caxias do Sul

Supported by CAPES, from Ministério da Educação e Cultura.

JA Marasca, MD; Hospital de Clínica de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre and Universidade de Caxias do Sul, Brasil; RM Xavier, PhD; JCT Brenol, PhD: Hospital de Clínica de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; JAB Chies, PhD: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, Brasil.

Address reprint request and correspondence about article to Corresponding author:

José Artur Bogo Chies

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Genética

Av Bento Gonçalves 9500 Caixa Postal 15051

Porto Alegre RS Brazil

CEP 91501-970

Tel: 55 51 33 16 67 40

FAX: 55 51 33 16 73 11

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder characterised by multi-organ involvement. The pathogenesis of SLE is complex and not well understood, although the etiology involves hormonal, genetic and environmental factors. It is widely accepted that T cells with altered function play a central role in the development of SLE and lupus nephritis, both in mice and in humans [1,2,3]. Earlier studies had indicated that the ablation of CD4 T cells using genetic or experimental approaches had the potential to ameliorate disease [4,5,6]. It is evident that T cells can promote disease in quite a variety of mechanisms including help to B cells for autoantibody production or facilitating tissue damage in the end organs [7,8,9]. Although it is evident that T cells are essential for autoimmune diseases, the degree to which genetically determined T cell features contribute to lupus is not clear [10,11,12].

The T-cell receptor (TCR) repertoire plays an important role in immune responses. Genetic variations at genes or gene segments encoding these molecules could modify specificities and, therefore, lead to the development of autoimmune disease [13,14,15]. The peripheral T cell repertoire present in a given individual reflects a selected sample of the potential repertoire, composed from all TCR variable segments that exist in germline configuration at the DNA. During T cell development, the TCR variable segments somatically rearrange to form alpha and beta chains that, as a heterodimer, are responsible by the interaction with the peptide-MHC complex and can, consequently, shape specific immune responses [16]. Considering the TCR involvement in the development of immune responses, several studies are directed to the analysis of TCR gene segment polymorphisms aiming to the association of allelic variants with pathological conditions [13,14,15,17,18,19,20]. Also, both the characterisation of the T cell repertoire in a given autoimmune disease as well as the identification of specific or predominantly

used TCRBV gene segments on such situations are interesting approaches in order to identify potential targets to therapy.

In the present study, we focus on the identification of genetic markers (TCR gene segments or genes linked to TCR gene segments) that could enable us to recognize a tendency or predisposition to develop SLE or lupus nephritis. We analysed two biallelic polymorphisms in two different TCRBV gene segments: the first is a single nucleotide polymorphism (C/T) located within the 23 bp spacer region of the TCRBV3S1 gene segment recombination signal sequence (RSS) region. Although the polymorphic site is located in the RSS non-conserved spacer region, this allelic variant is associated with the level of V $\beta$ 3.1+ T-cells in the peripheral pool [21]. Individuals homozygous for allele 1 have a low frequency of V $\beta$ 3.1+ T-cells (around 1% of the total T-cells), whereas individuals homozygous for allele 2 have higher frequency of V $\beta$ 3.1+ T-cells (around 7.5%) and heterozygous individuals present an intermediate frequency. The second polymorphism studied is located in the TCRBV20S1 gene segment (previously also referred as Vbeta18) and is the result of a nucleotide substitution (C/T) that also creates a stop codon inside the gene segment [22]. Individuals homozygous for the null allele (BV20S1A2P, from now called allele 2) are unable to produce TCR molecules using the TCRBV20S1 gene segment, which results in the absence of V $\beta$ 20+ T-cells in the peripheral pool. Our approach only analyse this polymorphic site, therefore alleles BV20S1A1N1 and BV20S1A1N2 were undistinguishable and, together are referred as allele 1. A detectable level of functional V $\beta$ 20+ T-cells is observed in the peripheral compartment of individual heterozygous for this polymorphism [23]. In an attempt to identify new susceptibility markers for SLE, we studied the frequency of these two biallelic TCBV polymorphisms in 139 South Brazilian Caucasoid and afro-

descendants patients with clinically defined SLE and compared to the frequencies previously obtained from healthy South Brazilian caucasoids and afro-americans.

**Patients.** We studied 139 patients (74.5% European-derived and 25.5% African-derived) with SLE (classified according to the American College of Rheumatology criteria) [24] who were followed at the Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre- Brazil); 69 patients had lupus nephritis (30 with biopsy proven proliferative type, WHO class III and IV). Peripheral blood samples were collected from these patients, as well as from 160 healthy volunteer blood donors (59.3% European-derived and 40.7% African-derived) who constituted the control group. One hundred thirty eight individuals were analyzed for TCRBV3S1 polymorphism and 136 individuals were analyzed for TCRBV20S1 polymorphism. This study was approved by the institutional ethics committee and all subjects have signed an informed consent.

**Methods.** DNA was extracted from peripheral blood using the method described by Lahiri and Nurnberger [25]. Both DNA polymorphisms were analyzed by restriction fragment length polymorphism preceded by PCR (PCR-RFLP), which involved the amplification of the DNA samples with specific primers, PCR product digestion with endonucleases for which the presence or absence of restriction sites distinguishes the two alleles and visualization by electrophoresis in agarose gel containing ethidium bromide.

*Identification of variants in the RSS region of the TCRBV3S1 gene segment*

For the analysis of the TCRBV3S1 RSS polymorphism, DNA samples were amplified by PCR using the specific primers 5'-CCTTGATGGCCTGTTTTTCAC-3'

and 5'-GTGCCATCGGAGCCAGCAC-3' [21]. The primers were mixed with 1 µl of DNA, 2.5 µl 10 x PCR buffer (containing 30mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl dNTP solution (final amount of 10mM each per reaction) and 0.2 µl of Taq polymerase (5 µU/l). The samples were subjected to 36 cycles of 1 min of denaturation at 94° C, 1 min of annealing at 51° C, and 2 min of extension at 72° C, proceeded by 1 min at 94° C and followed by 5 min at 72° C in a DNA thermal cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). The resultant 431 bp fragment was digested with *PvuII* and the products were visualized by electrophoresis in a 1% agarose gel containing ethidium bromide. The two allelic variants located at the TCRBV3S1 RSS differ at only a single nucleotide position (C/T). This cytosine to thymine transition creates a *PvuII* site inside the TCRBV3S1 RSS. When DNA amplified with the specific primers is submitted to digestion with *PvuII*, individuals homozygous for allele 1 can be identified by the presence of a single DNA band in agarose gel (431 bp) reflecting the absence of the restriction site. Homozygotes for allele 2 can be identified by the presence of a 352 bp band (the 79 bp fragment cannot be observed in an 1% agarose gel), whereas in heterozygotes two bands (431 and 352 bp) can be observed.

#### *Identification of variants in the TCRBV20S1 gene segment*

For the analysis of TCRBV20S1 polymorphism, the specific primers 5'-ATTCATCAATGGCCAGCGAC-3' and 5'-GGAGCTTCTTAGAACTCAG-3' were used [23]. PCR was performed under the same conditions described to the TCRBV3 polymorphism in 40 cycles of 1 min of denaturation at 94° C, 1 min of annealing at 60° C, and 2 min of extension at 72° C, preceded by 1 min at 94° C and followed by 5 min at 72° C. The TCRBV20S1 polymorphism analyzed is a single nucleotide substitution (a C–T base transition), leading to the introduction of a stop codon at

the Vbeta20 gene segment sequence (allele 2) and simultaneously eliminating a restriction site for the *KpnI* enzyme. Individuals homozygous for allele 2 can be identified by the presence of a single band in agarose gel (235 bp) when DNA is submitted to PCR amplification with the specific primers and followed by digestion with *KpnI*. DNA from homozygotes for allele 1 are identified by the presence of two bands (100 and 135 bp), whereas heterozygotes show three bands (235, 135 and 100 bp).

**Statistical analysis.** Intergroup genotypic and allelic frequencies were compared using the Chi-square test, Chi-square test using Yate's correction and Fisher's exact test. The populations were in Hardy-Weinberg equilibrium for both alleles analyzed. For statistical significance we considered a  $p < 0,05$ .

## RESULTS

The SLE patients were classified according to the ethnic background in European-derived or African-derived for separate analysis. 138 patients were investigated for TCRBV3S1/*PvuII* restriction site and 136 patients for TCRVB20S1/*KpnI* restriction site, but no difference in the allelic frequency was observed between these two ethnically classified groups, allowing the pooling of data on subsequent analysis. Both European-derived and African-derived groups show genotypic frequencies of the analysed variants distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium.

There were no differences in the allelic frequencies between SLE patients and the control group or between patients with lupus nephritis and controls. The genotypic and the allelic frequencies of the SLE patients (with and without lupus nephritis) and controls are summarized in Table 1 and 2.

A comparison among the proliferative subgroups of lupus nephritis with both controls and SLE patients without nephritis was performed. Nevertheless, this subgrouping resulted on small sample sizes and, also considering the difficulty to interpret such data, there were no significant differences among them (data not shown).

## **DISCUSSION**

SLE is a polygenic disease that has been demonstrated to be associated with class II HLA-DR2 and DR3. The participation of other genes outside the chromosome 6 in genetic susceptibility to SLE was already suggested [26].

T cell abnormalities concerning proximal signal transduction were observed in T cells from patients with active SLE who had specific clinical manifestations such as vasculitis, epithelitis and arthritis. The expression of the TCR zeta chain was shown to be attenuated, or absent in more than half of SLE patients and aberrant transcripts of the TCR zeta chain, including spliced variants lacking exon 7 and with a short 3' UTR, were detected [9]. It is important to point out that molecular mechanisms of T-cell signaling in SLE T cells are complex and difficult to be explained and include abnormal tyrosine phosphorylation, intracellular calcium response, and cytokine production [11].

Concerning the TCR repertoire, our results suggest that the TCRBV3S1 and TCRBV20S1 polymorphisms studied are not directly involved in SLE or lupus nephritis genetic susceptibility. Even after stratifying the patients by different WHO class of nephritis, we failed to show any difference between patients and controls. Nevertheless, Murata et al (2002) suggested that some TCRBV gene segments are preferentially expressed by T cells infiltrating the kidneys of patients with lupus nephritis, and that genetic polymorphisms of cytokines and, perhaps, of the TCR

gene segments themselves may contribute to deregulate lymphocyte activity on this situation [27]. Specifically, as described by these same authors, TCR Vbeta8 and Vbeta20 gene segments were expressed in 6 of 12 patients, and the analysis of junctional sequences in intrarenal T cells showed oligoclonal expansion, indicating antigen-driven stimulation. Interestingly, autoreactive Vbeta20+ T cells (directed against topoisomerase I) with substantial differences in functional properties were observed in monozygotic twins discordant for systemic sclerosis, suggesting an important role for these cells on disease establishment.

It is well established that any change at the TCR and/or MHC molecule could potentially alter a given immune response. Both biallelic TCRBV3S1 and TCRBV20S1 polymorphisms analysed in the present work lead to phenotypic alterations. TCRBV3S1 variants modify the frequency of V $\beta$ 3.1+ T-cells and the TCRBV20S1 null allele in homozygous can result in total absence of V $\beta$ 20+ T-cells at the periphery. It is interesting that even resulting in a gap in the T-cell repertoire, TCR null alleles can be found in high frequencies in some human populations. Charmley et al. [23] described a caucasoid population with 11% of homozygotes for the TCRBV20S1 null allele and TCRBV6S1 \*2P and \*3P, both null alleles, show frequencies as high as 0.12 and 0.16 in a sample of 203 individuals [28]. These reports suggest that null alleles can also confer some advantages in a given circumstance. For instance, deletions at the TCR locus encompassing TCRBV gene segments resulting in protection against the development of an autoimmune disease (induced arthritis) were already described in mice [29]. The absence of differences observed in TCRBV3S1 and TCRBV20S1 allelic frequencies between affected and healthy subjects in the present study, suggests that the polymorphic variants studied were not involved in the pathology of SLE or lupus nephritis. Nevertheless, considering the importance of T cells on lupus, and given the described



preferentially expression and oligoclonality of the Vbeta20 gene segment on the study of Murata et al (2002), other studies, in different human populations should be driven in order to clearly define the pathophysiology of SLE.

**Table 1.** Genotype and allelic frequency of TCRBV3S1 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), lupus nephritis and controls.

	Controls		SLE		Lupus Nephritis	
	n	freq	n	freq	n	freq
<b>Genotype</b>						
Allele1/allele1	58	0.417	38	0.275	20	0.286
Allele2/allele2	25	0.180	36	0.261	19	0.271
Allele1/allele2	56	0.403	64	0.464	31	0.443
Total	139	1.000	138	1.000	70	1.000
<b>Allele</b>						
Allele 1	172	0.619	140	0.507	71	0.507
Allele 2	106	0.381	136	0.493	69	0.493
Total	278	1.000	276	1.000	140	1.000

**Table 2.** Genotype and allelic frequency of TCRBV20S1 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), lupus nephritis and controls.

	Controls		SLE		Lupus Nephritis	
	n	freq	n	freq	n	freq
<b>Genotype</b>						
Allele1/allele1	107	0.764	85	0.625	40	0.580
Allele2/allele2	04	0.029	05	0.037	3	0.043
Allele1/allele2	29	0.207	46	0.338	26	0.377
Total	140	1.000	136	1.000	69	1.000
<b>Allele</b>						
Allele 1	243	0.868	216	0.794	106	0.768
Allele 2	37	0.132	56	0.206	32	0.232
Total	280	1.000	272	1.000	138	1.000

## REFERENCES

1. Craft J, Peng S, Fuji T, Okada M, Fatenejad S: Autoreactive T cells in murine lupus: origins and roles in autoantibody production. *Immunol Res* 19:245–257,1999.
2. Hahn BH, Datta SK: Characteristics of T-cells that participate in the pathogenesis of SLE. *Lupus* 6:330–332, 1997.
3. Massengill SF, Goodenow MM, Sleasman JW: SLE nephritis is associated with an oligoclonal expansion of intrarenal T cells. *Am J Kidney Dis* 31(3):418-26,1998.
4. Chen SY, Takeoka Y, Ansari AA, Boyd R, Klinman DM, Gershwin ME: The natural history of disease expression in CD4 and CD8 gene-deleted New Zealand black (NZB) mice. *J Immunol* 157:2676–2684,1996.
5. Koh DR, Ho A, Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Griesser H, Mak TW: Murine lupus in MRL/lpr mice lacking CD4 or CD8 T cells. *Eur J Immunol* 25:2558–2562, 1995.
6. Ruiz PJ, Waisman A, Mozes E: Anti-T-cell receptor therapy in murine experimental systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 62(1):1-8,1998.
7. Diaz Gallo C, Jevnikar AM, Brennan DC, Florquin S, Pacheco-Silva A, Kelley VR: Autoreactive kidney infiltrating T-cell clones in murine lupus nephritis. *Kidney Int* 42:851–859,1992.
8. Yamada M, Yagita H, Inoue H, et al: Selective accumulation of CCR4+ T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:735–740.
9. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T: T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38(5): 339-46, 2005.

10. Zhu J, Liu X, Xie C, et al: T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells. *J Clin Invest* 115(7):1869-78, 2005.
11. Nambiar MP, Krishnan S, Tsokos GC: T-cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Med* 102:31-47, 2004.
12. Mato T, Masuko K, Misaki Y, et al: Correlation of clonal T cell expansion with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 9(4):547-54, 1997.
13. Dresch C, Xavier R, Brenol JC, Nardi NB, Chies JA: Analysis of two T-cell receptor BV gene segment polymorphisms in caucasoid Brazilian patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 15;90(2-3):77-80, 2003.
14. Suttmuller M, Baelde HJ, Ouellette S, De Heer E, Bruijn JÁ: T-cell receptor Vbeta gene expression in experimental lupus nephritis. *Immunology* 95(1):18-25, 1998.
15. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K: Analysis of T cell receptor Vbeta repertoires of annular erythema associated with Sjogren's syndrome. *Eur J Dermatol* 8(4):248-51, 1998.
16. Wilson RK, Lai E, Concannon P, Barth RK, Hood LE: Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunol Rev* 101:149-72, 1988.
17. Takeuchi T, Tsuzaka K, Kameda H, Amano K: Therapeutic targets of misguided T cells in systemic lupus erythematosus. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(3): 295-8, 2005.
18. Manavalan SJ, Valiando JR, Reeves WH, et al: Genomic absence of the gene encoding T cell receptor Vbeta7.2 is linked to the presence of autoantibodies in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 50(1):187-98, 2004.

19. Schluter SF, Wang E, Winfield JB, Yocum DE, Marchalonis JJ: Autoregulation of Tcr V region epitopes in autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol* 383:231-6,1995.
20. Ikaheimo IL, Tiilikainen AS, Hameenkorpi R, Silvennoinen-Kassinen SH: Different distribution of T cell receptor beta-chain haplotypes in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Ann Med* 26(2):129-32, 1994.
21. Posnett DN, Vissinga CS, Pambuccian C, et al: Level of human TCRBV3S1 (V beta 3) expression correlates with allelic polymorphism in the spacer region of the recombination signal sequence. *J Exp Med* 179(5):1707-11, 1994.
22. Hunemeier T, Neves AG, Nornberg IF, et al: T cell and chemokine receptor variation in South Amerindian populations. *American Journal of Human Biology* 17(4): 515-518, 2005.
23. Charmley P, Wang K, Hood L, Nickerson DA: Identification and physical mapping of a polymorphic human T cell receptor V beta gene with a frequent null allele. *J Exp Med* 177(1):135-43, 1993.
24. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-7,1982.
25. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444, 1991.
26. Gulko PS, Winchester RJ: Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kammer GM, Tsokos GC, editors. *Lupus: Molecular and Cellular Pathogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 1999:101-23.
27. Murata H, Matsumura R, Koyama A, et al: T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 46(8):2141-7, 2002.

28. Barron KS, Robinson MA: The human T-cell receptor variable gene segment TCRBV6S1 has two null alleles. *Hum Immunol* 40(1):17-9, 1994.
29. Osman GE, Hannibal MC, Anderson JP, Lasky SR, Ladiges WC, Hood L: FVB/N (H2(q)) mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments. *Immunogenetics* 49(10):851-9, 1999.

## 11. VERSÃO EM INGLÊS ARTIGO 2

***T lymphocytes, T cell receptor (TCR) gene rearrangement and usage of TCR polymorphism as markers in autoimmune disorders***

João Adalberto Marasca, João Carlos Tavares Brenol, Ricardo Machado Xavier, José Artur Bogo Chies.

**Abstract:** The T cell receptor (TCR) repertoire in peripheral blood cells has an important influence in shaping any specific immune response. Genetic polymorphisms at the TCR locus, both at Constant and variable regions, seem to be an important mechanism to generate interpopulational diversity. These polymorphisms are also important when considering the possibility of a given individual to develop an immune reaction. As systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) are autoimmune disorders, the analysis of the T cell pool and the TCR repertoire can provide important insights on the pathogenesis of these diseases.

**Key words:** lupus erythematosus systemic, rheumatoid arthritis, TCR, polymorphism, repertoire, T cells



Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Genética.

Universidade de Caxias do Sul

Supported by CAPES, from Ministério da Educação e Cultura

JA Marasca, MD; Hospital de Clínica de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre and Universidade de Caxias do Sul, Brasil; RM Xavier, PhD; JCT Brenol, PhD: Hospital de Clínica de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; JAB Chies, PhD: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, Brasil.

Address reprint request and correspondence about article to Corresponding author:

José Artur Bogo Chies

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Genética

Av Bento Gonçalves 9500 Caixa Postal 15051

Porto Alegre RS Brazil

CEP 91501-970

Tel: 55 51 33 16 67 40

FAX: 55 51 33 16 73 11

email address: [jabchies@terra.com.br](mailto:jabchies@terra.com.br)

One of the main characteristics of the immune system is the huge diversity of the antigenic receptors of T and B lymphocytes. The mechanism that generate operates in different levels. Its study has contributed to understand the immune system in normal and pathologic situations.

The T cell receptors (TCR) and immunoglobulins (Ig) are codified by genes families that are denominated during the cellular differentiation and presents clonal distribution in lymphocyte. Each lymphocyte presents only one specific TCR or Ig. The establishment of the receptors specificities depends on several mechanisms operating in differents points of the development of B and T lymphocytes.

### **TCR MEMBRANE EXPRESSION**

Exist two kinds of TCR: the TCR  $\alpha\beta$  and TCR  $\gamma\delta$ . The TCR genes are organized in groups in genome and the formation of a chain of TCR depends on recombination of different genic fragments denominated V (variable), D (diversity) and J (joining). Thus, the chains  $\alpha$  e  $\gamma$  are produced by the recombination of segments V and J, and the chains  $\beta$  e  $\delta$  are produced by recombination of V, D e J (figure 1).

The generation of diversity of the antigenic receptors include: a) a big number of of different genic segments; b) recombination of these segments with recombinase enzyme; c) diversity on joining of these segments; d) association of polypeptide chains alpha/beta or gamma/delta.

### **THE GENERATION OF TCR DIVERSITY**

The main way of diversity is from the multigenic families V, D e J(1). Any D segment can bind any segment J, and any V segment can rearrange with DJ conjunct.

Is essential the reorganization of the RSS (recombination signal sequence) localized in the extremity of V, D e J segments to occur the recombination of these segments (2-4). These RSS will work as points of recognition and organization to the enzymatic machine, that will direct the rearranges to a tissue specific way. The genes RAG-1 e RAG-2 are de main genic products involved in the process of segment recombination V (D) J (5-7).

Any individual is able to product more Ig in TCR specificities than he can use in his life. Its necessary, therefore, a mechanism to select and control the lymphocytes that will be eliminated (negative selection) or will stay in the body periphery (positive selection). These complex processes happen in the bone marrow with B lymphocytes, and in the time with T lymphocytes.

Several TCR V $\beta$  segments have already been identified as polymorphic, with alleles being different by only a few nucleotides. These polymorphisms may have a great importance at the definition of the final T cell repertoire

### **TCR POLYMORPHISM AND AUTOIMMUNE DISEASE**

The search for the identification of genes associated with the immune system and that can be used as marking molecular associates has been intense. Some pathological situations in different ethnic groups already had been analyzed, being able itself to cite the rheumatic fever (11), systemic lupus erythematosus (12), diabetes type I(13) among others. In the case of RA, the developed studies objectifying to establish association between the polymorphism of TCR with the development of the illness have revealed controversial. Associations of RA the alleles of the TCR, as TCRAV8S1 (14); or, in individuals HLA-DR4+, allels TCRBV6S7, TCRBV13S5P and TCRBV12S4(15), minor and alelos TCRBV8(16) representation of certain alleles of TCRD(17) have been described. In youthful RA, it was described association between alleles of TCRBV6 (10,18). However, other studies, for times

using the same markers, as in the case of alleles of TCRBV8 (19-22) and TCRAV8(23) beyond different polymorphisms located in alleles of TCRBV2S1(24), the TCRBV11 and the constant region of TCRB(21,22) and the alleles of the TCRAV6, TCRAV17 and TCRAV21(23) or of TCRG(25) have presented resulted negative. Still the cases exist where the authors point out the existence of a weak association between the studied polymorphism and the development of the RA, as it is the situation of TCRAV5 (23), or some of works that suggest association inside a gene of locus of the TCRB, and the development of RA, without identifying which, accurately, would be this gene(26). In our laboratory we are analyzing polimorfismos related to genes TCRBV3S1, TCRBV13 and TCRBV18 with the objective to identify associations of these with the SLE and RA development.

#### **VARIATIONS OF REPERTOIRE T IN HUMAN ETNIAS**

Are unquestionable that the genetic basis of the individual can determine a greater or minor susceptibility to the development of the SLE and RA. Correlations with loci polymorphic of the HLA well are defined, as the association with subtypes of DR3 and DR4 and the call theory of common epytope. However, this correlation is not enough to define the genetic contribution for the development of these illnesses. In the truth, some authors have defended the notion of that the HLA would be plus a marker of prognostic of that of susceptibility properly said.

So that studies investigating the preferential use of certain segments or alelos of TCR in patients as with auto-immune illnesses can be validated are necessary the knowledge of the repertoires of cells a trend the biggest use of the segments Vbeta5.1 and Vbeta5.3 in the caucasoids, when compared with the group of polinesic origin. Also a bigger use of on the part of the samoanos if compared Vbeta3.2 segments could be observed with the population caucasoid (8). Of

Inocencio et al., in 1995(9), analyzing a population of Afro-American, had observed a reduction of the frequency of use of the Vbeta3.1 segment, as much in cellular subpopulations T CD4+ how much CD8+, in comparison with same cellular subpopulations T of caucasoids individuals. This exactly work disclosed that the frequency of Vbeta3.1+ cells observed in afroamericans and caucasoides is correlated with the occurrence of polymorphism in the region of the signal of recombination of gene TCRBV3S1, alelo 1, associated with low a frequency of Vbeta3.1+ cells, was more common between the Afro-American population and alelo 2, associate with one high frequency of Vbeta3.1+ cells, was more common between the caucasoids. Polymorphism of the genes that also codify the TCR already had been studied in different ethnic groups as caucasóides and Tlingit indians of the Alasca, aiming at itself to establish associations with RA (10). Of this form, the receiver of cells T, as much in level of DNA (allelic variant of the segments of the TCR) as in the protein expression (analysis of the molecule of TCR to the surface of the linfócito T), can be used marking in different ethnic groups.

## **PROTECTION AGAINST THE DEVELOPMENT OF ILLNESS AUTOIMMUNE**

An interesting point that has been explored is the possibility of protection against the development of auto-immune pathology due to absence of capacity of imunológica reply. So that this happens, two situations involving the TCR are possible. The first one inhabits in the existence of deleções that occur of course in locus of the TCR resulting in absence of determined fragmentos gênicos or the existence of alelos with insertions of códons of termination throughout its nucleotídicas sequences. Deleções in locus of the TCR resulting in protection of the individual already had directly been described in ancestries of endocruzados mice, as in the case of mice FVB/N [ H2(q) ] that they are resistant to the artrite

development induzida(27). In human beings, deleções in locus of the TCR already had been observed, although not to exist direct correlations between these and the occurrence, predisposition or resistance the illnesses autoimunes (28). Different works already had approached the existence of "null" alelos of gênicos segments of the TCR in human beings due to insertion of códons of termination to the long one of the segment of the TCR. Homozigose for these los alelos naked results in the appearance of a "hole" in the repertoire of cells T, or either, the individuals are not capable to mount an immune reply using these segments and, therefore, they are not apt to answer against recognized antigens for these gênicos segments.

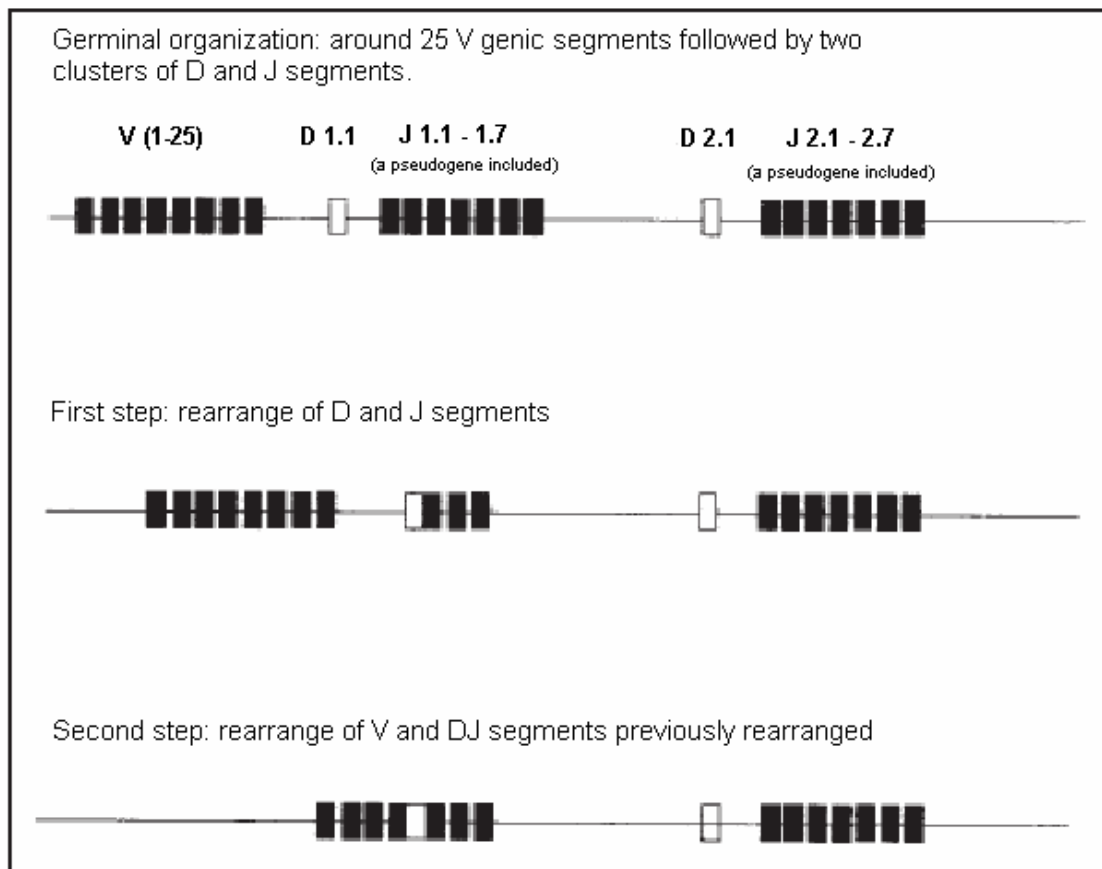
Despite this "imunológico inconvenience", the existence of null alelos of segments of the TCR seems to be sufficiently common. Charmley et al. had described in 1993(29) the null existence of one alelo of human the Vbeta18 gene that if found in homozigose in 11% of the analyzed population. One another example was the identification of two null alelos (TCRVB6S1\*2P and \* 3P) referring to the segment of TCRBV6S1 in a sample of 203 individuals of different etnias whose frequencies had been equal 12 and 16%, respectivamente (30). The second possibility of development of immune reply is not the deleção of reactive linfócitos T through the activation saw superantigens. In this case repertoire T is selected and modulated preventing the development of immune reaction. It is important to point out that diverse works have demonstrated that cells T gifts in the region of the injury in patients with reumatóide artrite present origin clonotípica (31,32). Amongst the works that demonstrate to the pathogenicity and oligoclonalidade of cells T in reumatóide artrite, it fits to cite a murino model using mice SCID as receiving of mononuclear cells proceeding from individuals with artrite reumatóide (33). Considering the clonalidade of cells T in the development of the pathology, we have

as perspective of treatment the specific deleção of these clones, what it would take to the disappearance or minor intensity of the inflammatory reply.

## **PERSPECTIVES**

Considering the presented data, is clear the necessity of more systematic analyses of the repertoire of cells T and its receptors in patients with LES and RA. These analyses could be the key for a better understanding of the involved mechanisms as in the inflammatory process as in the autoimmune response typical of these pathologies. This knowledge, in turn, is essential for the development of new therapeutical modalities. It fits to point out that, taking in consideration the differences in the genetic composition and expression of polymorphic genes in the diverse ethnicities, comments told in other populations possibly cannot be used as reference in the Brazilian population, having, therefore, necessity of accomplishment of local studies (in national and regional level) involving a great number, as much of normal individuals as of patients with auto-immune illnesses.

**Figure 1** - DNA – Somatic reconstruction. V, D and J rearranges to form a beta chain of the TCR.





## REFERENCES

1. Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581, 1983.
2. Akira S, Okazaki K, Sakano H: Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* 238: 1134-1138, 1987.
3. Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M: V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* 3: 1053-1061, 1989.
4. Wei Z, Lieber MR: Lymphoid V(D)J recombination – Functional analysis of the spacer sequence within the recombination signal. *Science* 268: 3180-3183, 1993.
5. Schatz DG, Baltimore D: Stable expression of immunoglobulin gene V(D)J recombinase activity by gene transfer into 3T3 fibroblasts. *Cell* 53: 107-115, 1988.
6. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D: The V(D)J recombination activating gene RAG-1. *Cell* 59: 1035-1048, 1989.
7. Oettinger A, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D: RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-1523, 1990.
8. Geursen A, Skinner MA, Townsend LA, et al: Population study of T cell receptor V beta gene usage in peripheral blood lymphocytes: differences in ethnic groups. *Clin Exp Immunol* 94: 201-207, 1993.
9. De Inocencio J, Choi E, Glass DN, Hirsch R: T cell receptor repertoire differences between African Americans and Caucasians associated with polymorphism of the TCRBV3S1 (V beta 3.1) gene. *J Immunol* 154: 4836-4841, 1995.
10. Charmley P, Nepom BS, Concannon P: HLA and T-cell receptor beta-chain DNA polymorphisms identify a distinct subset of patients with pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 695-701, 1994.

11. Abbott WG, Geursen A, Peake JS, Simpson IJ, Skinner MA, Tan PL: Search for linkage disequilibrium between alleles in the T cell receptor alpha and beta chain loci and susceptibility to rheumatic fever. *Immunol Cell Biol* 73: 369-371, 1995.
12. Huang DF, Siminovitch KA, Liu, et al: Population and family studies of three disease related polymorphic genes in systemic lúpus erythematosus. *J Clin Invest* 95: 1766-1772, 1995.
13. Bohem BO, Manfras BJ, Rosak C, et al: TcR-alpha and TcR-beta diallelic RFLPs in insulindependent (type-1) Caucasian diabetic patients. *Diabetes Res* 15: 63-67, 1990.
14. Cornélis F, Hardwick L, Flipo RM, et al: Association of rheumatoid arthritis with an amino acid allelic variation of the T cell receptor. *Arthritis Rheum* 40: 1387-1390, 1997.
15. Mu H, Charmley P, King MC, Criswell LA: Synergy between T cell receptor beta gene polymorphism and HLA-DR4 in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 931-937, 1996.
16. Funkhouser SW, Concannon P, Charmley P, Vredevoe DL, Hood L: Differences in the T cell receptor restriction fragment length polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35: 465-471, 1992.
17. Vandevyver C, Geusens P, Cassiman JJ, Raus J: T cell receptor delta locus polymorphism in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet* 21: 479-483, 1994.
18. Maksymowych WP, Gabriel CA, Luyrink L: Polymorphism in a T-cell receptor variable gene is associated with susceptibility to a juvenile rheumatoid arthritis subset. *Immunogenetics* 35: 257-262, 1992.
19. De Vries N, Prinsen CFM, Mensink EBJM, Van Riel PLMC, Van't Hof MA, Van de Putte LBA: A T cell receptor beta chain variable region polymorphism associated

- with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 52: 327-331, 1993.
20. Lunardi C, Ibberson M, Zeminian S, De Sandre G, So AK: Lack of association of T cell receptor V beta 8 polymorphism with rheumatoid arthritis in United Kingdom and Italian white patients. *Ann Rheum Dis* 53: 341-343, 1994.
21. Vandevyver C, Gu XX, Geusens P, et al: HLA class II and T-cell receptor beta chain polymorphisms in Belgian patients with rheumatoid arthritis: no evidence for disease association with the TCRBC2, TCRBV8 and TCRBVII polymorphisms. *Ann Rheum Dis* 53:580-586, 1994.
22. Wallin J, Hillert J, Olerup O, Carlsson B, Ström H: Association of rheumatoid arthritis with a dominant DR1/Dw4/Dw14 sequence motif, but not with T cell receptor beta chain gene allele or haplotypes. *Arthritis Rheum* 34: 1416-1424, 1991.
23. Ibberson M, Péclat V, Guerne P-A, et al: Analysis of T cell receptor V alpha polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 57: 49-51, 1998.
24. Pile K, Wordsworth P, Liot F, Bardin T, Bell J, Cornélis F: Analysis of a T cell receptor V beta segment implicated in susceptibility to rheumatoid arthritis: V beta 2 germline polymorphism does not encode susceptibility. *Ann Rheum Dis* 52: 891-894, 1993.
25. Chaoui I, Lefranc MP, D'Angeac A, et al: T cell receptor gamma variable gene locus polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35: 756-760, 1992.
26. McDermott M, Kastner DL, Holloman JD, et al: The role of T cell receptor beta chain genes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 91-95, 1995.
27. Osman GE, Hannibal MC, Anderson JP, Lasky SR, Ladiges WC, Hood L: FVB/N [H2(q)] mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments. *Immunogenetics* 49: 851-859, 1999.

28. Zhao TM, Witaker SE, Robinson MA: A genetically determined insertion/deletion related polymorphism in human T cell receptor b chain (TCRB) includes functional variable gene segments. *J Exp Med* 180: 1405-1414, 1994.
29. Charmley P, Wang K, Hood L, Nickerson DA: Identification and physical mapping of a polymorphic human T cell receptor V beta gene with a frequent null allele. *J Exp Med* 177: 135-143, 1993.
30. Barron KS, Robinson MA: The human T-cell receptor variable gene segment TCRBV6S1 has two null alleles. *Hum Immunol* 40: 1719, 1994.
31. Ikeda Y, Masuko K, Nakai, et al: High frequencies of identical T cell clonotypes in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients suggest the occurrence of common antigen-driven immune responses. *Arthritis Rheum* 39: 446-453, 1996.
32. Kurokawa M, Kato T, Masuko-Hongo, et al: Characterization of T cell clonotypes that accumulated in multiple joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58: 546-553, 1999.
33. Mima T, Saeki Y, Ohshima S, et al: Transfer of rheumatoid arthritis into severe combined immunodeficient mice. The pathogenetic implications of T cell populations oligoclonally expanding in the rheumatoid joints. *J Clin Invest* 96: 1746-1758, 1995.

## 12. ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS

***O polimorfismo do receptor do linfócito T Vbeta e a suscetibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico***

João Adalberto Marasca, Ricardo Machado Xavier, José Artur Bogo Chies, João Carlos Tavares Brenol.

**Objetivo:** Investigar se o lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou a nefrite lúpica estão associados com as variantes dos segmentos Vbeta do gene do TCR (TCRV3S1 e TCRBV20S1).

**Métodos:** Um total de 138 pacientes de LES (103 Europeu-descendentes e 35 Africano-descendentes) e 140 controles saudáveis foram genotipados para ambas as variantes do polimorfismo do segmento Vbeta do gene TCR pela técnica de restrição de fragmento precedido por PCR (PCR-RLFP). As freqüências obtidas foram comparadas. A nefrite lúpica estava presente em 70 pacientes (54 Europeu-descendentes e 16 Africano-descendentes).

**Resultados:** As freqüências alélicas do segmento do gene TCRVB3S1 foram, nos pacientes com LES e controles, 0.507 e 0.619 (alelo 1) e 0.493 e 0.381 (alelo 2) respectivamente. As freqüências alélicas para o segmento do gene TCRBV20S1 foram, no pacientes com LES e controles, 0.794 e 0.868 (alelo 1) e 0.206 e 0.132 (alelo 2) respectivamente. Nem as freqüências alélicas nem as freqüências genotípicas diferiram entre LES e indivíduos saudáveis. Além disso, não havia nenhuma diferença nas freqüências alélicas quando se compararam os grupos de acordo com a presença ou a ausência de nefrite, bem como os subtipos proliferativos de acordo com a classificação da OMS (Classe III e IV).

**Conclusões:** Apesar do papel descrito do TCR em doenças inflamatórias e auto-imune, as variantes alélicas TCRV3S1 e TCRBV20S1 não pareceram estar significativamente envolvidas na suscetibilidade genética ao LES ou nefrite lúpica.

**Palavras-chave:** polimorfismo do TCR, lúpus eritematoso sistêmico, TCRBV3S1, TCRBV20S1, nefrite lúpica.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Genética.

Universidade de Caxias do Sul

Supported by CAPES, from Ministério da Educação e Cultura.

JA Marasca, MD; Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre e Universidade de Caxias do Sul, Brasil; RM Xavier, PhD; JCT Brenol, PhD: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; JAB Chies, PhD: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, Brasil.

Endereço dos autores para correspondência:

José Artur Bogo Chies

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Genética

Av. Bento Gonçalves 9500 Caixa Postal 15051

Porto Alegre RS Brasil

CEP 91501-970

Tel: 55 51 33 16 67 40

FAX: 55 51 33 16 73 11

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune caracterizada pelo envolvimento de vários órgãos. A patogênese do LES é complexa e não bem compreendida ainda, embora a etiologia envolva fatores hormonais, genéticos e ambientais. É amplamente aceito que o linfócito T com função alterada tenha um papel central no desenvolvimento do LES e da nefrite lúpica, tanto em ratos como nos seres humanos [1.2.3]. Alguns estudos prévios indicaram que a ablação de células T CD4 levava a uma potencial melhora da doença [4.5.6]. É evidente que as células T podem promover a doença por uma grande variedade de mecanismos, incluindo o recrutamento de linfócitos B para a produção de auto-anticorpos, bem como facilitando os danos teciduais [7.8.9]. Embora seja evidente que os linfócitos T são essenciais para surgimento das doenças auto-imunes, o grau de determinação genética que contribui para o LES não está claro [10.11.12].

O repertório do receptor da célula T (TCR) desempenha um papel importante nas respostas imunes. As variações genéticas nos genes ou em segmentos do gene que codificam estas moléculas poderiam modificar a especificidade das respostas e, conseqüentemente, conduzir ao desenvolvimento da doença auto-imune [13.14.15]. O repertório periférico da célula T em um dado indivíduo reflete uma amostra selecionada do repertório potencial, composta de todos os segmentos variáveis de TCR que existem na configuração do DNA. Durante o desenvolvimento da célula T, os segmentos variáveis do TCR se rearranjam para formar as cadeias alfa e beta que são responsáveis pela interação com os peptídeos do complexo MHC; e podem, conseqüentemente, modular as respostas imunes específicas [16]. Considerando a participação de TCR no desenvolvimento das respostas imunes, diversos estudos foram dirigidos para analisar os polimorfismos do segmento do gene de TCR que apontam a associação



de variantes alélicas com condições patológicas [13.14.15.17.18.19.20]. Também, a caracterização do repertório do linfócito T em uma doença auto-imune, dada a identificação específica dos segmentos gênicos do TCRBV predominantemente usados em tais situações, é uma aproximação interessante a fim de identificar alvos potenciais para a terapia.

Neste estudo, nós focalizamos na identificação dos marcadores genéticos (os segmentos ou os genes do TCR ligados aos segmentos do gene de TCR) que poderiam nos permitir o reconhecimento de uma tendência ou uma predisposição em desenvolver o LES ou nefrite lúpica. Nós analisamos dois polimorfismos bialélicos em dois segmentos diferentes do gene do TCRBV: o primeiro é um único polimorfismo do nucleotídeo (C/T) situado dentro da região de 23 pb da seqüência de recombinação do segmento do gene TCRBV3S1 (RSS). Embora o local polimórfico seja situado na região não-conservada RSS, esta variante alélica está associada com o nível de células T Vb3.1+ no sangue periférico [ 21 ]. Os indivíduos homocigotos para o alelo 1 têm uma freqüência baixa das células T Vb3.1+ (ao redor 1% das células T totais), visto que os indivíduos homocigotos para o alelo 2 tenham uma freqüência mais elevada das células T Vb3.1+ (ao redor 7.5%) e indivíduos heterocigotos apresentam uma freqüência intermediária. O segundo polimorfismo estudado está situado no segmento do gene TCRBV20S1 (conhecido previamente também como Vbeta18) e é o resultado de uma substituição do nucleotídeo (C/T) que cria também um *stop* códon dentro do segmento gênico [22]. Indivíduos homocigotos para o alelo nulo (BV20S1A2P, agora chamado de alelo2) são incapazes de produzir moléculas de TCR usando o segmento do gene TCRBV20S1, resultando na ausência de células T Vb20+ no sangue periférico. Nosso estudo analisa somente este local polimórfico, conseqüentemente os alelos BV20S1A1N1 e BV20S1A1N2 eram indistinguíveis e

são considerados como alelo1. Um nível detectável de células T Vb20+ funcionais é observado no compartimento periférico de indivíduos heterozigotos para este polimorfismo [23]. Numa tentativa de identificar novos marcadores de suscetibilidade para LES, nós estudamos a freqüência destes dois polimorfismos bialélicos do TCRBV em 139 pacientes Caucasoides e pacientes afro-descendentes da região sul do Brasil, com LES clinicamente definidos, e comparamos com as freqüências obtidas previamente dos caucasóides e dos afro-descendentes saudáveis da mesma região.

**Pacientes.** Nós estudamos 139 pacientes (74.5% Europeu-descendentes e 25.5% Africano-descendentes) com LES (classificado de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologias) [24] quem eram acompanhados no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre-Brasil); 69 pacientes tinham nefrite lúpica e (30 com biopsia tipo proliferativo, classe do WHO III e IV). As amostras periféricas do sangue foram coletadas destes pacientes, assim como de 160 doadores de sangue voluntários saudáveis (59.3% Europeu-descendentes e 40.7% Africano-descendentes) que constituíram o grupo de controle. Cento e trinta e oito indivíduos foram analisados para o polimorfismo TCRBV3S1 e 136 indivíduos foram analisados para o polimorfismo TCRBV20S1. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e todos os pacientes assinaram um consentimento informado.

**Métodos.** O DNA foi extraído do sangue periférico usando o método descrito por Lahiri e por Nurnberger [25]. Ambos os polimorfismos do DNA foram por PCR (PCR-RFLP), que envolveu a amplificação das amostras do DNA com os *primers* específicos, digestão do produto de PCR com as endonucleases para que a presença ou a ausência dos locais de restrição distinguisse os dois alelos e a visualização foi por eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio.

#### *A identificação das variantes na região de RSS do segmento do gene TCRBV3S1*

Para a análise do polimorfismo do TCRBV3S1 RSS, amostras do DNA foram amplificadas por PCR usando os *primers* específicos 5'-CCTTGATGGCCTGTTTTTCAC-3' e 5'-GTGCCATCGGAGCCAGCAC-3' [ 21 ]. Os *primers* foram misturados com o 1 µl de DNA, 2.5µl 10 x tampão PCR (que contém o mgCl<sub>2</sub> de 30mM), solução do dNTP de 1 µl (uma quantidade final de 10mM por reação) e 0.2 µl do polimerase de Taq (5 mU/l). As amostras foram submetidas a 36 ciclos de 1 minuto de desnaturação em 94° C, de 1 minuto de anelamento em 51° C, e de 2 minutos da extensão em 72° C, precedidas por 1 minuto em 94° C e seguidas por 5 minutos em 72° C em um ciclador térmico do DNA (MJ Pesquisa, Inc., Watertown, MA, EUA). O fragmento resultante de 431 pb foi digerido com *PvuII* e os produtos foram visualizados por eletroforese em um gel de agarose a 1% que continha brometo de etídio. As duas variantes alélicas situadas no TCRBV3S1 RSS diferem somente em uma única posição do nucleotídeo (C/T). Esta citosina de transição da timina cria um local de *PvuII* dentro do TCRBV3S1 RSS. Quando o DNA amplificado com os *primers* específicos é submetido à digestão com *PvuII*, os indivíduos homocigotos para o alelo 1 podem ser identificados pela presença de uma única faixa do DNA no gel do agarose (431 pb) que reflete a ausência do local da limitação. Homocigotos para o alelo 2 podem ser identificados pela presença de uma faixa de 352 pb (o fragmento de 79 pb não pode ser observado em um gel de agarose de 1%), visto que nos heterocigotos duas faixas (431 e 352 pb) podem ser observadas.

#### *A identificação das variantes no segmento do gene TCRBV20S1*

Para a análise do polimorfismo TCRBV20S1, os *primers* específicos 5'-ATTCATCAATGGCCAGCGAC-3' e 5'-GGAGCTTCTTAGAACTCAG-3' foram

usados [ 23 ]. PCR foi executado sob as mesmas circunstâncias descritas ao polimorfismo TCRBV3 em 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação em 94° C, de 1 minuto de anelamento em 60° C, e de 2 minutos da extensão em 72° C, precedidas por 1 minuto em 94° C e seguidas por 5 minutos em 72° C. O polimorfismoTCRBV20S1 analisado é uma única substituição do nucleotídeo (uma transição baixa de C-T), conduzindo à introdução de um *stop* códon na seqüência de segmento do gene Vbeta20 (alelo 2) e simultaneamente eliminando um local da limitação para o enzima de KpnI. Os indivíduos homozigotos para o alelo 2 podem ser identificados pela presença de uma única faixa no gel do agarose (235 pb) quando o DNA é submetido à amplificação por PCR com os *primers* específicos e seguido pela digestão com o KpnI. O DNA dos homozigotos para o alelo 1 é identificado pela presença de duas faixas (100 e 135 pb), visto que os heterozigotos mostram três faixas (235, 135 e 100 pb).

**Análise estatística.** As freqüências genóticas e alélicas intergrupo foram comparadas usando o teste do Qui-quadrado, teste do Qui-quadrado com correção de Yate e o teste exato de Fisher. As populações estavam no equilíbrio Hardy-Weinberg para ambos os alelos analisados. Para significância estatística nós consideramos um  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Os pacientes com LES foram classificados de acordo com a origem étnica em Europeu-descendente ou Africano-descendente para análise separada. 138 pacientes foram investigados para o local da limitação de TCRBV3S1/PvuII e 136 pacientes para o local da limitação TCRVB20S1/KpnI. Nenhuma diferença na freqüência alélica foi observada entre estes dois grupos etnicamente classificados, o que permitiu a junção dos dados nas análises estatísticas. As freqüências genóticas das variantes analisadas dos grupos Europeu-descendentes e Africano-

descendentes estavam distribuídas de acordo com o equilíbrio Hardy-Weinberg. Não houve diferença nas frequências alélicas entre pacientes com LES e o grupo controle ou entre pacientes com nefrite lúpica e controles. As frequências genótípicas e alélicas dos pacientes com LES (com e sem nefrite lúpica) e de controles são sumariadas na tabela 1 e 2. Uma comparação entre os subgrupos com glomerulonefrite proliferativa e sem nefrite também foi executada. Entretanto, este subgrupo resultou num tamanho de amostra pequeno e também não houve diferença significativa entre eles (dados não mostrados).

## **DISCUSSÃO**

O LES é uma doença poligênica que tem sido demonstrado estar associada com o HLA classe II DR2 e DR3. A participação de outros genes fora do cromossomo 6 na suscetibilidade genética do LES já foi sugerida [ 26 ].

Anormalidades no funcionamento da célula T foram observadas em pacientes com LES em atividade que tinham manifestações clínicas específicas tais como vasculites, dermatite e artrite. A expressão da cadeia zeta do TCR parece estar atenuada, ou ausente em mais da metade dos pacientes com LES e transcrições aberrantes da cadeia zeta do TCR, incluindo as variantes com ausência do *exon 7* e com um 3' curto; UTR, foram detectados [ 9 ]. É importante salientar que os mecanismos moleculares da sinalização da célula T em pacientes com LES são complexos e difíceis de ser explicados. Incluem a fosforilação anormal da tirosina, a resposta intracelular do cálcio e a produção de citocinas [11].

A respeito do repertório do TCR, nossos resultados sugerem que os polimorfismos TCRBV3S1 e TCRBV20S1 estudados não estão envolvidos diretamente na suscetibilidade genética do LES ou nefrite lúpica. Mesmo após a estratificação dos pacientes pelas diferentes classes de nefrite da OMS, nós não mostramos nenhuma diferença entre pacientes e controles. Não obstante, Murata et

al (2002) sugeriram que os segmentos de alguns genes do TCRBV estão expressos preferencialmente pelas células T que infiltram os rins dos pacientes com nefrite lúpica, e que polimorfismos genéticos das citocinas e, talvez, do segmento gênico do TCR podem contribuir para desregular a atividade do linfócito nesta situação [27]. Especificamente, como descrito por estes mesmos autores, segmentos do gene TCR Vbeta8 e Vbeta20 foram expressos em 6 de 12 pacientes, e a análise das seqüências juncionais das células T intra-renais mostraram a expansão oligoclonal, indicando estimulação antígeno-específica. Interessantemente, células T Vbeta20+ autoreativas (dirigidas contra a topoisomerase I), com diferenças substanciais em propriedades funcionais, foram observadas em gêmeos monozigotos discordantes para a esclerose sistêmica, sugerindo um papel importante para estas células no estabelecimento da doença.

Esta claro que toda a mudança na molécula do TCR e/ou do MHC poderia potencialmente alterar uma dada resposta imune. Ambos os polimorfismos bialélicos TCRBV3S1 e TCRBV20S1 analisados no atual trabalho conduzem às alterações fenotípicas. As variantes TCRBV3S1 modificam a freqüência de células T Vb3.1+ e do alelo TCRBV20S1 nulo, resultando em homozigotos com ausência total de células T Vb20+ na periferia. É interessante que mesmo tendo por resultado uma “abertura” no repertório da célula T, os alelos nulos do TCR podem ser encontrados em altas freqüências em algumas populações humanas. Charmley et al [23] descreveram uma população caucasóide com 11% de homozigotos para o alelo TCRBV20S1 e o TCRBV6S1 \* 2P e \* 3P, ambos os alelos nulos, as freqüências foram 0.12 e 0.16 em uma amostra de 203 indivíduos [28]. Estes relatórios sugerem que os alelos nulos podem também conferir algumas vantagens dadas circunstâncias. Por exemplo, as deleções no locus do TCR que abrange segmentos do gene TCRBV tendo como resultado a proteção contra o desenvolvimento de

uma doença auto-imune (artite induzida) já foram descritas em ratos [29]. A ausência das diferenças observadas nas frequências alélicas do TCRBV3S1 e TCRBV20S1 entre pacientes LES e saudáveis nesse estudo, sugere que as variantes polimórficas estudadas não estiveram envolvidas na patogenia do LES ou da nefrite lúpica. Contudo, considerando a importância das células T no lúpus, e dada à expressão preferencialmente oligoclonal descrita no segmento do gene Vbeta20 no estudo de Murata et al (2002), outros estudos em populações humanas diferentes devem ser dirigidos para explicações adicionais a fisiopatologia do LES.

**Tabela 1.** Frequência genotípica e alélica do TCRBV3S1 em pacientes com LES, nefrite lúpica e controles.

	Controles		LES		Nefrite Lúpica	
	n	freq	n	freq	n	freq
<b>Genótipo</b>						
Alelo1/alelo1	58	0.417	38	0.275	20	0.286
Alelo2/alelo2	25	0.180	36	0.261	19	0.271
Alelo1/alelo2	56	0.403	64	0.464	31	0.443
Total	139	1.000	138	1.000	70	1.000
<b>Alelo</b>						
Alelo 1	172	0.619	140	0.507	71	0.507
Alelo 2	106	0.381	136	0.493	69	0.493
Total	278	1.000	276	1.000	140	1.000

**Tabela 2.** Frequência genotípica e alélica do TCRBV20S1 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), nefrite lúpica e controles.

	Controles		LES		Nefrite Lúpica	
	n	freq	n	freq	n	freq
<b>Genótipo</b>						
Alelo1/alelo1	107	0.764	85	0.625	40	0.580
Alelo2/alelo2	04	0.029	05	0.037	3	0.043
Alelo1/alelo2	29	0.207	46	0.338	26	0.377
Total	140	1.000	136	1.000	69	1.000
<b>Alelo</b>						
Alelo 1	243	0.868	216	0.794	106	0.768
Alelo 2	37	0.132	56	0.206	32	0.232
Total	280	1.000	272	1.000	138	1.000



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Craft J, Peng S, Fuji T, Okada M, Fatenejad S: Autoreactive T cells in murine lupus: origins and roles in autoantibody production. *Immunol Res* 19:245–257,1999.
2. Hahn BH, Datta SK: Characteristics of T-cells that participate in the pathogenesis of SLE. *Lupus* 6:330–332, 1997.
3. Massengill SF, Goodenow MM, Sleasman JW: SLE nephritis is associated with an oligoclonal expansion of intrarenal T cells. *Am J Kidney Dis* 31(3):418-26,1998.
4. Chen SY, Takeoka Y, Ansari AA, Boyd R, Klinman DM, Gershwin ME: The natural history of disease expression in CD4 and CD8 gene-deleted New Zealand black (NZB) mice. *J Immunol* 157:2676–2684,1996.
5. Koh DR, Ho A, Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Griesser H, Mak TW: Murine lupus in MRL/lpr mice lacking CD4 or CD8 T cells. *Eur J Immunol* 25:2558–2562, 1995.
6. Ruiz PJ, Waisman A, Mozes E: Anti-T-cell receptor therapy in murine experimental systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 62(1):1-8,1998.
7. Diaz Gallo C, Jevnikar AM, Brennan DC, Florquin S, Pacheco-Silva A, Kelley VR: Autoreactive kidney infiltrating T-cell clones in murine lupus nephritis. *Kidney Int* 42:851–859,1992.
8. Yamada M, Yagita H, Inoue H, et al: Selective accumulation of CCR4+ T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:735–740.
9. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T: T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38(5): 339-46, 2005.

10. Zhu J, Liu X, Xie C, et al: T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells. *J Clin Invest* 115(7):1869-78, 2005.
11. Nambiar MP, Krishnan S, Tsokos GC: T-cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Med* 102:31-47, 2004.
12. Mato T, Masuko K, Misaki Y, et al: Correlation of clonal T cell expansion with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 9(4):547-54, 1997.
13. Dresch C, Xavier R, Brenol JC, Nardi NB, Chies JA: Analysis of two T-cell receptor BV gene segment polymorphisms in caucasoid Brazilian patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 15;90(2-3):77-80, 2003.
14. Suttmuller M, Baelde HJ, Ouellette S, De Heer E, Bruijn JÁ: T-cell receptor Vbeta gene expression in experimental lupus nephritis. *Immunology* 95(1):18-25, 1998.
15. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K: Analysis of T cell receptor Vbeta repertoires of annular erythema associated with Sjogren's syndrome. *Eur J Dermatol* 8(4):248-51, 1998.
16. Wilson RK, Lai E, Concannon P, Barth RK, Hood LE: Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunol Rev* 101:149-72, 1988.
17. Takeuchi T, Tsuzaka K, Kameda H, Amano K: Therapeutic targets of misguided T cells in systemic lupus erythematosus. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(3): 295-8, 2005.
18. Manavalan SJ, Valiando JR, Reeves WH, et al: Genomic absence of the gene encoding T cell receptor Vbeta7.2 is linked to the presence of autoantibodies in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 50(1):187-98, 2004.

19. Schluter SF, Wang E, Winfield JB, Yocum DE, Marchalonis JJ: Autoregulation of Tcr V region epitopes in autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol* 383:231-6,1995.
20. Ikaheimo IL, Tiilikainen AS, Hameenkorpi R, Silvennoinen-Kassinen SH: Different distribution of T cell receptor beta-chain haplotypes in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Ann Med* 26(2):129-32, 1994.
21. Posnett DN, Vissinga CS, Pambuccian C, et al: Level of human TCRBV3S1 (V beta 3) expression correlates with allelic polymorphism in the spacer region of the recombination signal sequence. *J Exp Med* 179(5):1707-11, 1994.
22. Hunemeier T, Neves AG, Nornberg IF, et al: T cell and chemokine receptor variation in South Amerindian populations. *American Journal of Human Biology* 17(4): 515-518, 2005.
23. Charmley P, Wang K, Hood L, Nickerson DA: Identification and physical mapping of a polymorphic human T cell receptor V beta gene with a frequent null allele. *J Exp Med* 177(1):135-43, 1993.
24. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444, 1991.
25. Gulko PS, Winchester RJ: Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kammer GM, Tsokos GC, editors. *Lupus: Molecular and Cellular Pathogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 1999:101-23.
26. Murata H, Matsumura R, Koyama A, et al: T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 46(8):2141-7, 2002.
27. Barron KS, Robinson MA: The human T-cell receptor variable gene segment TCRBV6S1 has two null alleles. *Hum Immunol* 40(1):17-9, 1994.

28. Osman GE, Hannibal MC, Anderson JP, Lasky SR, Ladiges WC, Hood L: FVB/N (H2(q)) mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments. *Immunogenetics* 49(10):851-9, 1999.

### **13. ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS**

## **Linfócitos T, o rearranjo do receptor de células T (TCR) e a utilização de polimorfismos do TCR como marcadores em doenças auto-imunes**

João Adalberto Marasca, João Carlos Tavares Brenol, Ricardo Machado Xavier, José Artur Bogo Chies.

**Resumo:** O repertório de linfócitos T representado pela diversidade dos receptores de células T (TCR) presentes no sangue periférico é essencial para o desenvolvimento e modulação de uma resposta imune. O polimorfismo dos genes que codificam o TCR, em suas porções constante e variável, parece ser um mecanismo de extrema importância na geração de diversidade interpopulacional. Estes polimorfismos devem ser considerados quando estudamos a capacidade de um determinado indivíduo montar uma resposta imune eficiente. No caso de doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide, a análise do repertório de células T e a identificação de fragmentos de TCR potencialmente associados à doença podem ser instrumentos úteis na compreensão da sua patogênese.

**Palavras-chaves:** lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, TCR, polimorfismo, repertório, linfócitos T

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Genética.

Universidade de Caxias do Sul

Financiado pela CAPES, do Ministério da Educação e Cultura

JA Marasca, MD; Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre e Universidade de Caxias do Sul, Brasil; RM Xavier, PhD; JCT Brenol, PhD: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; JAB Chies, PhD: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, Brasil.

Endereço dos autores para correspondência:

José Artur Bogo Chies

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Genética

Av. Bento Gonçalves 9500 Caixa Postal 15051

Porto Alegre RS Brasil

CEP 91501-970

Tel: 55 51 33 16 67 40

FAX: 55 51 33 16 73 11

email address: jabchies@terra.com.br

Uma das principais características do sistema imunológico é a imensa diversidade dos receptores antigênicos em linfócitos T e B. Como em qualquer sistema exibindo diversidade genética – dentro de um indivíduo, população, espécie ou grupos maiores – os mecanismos que geram, selecionam e mantêm esta diversidade operam em diferentes níveis. Seu estudo não somente tem sido altamente enriquecedor em relação ao conhecimento básico da genética, como também tem contribuído para uma melhor compreensão da ação do sistema imune em situações normais e patológicas.

Os receptores antigênicos (T cell receptors ou TCR em linfócitos T e as imunoglobulinas ou Ig em linfócitos B) são codificados por famílias de genes que sofrem rearranjos durante a diferenciação celular e apresentam distribuição clonal nos linfócitos. Cada linfócito apresenta somente um tipo específico de TCR ou Ig. O estabelecimento do repertório de especificidades dos receptores TCR ou Ig depende de diversos mecanismos operando em diferentes pontos do desenvolvimento dos linfócitos B e T.

### **EXPRESSÃO DO TCR NA MEMBRANA**

Existem dois tipos de TCR: o TCR  $\alpha\beta$ , que é um heterodímero dos polipeptídeos  $\alpha$  e  $\beta$ , ligados entre si por pontes dissulfídicas; e o TCR  $\gamma\delta$ , organizado de maneira análoga, mas composto dos polipeptídeos  $\gamma$  e  $\delta$ . Os genes do TCR estão organizados em agrupamentos no genoma e a formação de uma cadeia do TCR depende do rearranjo (ou recombinação) de diferentes fragmentos gênicos denominados V (variabilidade), D (diversidade) e J (junção). Assim, as cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  são produzidas pela recombinação de segmentos V e J e as cadeias  $\beta$  e  $\delta$  são produzidas pela recombinação de segmentos V, D e J, de acordo com o esquema da figura 1.



Os processos geradores da diversidade dos receptores antigênicos incluem:

- a) grande número de diferentes segmentos gênicos; b) recombinação somática destes segmentos gênicos envolvendo participação de enzimas com atividade recombinase; c) diversidade na junção destes segmentos, com variações devidas à adição ou deleção ao acaso de nucleotídeos nas extremidades dos segmentos rearranjados; d) associação de cadeias polipeptídicas alfa/beta ou gama/delta.

### **MECANISMOS GERADORES DE DIVERSIDADE DO TCR**

Uma primeira fonte de diversidade provém da existência de famílias multigênicas V, D e J(1). A priori, qualquer segmento D poderá unir-se a qualquer segmento J e, seguindo-se o mesmo raciocínio, qualquer segmento V poderá rearranjar-se unindo ao conjunto DJ da cadeia polipeptídica em questão.

É essencial o reconhecimento de um sinal de recombinação (RSS – recombination signal sequence) composto de uma seqüência extremamente conservada localizada nas extremidades dos segmentos V, D e J para a ocorrência de rearranjo entre estes segmentos (2-4). Estes RSS funcionarão como pontos de reconhecimento e organização para a maquinaria enzimática que, por sua vez, direcionará os rearranjos de uma maneira tecido-específica (somente em linfócitos ocorre este processo de recombinação, sendo a configuração germinal mantida nas células de tecidos que não expressam os receptores antigênicos) e dependente das etapas de desenvolvimento tanto da célula quanto do organismo. Entre os principais produtos gênicos envolvidos no processo de rearranjo dos segmentos V (D)J podemos citar os genes RAG-1 e RAG-2 (5-7).

No que diz respeito à diversidade do sistema imune, qualquer indivíduo é capaz de produzir um número maior de especificidades Ig ou TCR do que será capaz de utilizar na sua vida. Torna-se, portanto, necessário que mecanismos de seleção e controle atuem escolhendo os linfócitos que deverão ser eliminados

(seleção negativa) ou que permanecerão na periferia do organismo (seleção positiva), constituindo assim a fonte de diversidade a ser utilizada quando do estabelecimento de uma resposta imune. Estes processos bastante complexos ocorrem na medula, no caso dos linfócitos B, e no timo, no caso dos linfócitos T, sendo também influenciados pelos antígenos presentes, ambiente e interações célula/célula; mesmo gêmeos homozigóticos (fundo genético idêntico) podem apresentar repertórios distintos.

Além da diversidade resultante dos mecanismos citados, quando comparamos diferentes indivíduos, populações ou grupos étnicos humanos é importante salientar a existência de polimorfismos do DNA que codifica os segmentos gênicos V(D)J do receptor de células T (TCR).

Diversos segmentos V $\beta$  do TCR humano já foram identificados como sendo polimórficos, com alelos diferindo entre si por uma ou poucas substituições de nucleotídeos. Estes polimorfismos, objeto de investigação em nosso laboratório, podem ter grande importância na definição do repertório final de células T e são bastante úteis na análise da diversidade de populações humanas, bem como em subsequentes comparações entre estas populações.

### **POLIMORFISMOS DO TCR E DOENÇA AUTO-IMUNE**

A busca pela identificação de genes ligados ao sistema imune e que possam ser utilizados como marcadores moleculares associados a doenças de fundo genético ou auto-imune têm sido intensa. Várias situações patológicas em diferentes grupos étnicos já foram analisadas, podendo-se citar a febre reumática (11), lúpus eritematoso(12), diabetes tipo I(13) entre outros.

No caso da AR, os estudos desenvolvidos objetivando estabelecer associação entre um dado polimorfismo de TCR com o desenvolvimento da doença têm-se mostrado controversos. Associações da AR a alelos do TCR, como

TCRAV8S1(14); ou, em indivíduos HLA-DR4+, os alelos TCRBV6S7, TCRBV13S5P e TCRBV12S4(15), alelos do TCRBV8(16) e menor representação de certos alelos de TCRD(17) têm sido descritas. Em artrite reumatóide juvenil, foi descrita associação entre alelos do TCRBV6(10,18). No entanto, outros estudos, por vezes utilizando os mesmos marcadores, como no caso de alelos do TCRBV8(19-22) e TCRAV8(23) além de diferentes polimorfismos localizados em alelos do TCRBV2S1(24), do TCRBV11 e da região constante do TCRB (21,22) e alelos do TCRAV6, TCRAV17 e TCRAV21 (23) ou do TCRG (25) têm apresentado resultados negativos. Ainda existem os casos em que os autores salientam a existência de uma fraca associação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento da AR, como é a situação do TCRAV5(23), ou mesmo de trabalhos que sugerem associação entre um gene dentro do locus do TCRB, ou ligado a este, e o desenvolvimento da AR, sem identificar qual, exatamente, seria este gene(26). Em nosso laboratório estamos analisando polimorfismos relacionados aos genes TCRBV3S1, TCRBV13 e TCRBV20 com o objetivo de identificar associações destes com o desenvolvimento de LES e AR.

### **VARIAÇÕES DE REPERTÓRIO T EM ETNIAS HUMANAS**

É indiscutível que o fundo genético do indivíduo pode determinar uma maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento do LES e artrite reumatóide. Correlações com os loci polimórficos do HLA estão bem definidas, como a associação com subtipos do DR3 e DR4 e a chamada teoria do epítipo comum. No entanto, esta correlação não é suficiente para definir a contribuição genética para o desenvolvimento destas doenças. Na verdade, alguns autores têm defendido a noção de que o HLA seria mais um marcador de prognóstico de que de suscetibilidade propriamente dita.

Para que estudos investigando a utilização preferencial de certos segmentos ou alelos de TCR em pacientes com doenças auto-imunes possam ser validados é necessário o conhecimento dos repertórios de células T em populações humanas normais. A análise do repertório periférico de células T por citometria de fluxo tem sido utilizada na caracterização da diversidade dos repertórios T em diferentes grupos étnicos. Assim, através de um estudo comparativo da utilização dos genes Vbeta do TCR (TCRBV) em sangue periférico de indivíduos caucasóides, maoris e samoanos, foi possível estabelecer uma tendência a maior utilização dos segmentos Vbeta5.1 e Vbeta5.3 nos caucasóides, quando comparados com o grupo de origem polinésica. Também pôde ser observada uma maior utilização de segmentos Vbeta3.2 por parte dos samoanos se comparados com a população caucasóide(8). De Inocencio et al., em 1995(9), analisando uma população de afro-americanos, observaram uma diminuição da freqüência de utilização do segmento Vbeta3.1, tanto em subpopulações celulares T CD4+ quanto CD8+, em comparação com as mesmas subpopulações celulares T de indivíduos caucasóides. Este mesmo trabalho revelou que a freqüência de células Vbeta3.1+ observada em afroamericanos e caucasóides está correlacionada com a ocorrência de polimorfismo na região do sinal de recombinação do gene TCRBV3S1, o alelo 1, associado com uma baixa freqüência de células Vbeta3.1+, era mais comum entre a população afro-americana e o alelo 2, associado com uma alta freqüência de células Vbeta3.1+, era mais comum entre os caucasóides. Polimorfismos dos genes que codificam o TCR também já foram estudados em diferentes grupos étnicos como caucasóides e índios Tlingit do Alasca, visando-se estabelecer associações com artrite reumatóide (10). Dessa forma, o receptor de células T, tanto em nível de DNA (variantes alélicas dos segmentos do TCR) como na

expressão de proteína (análise da molécula de TCR à superfície do linfócito T), pode ser utilizado como marcador em diferentes grupos étnicos.

## **PROTEÇÃO CONTRA O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA AUTO-IMUNE**

Um ponto interessante que tem sido explorado é a possibilidade de proteção contra o desenvolvimento de patologia auto-imune devido à ausência de capacidade de resposta imunológica. Para que isso aconteça, duas situações envolvendo o TCR são possíveis. A primeira reside na existência de deleções que ocorram naturalmente no locus do TCR resultando em ausência de determinados fragmentos gênicos ou na existência de alelos com inserções de códons de terminação ao longo de suas seqüências nucleotídicas. Deleções no locus do TCR diretamente resultando em proteção do indivíduo já foram descritas em linhagens de camundongos endocruzados, como no caso de camundongos FVB/N [H2(q)] que são resistentes ao desenvolvimento de artrite induzida (27). Em humanos, deleções no locus do TCR já foram observadas, apesar de não existirem correlações diretas entre estas e a ocorrência, predisposição ou resistência a doenças autoimunes (28). Diferentes trabalhos já abordaram a existência de alelos «nulos» de segmentos gênicos do TCR em humanos devido à inserção de códons de terminação ao longo do segmento do TCR. A homozigose para estes alelos nulos resulta no aparecimento de um “buraco” no repertório de células T, ou seja, os indivíduos não são capazes de montar uma resposta imune utilizando estes segmentos e, portanto, não estão aptos a responder contra antígenos reconhecidos por estes segmentos gênicos. Apesar deste “inconveniente imunológico”, a existência de alelos nulos de segmentos do TCR parece ser bastante comum. Charmley et al. descreveram em 1993(29) a existência de um alelo nulo do gene Vbeta18 humano que se encontrava em homozigose em 11% da população

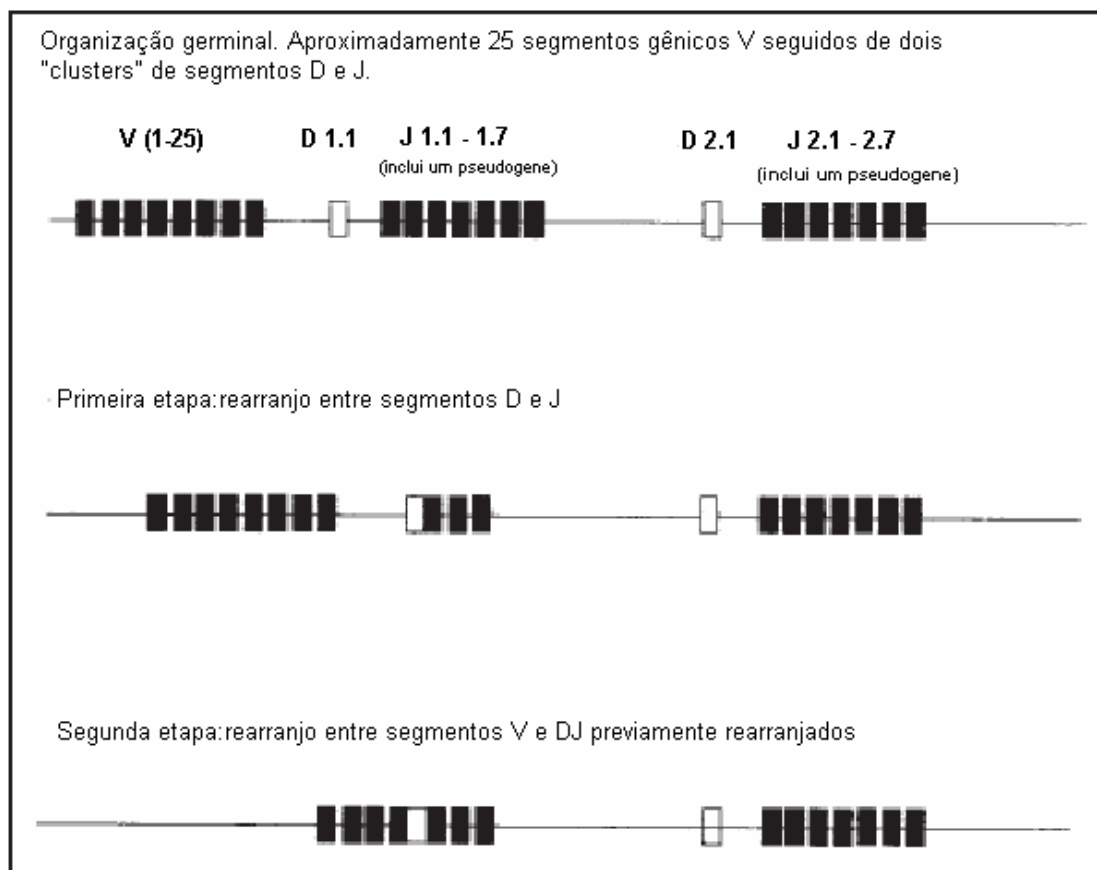
analisada. Um outro exemplo foi a identificação de dois alelos nulos (TCRVB6S1\*2P e \*3P) referentes ao segmento de TCRBV6S1 em uma amostra de 203 indivíduos de diferentes etnias cujas frequências foram iguais a 12 e 16%, respectivamente (30). A segunda possibilidade de não desenvolvimento de resposta imune é a deleção dos linfócitos T reativos através da ativação via superantígenos. Neste caso o repertório T é selecionado e modulado evitando o desenvolvimento de reação imune. É importante salientar que diversos trabalhos têm demonstrado que as células T presentes na região da lesão em pacientes com artrite reumatóide apresentam origem clonotípica (31,32). Dentre os trabalhos que demonstram a patogenicidade e oligoclonalidade das células T em artrite reumatóide, cabe citar um modelo murino usando camundongos SCID como receptores de células mononucleares provenientes de indivíduos com artrite reumatóide (33). Considerando a clonalidade das células T no desenvolvimento da patologia, temos como perspectiva de tratamento a deleção específica destes clones, o que levaria ao desaparecimento ou menor intensidade da resposta inflamatória.

## **PERSPECTIVAS**

Considerando os dados apresentados, fica clara a necessidade de análises mais sistemáticas do repertório de células T e de seus receptores em pacientes com LES e AR. Estas análises poderiam ser a chave para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos tanto no processo inflamatório quanto na resposta auto-imune típicos destas patologias. Este conhecimento, por sua vez, é essencial para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Cabe salientar que, levando em consideração as diferenças na composição genética e expressão de genes polimórficos nas diversas etnias, observações relatadas em outras populações possivelmente não possam ser utilizadas como referência na população

brasileira, havendo, portanto, necessidade de realização de estudos locais (em nível nacional e regional) envolvendo um grande número, tanto de indivíduos normais como de pacientes com doenças auto-imunes.

**Figura 1** - DNA – Reconstrução somática. Rearranjos V, D e J para a formação de uma cadeia beta do TCR





## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581, 1983.
2. Akira S, Okazaki K, Sakano H: Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* 238: 1134-1138, 1987.
3. Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M: V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* 3: 1053-1061, 1989.
4. Wei Z, Lieber MR: Lymphoid V(D)J recombination – Functional analysis of the spacer sequence within the recombination signal. *Science* 268: 3180-3183, 1993.
5. Schatz DG, Baltimore D: Stable expression of immunoglobulin gene V(D)J recombinase activity by gene transfer into 3T3 fibroblasts. *Cell* 53: 107-115, 1988.
6. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D: The V(D)J recombination activating gene RAG-1. *Cell* 59: 1035-1048, 1989.
7. Oettinger A, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D: RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-1523, 1990.
8. Geursen A, Skinner MA, Townsend LA, et al: Population study of T cell receptor V beta gene usage in peripheral blood lymphocytes: differences in ethnic groups. *Clin Exp Immunol* 94: 201-207, 1993.
9. De Inocencio J, Choi E, Glass DN, Hirsch R: T cell receptor repertoire differences between African Americans and Caucasians associated with polymorphism of the TCRBV3S1 (V beta 3.1) gene. *J Immunol* 154: 4836-4841, 1995.
10. Charmley P, Nepom BS, Concannon P: HLA and T-cell receptor beta-chain DNA polymorphisms identify a distinct subset of patients with pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 695-701, 1994.

11. Abbott WG, Geursen A, Peake JS, Simpson IJ, Skinner MA, Tan PL: Search for linkage disequilibrium between alleles in the T cell receptor alpha and beta chain loci and susceptibility to rheumatic fever. *Immunol Cell Biol* 73: 369-371, 1995.
12. Huang DF, Siminovitch KA, Liu, et al: Population and family studies of three disease related polymorphic genes in systemic lúpus erythematosus. *J Clin Invest* 95: 1766-1772, 1995.
13. Bohem BO, Manfras BJ, Rosak C, et al: TcR-alpha and TcR-beta diallelic RFLPs in insulindependent (type-1) Caucasian diabetic patients. *Diabetes Res* 15: 63-67, 1990.
14. Cornélis F, Hardwick L, Flipo RM, et al: Association of rheumatoid arthritis with an amino acid allelic variation of the T cell receptor. *Arthritis Rheum* 40: 1387-1390, 1997.
15. Mu H, Charmley P, King MC, Criswell LA: Synergy between T cell receptor beta gene polymorphism and HLA-DR4 in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 931-937, 1996.
16. Funkhouser SW, Concannon P, Charmley P, Vredevoe DL, Hood L: Differences in the T cell receptor restriction fragment length polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35: 465-471, 1992.
17. Vandevyver C, Geusens P, Cassiman JJ, Raus J: T cell receptor delta locus polymorphism in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet* 21: 479-483, 1994.
18. Maksymowych WP, Gabriel CA, Luyrink L: Polymorphism in a T-cell receptor variable gene is associated with susceptibility to a juvenile rheumatoid arthritis subset. *Immunogenetics* 35: 257-262, 1992.
19. De Vries N, Prinsen CFM, Mensink EBJM, Van Riel PLMC, Van't Hof MA, Van de Putte LBA: A T cell receptor beta chain variable region polymorphism associated

- with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 52: 327-331, 1993.
20. Lunardi C, Ibberson M, Zeminian S, De Sandre G, So AK: Lack of association of T cell receptor V beta 8 polymorphism with rheumatoid arthritis in United Kingdom and Italian white patients. *Ann Rheum Dis* 53: 341-343, 1994.
21. Vandevyver C, Gu XX, Geusens P, et al: HLA class II and T-cell receptor beta chain polymorphisms in Belgian patients with rheumatoid arthritis: no evidence for disease association with the TCRBC2, TCRBV8 and TCRBVII polymorphisms. *Ann Rheum Dis* 53:580-586, 1994.
22. Wallin J, Hillert J, Olerup O, Carlsson B, Ström H: Association of rheumatoid arthritis with a dominant DR1/Dw4/Dw14 sequence motif, but not with T cell receptor beta chain gene allele or haplotypes. *Arthritis Rheum* 34: 1416-1424, 1991.
23. Ibberson M, Péclat V, Guerne P-A, et al: Analysis of T cell receptor V alpha polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 57: 49-51, 1998.
24. Pile K, Wordsworth P, Liot F, Bardin T, Bell J, Cornélis F: Analysis of a T cell receptor V beta segment implicated in susceptibility to rheumatoid arthritis: V beta 2 germline polymorphism does not encode susceptibility. *Ann Rheum Dis* 52: 891-894, 1993.
25. Chaoui I, Lefranc MP, D'Angeac A, et al: T cell receptor gamma variable gene locus polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35: 756-760, 1992.
26. McDermott M, Kastner DL, Holloman JD, et al: The role of T cell receptor beta chain genes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 91-95, 1995.
27. Osman GE, Hannibal MC, Anderson JP, Lasky SR, Ladiges WC, Hood L: FVB/N [H2(q)] mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments. *Immunogenetics* 49: 851-859, 1999.

28. Zhao TM, Witaker SE, Robinson MA: A genetically determined insertion/deletion related polymorphism in human T cell receptor b chain (TCRB) includes functional variable gene segments. *J Exp Med* 180: 1405-1414, 1994.
29. Charmley P, Wang K, Hood L, Nickerson DA: Identification and physical mapping of a polymorphic human T cell receptor V beta gene with a frequent null allele. *J Exp Med* 177: 135-143, 1993.
30. Barron KS, Robinson MA: The human T-cell receptor variable gene segment TCRBV6S1 has two null alleles. *Hum Immunol* 40: 1719, 1994.
31. Ikeda Y, Masuko K, Nakai, et al: High frequencies of identical T cell clonotypes in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients suggest the occurrence of common antigen-driven immune responses. *Arthritis Rheum* 39: 446-453, 1996.
32. Kurokawa M, Kato T, Masuko-Hongo, et al: Characterization of T cell clonotypes that accumulated in multiple joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58: 546-553, 1999.
33. Mima T, Saeki Y, Ohshima S, et al: Transfer of rheumatoid arthritis into severe combined immunodeficient mice. The pathogenetic implications of T cell populations oligoclonally expanding in the rheumatoid joints. *J Clin Invest* 96: 1746-1758, 1995.

## 14. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até a realização deste trabalho não tínhamos dados sobre os receptores do linfócito T na população lúpica da América do Sul. Esta análise representa o primeiro estudo sobre o papel do TCR Vbeta03 e Vbeta20 em pacientes com LES e controles.

As pesquisas para elucidação da patogênese do lúpus eritematoso sistêmico mostram a participação de múltiplos fatores para o surgimento da doença. Embora possa ser homogênea e tenha um curso e incidência previsível em linhagens de camundongos com lúpus induzido, a resposta auto-imune em humanos com LES é extremamente variável. Além do mais, muitos fatores genéticos e ambientais parecem contribuir para sua patogênese, tornando pouco provável uma explicação única para o surgimento desta doença. O mais provável é que diferentes fatores etiológicos e patogênicos atuem de forma variada em cada paciente, acarretando uma marcada heterogeneidade na apresentação clínica e anormalidades laboratoriais encontradas nos pacientes com LES.

O grande desafio continua ser elucidar as complexas variáveis genéticas e ambientais que promovem o surgimento do sistêmico. A identificação de fatores específica para cada expressão da doença estimula a pesquisa de novos elementos implicados na patogênese, assim como o melhor entendimento do papel dos receptores do linfócito T.

## 15. APÊNDICES

### 1-CRITÉRIOS REVISADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO DE 1997.

<b>Critério</b>	<b>Definição</b>
1-Eritema malar	Eritema malar fixo, plano ou elevado
2-Eritema discóide	Placas eritematosas elevadas com escamas queratóticas aderentes e espículas foliculares
3-Fotossensibilidade	Eritema cutâneo por reação não usual à exposição solar
4-Úlceras orais	Úlceras orais ou nasais, geralmente indolores
5-Artrite	Artrite não erosiva que afeta duas ou mais articulações periféricas.
6-Serosite	a) Pleurite: história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico OU b) Pericardite: documentada por ECG, ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.
7-Alteração renal	a) Proteinúria persistente (>0,5 g/d ou >3+) OU b) Sedimento com cilindros ou hemácias
8-Alteração neurológica	a) Convulsões (na ausência de outra causa) OU b) Psicose (na ausência de outra causa)
9-Alteração hematológica	a) Anemia hemolítica OU b) Leucopenia (<4.000/ml em 2 medidas) OU c) Linfopenia (<1.500/ml em 2 medidas) OU d) Trombocitopenia (<100.000/ml na ausência de drogas)
10-Alteração imunológica	a) Anti DNA OU b) Anti-Sm OU c) Anticorpos antifosfolipídios (anticardiolipina IgG ou IgM; ou anticoagulante lúpico) OU d) Teste falso positivo para Lues, durante 6 meses
11- Anticorpo antinuclear	Um título anormal do anticorpo antinuclear em qualquer momento da doença, na ausência de drogas que possam levar a lúpus droga relacionado

\* Para o diagnóstico, deve haver a presença de 4 ou mais destes critérios.

## 2- CLASSIFICAÇÃO DA NEFRITE LÚPICA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

---

### Classificação

---

- I - Glomérulo normal
    - a) Negativa por qualquer técnica
    - b) Normal por microscopia, mas depósito na microscopia eletrônica
  
  - II - Mesangial
    - a) Celularidade leve
    - b) Celularidade moderada
  
  - III – Glomerulonefrite focal
    - a) Lesões necrosantes ativas
    - b) Lesões esclerosantes ativas
  
  - IV – Glomerulonefrite difusa
    - a) Sem lesões segmentares
    - b) Com lesões necrosantes ativas
    - c) Com lesões esclerosantes ativas
    - d) Sem lesões esclerosantes
  
  - V – Glomerulonefrite membranosa
    - a) Glomerulopatia membranosa pura
    - b) Associada com lesões da classe II
    - c) Associada com lesões da classe III
    - d) Associada com lesões da classe IV
  
  - VI – Glomerulonefrite esclerosante avançada
-

### 3- TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

PROJETO: Estudo do polimorfismo do receptor de células T e análise de marcadores de superfície em linfócitos provenientes de indivíduos com doenças de fundo genético e/ou autoimune.

Pesquisador responsável: Dr. José Artur Bogo Chies

Laboratório de Imunogenética

Departamento de Genética - UFRGS

O presente projeto consiste da análise de polimorfismos, ao nível de DNA, de genes relacionados com o sistema imune, especificamente de genes do receptor de células T (TCR) e do receptor de quimiocinas CCR5. Este estudo tem como objetivo identificar marcadores moleculares que possam estar relacionados com o prognóstico de patologias autoimunes ou de fundo genético.

#### COMO SERÁ FEITO O ESTUDO?

Para a realização deste estudo será coletado sangue, do qual será extraído DNA total. Este DNA será submetido à técnicas de biologia molecular (PCR e enzimas de restrição) as quais não modificam ou alteram as características gênicas do DNA, mas possibilitam evidenciar possíveis polimorfismos genéticos.

#### O QUE SÃO POLIMORFISMOS GENÉTICOS?

Polimorfismos genéticos são as diferentes formas de « descrever » uma característica ao nível do DNA (um exemplo disto é a diferença na cor dos olhos das pessoas, resultado de um polimorfismo genético).



#### POR QUE ANALISAR ESTES POLIMORFISMOS?

Muitas vezes estes polimorfismos, mesmo não aparecendo fisicamente, podem dar indicações sobre a possibilidade de desenvolvimento de uma doença ou o tipo de tratamento a ser utilizado para prevenir ou tratar esta doença. Por exemplo, sabemos que pessoas que tem certos polimorfismos de um gene chamado *APO* desenvolvem mais facilmente doenças do coração e sabemos que estas mesmas pessoas poderão ser beneficiadas se tiverem uma dieta alimentar específica.

#### EXISTE ALGUMA VANTAGEM EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Para a maioria das patologias de fundo autoimune, como é o caso da artrite reumatóide e do lúpus eritematoso sistêmico, ainda não existem informações sobre a correlação de algum polimorfismo do TCR ou do CCR5 no desenvolvimento da patologia. Existe, portanto, a necessidade de amplos estudos que envolvam a análise do DNA de muitos indivíduos para que possamos definir se a presença de algum polimorfismo é determinante no desenvolvimento destas patologias. No caso de identificação de alguma característica, seja ela favorável ou desfavorável à autoimunidade, durante as análises do DNA, você será imediatamente informado e nos colocaremos à disposição para qualquer esclarecimento a respeito desta característica.

#### EXISTE ALGUMA DESVANTAGEM EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Este estudo envolve apenas uma coleta de sangue a nível laboratorial e o material obtido será estocado no Laboratório de Imunogenética da UFRGS sob a responsabilidade do Dr José Artur Bogo Chies. Este material só será utilizado para análises de polimorfismos de DNA sendo seu uso vetado para quaisquer outras finalidades. Asseguramos também que preservaremos sua privacidade e que, em

hipótese alguma, sua identidade será revelada, seja no decorrer de nossos estudos ou após o término destes.

#### HÁ A POSSIBILIDADE DE CONTINUIDADE DESTE ESTUDO?

O conhecimento das causas que levam ao desenvolvimento de doenças de fundo genético e/ou autoimune aumenta a cada dia, portanto existe a possibilidade de que novos polimorfismos, hoje não conhecidos venham a ser identificados no futuro. O presente estudo é, portanto, o passo inicial de uma série de análises (hoje centradas no TCR e no CCR5) que visam esclarecer os mecanismos de desenvolvimento destas patologias.

#### **Favor assinalar com um X apenas uma das opções abaixo:**

(  ) Autorizo a utilização do sangue coletado APENAS para as análises de polimorfismos de DNA de genes do receptor de células T (TCR) e do CCR5.

(  ) Autorizo a utilização do sangue coletado para as análises de polimorfismos de DNA de genes do receptor de células T (TCR) e do CCR5 e para análises de outros polimorfismos de DNA que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que sob a responsabilidade do Dr. José Artur Bogo Chies.

Nome:

Nº do prontuário:

Assinatura do paciente:

Nome do coletador:

Assinatura:

Data e local da coleta:

