

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE TCRBV20S1 E
TCRBV3S1 NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Markus Bredemeier

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Co-orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

TESE DE DOUTORADO

2006

TESE DE DOUTORADO

2006

MARKUS BREDEMEIER

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE TCRBV20S1 E
TCRBV3S1 NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Autor: Markus Bredemeier

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Co-orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

TESE DE DOUTORADO

2006

Trabalho financiado em parte por recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

Dedicado (e em agradecimento) à minha avó Aracy (a "Jovem"), à Rosângela e à Dounia, à minha mãe, ao meu pai, aos meus familiares e a todos os meus amigos, pelo imenso apoio recebido durante a realização dessa tese.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Ricardo Machado Xavier, José Artur Bogo Chies e João Carlos Tavares Brenol, pela orientação e apoio durante a realização da tese.

Aos professores Flávio Danni Fuchs e Lenita Wannmacher, pelo sempre presente suporte ao longo de minha vida acadêmica e profissional, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelas grandes oportunidades que me ofereceram.

À dra. Karina Gatz Capobianco, que emprestou seu grande conhecimento de capilaroscopia periungueal, seu bom humor e muitas horas de trabalho a esta pesquisa.

Ao dr. Vicente Gregório Restelli, cuja disposição para o trabalho e inteligência em muito contribuíram para esse estudo.

À bióloga Andréia Wieck, pela realização dos procedimentos de biologia molecular envolvidos neste estudo.

Aos drs. Eduardo Hennemann Pitrez, Gustavo do Santos Mello, Marcelo Vasconcelos Vieira, Luis Eduardo Paim Rohde, Antônio Fernando Furlan Pinotti, Dolores Heloisa de Campos Ludwig e Maria Ângela Fontoura, por sua atenção especial na avaliação dos exames.

Às auxiliares de enfermagem Eliane Regina Moreira Pereira, Cleidia Rodrigues Guerra e Janie Pires dos Santos, pela paciência e persistência nas coletas de amostra de sangue.

Aos drs. Paulo Sérgio Thys, Patrícia Minuzzi da Motta, Max Brenner, Tamara Mucenic, Raquel Faccioni, Marcus Franck, Tatiana Freitas Tourinho, Marcelo Maltchick, Adriano Barbiero, Tatiana Karenini Müller, Carmen Both Schenatto, Charles Lubianca Kohem, Claiton Viegas Brenol, Lilian Scussel-Lonzetti, Sandra Helena Machado, Júlio César Simon, Ilóite Scheibel e Odirlei André Monticielo, pela boa vontade no encaminhamento dos pacientes à pesquisa.

Ao dr. Sérgio Menna Barreto, pelo apoio oferecido à realização deste estudo.

Aos secretários da zona 16, em especial os secretários Denílson dos Santos Marques, Rossimar Rocha e Andréia da Silva Ramiro, pela sua paciência e boa vontade.

Às secretárias do Serviço de Reumatologia, Leila Krammer e Juliana Rios, e à auxiliar de enfermagem Lorena Koglin, pela grande disposição em ajudar este trabalho.

A Iara Salin Gonçalves e Juliana Bredemeier, pelo auxílio na revisão do trabalho.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 A esclerose sistêmica.....	16
2.1.1 A esclerose sistêmica e o dano cutâneo e visceral.....	16
2.1.2 A classificação da esclerose sistêmica	20
2.1.3 A etiologia da esclerose sistêmica	22
2.1.3.1 As bases genéticas da esclerose sistêmica.....	22
2.1.3.2 A influência dos fatores ambientais e agentes infecciosos no risco para esclerose sistêmica	26
2.2 O papel dos linfócitos na resposta imune e o receptor de célula T	27
2.2.1 Os linfócitos T e a regulação da resposta na resposta imune	27
2.2.2 O receptor do linfócito T (TCR), sua função e a geração da diversidade dos TCRs	32
2.2.3 O repertório de cadeias V β nas células T	40
2.2.4 O repertório de cadeias V β de células T reguladoras	45
2.3 A patogênese da esclerose sistêmica e o repertório dos linfócitos T na doença.....	48
2.3.1 A patogênese da esclerose sistêmica e o papel dos linfócitos T e B.....	48
2.3.2 A ativação dos linfócitos T na esclerose sistêmica	52
2.3.3 O repertório de receptores de células T na esclerose sistêmica	55
2.3.4 TCRBV20S1 e TCRBV3S1 na esclerose sistêmica.....	60
2.3.5 O repertório de receptores de células T em modelos experimentais de esclerose sistêmica	61
2.4 As células V β 3+ e V β 20+ em doenças humanas.....	62

2.5 Polimorfismos genéticos de receptores de células T na esclerose sistêmica e nas outras doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC).....	64
2.5.1 Polimorfismos genéticos de receptores de células T na esclerose sistêmica.....	65
2.5.2 Os polimorfismos genéticos de receptores de células T nas outras DDTC	65
2.6 Os polimorfismos genéticos do TCRBV20S1 e TCRBV3S1	67
2.6.1 Os polimorfismos genéticos do TCRBV20S1	67
2.6.2 O polimorfismo genético do TCRBV3S1	69
3. JUSTIFICATIVA PARA A PESQUISA	71
4. OBJETIVOS DO ESTUDO.....	72
4.1 Objetivo geral.....	72
4.2 Objetivos específicos.....	72
5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA	73
6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	96
7. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS	124
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	155
9. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS (EM AUTORIA OU CO-AUTORIA) INTERNACIONALMENTE DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO	157
10. APÊNDICES	159
APÊNDICE A – Protocolo de Pesquisa	160
APÊNDICE B – Termo de Consentimento	165
APÊNDICE C – Termo de Consentimento para Extração do DNA	166
APÊNDICE D – Protocolo de Capilaroscopia Periungueal.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS

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

AFES – alveolite fibrosante associada à esclerose sistêmica

CBP – cirrose biliar primária

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

CD40L – ligante do CD40

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

CMV – citomegalovírus

CREST – *calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly and telangiectasias* – calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofágica, esclerodactilia e teleangiectasias.

CTGF – *connective tissue growth factor* – fator de crescimento do tecido conectivo

CTLA-4 – *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* – antígeno de linfócito T citotóxico-4

D – diversidade

DMTC – doença mista do tecido conjuntivo

DNA – *desoxyribonucleic acid* – ácido desoxiribonucléico

EAE – encefalomielite auto-imune experimental

ECA – enzima conversora da angiotensina

eNOS – *endothelial nitric oxide synthase* – óxido nítrico sintase endotelial

ES – esclerose sistêmica

FAN – fator antinuclear

FOXP3 – *forkhead box protein P3*

FPI – fibrose pulmonar idiopática

FR – fenômeno de Raynaud

GVHD – *graft versus host disease* – doença do enxerto versus hospedeiro

HLA – *human leukocyte antigen* – antígeno leucocitário humano

HGNC – *HUGO Gene Nomenclature Committee* – Comitê HUGO de Nomenclatura Gênica

IFN- γ – interferon gama

IL-1 α – *interleukin-1 α* – interleucina-1 alfa

J – junção

KIR – *killer-cell immunoglobulin-like receptor* – receptor de células assassinas naturais (*natural killer*) semelhante à imunoglobulina

LBA – lavado bronquíolo alveolar

LES – lúpus eritematoso sistêmico

MCP-1 – *monocyte chemoattractant protein-1* – proteína quimiotática para monócitos-1

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

NK – *natural Killer* – assassinas naturais

NOD – *nonobese diabetic* – não-obesos diabéticos

pb – pares de bases

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

PDGF – *platelet derived growth factor* – fator de crescimento derivado das plaquetas

PM – polimiosite

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

RNA – *ribonucleic acid* – ácido ribonucléico

RNA_m – RNA mensageiro

RNP – ribonucleoproteína

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

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

Scl – *scleroderma* – esclerodermia

SSCP – *single-strand conformational polymorphism* – polimorfismo conformacional de fitas simples do DNA

T – timócitos, linfócitos T

TCAR – tomografia computadorizada de alta resolução

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

TCRBV – *T cell receptor beta variable* – referente a um segmento gênico codificador de cadeia variável beta do receptor de célula T

TGF- β – *transforming growth factor beta* – fator de crescimento transformador beta

Th – *T helper* – linfócito T auxiliar

TNF- α – *tumor necrosis factor alfa* – fator de necrose tumoral alfa

UCD – *University of California at Davis* – Universidade da Califórnia em Davis

V – variável

VCAM-1 – *vascular cell adhesion molecule-1* – molécula de adesão da célula vascular-1

V β 20 – cadeia variável beta 20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática do TCR alfa-beta e de sua ativação por antígenos (Ag) e por superantígenos (SAg). Fonte: LaRoque e Robinson (10).	34
Figura 2. Organização dos segmentos gênicos D β , J β e C β do TCR beta. A maioria dos segmentos V β , não representados na figura, está localizada na extremidade 5' do complexo gênico. Fonte: LaRoque e Robinson (10).	35
Figura 3. Organização do TCRBV no cromossomo 7. Os diversos segmentos gênicos estão em sua maioria na extremidade 5' do gene, à exceção do V β 20 (localizado na extremidade 3') e dos segmentos órfãos. Fonte: LaRoque e Robinson (10).	36
Figura 4. Mecanismo da recombinação na junção dos segmentos D-J. Fonte: LaRoque e Robinson (10).	38
Figura 5. Rearranjo e recombinação dos segmentos gênicos V, D J e C. Fonte: LaRoque e Robinson (10).	39
Figura 6. Acima (A), freqüência percentual média (DP) de uso de cadeias V β por células T $\alpha\beta$ no sangue periférico de 36 indivíduos normais de diversas faixas etárias. Abaixo (B), o mesmo que acima com as células $\alpha\beta$ divididas em CD4+ e CD8+. Fonte: van der Beemd et al. (111).	44
Figura 7. Repertório de cadeias V β de células CD4+CD25+ e CD+CD25- em dois doadores normais. Fonte: Fujishima et al. (115).	45
Figura 8. Repertório de cadeias V β em células CD8+CD28- de três indivíduos normais. Fonte: Pennesi et al. (116).	47
Figura 9. Exemplo da análise molecular dos polimorfismos do segmento gênico TCRBV3S1 (a) e do TCRBV20S1 (b). Fonte: Dresch et al. (220).	68

1. INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença caracterizada por graus variáveis de disfunção vascular, fibrose cutânea e visceral e auto-anticorpos circulantes. O acometimento pulmonar (intersticial ou vascular) associado à doença é atualmente a causa mais importante de mortalidade na ES (1). A etiologia da esclerose sistêmica é desconhecida, embora fatores ambientais e genéticos tenham sido implicados na suscetibilidade à doença (2).

As principais características histopatológicas da ES são deposição excessiva de colágeno e dano microvascular. Os mecanismos levando a essas alterações não são completamente compreendidos, mas a ativação do sistema imune parece desempenhar um papel central nesse processo. Em fases iniciais da doença, um infiltrado mononuclear consistindo primariamente de linfócitos T e macrófagos foi identificado (3, 4). A ativação de células T CD4⁺ Th2 na pele leva à produção de grandes quantidades de interleucina-4 (IL-4), que promove a produção de fator de crescimento transformador beta (TGF- β) por macrófagos, que, por sua vez, leva à ativação e proliferação dos fibroblastos (5). Células T CD8⁺, que predominam no lavado bronquíolo-alveolar (LBA) de pacientes com alveolite fibrosante associada à ES, também produzem principalmente IL-4 (6). A expansão oligoclonal de células T tem sido relatada em biópsias de pele (7), no LBA (8, 9) e sangue periférico (8, 9) de pacientes com ES. Esses achados provavelmente refletem a proliferação e expansão de clones específicos de células T em resposta a certos antígenos, sugerindo que a esclerose sistêmica seja uma doença auto-imune associada à imunidade específica contra antígenos próprios (5). As células T reconhecem antígenos através do acoplamento do receptor da célula T (TCR) com peptídeos antigênicos ligados a moléculas do MHC (complexo de histocompatibilidade principal), presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos.

Os TCRs mais freqüentemente expressados por células T periféricas são compostos por cadeias α (alfa) e β (beta), cada uma delas sendo constituída por uma região variável e

uma constante. As regiões variáveis das cadeias α e β são constituídas pelo rearranjo dos seguintes segmentos gênicos: variável (V), diversidade (D, somente cadeias beta) e junção (J) (10). Esses segmentos gênicos apresentam variantes polimórficas (alelos), que podem afetar a capacidade de produzir TCRs específicos ou modificar sua especificidade antigênica, influenciando, portanto, o repertório de receptores de células T. O repertório de TCRs tem um papel central no desenvolvimento das respostas imunológicas, e variações nos genes que codificam os TCRs podem estar relacionadas ao surgimento de doenças auto-imunes (11).

Há poucos estudos abordando os polimorfismos genéticos dos segmentos gênicos dos TCRs na ES (12, 13). Nenhum desses estudos avaliou polimorfismos em genes codificando as cadeias variáveis beta ($V\beta$) dos TCRs. No presente estudo foram analisados dois polimorfismos em dois diferentes segmentos gênicos codificadores de cadeias variáveis beta (TCRBV). O primeiro polimorfismo estudado está localizado no segmento TCRBV20S1 (denominado TRBV30 pelo HGNC – *HUGO Gene Nomenclature Committee* (14)) e resulta de uma substituição de nucleotídeos (citosina por timina) que cria um códon de terminação (*stop codon*) dentro do segmento gênico. Indivíduos homozigotos para esse alelo nulo (aqui denominado de alelo 2, mas previamente conhecido como TCRBV20S1A2P (15), BV20S1*4 (16) ou $V\beta 18C$ (17)) são incapazes de produzir TCRs usando cadeias $V\beta 20$, o que resulta na ausência de células T $V\beta 20+$ no sangue periférico (17). Um nível intermediário de células T $V\beta 20+$ funcionais é observado no sangue periférico de indivíduos heterozigotos para esse polimorfismo (18).

O segundo é um polimorfismo de um único nucleotídeo (substituição de citosina por timina) localizado dentro da região espaçadora de 23 pares da sequência de sinal de recombinação (SSR) do segmento gênico TCRBV3S1 (TRBV3-1 na nomenclatura do HGNC (14)). Essa variante alélica está associada com o nível de células $V\beta 3.1+$ no sangue periférico (19). Indivíduos homozigotos para o alelo 1 têm uma baixa frequência de células T $V\beta 3.1+$ (em torno de 1% das células $CD3+ CD4+$), enquanto indivíduos homozigotos para

o alelo 2 têm maior quantidade dessas células (8,1% em média) e heterozigotos têm uma frequência intermediária (em média 4,7%) (19).

Numa tentativa de identificar novos marcadores de suscetibilidade para esclerose sistêmica, foram estudadas as frequências desses dois polimorfismos em pacientes com esclerose sistêmica, sendo essas comparadas com as frequências observadas em indivíduos hígidos provenientes da mesma população.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A esclerose sistêmica

2.1.1 A esclerose sistêmica e o dano cutâneo e visceral

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença difusa do tecido conjuntivo caracterizada por graus variáveis de fibrose cutânea e visceral, presença de auto-anticorpos no soro dos pacientes e vasculopatia de pequenos vasos (1, 20). As estimativas mais atuais de prevalência da ES na população americana situam-se entre 240 e 286 casos por milhão de habitantes, consideravelmente mais elevadas do que estimativas baseadas em estudos prévios (21, 22). É mais freqüente em mulheres do que em homens, em proporções que variam de 3:1 a 14:1 em diferentes estudos (22). Ocorre em todas as faixas etárias, mas o pico de incidência ocorre na vida adulta dos 35 aos 54 anos (23). O dano cutâneo é geralmente a manifestação mais marcante da doença, mas pode estar ausente em alguns pacientes. O acometimento visceral, que ocorre em graus variáveis, afeta predominantemente os pulmões, trato gastrointestinal, coração e, eventualmente, os rins.

As manifestações cutâneas são caracterizadas por espessamento, endurecimento e aderência da pele aos planos profundos, assim como a perda de anexos. Os locais mais afetados são as extremidades e face, mas a pele do tronco também é acometida na forma difusa da doença. Histopatologicamente, há um extenso e desordenado depósito de colágeno na pele. Também se observa um infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos, macrófagos e eosinófilos, principalmente nas fases iniciais da doença. Calcificações subcutâneas, denominadas calcinoses, são observadas freqüentemente nas mãos e superfícies extensoras das articulações. Teleangiectasias, que são formações vasculares aracneiformes que desaparecem sob pressão, podem estar presentes, principalmente em mãos e face (24).

A vasculopatia da ES é caracterizada clinicamente pelo fenômeno de Raynaud (FR) e por eventos isquêmicos verificados nas extremidades (cicatrizes digitais puntiformes, reabsorção de extremidades e amputações digitais) (25). Observam-se importantes alterações na morfologia e funcionalidade de capilares da pele: dilatação e perda de alças capilares; trombose e lentificação de fluxo sanguíneo. Essas anormalidades podem ser facilmente observadas através da capilaroscopia periungueal (26). O grau das alterações observadas na capilaroscopia periungueal associa-se com a gravidade e a atividade da doença cutânea e visceral na ES (27).

A doença pulmonar, seja por fibrose intersticial ou por doença vascular, é atualmente a maior causa de mortalidade na ES (1). Provas de função pulmonar podem detectar precocemente reduções significativas de volumes ou capacidade difusional, mesmo na ausência de manifestações clínicas ou alterações em outros exames. A doença intersticial (alveolite fibrosante) apresenta-se predominantemente com padrão restritivo e redução da capacidade difusional em provas de função pulmonar (28). A aparência histológica do pulmão na alveolite fibrosante associada à esclerose sistêmica é, em aproximadamente 80% dos casos, semelhante à pneumonia intersticial não-específica (29). Na tomografia computadorizada de alta resolução pulmonar (TCAR) observam-se graus variáveis de faveolamento, padrão reticular, infiltrado em vidro-fosco, linhas septais espessadas, bandas parenquimatosas, linhas subpleurais, micronódulos e espessamento pleural (28, 30). Pacientes com doença severa apresentam importante redução de volumes pulmonares, extensas áreas de faveolamento, bandas parenquimatosas, desorganização estrutural e bronquiectasias de tração (31). No entanto, é interessante observar que há pacientes com discretas alterações ou mesmo nenhuma anormalidade na TCAR que apresentam importantes alterações restritivas em provas de função pulmonar (32, 33).

A doença pulmonar vascular é caracterizada nas fases iniciais por disfunção e ativação de células endoteliais (34). O quadro é sugerido pela redução isolada ou desproporcional da capacidade difusional com relação aos volumes pulmonares. Esse é um quadro freqüente e geralmente de bom prognóstico, havendo melhora significativa da

difusão pulmonar com o passar do tempo em metade dos pacientes (35). No entanto, redução severa da capacidade de difusão pulmonar (<55%) sugere fortemente a presença de hipertensão arterial pulmonar (35), representando a forma mais grave de envolvimento vascular pulmonar e apresentando prognóstico pouco favorável. Nesses casos, observa-se histologicamente obliteração ou redução do diâmetro luminal de pequenos vasos juntamente com fibrose da média e adventícia e hiperplasia da íntima (34). O diagnóstico de hipertensão pulmonar pode ser confirmado por ecocardiografia, mas o diagnóstico de certeza é dado por cateterismo cardíaco direito com medição direta da pressão sistólica na artéria pulmonar (34). A hipertensão pulmonar também pode ocorrer em decorrência da destruição vascular e hipoxemia que caracterizam os quadros extensos de doença intersticial (34).

O trato gastrointestinal pode ser afetado em quase toda a sua extensão, sendo mais freqüentes os sintomas de disfunção do esôfago (principalmente pirose e epigastralgia). Esse órgão pode apresentar importantes alterações funcionais e anatômicas, caracterizadas principalmente por alteração no peristaltismo e dilatação, respectivamente (36). Estudo recente de nosso grupo mostrou que as alterações funcionais observadas na cintilografia de trânsito esofágico correlacionam-se fortemente com dilatação de esôfago observada na TCAR (37). No intestino delgado, a redução da motilidade pode ser assintomática, mas eventualmente pode levar a síndromes de má-absorção (associadas a supercrescimento bacteriano), alternância de diarreia e constipação e até a quadros pseudo-obstrutivos. No intestino grosso, exames de imagem podem revelar a presença de “divertículos de boca grande”, que são geralmente assintomáticos (36).

O acometimento cardíaco na ES geralmente é pouco sintomático. Áreas de fibrose distribuídas difusamente no miocárdio estão presentes na maioria dos pacientes e são atribuídas a lesões por hipóxia e reperfusão associadas ao vasoespasmo de vasos coronarianos distais. O eletrocardiograma freqüentemente mostra distúrbios de condução (geralmente assintomáticos). Derrame pericárdio pode estar presente em até 40% dos pacientes, mas raramente ocorre pericardite clínica ou tamponamento. Disfunção diastólica

por relaxamento miocárdico alterado é observada freqüentemente. A presença de sintomas de doença cardíaca (dispnéia, dor torácica) e taquiarritmias ventriculares e supraventriculares correlaciona-se com mau prognóstico (38).

Embora alterações histopatológicas renais estejam quase sempre presentes na ES, a manifestação clínica relevante é a crise renal esclerodérmica, caracterizada por hipertensão acelerada e/ou perda rapidamente progressiva de função renal. As alterações laboratoriais encontradas são elevação da creatinina sérica, proteinúria, hematúria microscópica e eventualmente anemia e trombocitopenia secundárias a processo microangiopático nos vasos renais. É uma ocorrência rara, aparecendo geralmente nos primeiros quatro ou cinco anos de doença e na forma difusa da doença. Foi no passado a maior causa de mortalidade na esclerose sistêmica. Atualmente, o prognóstico desse quadro melhorou muito com a introdução dos inibidores da enzima conversora da angiotensina no tratamento (39).

Diversos auto-anticorpos têm sido encontrados no soro dos pacientes. O FAN (fator antinuclear) está presente em 80-90% dos pacientes. Pode apresentar padrão centromérico na imunofluorescência indireta, presente em mais de 50% dos pacientes com a forma limitada da doença (sem acometimento da pele do tronco), sendo bem menos freqüente na forma difusa (1, 40). Anticorpos antitopoisomerase I (anti-Scl-70) são mais prevalentes na forma difusa (aproximadamente 30%) e estão associados a acometimento cutâneo, microvascular e pulmonar mais severo (1, 40). Até recentemente, anticorpos antitopoisomerase I eram considerados somente epifenômenos da ativação do sistema imune que ocorre na doença, não parecendo desempenhar um papel específico na fisiopatogenia da doença (41, 42). No entanto, evidências recentes (43) apontam para um possível papel desses anticorpos na ativação de fibroblastos. Outros anticorpos identificados no soro dos pacientes são anti-U1-RNP (por vezes considerado um marcador da doença mista do tecido conjuntivo), anti-PM-Scl (associado à miopatia inflamatória), anti-RNA polimerase (que é um marcador associado a envolvimento renal e mau prognóstico), anti-Th/To (associado à forma limitada da doença, à hipertensão e fibrose pulmonares), e

anticorpos antifibrilarina/U3-RNP (associado à miosite, à hipertensão pulmonar e ao acometimento renal) (1, 40). Os últimos quatro anticorpos citados apresentam-se na imunofluorescência indireta como um FAN com padrão nucleolar. Anticorpos antiendotélio, que são encontrados em até 2/3 dos pacientes, aparentemente estão relacionados à lesão endotelial e à disfunção vascular na doença (42, 44).

2.1.2 A classificação da esclerose sistêmica

Pacientes com a forma difusa cutânea da doença apresentam espessamento da pele no tronco e extremidades, enquanto que na forma limitada cutânea o espessamento da pele está restrito às extremidades (principalmente nos quirodáctilos) e/ou face. A forma difusa cutânea tem sido tradicionalmente associada a uma evolução agressiva, maior prevalência de fibrose pulmonar, acometimento precoce de órgãos internos e à presença do anticorpo antitopoisomerase I (anti-Scl-70) no soro. A forma limitada cutânea, geralmente de evolução mais lenta e com acometimento cutâneo predominantemente distal, pode se apresentar na forma CREST (calcinoses, fenômeno de Raynaud, doença esofágica, esclerodactilia e teleangiectasias), freqüentemente associada à hipertensão de artéria pulmonar e anticorpo anticentrômero no soro (1, 20). A forma limitada cutânea apresenta melhor prognóstico e maior tempo de sobrevida (1, 45).

Alguns pacientes apresentam alterações sorológicas e em órgãos internos típicas de esclerose sistêmica, porém sem evidências de fibrose cutânea. Esses pacientes são considerados portadores de esclerose sistêmica *sine scleroderma* (46, 47). Há também pacientes que apresentam alterações cutâneas (principalmente em extremidades), sorológicas e microvasculares características da ES, sem, no entanto, preencherem os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) (48) para a doença. Esses pacientes são freqüentemente classificados como tendo doença indiferenciada do tecido conjuntivo, que pode representar fases iniciais ou formas limitadas da doença (49). Aplicando-se estritamente os critérios diagnósticos propostos pelo ACR, 101 pacientes de um total de

259 deixariam de ser classificados como portadores de esclerose sistêmica numa série canadense (50). Em estudo prévio de nosso grupo (27), observou-se que 16% dos pacientes também não preenchiam os critérios estabelecidos pelo ACR para esclerose sistêmica. Tem havido uma tendência crescente na literatura de considerar esses pacientes como casos definidos de esclerose sistêmica (20, 50, 51). Nesse sentido, LeRoy e Medsger publicaram artigo sugerindo que pacientes com fenômeno de Raynaud associado a alterações na capilaroscopia periungueal ou a auto-anticorpos específicos para ES (e que não apresentassem espessamento cutâneo) fossem considerados como apresentando a forma limitada de esclerose sistêmica (51).

Quadros de esclerose sistêmica também podem ocorrer em sobreposição com diversas outras doenças difusas do tecido conjuntivo, como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, polimiosite, dermatomiosite e síndrome de Sjögren (20). Sharp et al. (52) sugeriram que a combinação de características de esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico e polimiosite, associada necessariamente à presença de anticorpo contra antígenos nucleares extraíveis sensíveis à ribonuclease (atualmente conhecido como anti-U1-RNP), representaria uma entidade clínica distinta conhecida como doença mista do tecido conjuntivo (DMTC). No entanto, diversas evidências colocam em dúvida esse conceito. Entre essas evidências, destacam-se o fato da DMTC depender da presença de um auto-anticorpo específico para seu diagnóstico, a observação de que grande parte dos pacientes evolui para esclerose sistêmica, a constatação de que as características esclerodérmicas da DMTC não respondem a glicocorticóides, a presença do anti-U1-RNP em outras doenças difusas do tecido conjuntivo e a observação de que alterações microvasculares típicas de esclerose sistêmica e dermatomiosite estão freqüentemente presentes (49).

2.1.3 A etiologia da esclerose sistêmica

A etiologia da esclerose sistêmica não é conhecida, mas fatores genéticos e ambientais parecem contribuir significativamente para a suscetibilidade à doença. Nos parágrafos seguintes, apresentamos uma breve discussão dos fatores de risco identificados para a doença.

2.1.3.1 As bases genéticas da esclerose sistêmica

A predisposição genética para a esclerose sistêmica é sugerida pelas seguintes evidências: agregação familiar dos casos, fatores étnicos, modelos animais de esclerose sistêmica, associação da doença com determinados alelos do HLA (*human leukocyte antigen*, antígeno leucocitário humano) e associações com polimorfismos genéticos.

A agregação familiar é sugerida pela observação de que aproximadamente 1,5% dos casos de esclerose sistêmica ocorrem em familiares de primeiro grau de pacientes com ES (53-55). O fato de ter um familiar de primeiro grau com esclerose sistêmica é o maior fator de risco identificado para esclerose sistêmica, apesar do risco absoluto para os membros da família ser baixo (< 1%) (54). A ocorrência de ES e de outras doenças autoimunes, principalmente lúpus eritematoso sistêmico, numa mesma família também tem sido relatada (54). Um estudo de gêmeos também fornece evidências sobre a genética da ES (56). Nesse estudo, a concordância entre gêmeos idênticos foi de apenas 4,2%, enquanto que entre gêmeos dizigóticos foi de 5,6%. Interessantemente, houve 90% de concordância para a produção de fator antinuclear entre os gêmeos monozigóticos e 40% para os dizigóticos (independentemente da presença da doença) (56). Anticorpos antinucleolares são encontrados com maior frequência em familiares e mesmo cônjuges de pacientes com ES (57), o que, juntamente com a concordância semelhante entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos, sugere a possível influência de fatores ambientais.

Características étnicas estão associadas a diferenças na frequência e apresentação da doença (2, 21). A maior prevalência de ES até agora observada numa população

geneticamente isolada é a apresentada pelos índios Choctaw americanos (4.690 casos por milhão), a maioria dos casos com a forma difusa da doença (58). Afro-americanos parecem ter maior incidência e doença mais grave e precoce do que caucasóides (2, 21). Pacientes de origem hispânica e japoneses também parecem, de modo geral, ser acometidos por formas mais agressivas da doença (2). Obviamente, o impacto das características étnicas é multifatorial, representando uma combinação de influências genéticas, socioeconômicas e ambientais (2).

Entre os modelos animais de esclerose sistêmica, destacam-se os desenvolvidos em camundongos *tsk1* (*tight skin mice 1*), *tsk2* e os galináceos UCD-200. Nos camundongos *tsk1*, a alteração genética observada é a duplicação do gene da fibrilina-1 (localizado no cromossomo 2), que é uma glicoproteína constituinte das microfibrilas elásticas presentes na matriz extracelular. Esses camundongos desenvolvem fibrose cutânea sem um infiltrado inflamatório significativo, não desenvolvendo as alterações microvasculares da ES e apresentando enfisema pulmonar em vez de fibrose. Camundongos *tsk1* apresentam produção aumentada de colágeno e produzem alguns anticorpos específicos da esclerose sistêmica, alterações que parecem ser dependentes da atividade de células Th2 e da produção de IL-4 (59). Camundongos *tsk2* apresentam uma mutação (localizada no cromossomo 1) diferente da observada em camundongos *tsk1*, apresentando fibrose cutânea associada a um importante infiltrado inflamatório mononuclear (60). Os galináceos UCD-200 (Universidade da Califórnia em Davis) desenvolvem um quadro apresentando todo o espectro de anormalidades da esclerose sistêmica: apoptose precoce de células endoteliais, infiltração linfocítica perivascular da pele e de órgãos internos, fibrose tecidual, anticorpos antinucleares e antiendotélio (61). A doença parece ter um padrão autossômico recessivo de herança genética (62).

A relação dos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC ou HLA, em humanos) com a esclerose sistêmica tem sido avaliada em estudos caso-controle em diferentes populações. De modo geral, as associações observadas são de fraca intensidade e variam conforme a população estudada, envolvendo alelos ou haplótipos de HLA-DR2,

HLA-DR3, e HLA-DR11 (revisado por Tan e Arnett (54)). No entanto, associações mais fortes são observadas entre os genes do HLA e o perfil de auto-anticorpos dos pacientes. Por exemplo, anticorpos anticentrômero têm sido associados a haplótipos que contêm os alelos DQB1*0501 e DRB1*0101 do HLA-DR1, enquanto anticorpos antitopoisomerase I foram associados a alguns alelos e haplótipos do HLA-DR2, DR5 e DR11 (54). Como as moléculas do MHC estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T, as associações observadas provavelmente refletem o envolvimento dessas células na patogênese da doença (53).

Diversos polimorfismos genéticos de nucleotídeo único ou de inserção/deleção têm sido associados à suscetibilidade para esclerose sistêmica (revisado por Assassi e Tan (63)). Polimorfismos relacionados aos genes produtores de agentes imunológicos como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos-1), IL-1 α (interleucina-1 alfa), CTLA-4 (antígeno de linfócito T citotóxico-4), CD19, KIR (receptor de células assassinas naturais) têm apresentado associações positivas com ES em alguns estudos. Polimorfismos envolvendo genes responsáveis por agentes vasoativos, como as enzimas conversora da angiotensina (ECA) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), também foram associados à doença. No entanto, os resultados inicialmente positivos freqüentemente não são confirmados em estudos posteriores testando os mesmos polimorfismos, como ocorreu com os polimorfismos da IL1- α , CTLA-4, ECA e eNOS (63). Dois estudos realizados em amostras européia e japonesa de pacientes, analisando polimorfismos do gene do TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta-1), mostraram associação de uma substituição de timina por citosina na posição +869 (T869C) com a doença (64, 65), enquanto um estudo semelhante realizado na população coreana teve resultados negativos (66).

Há várias explicações possíveis para a baixa reprodutibilidade dos resultados relativos aos polimorfismos genéticos (63). A estratificação da população é uma das causas apontadas para a observação de associações espúrias. Esse problema ocorre quando a doença é mais freqüente em uma subpopulação específica (geneticamente diferente da

população geral), que estaria excessivamente representada entre os casos. Pode advir igualmente de uma miscigenação recente quando a frequência do alelo testado é diferente da originalmente observada na população (63).

O desequilíbrio de ligação com outros genes situados em *loci* próximos pode contribuir para a variabilidade nos resultados dos estudos testando polimorfismos genéticos (63). Por exemplo, o HLA-DRB1*0101 mostrou-se significativamente associado à presença de anticorpos anticentrômero (54). Por outro lado, polimorfismos do promotor do gene do TNF- α (o alelo C na posição -1031 e o alelo A na posição -863) mostraram-se também em associação com a presença de anticorpos anticentrômero, mas com intensidade mais forte do que o HLA-DRB1*0101 (63). Há fortes evidências de um importante desequilíbrio de ligação entre polimorfismos do promotor do TNF- α e haplótipos do HLA, ambos localizados no cromossomo 6 (67). Portanto, é possível que a associação entre o HLA-DRB1*0101 e anticorpos anticentrômero seja, na verdade, devida ao desequilíbrio de ligação com o polimorfismo do promotor do TNF- α (63).

Outro fenômeno complicando a interpretação de estudos genéticos na esclerose sistêmica é que múltiplos alelos de um mesmo locus (heterogeneidade alélica) ou de diferentes *loci* (heterogeneidade de locus) são responsáveis pelo risco aumentado para o desenvolvimento da doença (63). Isso ocorre porque variações genéticas associadas a doenças de estabelecimento relativamente tardio permitem a transmissão dos genes às próximas gerações antes do estabelecimento da doença, potencialmente aumentando o número de genes de suscetibilidade na população. Portanto, o efeito total das influências genéticas pode ser diluído entre múltiplos *loci*, de forma que o risco calculado para um determinado alelo seja relativamente baixo (razão de chances $\leq 1,5$). Por outro lado, se um determinado alelo confere um risco relativamente grande para uma doença, a frequência desse alelo será baixa devido a pressão seletiva negativa. Por essas razões, genes candidatos à suscetibilidade para a esclerose sistêmica podem não ser devidamente identificados por falta de poder estatístico (63). Adicionalmente, a heterogeneidade de locus e alelos e diferentes pressões seletivas podem fazer com que, em diferentes populações,

diferentes genes ou combinações de genes possam ser responsáveis pelo risco de desenvolver a doença.

2.1.3.2 A influência dos fatores ambientais e agentes infecciosos no risco para esclerose sistêmica

Há evidências indicando que fatores relacionados à exposição ambiental e a agentes infecciosos também podem desempenhar um papel na etiologia da doença.

Agentes infecciosos, bacterianos e virais têm sido implicados como possíveis fatores no desenvolvimento e progressão da esclerose sistêmica. Entre os agentes bacterianos potencialmente envolvidos, o *Helicobacter pilory* tem sido associado a fenômeno de Raynaud primário (68). Também observou-se que pacientes com ES, apesar da prevalência semelhante de infecção por *H. pilory*, apresentam mais freqüentemente cepas virulentas dessa bactéria (69). Entre os agentes virais, o citomegalovírus (CMV) tem sido estudado pela sua associação com doenças vasculares. Neidhart et al. (70) observaram prevalência significativamente maior de sorologia positiva para CMV em pacientes com esclerose sistêmica, em comparação a pacientes com artrite reumatóide e osteoartrose. O CMV infecta o endotélio vascular, levando a lesões na camada íntima, dano esse semelhante ao que ocorre na esclerose sistêmica. É possível que haja mimetismo molecular entre antígenos do CMV e proteínas expressas pelas células endoteliais, o que levaria à produção de anticorpos que, em reação cruzada, lesariam as células endoteliais (68). Outra hipótese é que a infecção pelo CMV ative células microquiméricas (células T fetais ou de doador adquiridas durante uma gestação ou transfusão sanguínea, respectivamente), desencadeando a doença (68). Além do CMV, o parvovírus B19 tem sido implicado como um possível fator na etiologia da ES (68). No estudo de Ferri et al. (71), DNA de parvovírus B19 foi encontrado na medula óssea em 12 de 21 pacientes com ES, contra nenhum detectado nos 15 controles. DNA de parvovírus B19 também foi encontrado mais freqüentemente na pele de pacientes com ES do que em controles (72).

Diversos agentes ambientais têm sido relacionados à esclerose sistêmica através da realização de estudos caso-controle ou da observação de evidências ecológicas (73). Indícios apontando para o aparecimento de fenômeno de Raynaud e de características semelhantes às da esclerose sistêmica em trabalhadores expostos ao cloreto de vinil surgiram a partir da década de 1930 (73). A exposição à sílica foi apontada como forte fator de risco para a doença, apesar de haver estudos com resultados negativos (2, 73). Suspeitas de que implantes de silicone pudessem predispor à ES não foram confirmadas por uma metaanálise abrangendo 12 estudos (74). Os solventes orgânicos (derivados do petróleo, *thinners* e outros) têm se apresentado como fatores de risco para ES na maioria dos estudos publicados (73). A exposição a resinas epóxi e pesticidas não se associaram significativamente à ES em estudos caso-controle (73).

2.2 O papel dos linfócitos na resposta imune e o receptor de célula T

2.2.1 Os linfócitos T e a regulação da resposta na resposta imune

O principal marcador da linhagem das células T é o receptor de célula T (TCR). De acordo com o TCR, as células T são divididas em $\alpha\beta$ (alfa-beta) e $\gamma\delta$ (gama-delta). Aproximadamente 95% dos linfócitos T são $\alpha\beta$ e 5% são $\gamma\delta$ (75). As células T $\alpha\beta$ são divididas em duas populações, de acordo com a presença de marcadores na membrana: CD4+ e CD8+. As células T CD4+ são conhecidas como linfócitos T *helper* (Th) e estão envolvidas na promoção de atividades de imunidade celular e humoral. As células T CD8+ exercem predominantemente atividades de citotoxicidade. As células T CD4+ reconhecem antígenos específicos (apresentados por células apresentadoras de antígenos e geralmente de origem exógena a essas células) associados a moléculas do MHC de Classe II, enquanto os linfócitos T CD8+ reconhecem antígenos intracelulares ligados a moléculas de MHC de classe I. Uma pequena proporção de células $\alpha\beta$ não expressam CD4 nem CD8, sendo denominadas duplo-negativas (75).

Entre as células CD4+, dois grupos de linfócitos (Th1 e Th2) são identificados, diferenciados pelas funções e perfil de citocinas liberadas. As células Th1 secretam predominantemente interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ e estão envolvidas principalmente no estímulo às atividades de imunidade celular (isto é, citotoxicidade direta e estímulo à atividade dos macrófagos), sendo importantes no combate a patógenos intracelulares e células tumorais. As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β , estando envolvidas principalmente no estímulo à ativação e proliferação de linfócitos B, o que leva à produção de anticorpos (imunidade humoral). De modo geral, as respostas imunes são polarizadas em Th1 ou Th2, o que ocorre em parte porque o IFN- γ inibe a atividade das células Th2, enquanto a IL-10 inibe a atividade Th1 (75, 76). Mais recentemente, descreveu-se um novo grupo de linfócitos, conhecidos como Th17, que se desenvolvem a partir de exposição do linfócito T *naive* (não previamente apresentado a antígenos) ao TGF- β e IL-6 e se caracterizam pela produção de IL-17. Essa citocina tem importante ação pró-inflamatória, e acredita-se que os linfócitos Th17 tenham função na proteção contra bactérias e fungos, havendo também evidências significativas de seu envolvimento em processos auto-imunes (77).

As células $\gamma\delta$ representam uma pequena proporção dos linfócitos circulantes ($\leq 5\%$), mas estão presentes em proporção muito maior em superfícies epiteliais (principalmente nos intestinos) e sítios inflamatórios (78). A maioria dessas células é duplo-negativa (CD4- e CD8-), embora algumas poucas possam ser CD8+ (75). Células $\gamma\delta$ estão geralmente presentes em dois subgrupos, a maioria expressando V δ 2 e uma minoria (<30%) expressando V δ 1 no sangue periférico (9, 79). Essas células parecem ter um papel efetor nas respostas auto-imunes, não apenas produzindo citocinas, mas principalmente através de atividade citotóxica dependente e independente da presença de moléculas do MHC. No entanto, essas também exercem influências reguladoras sobre a resposta imune, estando possivelmente associadas à indução de tolerância imunológica no intestino e imunorregulação na pele (78, 80).

Existe uma enorme variedade de antígenos aos quais o sistema imune pode responder, o que é gerado pela diversidade de especificidades antigênicas dos receptores das células T (TCRs). Portanto, é inevitável que alguns clones de células T (cada um com seu próprio TCR) possam reconhecer auto-antígenos e gerar auto-imunidade. Para evitar que isso aconteça, são necessários processos que garantam a eliminação ou inibição dos linfócitos T auto-reativos. Esses processos são conhecidos como autotolerância. Há dois mecanismos principais de autotolerância: a seleção central e a tolerância periférica (revisado por Jlang e Chess (81)).

A seleção central ocorre no timo, onde as células T imaturas começam a expressar TCR, após migrarem a partir da medula óssea. No timo, as células epiteliais e outras células apresentadoras de antígenos disponibilizam uma grande variedade de autopeptídeos ligados a moléculas do MHC (complexo de histocompatibilidade principal). Os linfócitos T com TCRs de afinidade suficiente para alguns desses peptídeos sobrevivem (seleção positiva), enquanto que linfócitos com afinidade muito baixa morrem. Um segundo processo, denominado seleção negativa, leva à eliminação de células T com receptores com alta afinidade pelos auto-antígenos. A seleção negativa é considerada o principal mecanismo de autotolerância. Por fim, somente 3% dos linfócitos sobrevivem às seleções positiva e negativa e deixam o timo para povoar os órgãos linfóides. Apesar da baixa e intermediária afinidade por autopeptídeos, os TCRs desses linfócitos podem apresentar afinidade elevada por antígenos externos (permitindo as atividades de imunidade protetora) e, eventualmente, por auto-antígenos que não são normalmente apresentados no timo (denominados antígenos críticos) (81, 82).

A tolerância periférica do sistema imune tem por objetivo evitar que células auto-reativas que sobrevivem à seleção central tornem-se linfócitos efetores nos tecidos (81-83). Um dos mecanismos dessa regulação compreende a avidéz e duração da ligação do TCR com o complexo antígeno-MHC: uma ligação de alta afinidade e grande duração favorece ativação e proliferação, enquanto uma ligação fraca e rápida favorece apoptose da célula T (81). Outros tipos de interações, envolvendo moléculas co-estimuladoras, também têm

função reguladora. Por exemplo, a ligação do ligante do CD40 (CD40L, presente em células T ativadas) com seu receptor (o CD40) é essencial para a ativação dos linfócitos B, monócitos e células dendríticas (81, 83). A ligação do CD40L com o CD40 promove a expressão de CD80/CD86 (B7) nas células-alvo (81). Quando o CD80/CD86 (B7) interage com o CD28 (presente nos linfócitos T), ocorre ativação dos linfócitos T (81, 83). Em contraste, a interação do complexo B7 com CTLA-4 (nos linfócitos) leva à anergia ou tolerância imunológica (81, 83).

Outros mecanismos de regulação do sistema imune envolvem a atividade de células NK (*natural killer*), células CD4⁺ reguladoras (Tregs) e células CD8⁺ supressoras (81, 84). As células NK são supressores “naturais”, estando presentes no repertório imune antes da ativação dos linfócitos T por antígenos, atuando nas imunidades primária e inata. Em contraste, as células CD8⁺ supressoras funcionam principalmente nas fases de imunidade secundária (adaptativa) e de memória, ativando-se experimentalmente somente após reestimulação por antígeno ou superantígeno (81, 84). As células CD4⁺ reguladoras exercem atividades inibitórias nas imunidades inata e adaptativa (85).

Os linfócitos NK são células envolvidas na imunidade celular por citotoxicidade direta contra células tumorais ou microrganismos invasores que apresentam determinados glicolipídios e que não têm moléculas de MHC de classe I na sua superfície (81). Elas podem ser CD4/CD8 negativas (duplo-negativas) ou CD4⁺ e expressam TCRs $\alpha\beta$, que consistem em cadeias alfa invariáveis ($V\alpha 24J\alpha 18$, também denominadas $V\alpha 24J\alpha Q$) em combinação com cadeias $V\beta 11$ em humanos (86, 87). Células NK CD4⁺ produzem IL-4, IL-10 e IL-13 (citocinas que promovem respostas imunes tipo Th2) (86, 88), mas podem também produzir citocinas com um perfil Th1 (88). No entanto, células NK CD4/CD8 negativas têm um perfil exclusivamente Th1 (produzindo principalmente IFN- γ e TNF- α) (86, 88). Isso explica por que células NK podem promover respostas Th2 em algumas situações e Th1 em outras (86-88). No diabetes melito, células NK exercem atividade protetora pela secreção de citocinas com perfil Th2 (81, 86).

Células CD4⁺ reguladoras (Tregs) foram inicialmente identificadas como portadoras de CD25 na sua membrana. Posteriormente, células CD4⁺CD25⁻ com atividade reguladora também foram identificadas. Outra molécula de membrana, o FOXP3, foi mais consistentemente demonstrada como sendo um marcador de células CD4⁺ reguladoras (81, 85). Essas células são capazes de suprimir ou regular a resposta a auto-antígenos em imunidade tumoral, transplante de órgãos, alergia e imunidade contra microrganismos (83, 85). A ativação do TCR é necessária para sua função, mas não é necessário o compartilhamento de especificidade antigênica entre a células T reguladora e a célula T-alvo (82, 83). Essas células parecem suprimir o efeito da IL-2 nas células T-alvo, expressam na sua superfície CTLA-4 (molécula de sinalização inibitória que se liga ao complexo B7), e freqüentemente atuam através do contato célula a célula para exercer sua atividade supressora (81-83, 85). A liberação de IL-10 e TGF- β , que inibem a atividade Th1, também parece estar envolvida na atividade supressora desempenhada por essas células (81-83). Camundongos que não apresentam células T reguladoras desenvolvem doenças auto-imunes órgão-específicas (81-83). Em humanos, evidências de anormalidades funcionais em linfócitos Tregs foram observadas no diabetes melito, esclerose múltipla e artrite reumatóide. No lupus eritematoso sistêmico, observa-se redução numérica de Tregs, principalmente em pacientes com doença ativa (85).

Alguns diferentes subtipos de células CD8⁺ supressoras têm sido reconhecidos. As células CD8⁺ supressoras Qa-1 restritas atuam inibindo (ou levando à lise celular (84)) especificamente células T CD4⁺ que apresentam interações TCR/antígeno-MHC de afinidade intermediária (onde se situam a maior parte das interações de TCRs com auto-antígenos apresentados) (81, 84). Essas células CD4⁺ são reconhecidas pelas células CD8⁺ supressoras (através do receptor da célula T) pela expressão do complexo MHC de classe Ib/antígeno (proteína Qa-1/antígeno no camundongo e HLA-E/antígeno em humanos) na superfície da membrana (81, 84). A proteína Qa-1 pode apresentar grande variedade de autopeptídeos e também aloantígenos (84). A regulação por células CD8⁺ Qa-

1/HLA-E dependentes é um importante mecanismo atuando na discriminação entre próprio/não-próprio e na prevenção de auto-imunidade patogênica no organismo (81, 89).

Linfócitos T supressores CD8+CD28- não-Qa-1-dependentes também foram reconhecidos (89, 90). Essas células inibem de forma antígeno-específica as células apresentadoras de antígenos (dessa forma, impedindo indiretamente a ativação das células CD4+), necessitando contato direto célula a célula (90, 91). Células T CD8+CD28- não-antígeno-específicas que atuam através da liberação de citocinas (IFN- γ , IL-6 e IL-10) também foram identificadas, sendo capazes de inibir a proliferação de células CD4+ e CD8+ (citotóxicas) antígeno-específicas (91-93).

2.2.2 O receptor do linfócito T (TCR), sua função e a geração da diversidade dos TCRs

Conforme exposto resumidamente acima, as células T são essenciais para geração de imunidade celular e humoral. O reconhecimento do antígeno é o estímulo inicial para ativação da célula T e leva a proliferação, secreção de citocinas, e realização de atividades reguladoras ou citolíticas. A ativação da célula T é mediada por um complexo de proteínas transmembrana, mas a especificidade antigênica da resposta da célula T é dada pelo receptor da célula T (TCR). O TCR é um heterodímero formado por duas cadeias polipeptídicas ligadas entre si por pontes dissulfídicas. Existem dois tipos de TCR: o TCR $\alpha\beta$ (alfa-beta), formado por uma cadeia (polipeptídeo) alfa e uma beta, e o TCR $\gamma\delta$ (gama-delta), formado por uma cadeia gama e uma delta (Figura 1). As cadeias alfa, beta, gama e delta apresentam regiões constantes, que variam pouco de um clone de células para outro, e variáveis, que conferem a especificidade para o antígeno e que diferem bastante entre os clones celulares (10, 94). Os complexos de $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ estão ambos associados na membrana celular a uma série de polipeptídeos, coletivamente denominados CD3. O CD3 (que é formado por cadeias gama, delta e zeta) é necessário para a “ancoragem” do TCR à

superfície da membrana e para a transdução do sinal após reconhecimento do peptídeo (94).

O TCR reconhece o antígeno (peptídeo) quando este está ligado a uma molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), localizado na membrana de uma célula apresentadora de antígeno ou célula-alvo (Figura 1) (10, 95, 96). Cada receptor de célula T reconhece somente um ou poucos antígenos de aspecto estrutural muito semelhante. Esse reconhecimento leva à ativação de proliferação de um ou poucos linfócitos capazes de reconhecer o antígeno, determinando a expansão monoclonal ou oligoclonal da população de linfócitos, respectivamente (95). Além da ativação através de peptídeos ligados a moléculas do MHC, outros antígenos (denominados superantígenos) podem ativar as células T através de um mecanismo diferente (Figura 1). Esses superantígenos (como a enterotoxina estafilocócica e a exotoxina estreptocócica) estimulam as células T através da formação de uma ponte cruzada entre uma molécula do MHC (de classe II) e o TCR (numa região variável da cadeia beta, fora do sítio de ligação com o peptídeo). Aparentemente a enterotoxina estafilocócica pode estimular os linfócitos T, até mesmo independentemente da presença da molécula de MHC. A ligação com superantígenos não leva à expansão de um único clone de linfócitos, mas, sim, à expansão de diversos clones que usam um mesmo tipo de cadeia variável beta ($V\beta$) (10, 97).

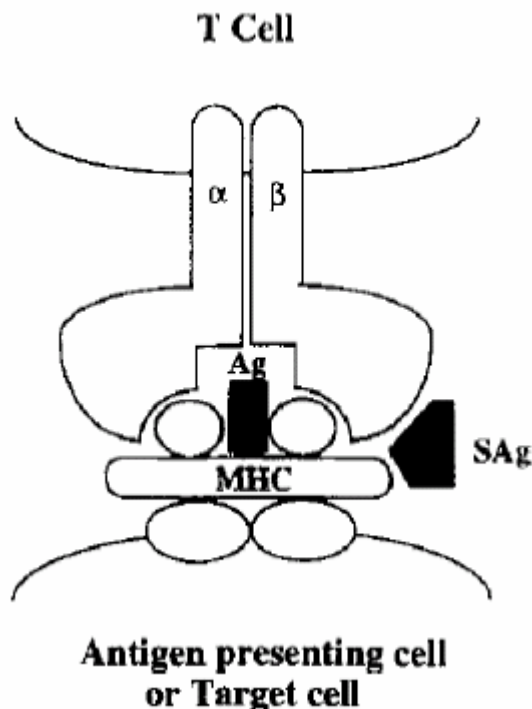


Figura 1. Ilustração esquemática do TCR alfa-beta e de sua ativação por antígenos (Ag) e por superantígenos (SAg). Fonte: LaRoque e Robinson (10).

A geração da diversidade da especificidade dos TCRs é dada principalmente pela variabilidade nas regiões variáveis das cadeias α e β (em células $\alpha\beta$) ou γ e δ (em células $\gamma\delta$). Essa variabilidade dos TCRs é gerada principalmente pela seleção e rearranjo de diversos segmentos gênicos não-contíguos. No caso das cadeias β e δ , esses segmentos gênicos estão divididos em quatro grupos: variável (V), diversidade (D), junção (J) e constante (C) (10, 98-100). As cadeias α e γ são produzidas pela recombinação somente de segmentos V, J e C (99, 100).

Os genes que codificam as cadeias beta estão localizados no cromossomo 7q34. A maioria dos segmentos $V\beta$ encontra-se concentrada num grupamento principal localizado no final 5' do gene, enquanto os grupamentos de segmentos $D\beta$, $J\beta$ e $C\beta$ encontram-se duplicados e localizam-se no final 3' do gene do TCR beta. Como mostrado na Figura 2, as duas regiões constantes altamente similares ($C\beta 1$ e $C\beta 2$) estão aproximadamente a 10 quilobases de distância. Aproximadamente 5 quilobases acima de cada uma das regiões

constantes estão agrupamentos de segmentos J ($J\beta 1$ e $J\beta 2$). O grupo $J\beta 1$ contém seis segmentos funcionais, enquanto o grupo $J\beta 2$ contém sete segmentos funcionais. As regiões D ($D\beta 1$ e $D\beta 2$), compostas por um segmento gênico cada, estão localizadas aproximadamente 600 quilobases acima de cada uma das regiões $J\beta$ (10, 98).



Figura 2. Organização dos segmentos gênicos $D\beta$, $J\beta$ e $C\beta$ do TCR beta. A maioria dos segmentos $V\beta$, não representados na figura, está localizada na extremidade 5' do complexo gênico. Fonte: LaRoque e Robinson (10).

A maioria dos mais de 60 segmentos $V\beta$ está localizada no final 5' do gene do TCR β (Figura 3), à exceção do TCRBV20S1, que está localizado na extremidade 3' do referido gene, e dos segmentos órfãos. Os segmentos órfãos são seis segmentos $V\beta$ não-funcionais localizados no cromossomo 9. Há também outros segmentos gênicos não-funcionais (localizados no final 5' do complexo gênico do TCR beta), denominados pseudogenes, como aqueles pertencentes às famílias TCRBV10 e TCRBV19 (10, 101). Contando-se a presença dos genes órfãos e dos pseudogenes, observa-se que mais de 15% dos segmentos gênicos do gene do TCR beta não são funcionais (10).

Os 65 segmentos gênicos variáveis beta do TCR (TCRBV) estão agrupados em pelo menos 25 famílias, baseando-se numa semelhança >75% na seqüência de nucleotídeos. As famílias são numeradas seqüencialmente (TCRBV1 a TCRBV25), e *loci* distintos dentro de uma família são designados pela letra S (por exemplo, TCRBV3S1) (10, 102). Mais recentemente, o HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) (103) sugeriu nova nomenclatura para os segmentos gênicos do TCR beta, onde são identificadas 30 famílias

freqüentemente em um ou poucos resíduos de aminoácidos (15). Há também polimorfismos de inserção/deleção e polimorfismos nos quais uma das variantes alélicas é um alelo nulo (10). Alguns dos diversos polimorfismos identificados parecem afetar significativamente o repertório de receptores de células T, como os polimorfismos do TCRBV20S1 (denominado previamente de TCRBV18) (17) e TCRBV3S1 (19). Alguns polimorfismos, no entanto, não se traduzem em alterações fenotípicas. Um exemplo disso são os polimorfismos do TCRBV12S2 e TCRBV12S3, nos quais a produção das proteínas codificadas pelos diferentes alelos não é afetada (104).

O processo de rearranjo dos segmentos gênicos para a formação das cadeias β do TCR ocorre como será descrito a seguir (10). Nos precursores mais primitivos das células T na medula, a configuração genômica do DNA é caracterizada pela separação espacial dos segmentos gênicos V, D, J e C ao longo de aproximadamente 575 quilobases. Durante a maturação do linfócito T no timo, esses segmentos gênicos se rearranjam para justapor os segmentos V, D e J. A recombinação é orientada pela presença da seqüência de sinal de recombinação (*RSS – recombination signal sequence*), composta por uma seqüência de bases extremamente conservada localizada em uma das extremidades de cada segmento V e J e em ambas as extremidades dos segmentos D. A RSS é composta por um heptâmero e um nonâmero separados por uma região espaçadora de 12 ou 23 nucleotídeos (Figura 4). Enzimas denominadas recombinases reconhecem as RSS, justapõem as cadeias que devem ser combinadas (D-J ou V-DJ) e realizam a excisão da seqüência de DNA interveniente (junto com as RSS) (Figura 4). Primeiro ocorre a combinação D-J, depois a combinação V-DJ e, por fim, a combinação VDJ-C (Figura 5). Após esse processo de recombinação, esse DNA é transcrito para o RNA mensageiro (RNAm). Os íntrons (segmentos de genes que serão retirados durante o processamento do RNAm) são subseqüentemente removidos para formar um RNAm maduro (Figura 5). A tradução desse RNAm (sem os íntrons) levará à produção de uma cadeia β funcional. Tipicamente, somente um dos dois *loci* para cadeias β geneticamente herdados é rearranjado da maneira

descrita em cada célula (por meio do processo denominado exclusão alélica), de forma que as células expressam somente um tipo de cadeia β (10).

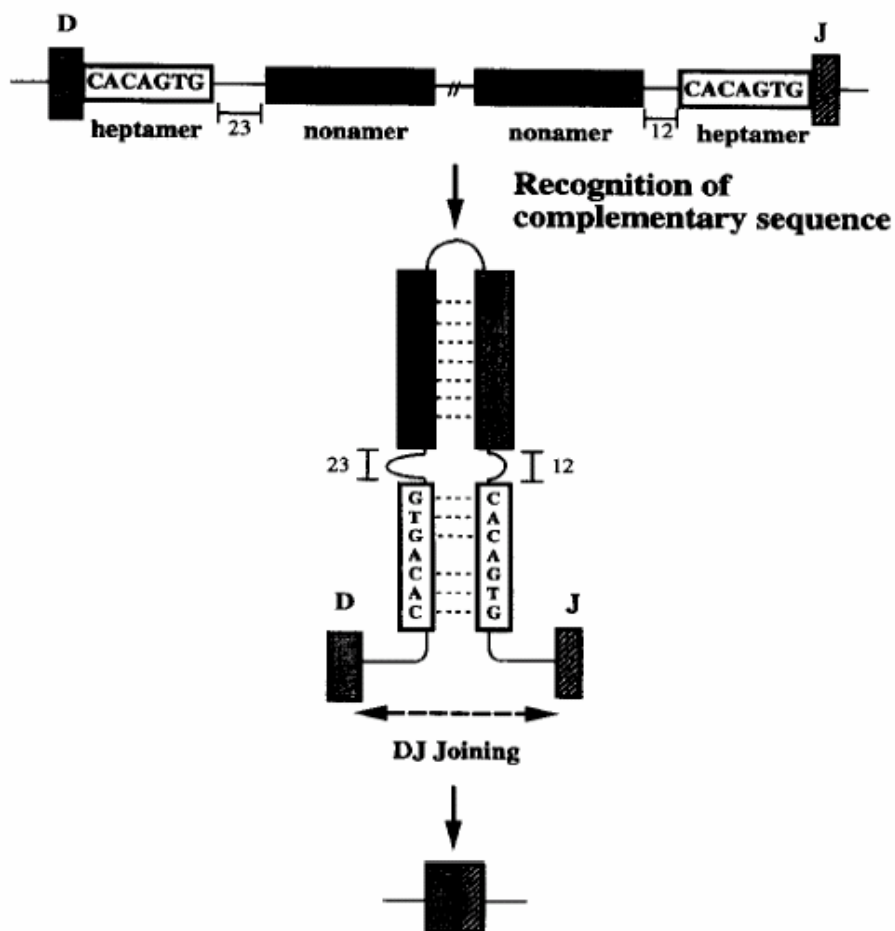


Figura 4. Mecanismo da recombinação na junção dos segmentos D-J. Fonte: LaRoque e Robinson (10).

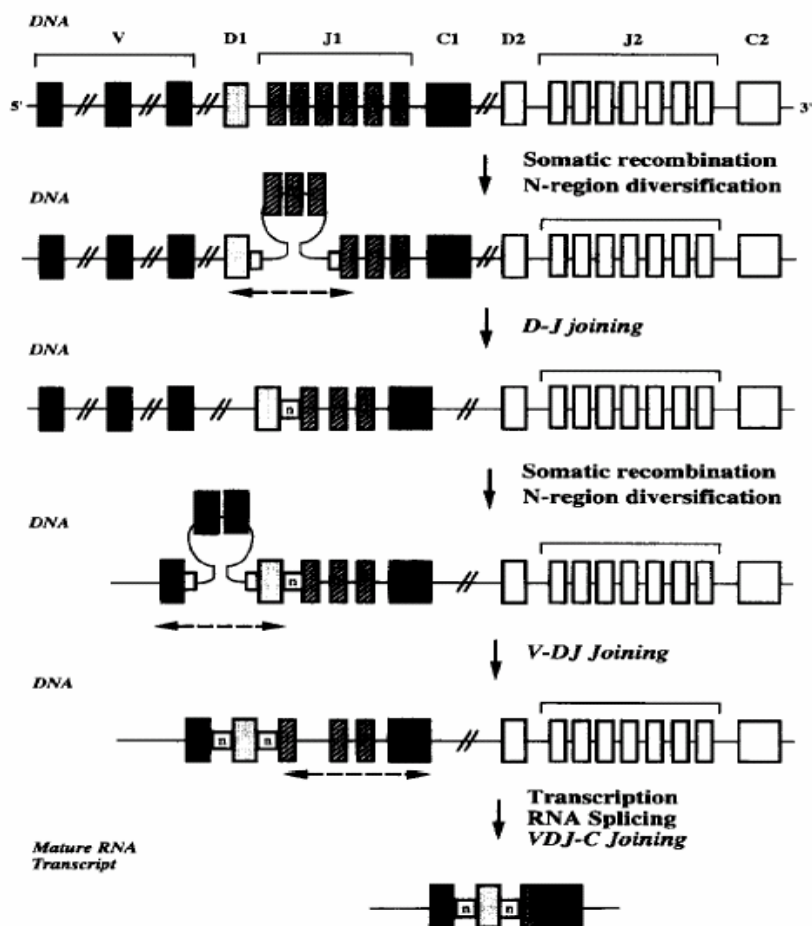


Figura 5. Rearranjo e recombinação dos segmentos gênicos V, D J e C. Fonte: LaRoque e Robinson (10).

Além das diversas possibilidades de recombinação somática dos múltiplos segmentos V, D e J, outros mecanismos contribuem para a diversidade da especificidade antigênica dos receptores das células T. Há enzimas que adicionam aleatoriamente nucleotídeos que não são parte da seqüência genômica nas junções VD, V-DJ e VJ. Diversidade adicional é promovida por enzimas que removem nucleotídeos das junções dos segmentos rearranjados, sendo ambos os processos responsáveis pelas junções imprecisas dos segmentos VD, DJ e VJ. A associação das cadeias alfa com beta e cadeias gama com delta é a última etapa no processo da geração da diversidade (10, 99).

Como os mecanismos geradores de diversidade descritos acima atuam principalmente na junção dos segmentos V, D e J, a região codificada por essa junção é

que concentra a maior variabilidade no complexo molecular do TCR. Essa região é denominada CDR3 (*complementary determining region - 3*) e é justamente a parte do TCR que faz contato com o complexo peptídeo-MHC. A região CDR3 parece conferir a especificidade fina do TCR ao reconhecer peptídeos ligados à moléculas do MHC de forma bastante restrita e discriminatória. Essas conclusões são suportadas pela observação da conservação de CDR3 em TCRs de especificidade antigênica semelhante e pela constatação de que TCRs com especificidades diferentes por vezes variam somente na região do CDR3 (10).

2.2.3 O repertório de cadeias V β nas células T

O repertório de receptores de células T periféricas que é utilizado no reconhecimento de antígenos é moldado por pelo menos três fatores: a disponibilidade de elementos gênicos para as cadeias que compõe o TCR, a seleção tímica e a estimulação clonal (18). Primeiramente, polimorfismos nos genes que codificam as cadeias variáveis podem resultar em diferenças no número de segmentos gênicos expressos ou em alterações na seqüência de aminoácidos do produto do gene. Em segundo, células T podem ser selecionadas ou deletadas no timo com base no TCR que apresentam (18). Os genes do MHC atuam marcadamente na seleção tímica dos linfócitos, levando à expressão preferencial de algumas cadeias α e β , sendo esse o fator mais importante na definição do repertório de cadeias variáveis do TCR (105-108). Em terceiro, a exposição de células T maduras a antígenos externos na periferia pode estimular a proliferação de células T apresentando TCRs que fazem uso de determinadas cadeias alfa ou beta (18). As Figuras 6, 7 e 8 ilustram a forma comum de apresentar quantitativamente a expressão das diversas cadeias V β em células T.

Malhotra et al. (18) estudaram o repertório de cadeias V β dos linfócitos do sangue periférico de três famílias que tinham membros com diabetes melito. Os autores observaram que o padrão de expressão de cadeias V β testadas (1-20) variava significativamente entre

os indivíduos, mesmo que geneticamente relacionados. Apesar da grande variabilidade observada entre os indivíduos, alguns padrões básicos puderam ser reconhecidos: certas cadeias V β eram freqüentemente expressadas em níveis elevados (V β 1, 2, 6, 7, 13.1 e 13.2), outras, em níveis baixos (V β 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 e 19), e as demais em níveis intermediários. Um mesmo indivíduo testado em duas ocasiões (separadas por um intervalo de 21 meses) mostrou um padrão muito semelhante de utilização de cadeias V β , o mesmo acontecendo com um par de gêmeos idênticos testados simultaneamente. No entanto, a utilização de cadeias V β foi menos conservada nos gêmeos idênticos do que no mesmo indivíduo testado seriadamente, sugerindo que diferentes exposições a antígenos ou efeitos da seleção tímica pudessem explicar parte das diferenças observadas. Adicionalmente, os autores observaram que, nos indivíduos de uma mesma família, os segmentos gênicos cuja expressão mais variava eram o V β 3 e o V β 20. Utilizando técnicas de SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) e seqüenciamento de DNA para a identificação de polimorfismos genéticos, os autores identificaram que um polimorfismo no segmento gênico V β 20 era o responsável pela diferença na expressão de células V β 20+. No entanto, os autores não conseguiram detectar polimorfismos que explicassem a variabilidade na expressão de V β 3 (18). Posteriormente, outro estudo do mesmo grupo, utilizando seqüenciamento de DNA e RFLP-PCR (*restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction*), detectou um polimorfismo genético associado a importantes variações na expressão de V β 3 (19).

Geursen et al. (109) estudaram o repertório de cadeias V β (V β 1-15 e V β 24) em quatro indivíduos de origem européia residentes na Nova Zelândia. Observou-se que as cadeias V β 3, 4, 5, 6, 8 e 13 eram as mais comumente expressadas (aproximadamente 10% cada uma delas), enquanto que cadeias V β 1, 9 e 15 eram menos expressadas. Três indivíduos tiveram seu repertório de cadeias V β testado de maneira seriada (medições feitas nas semanas 0, 5 e 8), e concluiu-se que, de modo geral, o padrão de uso de cadeias V β não sofria grandes distorções ao longo do tempo. Dentro desse mesmo estudo (109), os autores compararam os repertórios de cadeias V β em 70 indivíduos de diferentes origens

(européia, maori e samoanos). Observou-se que a expressão da maioria das cadeias V β ocorria de modo semelhante, com elevada expressão de V β 8, 13 e 4 e baixa expressão de V β 1, 9, 15 e 24 nos três grupos. Exceções a essa observação foram as cadeias V β 3.2 (mais expressas em samoanos, sendo as cadeias mais expressas nesse grupo), V β 5.1 e 5.3 (mais expressas em europeus).

Grunevald et al. (110) compararam a frequência da expressão de algumas cadeias V β em linfócitos CD4+ e CD8+ de 24 doadores normais e em quatro amostras de sangue derivadas de cordão umbilical. Os autores observaram maior expressão de cadeias V β 5.1 (4,8% em linfócitos CD4+ versus 1,5% em linfócitos CD8+), 6.7, 8 e 12 em células CD4+, e expressão semelhante de cadeias V β 5.2, 5.3 e 2.3 em células CD4+ e CD8+. O sangue de cordão umbilical mostrou resultados semelhantes para cadeias V β 5.1, 6.7 e 12, sugerindo que as diferenças observadas sejam devidas à seleção tímica e não à expansão clonal por exposição a antígenos.

Gulwani-Akolkar et al. (106) estudaram a frequência de expressão de cadeias V β 12, 5.2/5.3, 6.7, 8.1/8.2 e V α 2.3 em nove famílias, correlacionando com o HLA dos indivíduos. Os autores observaram que, em todas as famílias, os irmãos que apresentavam HLA idêntico tinham a expressão mais semelhante das cadeias testadas, enquanto irmãos com HLA totalmente díspar apresentavam as maiores diferenças na expressão das cadeias. Indivíduos que compartilhavam somente um dos haplótipos do HLA apresentavam um nível intermediário de diferença no uso das cadeias V testadas. Adicionalmente, o grau de similaridade no uso das cadeias entre irmãos HLA-idênticos foi semelhante ao dos gêmeos monozigóticos, sugerindo que o HLA é o mais importante componente genético que influencia a frequência de uso das cadeias variáveis. Comparando-se a expressão das cadeias em células CD4+ e CD8+, observou-se o uso preferencial de cadeias V β 12 e V β 6.7 em células CD4+, e de V β 5.2/5.3 em células CD8+. Quando amostras de sangue de cordão umbilical foram examinadas, a mesma tendência foi observada, indicando que células que não foram expostas a antígenos exógenos têm o mesmo desvio na expressão de cadeias variáveis entre células CD4+ e CD8+. Os autores também mostraram que indivíduos com

HLA-B38 (molécula de MHC de classe I) expressavam níveis mais elevados de V α 2.3 entre as células CD8+ do que em células CD4+. Em indivíduos que não apresentavam HLA-B38, a expressão de V α 2.3 foi semelhante nos dois grupos celulares.

Hawes et al. (107) estudaram o repertório de cadeias V β e V α em gêmeos monozigóticos utilizando PCR quantitativo. Os autores observaram elevada concordância no padrão de expressão de cadeias V β ($R^2 \approx 0,85$) e concordância um pouco menor na expressão de cadeias V α ($R^2 \approx 0,62$) nos pares de gêmeos, sugerindo uma influência predominante das características genéticas sobre o repertório de TCRs. Adicionalmente, os autores observaram expressão preferencial de cadeias V β 3, 9, 12 e 18 em células CD4+; V β 7, 14 e 17 foram expressas preferencialmente em células CD8+. Observou-se também que a expressão preferencial de diferentes cadeias V β em células CD4+ ou CD8+ mantinha-se constante dentro dos pares de gêmeos.

O estudo mais amplo e completo sobre o repertório normal de células $\alpha\beta$ foi realizado por van den Beemd et al. (111). Os autores estudaram o sangue periférico de 36 indivíduos holandeses hígidos, de vários grupos etários, usando anticorpos monoclonais e citometria de fluxo. As freqüências médias da expressão das diversas cadeias β , assim como a expressão preferencial das mesmas em células $\alpha\beta$ CD4+ ou CD8+, são mostradas na Figura 6. Observa-se que as cadeias β mais freqüentemente usadas pertencem às famílias V β 13, 5, 2, 6, 17 e 14, enquanto as menos expressas são V β 18, 16, 11 e 23. Cadeias V β 1, 7.1, 14 e 23 mostraram expressão preferencial em células CD8+, enquanto V β 2, 5.1, 6.7, 9.1 e 22 foram significativamente mais freqüentes em células CD4+. Observou-se que os valores médios da expressão das cadeias V β mantiveram-se relativamente estáveis nos diferentes grupos etários, mas os desvios-padrão aumentavam nas faixas etárias mais elevadas. Isso foi causado pela expansão oligoclonal de células T observada em alguns indivíduos idosos.

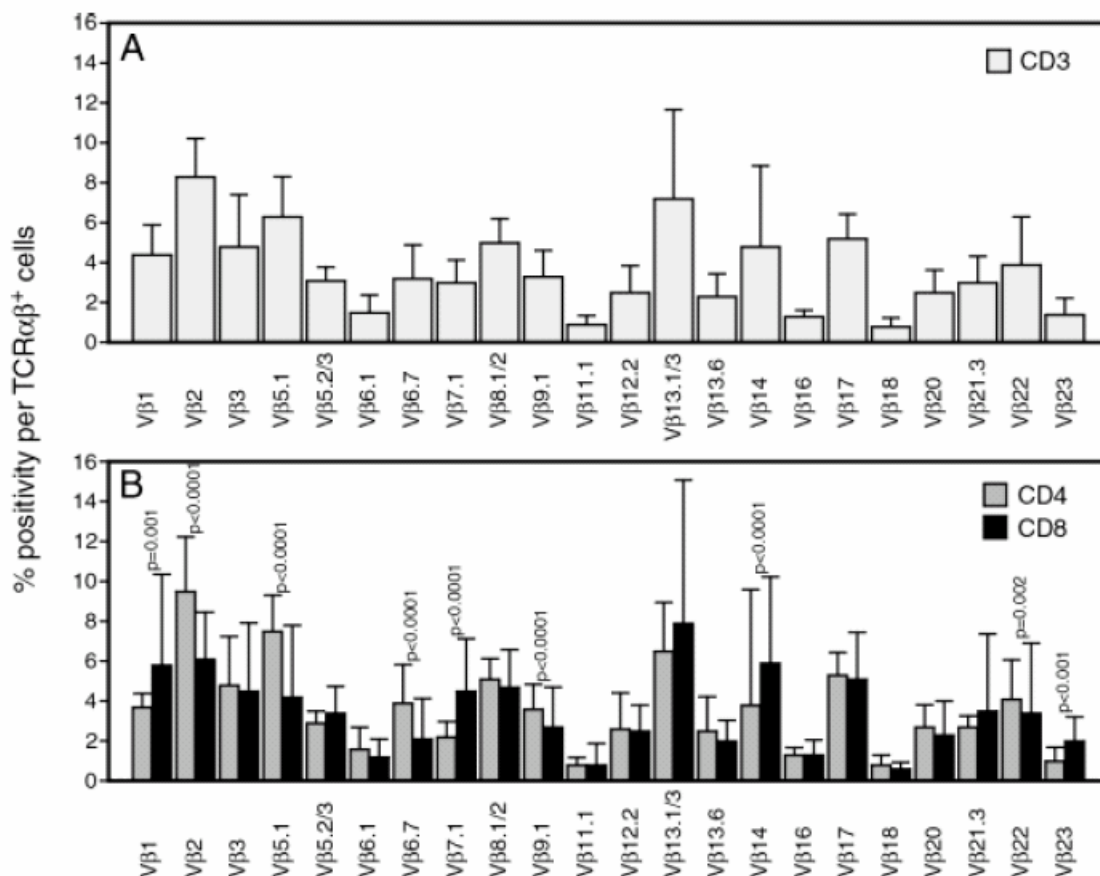


Figura 6. Acima (A), frequência percentual média (DP) de uso de cadeias Vβ por células T αβ no sangue periférico de 36 indivíduos normais de diversas faixas etárias. Abaixo (B), o mesmo que acima com as células αβ divididas em CD4+ e CD8+. Fonte: van der Beemd et al. (111).

É interessante observar que alguns dos estudos avaliados detectaram, apesar de geralmente em níveis baixos, a presença de células Vβ10+ e Vβ19+ no sangue periférico dos indivíduos testados (18, 105, 112). No entanto, o produto desses genes não é funcional, não sendo possível a formação de TCRs utilizando essas cadeias (10, 101). Diante dessa observação, Currier et al. (101) sugeriram que estudos prévios reportando níveis significativos de células Vβ10+ e Vβ19+ no repertório de células T deveriam ser reavaliados. Em pelo menos alguns dos estudos mais recentes (94, 113-115) sobre o repertório de TCRs, a expressão de cadeias Vβ10 e Vβ19 não é mais testada.

2.2.4 O repertório de cadeias V β de células T reguladoras

Fujishima et al. (115) examinaram o repertório de cadeias variáveis beta de linfócitos CD4+CD25+ (células CD4 reguladoras) e CD4+CD25- em dois indivíduos normais. Os autores observaram que o repertório das células CD4+CD25+ é muito semelhante ao das células CD4+CD25-, com a grande maioria das cadeias beta expressa praticamente na mesma proporção em ambos os grupos de células. No entanto, havia uma expressão aumentada de cadeias V β 3 entre as células CD4+CD25+ (Figura 7) nos dois indivíduos estudados.

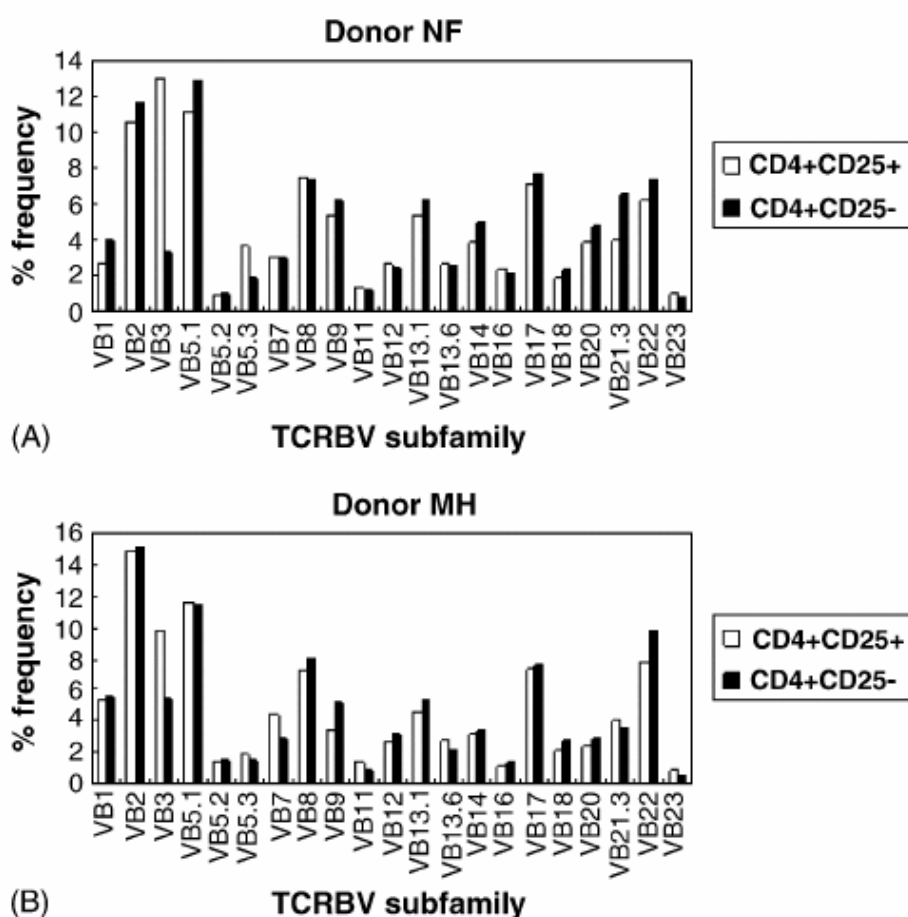


Figura 7. Repertório de cadeias V β de células CD4+CD25+ e CD+CD25- em dois doadores normais. Fonte: Fujishima et al. (115).

Ciubotariu et al. (112) estudaram o repertório de células T supressoras CD8+CD28- cultivadas antes e após a exposição a xenoantígenos derivados de células apresentadoras de antígenos de porco. Os autores observaram que, nas linhagens celulares de células CD8+CD28- de um dos indivíduos, a exposição a antígenos de porco provocou expansão oligoclonal de células V β 3, V β 9, V β 20 e V β 23. Em células de outro indivíduo, a exposição a diferentes xenoantígenos provocou expansão de células V β 16 e V β 23. Em outro estudo do mesmo grupo (116), demonstrou-se expansão oligoclonal de células CD8+CD28- expressando diferentes cadeias V β (variando conforme o indivíduo e os antígenos) após exposição a xenoantígenos, aloantígenos e outros antígenos específicos. Antes da exposição aos diferentes antígenos, as linhagens celulares CD8+CD28- dos três indivíduos testados já apresentavam padrão heterogêneo de expressão de cadeias V β (Figura 8). Interessantemente, nos três pacientes observa-se baixo uso de cadeias V β 2 entre as células CD8+CD8-.

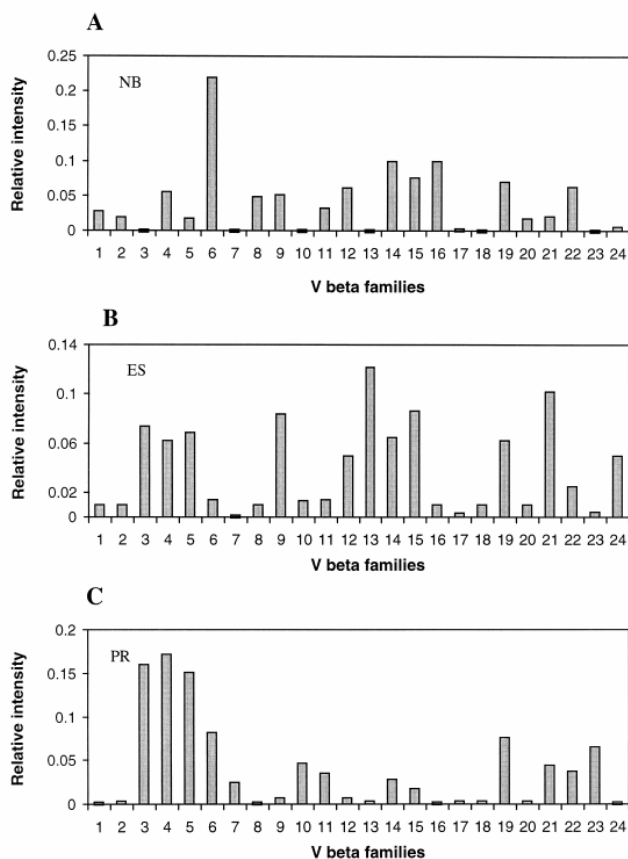


Figura 8. Repertório de cadeias V β em células CD8+CD28⁻ de três indivíduos normais. Fonte: Pennesi et al. (116).

Interessantes evidências de que células reguladoras podem fazer uso preferencial de determinadas cadeias V β em algumas doenças vêm de estudos experimentais. A encefalomielite auto-imune experimental (EAE) é uma doença desmielinizante do sistema nervoso central mediada por células CD4⁺ (geralmente V β 8.2⁺) que ocorre após imunização de camundongos com proteína básica da mielina ou seus fragmentos peptídicos. Kumar et al. (117) observaram que células CD4⁺ anti-B5 (B5 é um dos peptídeos que compõem as cadeias V β 8.2, sendo um importante determinante antigênico) fazem uso predominante de cadeias V β 14 e, em menor grau, de cadeias V β 3. A transferência de células T CD4⁺ V β 14⁺ anti-B5 foi capaz de prevenir o surgimento de EAE em camundongos expostos à proteína básica da mielina. Num estudo posterior do mesmo grupo (118), os autores observaram que, em camundongos nos quais a EAE foi induzida, o tratamento com anticorpos anti-V β 14, juntamente com anti-V β 3, reduziu o nível de células

CD4+ V β 14+ e V β 3+ em aproximadamente 80% e levou a um curso grave e prolongado da doença. Portanto, esses estudos mostram que células CD4+ reguladoras envolvidas no controle da EAE fazem uso preferencial de V β 14 e, em menor extensão, de V β 3. O uso preferencial de um determinado tipo de cadeia V β também foi observado no modelo experimental de camundongos não-obesos diabéticos (NOD), onde as células CD4+ efetoras utilizavam cadeias V β 4, enquanto as células reguladoras utilizavam V β 12 (119).

2.3 A patogênese da esclerose sistêmica e o repertório dos linfócitos T na doença

2.3.1 A patogênese da esclerose sistêmica e o papel dos linfócitos T e B

Apesar dos fatores desencadeantes da esclerose sistêmica não serem apropriadamente conhecidos, a seqüência de eventos que se seguem à ativação do sistema imune tem sido bastante estudada (revisado por Sakkas e Platsoucas (5)). Nas fases iniciais da doença, um infiltrado cutâneo monocelular composto principalmente por células T e macrófagos tem sido observado (3, 4). A intensidade do infiltrado se correlaciona com o grau e progressão da doença cutânea (3). A proporção de mastócitos também está aumentada (120). A produção de interleucina-4 (IL-4) por linfócitos CD4+ Th2 induz à produção de fator de crescimento transformador (TGF- β , um mitógeno de fibroblastos) por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. O TGF- β apresenta pelo menos três isoformas, entre elas destacando-se o TGF- β 1. O TGF- β leva à ativação e à hiperplasia dos fibroblastos e aumenta a síntese de colágeno e fibronectina. Também promove indiretamente a inibição da atividade de metaloproteinases e colagenases (121). Outra ação do TGF- β é o estímulo à produção de interleucina-1 (IL-1) e do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) por monócitos e do fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) por fibroblastos. O PDGF e o CTGF são mitógenos e ativadores da produção de colágeno por fibroblastos. A IL-17, também produzida por linfócitos CD4+

ativados, induz à proliferação de macrófagos, à produção de IL-1 por essas células e à expressão de moléculas de adesão em células endoteliais. A IL-1 induz à produção de colágeno por fibroblastos e de PDGF por fibroblastos e células endoteliais. A IL-1, o PDGF e a interleucina-17 levam ao aumento da produção de interleucina-6 (IL-6) por células T, monócitos, células endoteliais e fibroblastos. A IL-6 é um indutor da produção de colágeno por fibroblastos e promove a diferenciação dos linfócitos CD4+ em células Th2 (5).

O dano vascular na esclerose sistêmica é um processo associado à lesão da camada íntima de pequenas artérias e arteríolas nos órgãos afetados (122, 123), sendo um dos primeiros eventos fisiopatogênicos observados na doença (61). Há evidências de que esse processo tem origem primariamente no endotélio (122, 123), que mostra indícios de lesão, ativação (desaparecimento de células endoteliais, trombose e duplicação da membrana basal de pequenos vasos) (122) e apoptose de células endoteliais (61). A ativação de células endoteliais também é sugerida pela expressão de selectina-E, endotelina-1 e da molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1). A IL-17, diretamente e através do estímulo à produção de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa, produzido por macrófagos), é um importante ativador das células endoteliais, levando à expressão de moléculas de adesão e liberação de IL-1 e IL-6 por essas células. A IL-4 e o TGF- β liberados nos tecidos inflamados estimulam a fibrose e proliferação da camada íntima das arteríolas (5). A liberação de substâncias das plaquetas (como o PDGF) atraídas pelo endotélio ativado (124) e de células endoteliais (como a endotelina-1) (125) podem, além de induzir à vasoconstrição, estimular a proliferação celular e síntese de colágeno em fibroblastos, contribuindo para a fibrose da pele e de órgãos internos (124, 125). A produção aumentada de MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) por células endoteliais e também por células mononucleares, nos tecidos inflamados (126), tem efeito pró-fibrótico (através do aumento da expressão do TGF- β (127)) e estimula um perfil Th2 de resposta imune (128).

A produção de auto-anticorpos na ES (principalmente o FAN, os anticorpos anticentrômero e antitopoisomerase I) é um dos fatores que apontam para a importância

das células T na esclerose sistêmica (5, 129). A cooperação entre células CD4+ Th2 e células B é fundamental para a produção de auto-anticorpos em condições normais de resposta a agentes agressores e nas doenças auto-imunes (97). Na esclerose sistêmica, Kuwana et al. (129) demonstraram que a interação entre células T e B (ambas específicas para determinantes antigênicos da enzima DNA topoisomerase I) é essencial para a produção de anticorpos antitopoisomerase I.

Outra evidência da importância da atividade dos linfócitos na esclerose sistêmica vem da semelhança da esclerose sistêmica com a doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) (5, 130, 131). A GVHD é uma doença mediada por linfócitos T do doador que reagem contra os antígenos HLA do hospedeiro, ocorrendo principalmente após transplante de medula óssea. O quadro clínico, histopatológico e sorológico é bastante semelhante ao da esclerose sistêmica, incluindo envolvimento cutâneo, esofágico e pulmonar, infiltração linfocítica, fibrose dos órgãos afetados e produção de auto-anticorpos (como antitopoisomerase I e anti-PM-Scl) (130, 131).

Os linfócitos também são importantes na fisiopatogenia da doença pulmonar na ES. Pacientes com alveolite fibrosante associada à esclerose sistêmica têm aumento do número de células T no interstício pulmonar na biópsia pulmonar (132) e no lavado bronquíolo-alveolar (LBA) (132-134). No LBA, observa-se aumento da quantidade de células T CD8+ (8), contrariamente ao que ocorre na pele, onde predominam as células T CD4+ (3). Células T CD8+ do LBA de pacientes com ES produzem quantidades significativas de IL-4 (6), à semelhança das células CD4+ na pele. Em controles normais, as células CD8+ do LBA secretam predominantemente IFN- γ , que inibe a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno (6).

Há evidências de que a regulação do sistema imune esteja alterada na esclerose sistêmica. Alguns estudos apontam para um aumento na proporção entre linfócitos T *helper* (CD4+) e CD8+ supressores, atribuível principalmente à redução na quantidade das células CD8+ no sangue periférico de pacientes (135, 136). Filaci et al. (91) relataram disfunção de células T CD8+CD28- supressoras não-antígeno específicas na esclerose sistêmica ativa.

A atividade citotóxica das células NK, que também exercem atividade imunorreguladora, está consistentemente reduzida na esclerose sistêmica (137-140), apesar de haver evidências contraditórias com relação à quantidade absoluta dessas células no sangue dos pacientes (137, 139-142). Fiocco et al. (143) observaram aumento do percentual e quantidade absoluta de células (CD4+CD25+) na ES com relação a controles, principalmente quando a doença se encontrava ativa. No entanto, não foi determinado se células tinham um perfil regulador ou não. Nesse sentido, Hu et al. (144) observaram que células T (de pacientes e controles) reativas à DNA topoisomerase I recombinante eram predominantemente CD4+CD25+, mas não apresentavam o fenótipo de células T reguladoras e tinham expressão reduzida de FOXP3.

Diversas evidências apontam para a importância das células $\gamma\delta$ na esclerose sistêmica. Células $\gamma\delta$ apresentam atividade predominantemente citotóxica e atuam em células que apresentam ou não moléculas do MHC. Na esclerose sistêmica, acúmulo de células $\gamma\delta$ ocorre na pele (145) e pulmões dos pacientes (146). Giacomelli et al. (145) observaram que essas células apareciam na pele de pacientes em frequência maior do que células CD4+. Kalaleb et al. (147) observaram aumento na aderência, proliferação e atividade citotóxica de células $\gamma\delta$ de pacientes com ES (se comparados às células de controles normais) quando expostas à cultura de células endoteliais. As células $\gamma\delta$ também apresentam a capacidade de aderir a fibroblastos (146) e são encontradas abundantemente nas regiões perivasculares da derme dos pacientes (145). Tanto na pele como nos pulmões, o aumento de células $\gamma\delta$ é causado principalmente pela expansão oligoclonal de células V δ ₁ (145, 146). Esses dados sugerem a possibilidade de que células $\gamma\delta$ sejam importantes células efetoras da atividade inflamatória da doença. Por outro lado, sabe-se que células $\gamma\delta$ também podem exercer funções reguladoras da imunidade, não estando ainda seu papel totalmente esclarecido (145). Nesse sentido, Giacomelli et al. (79) observaram que as células $\gamma\delta$ circulantes de pacientes com ES produziam preferencialmente IFN- γ (tendo, portanto, um perfil Th1, oposto ao perfil normalmente observado na doença) e apresentavam aumento da capacidade citotóxica.

Os linfócitos B também parecem desempenhar importantes funções na ES (41, 128). Células B são identificadas no infiltrado inflamatório cutâneo da doença (148). A expressão de CD19, que é uma molécula de transdução de sinal e marcador de ativação dos linfócitos B, está aumentada na ES (41, 128). Células B ativadas têm a capacidade de produzir TGF- β , IL-6, e IL-10 (que têm efeito pró-fibrótico) e também são importantes apresentadoras de antígenos, evocando respostas tipo Th2 (128). A expressão de auto-anticorpos em frequência elevada também é um indício claro da ativação dos linfócitos B na doença. A maioria dos auto-anticorpos identificados na ES parece não ter um papel fisiopatogênico específico (5, 41, 42). No entanto, anticorpos anticélulas endoteliais (capazes de levar à expressão de moléculas de adesão (149) e apoptose dessas células (61, 150)) e anticorpos antifibroblastos (capazes de ativar as células-alvo (151)) identificados na ES parecem contribuir diretamente para o processo gerador de fibrose tecidual. Recentemente, demonstrou-se que anticorpos antitopoisomerase I podem ligar-se a moléculas de DNA topoisomerase I (liberadas de células endoteliais que sofreram apoptose) aderidas à membrana de fibroblastos (43). Essa ligação antígeno-anticorpo pode recrutar, ativar e estimular a adesão de monócitos (43), cujas citocinas pró-inflamatórias contribuem para a ativação dos fibroblastos e para o desenvolvimento de fibrose tecidual (5).

2.3.2 A ativação dos linfócitos T na esclerose sistêmica

Células T podem ser ativadas e proliferar de modo não-específico ou em resposta a antígenos específicos. Ativação e proliferação não-específicas de células T podem ocorrer em resposta a quimiocinas, citocinas e mitógenos e resultam em uma população heterogênea e policlonal que expressa diferentes receptores de células T. Os superantígenos ativam os receptores de células T através da formação de uma ligação entre as moléculas de MHC de classe II e as cadeias beta do TCR. Dessa forma, a ativação em resposta a superantígenos resulta na expansão policlonal de células T que usam uma mesma cadeia variável beta. Em contraste, a ativação e proliferação em

resposta a antígenos específicos resultarão na expansão clonal somente daquelas células T que reconhecem esse antígeno específico através do receptor da célula T (10, 152).

Há importantes indícios que sugerem que a ativação linfocitária na esclerose sistêmica seja mediada por antígenos. Sakkas et al. (7), estudando biópsias de pele de pacientes com ES, observou expansão oligoclonal dos linfócitos que infiltram a pele. Em um paciente no qual três biópsias de diferentes regiões da pele foram feitas em momentos distintos (0, 8 e 13 meses), um mesmo clone de linfócitos foi identificado nos três espécimes. Estudando o lavado bronquíolo-alveolar de pacientes com ES, Yurovski et al. (8) observaram a expansão oligoclonal de células T (principalmente nas células CD8+) a partir da análise da diversidade da extensão das regiões juncionais das cadeias alfa e beta de receptores de células T. Outros estudos observaram a expansão de clones específicos de células T $\alpha\beta$ (8, 153, 154) ou $\gamma\delta$ (146, #101) no sangue periférico de pacientes com ES. Esses estudos sugerem que as células T na ES foram ativadas e proliferaram em resposta a um antígeno ainda não identificado.

Há vários potenciais candidatos a antígenos que desencadeiam a expansão clonal na ES (5). Uma das hipóteses mais interessantes é a do microquimerismo, a qual propõe que a causa da esclerose sistêmica seja uma reação contra os antígenos HLA do paciente desencadeada por linfócitos imunocompetentes transferidos durante a gestação ou por transfusões sanguíneas (5, 130, 131). A presença de pequenas proporções de células fetais (geralmente <5%) no sangue periférico ou pele de pacientes com ES que já estiveram grávidas foi documentada (5). Adicionalmente, pequenas proporções de células maternas foram identificadas no sangue periférico de mulheres que não estiveram grávidas e em homens com ES. A persistência de células maternas ou fetais nos pacientes com ES resulta no que se chama microquimerismo, sendo esse fenômeno observado também em controles normais, mas em proporção menor do que em pacientes com ES (131). Nesse contexto, existe a possibilidade de que se desenvolva um quadro semelhante ao que ocorre na doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD), em que os linfócitos transplantados são ativados pelos antígenos HLA do hospedeiro, iniciando uma doença parecida com a

esclerose sistêmica. A ES seria então explicada pela quebra de tolerância aos aloantígenos do hospedeiro ou ativação dos linfócitos transferidos por antígenos desconhecidos, iniciando a reação auto-imune. Apesar dessa hipótese ser atraente, a importância do microquimerismo na patogênese da ES ainda não está definitivamente estabelecida (5, 131).

Outro antígeno-candidato na esclerose sistêmica é a enzima DNA topoisomerase I, envolvida no enovelamento, transcrição, recombinação e reparo do DNA. Durante a apoptose celular, a topoisomerase I é clivada em fragmentos peptídicos e redistribuída em bolhas e corpos apoptóticos (155). Normalmente, esses fragmentos são rapidamente removidos por macrófagos, mas, em situações de aumento súbito no número de células apoptóticas, a capacidade de fagocitose pode ser eventualmente superada (43, 155). Se os mecanismos normais de remoção de células apoptóticas estão deficientes, sobrecarregados por elevados níveis de apoptose ou afetados pela produção anormal de citocinas (como no curso de uma infecção viral), as células podem entrar num estágio tardio de apoptose (156) ou de necrose secundária (157). A produção de antígenos modificados durante a apoptose tardia ou a presença de células necróticas implicam uma rota que é mais inflamatória e imunogênica de remoção de auto-antígenos (156, 157). Normalmente, a fagocitose de células apoptóticas por células dendríticas não leva a uma apresentação eficiente de antígenos. No entanto, a fagocitose de células necróticas resulta não só na apresentação de antígenos como também na expressão de moléculas co-estimuladoras por essas células (157). Desse modo, esses auto-antígenos poderiam ser eficientemente apresentados às células T, gerando a resposta auto-imune. É possível que isso ocorra na esclerose sistêmica, onde a apoptose aumentada de células endoteliais de pequenos vasos foi detectada em vários tecidos (61). Também foi demonstrado que células T de pacientes com antitopoisomerase I apresentam rápida resposta proliferativa diante da exposição aos produtos de clivagem da topoisomerase I em condições experimentais, contrastando com controles e pacientes sem esses anticorpos (158, 159). No entanto, o encontro de células T específicas para a DNA topoisomerase I no sangue de controles normais (que apresentam

alguns alelos específicos de HLA) mostra que essas células são parte do repertório normal de linfócitos (159, 160).

Outros antígenos que podem desencadear a produção de anticorpos na ES são fibrilarina, centrômero, RNA polimerases I,II e III e outros antígenos nucleolares. Semelhantemente ao que ocorre com o anticorpo antitopoisomerase I, esses auto-anticorpos também estão associados a alelos específicos do HLA (5).

Anticorpos anticitomegalovírus (CMV) são encontrados com maior frequência em pacientes com ES do que em controles normais (70), e há importantes similaridades entre a vasculopatia da ES e a associada ao CMV (68, 130). Mimetismo molecular entre antígenos do CMV e antígenos endoteliais poderia, pelo menos teoricamente, levar à produção de anticorpos antiendotélio (68, 130). Um mimetismo molecular (compartilhamento de epítomos entre diferentes moléculas) foi observado entre uma seqüência de peptídeos de uma proteína do CMV e a topoisomerase I, assim como entre a topoisomerase I e proteínas retrovirais (5, 130). Infecção por parvovírus B19 também foi associada à ES (68). Portanto, é possível que as infecções virais sejam desencadeantes da atividade auto-imune observada na doença através da indução à quebra de tolerância a determinados auto-antígenos.

2.3.3 O repertório de receptores de células T na esclerose sistêmica

O repertório de receptores de células T na ES tem sido objeto de diversos estudos.

Limpany et al. (161) estudaram biópsias pulmonares de cinco pacientes com fibrose pulmonar idiopática (FPI), seis com alveolite fibrosante associada à esclerose sistêmica (AFES) e seis controles. Os autores testaram a expressão de 18 cadeias alfa e de 22 cadeias beta através de RT-PCR (*reverse transcription polimerase chain reaction*) nos linfócitos obtidos. Observou-se que não havia diferenças significativas no número médio de famílias de cadeias variáveis alfa ou beta expressas entre os grupos. Também não havia diferença significativa na frequência de qualquer uma das cadeias alfa ou beta entre os

grupos. Referindo-nos especificamente às cadeias beta, de especial interesse no presente trabalho, linfócitos apresentando cadeias V β 20 foram detectados em um paciente com FPI, três pacientes com AFES e três controles. Linfócitos expressando cadeias V β 3 foram encontrados em três pacientes com FPI, dois com AFES e dois controles, respectivamente. Os autores concluíram que não havia diferenças no repertório de receptores de linfócitos T entre os grupos, mas o pequeno número de pacientes estudados não permite conclusões precisas a esse respeito.

Limpany et al. (161) também estudaram a expressão de cadeias alfa e beta em linfócitos do lavado bronquíolo-alveolar (LBA) e do sangue periférico de 10 pacientes com ES, diferenciando-os quanto à presença de CD4 ou CD8. Não houve diferenças significativas entre o número médio de famílias de cadeias alfa ou beta expressas no sangue periférico e lavado bronquíolo-alveolar. Também não havia diferença significativa na expressão de cadeias alfa ou beta entre as células T CD4+ e CD8+ no LBA e sangue periférico. No entanto, em um mesmo indivíduo, havia diferenças na expressão de cadeias alfa e beta entre células CD4+ e CD8+ e também entre LBA e sangue periférico. Nesse sentido, os autores observaram que a diversidade da expressão de cadeias V β em linfócitos CD8+ era menor no LBA que no sangue periférico. A menor diversidade de cadeias V β no LBA sugere uma expansão oligoclonal de linfócitos CD8+ pulmonares na alveolite fibrosante associada à esclerose sistêmica.

Sakamoto et al. (153) estudaram as células T CD4- e CD8- (duplo-negativas) no sangue periférico de 19 pacientes com ES e 9 controles saudáveis. Os autores observaram, através da citometria de fluxo, maior frequência de células CD4/CD8 negativas com relação aos controles. Também foi testada a utilização de genes V β , sendo utilizado RT-PCR para identificação de 20 famílias de V β em três pacientes. Nesses, observou-se que as células CD4/CD8 negativas apresentavam somente uma ou duas cadeias V β (V β 7 e V β 5 no primeiro, V β 5 no segundo e V β 17 no terceiro paciente). Já as células CD4+ ou CD8+ expressavam todas, ou quase todas, as cadeias V β testadas (153). O fato de não se

observarem células V β 11 entre as células CD4/CD8 negativas sugere que não haja expansão de células com atividade NK na ES.

Em outro estudo do mesmo grupo, Sumida et al. (154) estudaram a expressão de cadeias variável alfa de linfócitos CD4⁻ e CD8⁻ (duplo-negativos) do sangue periférico de quatro pacientes em fase inflamatória de esclerose sistêmica e três controles normais. Nos pacientes, observou-se aumento da quantidade de células CD4/CD8 negativas (todas elas expressando V α 24), mas quase completa ausência de células V α 24J α Q (um marcador de células NK) entre essas células. Diferentemente, nos controles as células CD4/CD8 negativas V α 24J α Q⁺ compuseram mais de 20% das células V α 24. Os autores sugeriram que as células CD4⁻/CD8⁻ V α 24J α Q⁺ tenham um papel imunorregulador, possivelmente evitando o surgimento de doenças auto-imunes, enquanto as outras células CD4⁻/CD8⁻ V α 24⁺ poderiam ser auto-agressivas na ES.

Yurovsky et al. (8) estudaram os linfócitos T do sangue periférico e do lavado bronquíolo-alveolar de sete pacientes com esclerose sistêmica. Os autores observaram, através de RT-PCR, que todas as famílias de cadeias alfa (1 a 22) e beta (1 a 24) testadas eram expressas em linfócitos do sangue periférico e LBA. Em pacientes individuais, uma expressão maior ou menor de determinadas cadeias alfa e beta ocorriam no LBA com relação ao sangue periférico, mas no grupo de pacientes não havia diferenças estatisticamente significativas na expressão de qualquer uma das cadeias alfa ou beta entre o LBA e o sangue periférico. A expressão de genes V α e V β foi adicionalmente analisada pela determinação do número de nucleotídeos (*nucleotide lengths*) codificadores das regiões juncionais dos TCRs. As regiões juncionais compõem o CDR3, que é a região relacionada à especificidade antigênica do TCR, já que os resíduos codificados pelas junções V-D-J entram em contato direto com o peptídeo apresentado. A maioria das famílias de genes variável-alfa e variável-beta expressas no sangue e LBA de todos os pacientes tinha múltiplos comprimentos de regiões juncionais, com uma distribuição normal de comprimentos. No entanto, em alguns pacientes, determinados comprimentos juncionais específicos apareciam com frequência elevada, tornando a distribuição de comprimentos

juncionais diferente da normal. Esse fato sugere a proliferação de um ou mais clones específicos de linfócitos. As alterações na distribuição dos comprimentos juncionais foram mais pronunciadas em linfócitos CD8+, principalmente naqueles presentes no LBA. Os autores também observaram que algumas famílias V α (V α 14, 17, 19 e 21) e V β (V β 8, 9, 12, 21) apresentavam comprimentos das regiões juncionais do TCR oligoclonais em dois ou mais pacientes. Alguns desses comprimentos de regiões juncionais eram idênticos em diferentes pacientes, especialmente entre as células CD8+. Como a especificidade antigênica é determinada pelas regiões juncionais dos TCRs, a observação de comprimentos idênticos de regiões juncionais pode significar que um mesmo antígeno pode desencadear a doença em diferentes pacientes. Repetindo-se o LBA em três pacientes com alveolite fibrosante, os autores observaram que o curso clínico caracterizado por resposta incompleta à terapia era acompanhado pela expressão persistente dos mesmos comprimentos de regiões juncionais de cadeias variáveis nas células CD8+.

Em outros estudos do mesmo grupo (9, 146), os autores estudaram as células T $\gamma\delta$ (gama-delta) no sangue periférico, biópsias de órgãos-alvo e lavado bronquíolo-alveolar (LBA) de pacientes com esclerose sistêmica e controles. Os autores observaram elevada proporção de células V δ 1 (com relação ao total de células T $\gamma\delta$) no sangue e lavado bronquíolo-alveolar dos pacientes (9). Também notaram expansão oligoclonal dessas células com relação às células do mesmo tipo dos controles, através da observação de limitada diversidade das regiões juncionais de TCRs de células V δ 1 nos pacientes (9, 146). Observaram ainda que a mesma seqüência juncional da cadeia V δ 1 persistiu no LBA em um paciente ao longo do tempo e que seqüências juncionais idênticas eram obtidas de múltiplos sítios em alguns pacientes (146). Esses achados mais uma vez sugerem que a ES seja uma doença desencadeada por antígenos específicos.

Giacomelli et al. (145), reproduzindo resultados já obtidos por outro grupo (9, 146), observaram também aumento da quantidade de células V δ 1 na pele e sangue de pacientes com ES, relativamente a controles. De fato, as células V δ 1, que são minoria entre as células $\gamma\delta$ no sangue (já que a maioria expressa V δ 2), representavam freqüentemente a

maior parte das células $\gamma\delta$ que infiltravam a pele dos pacientes. Nos controles e na pele não afetada de pacientes, não foram observadas células $\gamma\delta$ de nenhum tipo. Pacientes em fase inicial de doença apresentavam maiores quantidades de linfócitos $\gamma\delta$ na pele do que nas fases tardias. Os autores sugeriram que as células $\gamma\delta$ podem ter um papel importante na patogênese da doença.

Sakkas et al. (7) estudaram o repertório de TCRs (através de técnicas de PCR) em biópsias de pele de cinco pacientes com ES inicial (menos de 18 meses do início do espessamento da pele). Os autores encontraram expansão mono ou oligoclonal de células $\alpha\beta$ em todos os casos estudados. Em um dos pacientes, havia um mesmo clone dominante em três biópsias realizadas em momentos (com intervalo de vários meses) e locais diferentes. Em meio às cadeias $V\beta$ expressas entre os linfócitos cutâneos, estão $V\beta 6, 9, 13, 14, 20$ e 21 ; as mais freqüentes entre elas foram $V\beta 13, 14$ e 21 .

Tiev et al. (162) estudaram o repertório de TCRs em 22 pacientes com ES com doença de longa evolução (11 tendo a forma difusa, e 11, a forma limitada, com duração média de doença em torno de 7,5 anos), 10 pacientes com fenômeno de Raynaud primário e 11 controles normais. Os autores não encontraram aumento de representação de nenhuma das cadeias $V\beta$ em células $CD4+$ ou $CD8+$ do sangue periférico dos pacientes; também não encontraram expansão oligoclonal significativamente maior nos pacientes, com relação aos outros grupos. Seis pacientes foram adicionalmente submetidos à biópsia de pele, não havendo expansão oligoclonal significativa e observando-se poucos linfócitos a infiltrar localmente o tecido. No entanto, a não detecção de expansão clonal pode dever-se, nesse estudo, à menor sensibilidade da técnica utilizada (análise imunoscópica) e, provavelmente, à redução do infiltrado inflamatório nas fases tardias de doença.

Observando-se em conjunto as evidências apresentadas nessa seção, concluímos que não há evidências da expressão aumentada de alguma das cadeias variáveis alfa ou beta nas células $CD4+$ ou $CD8+$ de pacientes com ES. Entre as células T $\gamma\delta$, observa-se a expressão aumentada de cadeias $V\delta 1$. A quantidade de células $CD4/CD8$ negativas está aumentada na ES, mas a expressão reduzida de $V\beta 11$ e $V\alpha 24JaQ$ sugere importante

redução da atividade das células NK. Em diversos estudos, a expansão oligoclonal de células T foi observada, sugerindo que essas células foram ativadas por antígenos.

2.3.4 TCRBV20S1 e TCRBV3S1 na esclerose sistêmica

Conforme já comentado, o auxílio de linfócitos T CD4+ com especificidade antigênica para DNA topoisomerase I é essencial para a produção de anticorpos antitopoisomerase I (129). Kuwana et al. (160) cultivaram clones desses linfócitos obtidos de dois pacientes com esclerose sistêmica e de três indivíduos saudáveis. Tanto pacientes como controles apresentavam HLA-DR11, molécula de MHC de classe II associada à presença de anticorpos antitopoisomerase I no soro de pacientes. Dos 15 clones de linfócitos analisados, observou-se que 14 deles utilizavam segmentos gênicos V β 20.1a (também chamado de TCRBV20S1A1N2 (15) ou BV20S1*1 (16)), J β 1 e C β 1. Esses linfócitos reconheciam uma porção específica da molécula denominada F5 (aminoácidos 276-386 da DNA topoisomerase I) e estavam presentes de modo semelhante em controles e pacientes. Outro estudo do mesmo grupo (158) avaliou a presença de linfócitos reativos à topoisomerase I no sangue de gêmeos monozigóticos (HLA-DR11+) discordantes para esclerose sistêmica. O fator antinuclear foi detectado no soro de ambos, mas somente o gêmeo com ES tinha anticorpos antitopoisomerase I. Ambos apresentavam linfócitos T CD4+ anti-topoisomerase I (reconhecendo principalmente a porção F5 da molécula), mas no gêmeo não-afetado esses linfócitos demoraram mais a proliferar e estavam em menor quantidade, sugerindo um perfil imaturo.

Mayo et al. (163) estudaram a expressão de TCRBV3S1 no sangue periférico de 18 pacientes com cirrose biliar primária (CBP) e síndrome CREST, 8 pacientes com CREST, 21 pacientes com CBP isolada e 20 controles normais. Usando PCR semiquantitativo, os autores observaram maior expressão de RNAm de TCRBV3S1 nos três grupos de pacientes, com relação aos controles, principalmente naqueles com CBP associado a síndrome de CREST. Nesse grupo, essas células compreendiam em média 35% do

repertório das células T medido pelo PCR semiquantitativo, refletindo ativação e/ou expansão desse subgrupo. O aumento da expressão de TCRBV3S1 deveu-se principalmente à expansão oligoclonal de células V β 3+, que, na maioria das vezes, eram CD8+. As células T clonalmente expandidas mostraram-se persistentes nos pacientes testados, mesmo após anos de intervalo entre os testes. Os autores concluíram que a expansão oligoclonal observada era devida à estimulação por algum antígeno ou superantígeno, podendo desempenhar um papel na patogenia da doença. No entanto, também consideraram a possibilidade de que essas células tivessem funções reguladoras de resposta imune.

2.3.5 O repertório de receptores de células T em modelos experimentais de esclerose sistêmica

Uma interessante evidência da importância do repertório de receptores de linfócito T em modelos animais de esclerose sistêmica vem dos camundongos *tsk1* (*tight skin mice*). Esses camundongos apresentam fibrose cutânea, fibrose de órgãos internos (mas não no pulmão) e anticorpos antinucleares, à semelhança do que ocorre na esclerose sistêmica (59). O desenvolvimento de fibrose nesses camundongos é dependente da atividade de linfócitos T CD4+ e da liberação de interleucina-4 (IL-4). Ong et al. (59) introduziram nesses camundongos transgenes que alteraram o repertório de células T, de forma que as células CD4+ expressassem exclusivamente cadeias V β 8.2 em combinação com repertório variado de cadeias alfa. Foi observado que os ratos transgênicos não apresentavam fibrose cutânea, embora as células CD4+ apresentassem um desenvolvimento normal. Os autores formularam a hipótese de que o uso exclusivo de cadeias V β 8.2 pelas células CD4+ pode ter evitado a geração de um subgrupo de células CD4+ capazes de diferenciar-se em células Th2 (produtoras de IL-4). Outra explicação aventada é que o uso exclusivo de V β 8.2 pelos linfócitos CD4+ pode levar a uma alteração do perfil de citocinas, de forma que as células CD4+ causadoras de fibrose (com um perfil Th2) diferenciem-se em células Th1

(com atividade antifibrose). Uma terceira hipótese aventada é que a polarização das células CD4⁺ para a linhagem Th2 possa não ocorrer eficientemente nos camundongos transgênicos. Há ainda a possibilidade de que ocorra falha no desenvolvimento das células $\gamma\delta$, possivelmente associadas à fibrose tecidual, nos camundongos transgênicos para TCRs $\alpha\beta$ (59), como já foi previamente observado (164).

Wooley et al. (165) estudaram o repertório de receptores de célula T em outro modelo experimental de esclerose sistêmica – os camundongos *tsk-2*. Esses camundongos mostram uma maior semelhança de acometimento cutâneo com a esclerose sistêmica humana, já que apresentam um marcado infiltrado inflamatório mononuclear na derme e tecido subcutâneo. Estudando amostras de pele e linfonodos, observou-se que as principais famílias de cadeias V β infiltrando a pele foram V β 11 (30% do total de linfócitos), V β 18 (20%) e V β 8.1 (16%). Essa distribuição foi diferente da observada nos linfonodos, onde os percentuais foram 4%, 5% e 12%, respectivamente. Esses resultados, mostrando um desvio na expressão de cadeias V β na pele, sugerem que uma população mais restrita e com limitadas especificidades antigênicas participa do infiltrado inflamatório da pele.

2.4 As células V β 3⁺ e V β 20⁺ em doenças humanas

A expressão das cadeias beta do TCR tem sido estudada em diversas doenças, reumáticas ou não, em que a atividade imunológica parece desempenhar um papel importante. Em alguns desses estudos, a expressão de cadeias V β 3 ou V β 20 destacou-se de modo significativo com relação às outras famílias de cadeias β . A seguir, apresentamos uma breve discussão desses estudos.

A expansão oligoclonal de células V β 3⁺ é observada em algumas doenças cutâneas. Entre essas doenças, estão o lúpus cutâneo crônico (166), a psoríase (167) e a dermatite atópica (168). Na psoríase, as células V β 3⁺ expandidas localizadas na pele são predominantemente CD8⁺, sendo que, na dermatite atópica (onde predominam os linfócitos CD4⁺), não parece haver expressão preferencial de células CD8⁺ V β 3⁺ (167). A expansão

preferencial de células V β 3+ com um mesmo CDR3, nas biópsias repetidas vários meses mais tarde, sugeriu aos autores que essas células tivessem um papel importante na patogênese, sendo pouco provável que se tratasse de células reguladoras (167). Expansão oligoclonal de células V β 3+ de doadores foi observada na pele de pacientes com doença aguda do enxerto versus hospedeiro após transplante alogênico de medula óssea (169).

A expansão de células V β 3+ também foi observada em doenças pulmonares. Wahlstrom et al. (170) mostrou uso preferencial de cadeias V β 3 em células T derivadas do sangue periférico e lavado bronquíolo-alveolar (LBA) em pacientes asmáticos. Na doença pulmonar induzida pelo berílio, foi observada expansão (restrita ao pulmão) de células V β 3 CD4+ com CDR3 muito semelhante em diversos pacientes, sugerindo que tenham sido ativadas por um mesmo antígeno (171). Essa expansão foi mantida em exames repetidos em pacientes com doença ativa (171). Na pneumonite de hipersensibilidade, observou-se expressão aumentada de V β 3 entre as células CD8+ (que é subtipo aparentemente responsável pelo processo inflamatório da doença) pulmonares com relação ao sangue periférico (172). A V β 3 é aparentemente a cadeia β mais freqüente entre as células CD4+ reativas aos antígenos de ácaros caseiros em indivíduos atópicos (173).

Nas doenças reumáticas, a expressão de cadeias V β 3 também tem sido estudada. Aumento da expressão linfócitos V β 3+ tem sido observado no sangue periférico (174, 175) e líquido sinovial (176-178) de pacientes com artrite reumatóide. Em alguns desses estudos, demonstrou-se que esses linfócitos são oligoclonais (174, 175, 178), apresentando por vezes CDR3 semelhantes em diferentes pacientes (174, 175). As células V β 3+ expandidas podem ser identificadas como CD4+ (175, 178) ou CD8+ (174). Na miosite por corpúsculos de inclusão, caracterizada pela infiltração predominante de linfócitos CD8+, células V β 3+ são freqüentemente encontradas no infiltrado inflamatório (179-183), sendo também demonstrada a oligoclonalidade dessas células em um dos estudos (180). Na polimiosite e dermatomiosite, também observou-se expressão aumentada de V β 3 em biópsias musculares (182). Num paciente com polimiosite, foi demonstrado que > 75 % das células CD8+ que invadem as células musculares eram V β 3+, sendo 60% dessas

pertencentes a um mesmo clone de linfócitos (184). Pacientes com poliangeíte microscópica apresentam expressão aumentada de V β 3 no sangue periférico (185). Além de doenças reumáticas, outras doença auto-imunes (como a doença de Graves (186) e a hepatite auto-imune (187)) apresentam expansão de células V β 3 nos tecidos afetados.

A expressão aumentada de células V β 20+ também foi demonstrada em algumas doenças. Na nefrite lúpica, observou-se expressão preferencial de células V β 20+ oligoclonais em 6 de 12 biópsias renais analisadas. Essas células apresentavam um perfil Th2 de produção de citocinas (188). Na artrite idiopática juvenil, foi observada expansão oligoclonal de células V β 20+ no líquido sinovial em 18 de 36 pacientes. Desses 18 pacientes, 14 tinham a forma pauciarticular da doença (189). Outros dois estudos (190, 191) também encontraram resultados semelhantes. Na artrite reumatóide, Choi et al. (192) observaram expansão oligoclonal de células V β 20+ CD8+ (mas não de células CD4+) no líquido sinovial em dois de três pacientes. Em pacientes atópicos com alergia a pólen de videira, foi observado aumento da expressão de V β 20 no sangue periférico, mas somente na época do ano associada à exposição ao antígeno (193). Na miastenia gravis, Gigliotti et al. (194) observaram expressão aumentada de V β 20 em células T CD4+ e CD8+ do sangue periférico.

Analisando-se em conjunto os estudos citados nessa seção, não está claro se as células V β 3+ e V β 20+ exercem predominantemente funções efetoras ou reguladoras nas diversas doenças estudadas. É possível que, em diferentes patologias, essas células exerçam funções diferentes ou até mesmo opostas.

2.5 Polimorfismos genéticos de receptores de células T na esclerose sistêmica e nas outras doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC)

2.5.1 Polimorfismos genéticos de receptores de células T na esclerose sistêmica

Há poucos estudos associando polimorfismos de receptores de células T com suscetibilidade à esclerose sistêmica. Kratz et al. (13) estudaram 60 pacientes com esclerose sistêmica e 150 controles, utilizando diversas enzimas de restrição para identificar polimorfismos em genes codificadores de cadeias constante gama, constante beta, constante alfa e variável alfa. Observou-se associação positiva entre esclerose sistêmica e um alelo de 11,3 kb identificado pela enzima de restrição *Pvu* II na região próxima ao segmento gênico $C\gamma_2$ (localizado no cromossomo 7p15). Como o sítio de restrição da enzima *Pvu* II está localizado numa seqüência de bases que não é transcrita, os autores sugeriram que a associação observada deva-se ao desequilíbrio de ligação com seqüências de bases (dentro do segmento $C\gamma_2$) que são expressas. Não houve associação da doença com os outros polimorfismos testados (entre eles, o polimorfismo localizado próximo ao segmento $C\beta_2$ identificado pela enzima de restrição *Bgl* II, denominado $C\beta$ -*Bgl* II RFLP ou $C\beta_2$ -1(17)).

Arnett et al. (12) estudaram 14 pacientes com ES, 20 pacientes de LES e 54 controles normais. Nesse estudo, a freqüência das variantes alélicas do polimorfismo $C\beta_2$ -*Bgl* II RFLP nos pacientes com ES não foi diferente da dos controles. No entanto, houve diferença significativa ($p = 0,02$, sem ajuste para múltiplas comparações) entre pacientes com ES e LES. Os autores consideram os resultados apenas como preliminares, dado o pequeno número de pacientes, e sugeriram que o estudo de genes que codificam as cadeias $V\beta$ seria de grande interesse pela sua importância funcional.

2.5.2 Os polimorfismos genéticos de receptores de células T nas outras DDTC

Os polimorfismos genéticos de TCR têm sido estudados em diversas doenças difusas do tecido conjuntivo, além da esclerose sistêmica, principalmente na artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjögren.

Na artrite reumatóide, que concentra a maior parte dos estudos, polimorfismos relacionados às cadeias $V\alpha$, $V\beta$, $C\beta$ e σ têm sido analisados, obtendo-se resultados variáveis (revisado por Dresch et al. (99)). Por exemplo, a associação de polimorfismo do TCRBV8 com a doença mostrou-se positiva em dois estudos (195, 196) (em um deles somente em pacientes HLA-DR4+ (195)), mas outros quatro estudos testando o mesmo polimorfismo foram negativos (197-200). Dresch et al. (201) avaliaram a associação de polimorfismos dos segmentos gênicos TCRBV20S1 e TCRBV3S1 com a suscetibilidade para artrite reumatóide em 80 pacientes caucasóides sul-brasileiros. A distribuição das frequências alélicas e genótípicas não foram significativamente diferentes em pacientes e controles. Na artrite idiopática juvenil pauciarticular, dois estudos realizados em populações diferentes mostraram associação da doença com um alelo nulo do TCRBV6.1 em pacientes que apresentavam HLA-DQA1*0101 (202, 203).

No lúpus eritematoso sistêmico (LES), diversos estudos encontraram associações significativas de polimorfismos ou mutações nos genes codificadores de cadeias zeta de TCR (envolvidas na transdução do sinal após ativação do TCR) com a doença (204-207), apesar de os resultados nem sempre terem sido reproduzidos (208). Estudos tentando associar polimorfismos genéticos de TCR beta (209-213) e gama (212) com LES obtiveram resultados negativos. Tebib et al. (214) observaram associação de um polimorfismo de TCR alfa com lúpus eritematoso sistêmico em pacientes americanos, mas essa associação não se confirmou em outro estudo (215). Frank et al. (216) observaram associação de um par de polimorfismos localizados nos segmentos de $C\beta 1$ e $C\beta 2$ com a presença de anticorpos anti-SSA (Ro) em pacientes lúpicos.

Na síndrome de Sjögren primária, Kay et al. (217) observaram prevalência significativamente menor de homozigotos para o alelo TCRBV13S2*2 na doença, em comparação com controles. Os autores desse estudo avaliaram somente pacientes com síndrome de Sjögren associada a hipergamaglobulinemia. Nesse mesmo estudo, não houve associação da doença com um polimorfismo do TCRBV2S1. Manavalan et al. (213), estudando um polimorfismo do TCRBV7.2 (localizado na mesma região do segmento

gênico TCRBV13S2), observaram associação entre a variante alélica representando uma deleção e a síndrome de Sjögren. Essa associação restringiu-se aos pacientes com anticorpos anti-SSA (Ro) positivos. Lawson et al. (218) estudaram um polimorfismo bialélico do TCRBV6S7 e um polimorfismo de inserção/deleção consistindo numa região que contém uma cópia extra do alelo TCRBV13S2*1, um segmento TCRBV7S3 extra e o pseudogene TCRBV9S2. Observou-se maior proporção de indivíduos com a inserção entre os pacientes com síndrome de Sjögren do que nos controles, enquanto não houve diferença significativa com relação aos alelos do TCRBV6S7. De modo geral, os dados relacionados aos polimorfismos do TCRBV13 são aparentemente explicados pela presença marcante de células V β 13+ no infiltrado inflamatório acometendo as glândulas salivares menores na síndrome de Sjögren (219).

2.6 Os polimorfismos genéticos do TCRBV20S1 e TCRBV3S1

2.6.1 Os polimorfismos genéticos do TCRBV20S1

O TCRBV20S1 (denominado TRBV30 pelo HGNC (14), e previamente conhecido como TCRBV18) apresenta diversas variantes polimórficas (15-17). As mais freqüentes dessas foram descritas por Charmley et al. (17). A variante BV20S1A1N1 (15) (BV20S1*3 ou V β 18A (16)) apresenta citosina nas posições 524, 620 e 661 do segmento gênico, sendo a mais freqüente na população estudada por Charmley et al. (17). A variante BV20S1A1N2 (15) (BV20S1*1 ou V β 18B (16)) apresenta uma substituição silenciosa por timina na posição 661 (17). A variante BV20S1A2P (15) (BV20S1*4 ou V β 18C (16)) apresenta substituições por timina nas posições 524, 620 e 661 (17). Nesse alelo, a substituição silenciosa na posição 661 não teria expressão funcional, e a substituição na posição 620 levaria a uma substituição de prolina por serina no produto do gene. No entanto, a substituição na posição 524 leva à introdução de um códon de terminação (*stop codon*), impedindo a transcrição do segmento e, portanto, produzindo um alelo nulo. Charmley et al.

(17) observaram que a substituição na posição 524 modifica o sítio de restrição da enzima *Kpn* I, impedindo a ação da enzima. Portanto, quando o DNA é submetido à amplificação por PCR com os *primers* específicos, seguida pela digestão pela enzima *Kpn* I (PCR-RFLP), indivíduos homocigotos para o alelo nulo podem ser identificados pela presença de uma banda única de 235 pares de bases (pb) na eletroforese no gel de agarose a 1%. O DNA de indivíduos que não apresentam o alelo nulo é identificado pela presença de duas bandas (100 e 135 pb), enquanto heterocigotos mostram três bandas (100, 135 e 235 pb) (Figura 9b) (201).

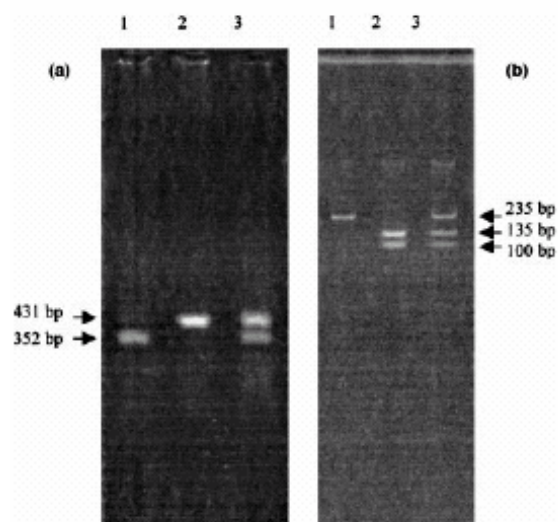


Figura 9. Exemplo da análise molecular dos polimorfismos do segmento gênico TCRBV3S1 (a) e do TCRBV20S1 (b). Fonte: Dresch et al. (220).

Apesar de Charmley et al. (17) terem descrito mais precisa e detalhadamente a presença do alelo nulo do segmento V β 20, Malhotra et al. (18), usando métodos e tecnologia diferentes, haviam descrito o mesmo polimorfismo em artigo publicado poucos meses antes.

Na amostra testada por Charmley et al. (17), composta por 76 pessoas (152 cromossomos), a frequência alélica do alelo nulo foi 32%. Onze por cento dos indivíduos

testados foram homozigotos para o alelo nulo e, portanto, seriam incapazes de produzir células que apresentam cadeias V β 20. De fato, a expressão de RNA mensageiro do TCRBV20S1 foi detectada em todos os indivíduos, menos naqueles que eram homozigotos para o alelo nulo. Em indivíduos heterozigotos, expressão do TCRBV20S1 ocorreu em níveis detectáveis (17). Esses achados estão de acordo com os descritos por Malhotra et al. (18), em que se observaram expressão muito baixa da células V β 20+ em homozigotos para o alelo nulo, níveis intermediários para os heterozigotos e níveis elevados para homozigotos para o alelo funcionante.

O segmento gênico TCRBV20S1 está localizado junto ao final 3' do complexo gênico TCR β e está próximo a um dos segmentos gênicos (C β 2) que codificam as regiões constantes das cadeias beta dos TCRs (17). Interessantemente, o TCRBV20S1 é o único segmento gênico codificador de cadeias variáveis beta nessa posição, estando em posição análoga ao V β 14 do camundongo (17, 98). Isso tem como consequência que os polimorfismos do TCRBV20S1 estejam em desequilíbrio de ligação com alguns polimorfismos do segmento C β 2 (17). No entanto, não houve desequilíbrio de ligação com o polimorfismo C β 2-1 (C β -*Bgl* II RFLP) e com polimorfismos das famílias V β 1, V β 8 e V β 11(17).

Influências raciais parecem alterar a prevalência dos alelos do TCRBV20S1. Barron et al. (16), estudando uma população americana, observaram frequência alélica significativamente mais elevada do alelo nulo (BV20S1A2P) em caucasóides (0,20) do que em afro-americanos (0,06). Na população urbana de Porto Alegre/RS, a frequência do alelo nulo foi praticamente a mesma que a relatada no estudo americano (0,19 em caucasóides e 0,06 em afro-brasileiros) (220).

2.6.2 O polimorfismo genético do TCRBV3S1

O polimorfismo em questão é uma variante alélica definida pela substituição de citosina por timina (C/T) localizada dentro da região espaçadora de 23 pares de bases da

seqüência de sinal de recombinação (RSS) do segmento gênico TCRBV3S1 (19, 201) (TRBV3-1 na nomenclatura do HGNC (14)). A substituição de citosina por timina cria um sítio de restrição para a enzima *Pvu* II dentro da RSS do TCRBV3S1. Quando o DNA amplificado com os *primers* específicos é submetido à digestão com *Pvu* II, indivíduos homocigotos para o alelo 1 (sem a substituição C/T) podem ser identificados pela presença de uma banda única de DNA no gel de agarose (431 pb), refletindo a ausência do sítio de restrição. Homocigotos para o alelo 2 (que apresenta a substituição C/T) são identificados pela presença de uma banda com 352 pb (o fragmento com 79 pb não pode ser observado no gel de agarose a 1%), enquanto, nos heterocigotos, duas bandas (352 e 431 pb) são observadas (Figura 9a) (201).

Apesar do sítio polimórfico estar localizado na região espaçadora não-conservada da RSS, essa variante alélica está associada com o nível de células T V β 3.1+ no sangue periférico. Indivíduos homocigotos para o alelo 1 têm baixa freqüência de células V β 3.1+ (em média 1,2% do total de células CD3+ CD4+). Indivíduos heterocigotos apresentam freqüência intermediária (em média 4.7%), enquanto que os homocigotos para o alelo 2 têm freqüência mais elevada de células V β 3.1+ (8,1% em média) no sangue periférico. Aparentemente, a substituição C/T na região espaçadora da RSS afeta a recombinação V-D-J, aumentando a capacidade de produzir receptores de células T com a utilização de cadeias V β 3.1 (19).

Alguns estudos avaliaram a influência das características raciais na prevalência do polimorfismo do TCRBV3S1. De Inocência et al. (221) observaram maior prevalência do alelo 1 (associado a níveis mais baixos de células CD4+ e CD8+ V β 3.1+) em afro-americanos do que em caucasóides (freqüências alélicas de 0,68 e 0,43, respectivamente). Dresch et al. (220), estudando a população da região urbana de Porto Alegre/RS, também observaram freqüência significativamente maior do alelo 1 na população afro-brasileira (0,68), em comparação com a caucasóide (0,54).

3. JUSTIFICATIVA PARA A PESQUISA

O presente estudo justifica-se pela necessidade da identificação dos fatores de risco para a esclerose sistêmica e também pela necessidade de melhorar a compreensão a respeito dos mecanismos imunogenéticos que levam ao desenvolvimento da doença. Conforme já comentado, há fortes evidências de que os linfócitos T e o seu repertório de receptores celulares estão importantemente relacionados à fisiopatogenia dessa doença. Portanto, consideramos relevante o estudo de polimorfismos genéticos do TCRBV20S1 e TCRBV3S1, já que esses alteram significativamente o repertório de células T, podendo estar implicados na suscetibilidade à esclerose sistêmica e a outras doenças difusas do tecido conjuntivo. Segundo nosso conhecimento, não há estudos prévios abordando a possibilidade de associação desses polimorfismos com o risco para o desenvolvimento de esclerose sistêmica.

4. OBJETIVOS DO ESTUDO

4.1 Objetivo geral

1- Estudar os polimorfismos genéticos de TCRBV3S1 e TCRBV20S1 em pacientes com esclerose sistêmica e controles normais.

4.2 Objetivos específicos

1- Comparar as frequências alélicas e genótípicas 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 de esclerose sistêmica.

2- Comparar as frequências alélicas e genótípicas dos alelos do TCRBV3S1 em pacientes e controles e calcular a razão de chances da presença do alelo 1 do TCRBV3S1 para o desenvolvimento de esclerose sistêmica.

3- Estudar as associações das variantes alélicas do TCRBV20S1 e do TCRBV3S1 com as severidades das doenças cutânea, visceral e vascular periférica em pacientes com esclerose sistêmica.

4- Estudar as associações das variantes alélicas do TCRBV20S1 e do TCRBV3S1 com o perfil de auto-anticorpos na esclerose sistêmica.

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Medsger TA, Jr. Classification, Prognosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. Systemic Sclerosis. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 17-28.
2. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:211-37.
3. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984;27:645-53.
4. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995;63:48-56.
5. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004;50:1721-33.
6. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1168-78.
7. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002;168:3649-59.
8. Yurovsky VV, Wigley FM, Wise RA, White B. Skewing of the CD8+ T-cell repertoire in the lungs of patients with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 1996;48:84-97.
9. White B, Yurovsky VV. Oligoclonal expansion of V delta 1+ gamma/delta T-cells in systemic sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci* 1995;756:382-91.
10. LaRocque R, Robinson MA. Diversity in the human T cell receptor beta chain. *Hum Immunol* 1996;48:3-11.
11. Mackelprang R, Carlson CS, Subrahmanyam L, Livingston RJ, Eberle MA, Nickerson DA. Sequence variation in the human T-cell receptor loci. *Immunol Rev* 2002;190:26-39.

12. Arnett FC, Bias WB, McLean RH, Engel M, Duvic M, Goldstein R, et al. Connective tissue disease in southeast Georgia. A community based study of immunogenetic markers and autoantibodies. *J Rheumatol* 1990;17:1029-35.
13. Kratz LE, Boughman JA, Pincus T, Cohen DI, Needleman BW. Association of scleroderma with a T cell antigen receptor gamma gene restriction fragment length polymorphism. *Arthritis Rheum* 1990;33:569-73.
14. Eyre TA, Ducluzeau F, Sneddon TP, Povey S, Bruford EA, Lush MJ. The HUGO Gene Nomenclature Database, 2006 updates. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D319-21.
15. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995;42:455-500.
16. Barron KS, Deulofeut H, Robinson MA. TCRBV20S1 allele frequencies vary among human populations. *Immunogenetics* 1995;41:383-5.
17. 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* 1993;177:135-43.
18. Malhotra U, Spielman R, Concannon P. Variability in T cell receptor V beta gene usage in human peripheral blood lymphocytes. Studies of identical twins, siblings, and insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Immunol* 1992;149:1802-8.
19. Posnett DN, Vissinga CS, Pambuccian C, Wei S, Robinson MA, Kostyu D, 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* 1994;179:1707-11.
20. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
21. Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis and related diseases. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:557-61.
22. Mayes MD. Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:239-54.

23. Medsger TA, Masi AT. Epidemiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Intern Med* 1971;74:714-21.
24. Clements PJ, Medsger TA, Jr., Feghali CA. Cutaneous Involvement in Systemic Sclerosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. *Systemic Sclerosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 129-50.
25. Matucci-Cerinic M, Kahaleh MB, LeRoy EC. Vascular Involvement in Systemic Sclerosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. *Systemic Sclerosis*. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. p. 153-74.
26. Maricq HR, LeRoy EC, D'Angelo WA, Medsger TA, Rodnan GP, Sharp GC, et al. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23:183-9.
27. Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Rohde LE, Pinotti AF, et al. Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonary disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:286-94.
28. White B. Pulmonary Fibrosis in Systemic Sclerosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. *Systemic Sclerosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 163-83.
29. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1581-6.
30. Schurawitzki H, Stiglbauer R, Graninger W, Herold C, Polzleitner D, Burghuber OC, et al. Interstitial lung disease in progressive systemic sclerosis: high-resolution CT versus radiography. *Radiology* 1990;176:755-9.
31. Remy-Jardin M, Remy J, Wallaert B, Bataille D, Hatron PY. Pulmonary involvement in progressive systemic sclerosis: sequential evaluation with CT, pulmonary function tests, and bronchoalveolar lavage. *Radiology* 1993;188:499-506.
32. Warrick JH, Bhalla M, Schabel SI, Silver RM. High resolution computed tomography in early scleroderma lung disease. *The Journal of Rheumatology* 1991;18:1520-8.

33. Diot E, Boissinot E, Asquier E, Guilmot JL, Lemarie E, Valat C, et al. Relationship between abnormalities on high-resolution CT and pulmonary function in systemic sclerosis. *Chest* 1998;114:1623-9.
34. Denton CP, Black CM. Pulmonary Vascular Involvement in Systemic Sclerosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. *Systemic Sclerosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 184-194.
35. Steen VD, Graham G, Conte C, Owens G, Medsger TA. Isolated diffusing capacity reduction in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992;35:765-70.
36. Weinstein WM, Kadell BM. The Gastrointestinal Tract in Systemic Sclerosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. *Systemic Sclerosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 293-308.
37. Pitrez EH, Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Vieira MV, et al. Oesophageal dysmotility in systemic sclerosis: comparison of HRCT and scintigraphy. *Br J Radiol* 2006;79:719-24.
38. Follansbee WP, Marroquin OC. Cardiac Involvement in Systemic Sclerosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. *Systemic sclerosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 195-220.
39. Steen V. Renal Involvement in Systemic Sclerosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. *Systemic Sclerosis*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 279-92.
40. Cepeda EJ, Reveille JD. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:723-32.
41. Fujimoto M, Sato S. B lymphocytes and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:746-51.
42. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:778-84.

43. Henault J, Robitaille G, Senecal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006;54:963-73.
44. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, et al. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998;101:2029-35.
45. Barnett AJ, Miller MH, Littlejohn GO. A survival study of patients with scleroderma diagnosed over 30 years (1953-1983): the value of a simple cutaneous classification in the early stages of the disease. *J Rheumatol* 1988;15:276-83.
46. Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000;43:444-51.
47. Rodnan GP, Fennel RH. Progressive systemic sclerosis sine scleroderma. *Journal of the American Medical Association* 1962;180:665--70.
48. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
49. LeRoy EC, Maricq HR, Kahaleh MB. Undifferentiated connective tissue syndromes. *Arthritis Rheum* 1980;23:341-3.
50. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E, et al. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001;44:735-6.
51. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28:1573-6.
52. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease--an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific

antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *The American Journal of Medicine* 1972;52:148-59.

53. Herrick AL, Worthington J. Genetic epidemiology: systemic sclerosis. *Arthritis Res* 2002;4:165-8.

54. Tan FK, Arnett FC. Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:511-9.

55. Ahmed SS, Tan FK, Arnett FC. The complex genetics of scleroderma. *Am J Med* 2002;112:584-6.

56. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr., Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:1956-63.

57. Harvey G, Black C, Maddison P, McHugh N. Characterization of antinucleolar antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and their relatives. *J Rheumatol* 1997;24:477-84.

58. Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, et al. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* 1996;39:1362-70.

59. Ong CJ, Ip S, Teh SJ, Wong C, Jirik FR, Grusby MJ, et al. A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell Immunol* 1999;196:60-8.

60. Christner PJ, Peters J, Hawkins D, Siracusa LD, Jimenez SA. The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum* 1995;38:1791-8.

61. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996;98:785-92.

62. Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, Ikeda RM, van der Water J, Eklund J, et al. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med* 1981;153:1640-59.

63. Assassi S, Tan FK. Genetics of scleroderma: update on single nucleotide polymorphism analysis and microarrays. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:761-7.
64. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:678-81.
65. Ohtsuka T, Yamakage A, Yamazaki S. The polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2002;147:458-63.
66. Lee EB, Kim JY, Lee YJ, Abdallah A, Lympany P, Song YW. Transforming growth factor-beta1 polymorphisms in Korean patients with systemic sclerosis. *Tissue Antigens* 2004;63:491-5.
67. Shaw BE, Maldonado H, Madrigal JA, Smith C, Petronzelli F, Mayor NP, et al. Polymorphisms in the TNFA gene promoter region show evidence of strong linkage disequilibrium with HLA and are associated with delayed neutrophil engraftment in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2004;63:401-11.
68. Hamamdžić D, Kasman LM, LeRoy EC. The role of infectious agents in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:694-8.
69. Danese S, Zoli A, Cremonini F, Gasbarrini A. High prevalence of *Helicobacter pylori* type I virulent strains in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27:1568-9.
70. Neidhart M, Kuchen S, Distler O, Bruhlmann P, Michel BA, Gay RE, et al. Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42:389-92.
71. Ferri C, Zakrzewska K, Longombardo G, Giuggioli D, Storino FA, Pasero G, et al. Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:718-20.
72. Ohtsuka T, Yamazaki S. Increased prevalence of human parvovirus B19 DNA in systemic sclerosis skin. *Br J Dermatol* 2004;150:1091-5.

73. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:520-6.
74. Janowsky EC, Kupper LL, Hulka BS. Meta-analyses of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. *N Engl J Med* 2000;342:781-90.
75. Lydyard P, Grossi C. Cells Involved in the Immune Response. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 5th ed. London: Mosby International; 1998. p. 14-30.
76. Rook G, Balkwill F. Cell-Mediated Immune Reactions. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 5th ed. London: Mosby International; 1998.
77. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-88.
78. Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2272-9.
79. Giacomelli R, Cipriani P, Fulminis A, Barattelli G, Matucci-Cerinic M, D'Alo S, et al. Circulating gamma/delta T lymphocytes from systemic sclerosis (SSc) patients display a T helper (Th) 1 polarization. *Clin Exp Immunol* 2001;125:310-5.
80. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:233-42.
81. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006;354:1166-76.
82. Sigal LH. Basic science for the clinician 32: T-cells with regulatory function. *J Clin Rheumatol* 2005;11:286-9.
83. Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005;204:195-207.
84. Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *J Clin Invest* 2004;114:1218-21.
85. Cruvinel WM, Andrade LC. Células R regulatórias (CD4+CD25+). *Sinopse de Reumatologia* 2006;8:19-28.

86. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 2002;195:637-41.
87. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004;114:1379-88.
88. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002;195:625-36.
89. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114:1198-208.
90. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, et al. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 2003;112:1037-48.
91. Filaci G, Fravega M, Fenoglio D, Rizzi M, Negrini S, Viggiani R, et al. Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes. *Clin Exp Med* 2004;4:86-92.
92. Filaci G, Bacillieri S, Fravega M, Monetti M, Contini P, Ghio M, et al. Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:6452-7.
93. Filaci G, Fravega M, Negrini S, Procopio F, Fenoglio D, Rizzi M, et al. Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol* 2004;65:142-56.
94. Owen M. T-Cell Receptors and MHC Molecules. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 5th ed. London: Mosby International; 1998. p. 83-92.
95. Yamamoto K. Significance of antigen-specific T cell clones in collagen diseases: analyses with a novel T cell clonality evaluation system. *Intern Med* 1997;36:242-7.
96. Owen M, Steward M. Antigen Recognition. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 5th ed. London: Mosby International; 1998. p. 107-120.
97. Feldmann M. Cell Cooperation in the Antibody Response. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. London: Mosby International; 1998. p. 139-155.

98. 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* 1988;101:149-72.
99. Dresch C, Marasca JA, Canabarro UP, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA. Linfócitos T, o rearranjo do receptor de células T (TCR) e a utilização de polimorfismos do TCR como marcadores em artrite reumatóide [T lymphocytes, T cell receptor (TCR) gene rearrangement and usage of TCR polymorphisms as markers in rheumatoid arthritis]. *Rev Bras Reumatol* 2001;41:21-6.
100. Westwood O, Hay F. The Generation of Diversity. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 5th ed. London: Mosby International; 1998. p. 93-106.
101. Currier JR, Yassai M, Robinson MA, Gorski J. Molecular defects in TCRBV genes preclude thymic selection and limit the expressed TCR repertoire. *J Immunol* 1996;157:170-5.
102. Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation. *Bull World Health Organ* 1993;71:113-5.
103. Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 2002;79:464-70.
104. Deulofeut H, Wilderson JL, Barron KS, Robinson MA. TCRBV12 genes are polymorphic but the protein products encoded by each gene are conserved. *Hum Immunol* 1995;43:227-30.
105. Davey MP, Meyer MM, Munkirs DD, Babcock D, Braun MP, Hayden JB, et al. T-cell receptor variable beta genes show differential expression in CD4 and CD8 T cells. *Hum Immunol* 1991;32:194-202.
106. Gulwani-Akolkar B, Posnett DN, Janson CH, Grunewald J, Wigzell H, Akolkar P, et al. T cell receptor V-segment frequencies in peripheral blood T cells correlate with human leukocyte antigen type. *J Exp Med* 1991;174:1139-46.

107. Hawes GE, Struyk L, van den Elsen PJ. Differential usage of T cell receptor V gene segments in CD4+ and CD8+ subsets of T lymphocytes in monozygotic twins. *J Immunol* 1993;150:2033-45.
108. Liao NS, Maltzman J, Raulet DH. Positive selection determines T cell receptor V beta 14 gene usage by CD8+ T cells. *J Exp Med* 1989;170:135-43.
109. Geursen A, Skinner MA, Townsend LA, Perko LK, Farmiloe SJ, Peake JS, et al. Population study of T cell receptor V beta gene usage in peripheral blood lymphocytes: differences in ethnic groups. *Clin Exp Immunol* 1993;94:201-7.
110. Grunewald J, Janson CH, Wigzell H. Biased expression of individual T cell receptor V gene segments in CD4+ and CD8+ human peripheral blood T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1991;21:819-22.
111. van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, et al. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000;40:336-45.
112. Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G, Liu Z, Smith D, Berlocco P, et al. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28-regulatory T cells. *J Immunol* 1998;161:5193-202.
113. Fernandes S, Chavan S, Chitnis V, Kohn N, Pahwa S. Simplified fluorescent multiplex PCR method for evaluation of the T-cell receptor V beta-chain repertoire. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:477-83.
114. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005;115:930-9.
115. Fujishima M, Hirokawa M, Fujishima N, Sawada K. TCRalpha repertoire diversity of human naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Immunol Lett* 2005;99:193-7.
116. Pennesi G, Liu Z, Ciubotariu R, Jiang S, Colovai A, Cortesini R, et al. TCR repertoire of suppressor CD8+CD28- T cell populations. *Hum Immunol* 1999;60:291-304.

117. Kumar V, Sercarz EE. The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4⁺ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med* 1993;178:909-16.
118. Kumar V, Stellrecht K, Sercarz E. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Exp Med* 1996;184:1609-17.
119. Quinn A, McInerney B, Reich EP, Kim O, Jensen KP, Sercarz EE. Regulatory and effector CD4 T cells in nonobese diabetic mice recognize overlapping determinants on glutamic acid decarboxylase and use distinct V beta genes. *J Immunol* 2001;166:2982-91.
120. Hawkins RA, Claman HN, Clark RA, Steigerwald JC. Increased dermal mast cell populations in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis? *Ann Intern Med* 1985;102:182-6.
121. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J* 1987;6:1899-904.
122. Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *Journal of Experimental Medicine* 1979;149:1326-35.
123. Jayson MI. Systemic sclerosis: a collagen or microvascular disease? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;288:1855-7.
124. Klareskog L, Gustafsson R, Scheynius A, Hallgren R. Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptors in the skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1534-41.
125. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum* 1991;34:978-83.
126. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999;117:159-65.

127. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996;271:17779-84.
128. Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 2005;39:1-7.
129. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Immunol* 1995;155:2703-14.
130. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 2004;140:37-50.
131. Jimenez SA, Artlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:86-90.
132. Harrison NK, Myers AR, Corrin B, Soosay G, Dewar A, Black CM, et al. Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:706-13.
133. Silver RM, Metcalf JF, Stanley JH, LeRoy EC. Interstitial lung disease in scleroderma. Analysis by bronchoalveolar lavage. *Arthritis Rheum* 1984;27:1254-62.
134. Wallaert B, Hatron PY, Grosbois JM, Tonnel AB, Devulder B, Voisin C. Subclinical pulmonary involvement in collagen-vascular diseases assessed by bronchoalveolar lavage. Relationship between alveolitis and subsequent changes in lung function. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:574-80.
135. Whiteside TL, Kumagai Y, Roumm AD, Almendinger R, Rodnan GP. Suppressor cell function and T lymphocyte subpopulations in peripheral blood of patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1983;26:841-7.
136. Gustafsson R, Totterman TH, Klareskog L, Hallgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:40-5.

137. Horikawa M, Hasegawa M, Komura K, Hayakawa I, Yanaba K, Matsushita T, et al. Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity. *J Invest Dermatol* 2005;125:731-7.
138. Wanchu A, Singh VK, Yadav VS, Biswas S, Misra R, Agarwal SS. Lack of natural killer cell augmentation in vitro by human interferon gamma in a subset of patients with systemic sclerosis. *Pathobiology* 1995;63:288-92.
139. Kantor TV, Whiteside TL, Friberg D, Buckingham RB, Medsger TA, Jr. Lymphokine-activated killer cell and natural killer cell activities in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992;35:694-9.
140. Miller EB, Hiserodt JC, Hunt LE, Steen VD, Medsger TA, Jr. Reduced natural killer cell activity in patients with systemic sclerosis. Correlation with clinical disease type. *Arthritis Rheum* 1988;31:1515-23.
141. Riccieri V, Parisi G, Spadaro A, Scrivo R, Barone F, Moretti T, et al. Reduced circulating natural killer T cells and gamma/delta T cells in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2005;32:283-6.
142. Holcombe RF, Baethge BA, Wolf RE, Betzing KW, Stewart RM. Natural killer cells and gamma delta T cells in scleroderma: relationship to disease duration and anti-Sc1-70 antibodies. *Ann Rheum Dis* 1995;54:69-72.
143. Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, Ortolani C, De Silvestro G, Ruffatti A, et al. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993;52:272-7.
144. Hu PQ, Oppenheim JJ, Medsger TA, Jr., Wright TM. T cell lines from systemic sclerosis patients and healthy controls recognize multiple epitopes on DNA topoisomerase I. *J Autoimmun* 2006;26:258-67.
145. Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P, Ghersetich I, Lattanzio R, Pavan A, et al. Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 1998;41:327-34.

146. Yurovsky VV, Sutton PA, Schulze DH, Wigley FM, Wise RA, Howard RF, et al. Expansion of selected V delta 1+ gamma delta T cells in systemic sclerosis patients. *J Immunol* 1994;153:881-91.
147. Kahaleh MB, Fan PS, Otsuka T. Gammadelta receptor bearing T cells in scleroderma: enhanced interaction with vascular endothelial cells in vitro. *Clin Immunol* 1999;91:188-95.
148. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12319-24.
149. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996;97:111-9.
150. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 2000;43:2550-62.
151. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1602-13.
152. Yurovsky VV, White B. T cell repertoire in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995;12:97-105.
153. Sakamoto A, Sumida T, Maeda T, Itoh M, Asai T, Takahashi H, et al. T cell receptor V beta repertoire of double-negative alpha/beta T cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992;35:944-8.
154. Sumida T, Sakamoto A, Murata H, Makino Y, Takahashi H, Yoshida S, et al. Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med* 1995;182:1163-8.

155. Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med* 1996;184:765-70.
156. Cline AM, Radic MZ. Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity. *Clin Immunol* 2004;112:175-82.
157. Pittoni V, Valesini G. The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2002;1:154-61.
158. Kuwana M, Feghali CA, Medsger TA, Jr., Wright TM. Autoreactive T cells to topoisomerase I in monozygotic twins discordant for systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1654-9.
159. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T cell proliferative response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J Clin Invest* 1995;96:586-96.
160. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. Highly restricted TCR-alpha beta usage by autoreactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I: recognition of an immunodominant epitope. *J Immunol* 1997;158:485-91.
161. Lympny PA, Southcott AM, Welsh KI, Black CM, Boylston AW, du Bois RM. T-cell receptor gene usage in patients with fibrosing alveolitis and control subjects. *Eur J Clin Invest* 1999;29:173-81.
162. Tiev KP, Abriol J, Burland MC, Antonelli D, Klatzmann D, Cabane J, et al. T cell repertoire in patients with stable scleroderma. *Clin Exp Immunol* 2005;139:348-54.
163. Mayo MJ, Jenkins RN, Combes B, Lipsky PE. Association of clonally expanded T cells with the syndrome of primary biliary cirrhosis and limited scleroderma. *Hepatology* 1999;29:1635-42.
164. Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. The alpha beta T cell receptor can replace the gamma delta receptor in the development of gamma delta lineage cells. *Immunity* 1996;5:343-52.

165. Wooley PH, Sud S, Langendorfer A, Calkins C, Christner PJ, Peters J, et al. T cells infiltrating the skin of Tsk2 scleroderma-like mice exhibit T cell receptor bias. *Autoimmunity* 1998;27:91-8.
166. Furukawa F, Tokura Y, Matsushita K, Iwasaki-Inuzuka K, Onagi-Suzuki K, Yagi H, et al. Selective expansions of T cells expressing V beta 8 and V beta 13 in skin lesions of patients with chronic cutaneous lupus erythematosus. *J Dermatol* 1996;23:670-6.
167. Chang JC, Smith LR, Froning KJ, Schwabe BJ, Laxer JA, Caralli LL, et al. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9282-6.
168. Neuber K, Loliger C, Kohler I, Ring J. Preferential expression of T-cell receptor V beta-chains in atopic eczema. *Acta Derm Venereol* 1996;76:214-8.
169. Dietrich PY, Caignard A, Lim A, Chung V, Pico JL, Pannetier C, et al. In vivo T-cell clonal amplification at time of acute graft-versus-host disease. *Blood* 1994;84:2815-20.
170. Wahlstrom J, Gigliotti D, Roquet A, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J. T cell receptor Vbeta expression in patients with allergic asthma before and after repeated low-dose allergen inhalation. *Clin Immunol* 2001;100:31-9.
171. Fontenot AP, Falta MT, Freed BM, Newman LS, Kotzin BL. Identification of pathogenic T cells in patients with beryllium-induced lung disease. *J Immunol* 1999;163:1019-26.
172. Trentin L, Zambello R, Facco M, Tassinari C, Sancetta R, Siviero M, et al. Selection of T lymphocytes bearing limited TCR-Vbeta regions in the lung of hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:587-96.
173. Jarman ER, Hawrylowicz CM, Panagiotopolou E, O'Hehir RE, Lamb JR. Inhibition of human T-cell responses to house dust mite allergens by a T-cell receptor peptide. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:844-52.
174. Hingorani R, Monteiro J, Furie R, Chartash E, Navarrete C, Pergolizzi R, et al. Oligoclonality of V beta 3 TCR chains in the CD8+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 1996;156:852-8.

175. Goronzy JJ, Bartz-Bazzanella P, Hu W, Jendro MC, Walser-Kuntz DR, Weyand CM. Dominant clonotypes in the repertoire of peripheral CD4+ T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994;94:2068-76.
176. Alam A, Lule J, Coppin H, Lambert N, Mazieres B, De Preval C, et al. T-cell receptor variable region of the beta-chain gene use in peripheral blood and multiple synovial membranes during rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 1995;42:331-9.
177. Uematsu Y, Wege H, Straus A, Ott M, Bannwarth W, Lanchbury J, et al. The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8534-8.
178. Werfel T, Hentschel M, Kapp A, Renz H. Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4-producing allergen-specific T cells and restricted V beta repertoire in nickel-mediated contact dermatitis. *J Immunol* 1997;158:2500-5.
179. Amemiya K, Granger RP, Dalakas MC. Clonal restriction of T-cell receptor expression by infiltrating lymphocytes in inclusion body myositis persists over time. *Studies in repeated muscle biopsies. Brain* 2000;123 (Pt 10):2030-9.
180. Fyhr IM, Moslemi AR, Mosavi AA, Lindberg C, Tarkowski A, Oldfors A. Oligoclonal expansion of muscle infiltrating T cells in inclusion body myositis. *J Neuroimmunol* 1997;79:185-9.
181. Fyhr IM, Moslemi AR, Tarkowski A, Lindberg C, Oldfors A. Limited T-cell receptor V gene usage in inclusion body myositis. *Scand J Immunol* 1996;43:109-14.
182. Lindberg C, Oldfors A, Tarkowski A. Restricted use of T cell receptor V genes in endomysial infiltrates of patients with inflammatory myopathies. *Eur J Immunol* 1994;24:2659-63.
183. O'Hanlon TP, Dalakas MC, Plotz PH, Miller FW. The alpha beta T-cell receptor repertoire in inclusion body myositis: diverse patterns of gene expression by muscle-infiltrating lymphocytes. *J Autoimmun* 1994;7:321-33.

184. Bender A, Ernst N, Iglesias A, Dornmair K, Wekerle H, Hohlfeld R. T cell receptor repertoire in polymyositis: clonal expansion of autoaggressive CD8+ T cells. *J Exp Med* 1995;181:1863-8.
185. Simpson IJ, Skinner MA, Geursen A, Peake JS, Abbott WG, Fraser JD, et al. Peripheral blood T lymphocytes in systemic vasculitis: increased T cell receptor V beta 2 gene usage in microscopic polyarteritis. *Clin Exp Immunol* 1995;101:220-6.
186. Zhang J, Wang Y, Luo W, Shi B, Zhu B, Si L. [Antigen receptor V beta gene usage of T lymphocytes in diseased thyroids in patients with autoimmune thyroid diseases]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2001;30:268-72.
187. Arenz M, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohr HF. Limited T cell receptor Vbeta-chain repertoire of liver-infiltrating T cells in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998;28:70-7.
188. Murata H, Matsumura R, Koyama A, Sugiyama T, Sueishi M, Shibuya K, et al. T cell receptor repertoire of T cells in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2141-7.
189. Thompson SD, Grom AA, Bailey S, Luyrink L, Giannini EH, Murray K, et al. Patterns of T lymphocyte clonal expansion in HLA-typed patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1356-64.
190. Sioud M, Kjeldsen-Kragh J, Suleyman S, Vinje O, Natvig JB, Forre O. Limited heterogeneity of T cell receptor variable region gene usage in juvenile rheumatoid arthritis synovial T cells. *Eur J Immunol* 1992;22:2413-8.
191. Thompson SD, Murray KJ, Grom AA, Passo MH, Choi E, Glass DN. Comparative sequence analysis of the human T cell receptor beta chain in juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathies: evidence for antigenic selection of T cells in the synovium. *Arthritis Rheum* 1998;41:482-97.
192. Choi IH, Chwae Y, Lee SK, Chu M, Kim JD, Kim SJ. Discrepancy in T cell clonal expansions in synovial fluid and peripheral blood from rheumatoid arthritis patients. *Yonsei Med J* 1995;36:68-76.

193. Beyer K, Hausler T, Kircher M, Nickel R, Wahn U, Renz H. Specific V beta T cell subsets are associated with cat and birch pollen allergy in humans. *J Immunol* 1999;162:1186-91.
194. Gigliotti D, Lefvert AK, Jeddi-Tehrani M, Esin S, Hodara V, Pirskanen R, et al. Overexpression of select T cell receptor V beta gene families within CD4+ and CD8+ T cell subsets of myasthenia gravis patients: a role for superantigen(s)? *Mol Med* 1996;2:452-9.
195. Funkhouser SW, Concannon P, Charmley P, Vredevoe DL, Hood L. Differences in T cell receptor restriction fragment length polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:465-71.
196. Gao XJ, Ball EJ, Dombrowsky L, Olsen NJ, Pincus T, Khan MA, et al. Class II human leukocyte antigen genes and T cell receptor polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1988;85:14-6.
197. de Vries N, Prinsen CF, Mensink EB, van Riel PL, van't Hof MA, van de Putte LB. A T cell receptor beta chain variable region polymorphism associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:327-31.
198. Vandevyver C, Gu XX, Geusens P, Spaepen M, Philippaerts L, Cassiman JJ, 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 TCRBV11 polymorphisms. *Ann Rheum Dis* 1994;53:580-6.
199. 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* 1994;53:341-3.
200. Wallin J, Hillert J, Olerup O, Carlsson B, Strom H. Association of rheumatoid arthritis with a dominant DR1/Dw4/Dw14 sequence motif, but not with T cell receptor beta chain gene alleles or haplotypes. *Arthritis Rheum* 1991;34:1416-24.
201. 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* 2003;90:77-80.

202. Maksymowych WP, Gabriel CA, Luyrink L, Melin-Aldana H, Elma M, Giannini EH, et al. Polymorphism in a T-cell receptor variable gene is associated with susceptibility to a juvenile rheumatoid arthritis subset. *Immunogenetics* 1992;35:257-62.
203. 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* 1994;37:695-701.
204. Nambiar MP, Enyedy EJ, Warke VG, Krishnan S, Dennis G, Kammer GM, et al. Polymorphisms/mutations of TCR-zeta-chain promoter and 3' untranslated region and selective expression of TCR zeta-chain with an alternatively spliced 3' untranslated region in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2001;16:133-42.
205. Nambiar MP, Enyedy EJ, Warke VG, Krishnan S, Dennis G, Wong HK, et al. T cell signaling abnormalities in systemic lupus erythematosus are associated with increased mutations/polymorphisms and splice variants of T cell receptor zeta chain messenger RNA. *Arthritis Rheum* 2001;44:1336-50.
206. Tsuzaka K, Takeuchi T, Onoda N, Pang M, Abe T. Mutations in T cell receptor zeta chain mRNA of peripheral T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Autoimmun* 1998;11:381-5.
207. Takeuchi T, Tsuzaka K, Pang M, Amano K, Koide J, Abe T. TCR zeta chain lacking exon 7 in two patients with systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 1998;10:911-21.
208. Wu J, Edberg JC, Gibson AW, Tsao B, Kimberly RP. Single-nucleotide polymorphisms of T cell receptor zeta chain in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:2601-5.
209. Youinou P, Semana G, Muller S, Piette JC, Guillevin L, Jouquan J, et al. Interaction between certain major histocompatibility complex class II and T-cell receptor V beta alleles promotes the antibody production to extractable nuclear antigen-related peptides. *Hum Immunol* 1997;52:12-21.

210. 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* 1994;26:129-32.
211. Perl A, Divincenzo JP, Gergely P, Condemi JJ, Abraham GN. Detection and mapping of polymorphic KpnI alleles in the human T-cell receptor constant beta-2 locus. *Immunology* 1989;67:135-8.
212. Wong DW, Bentwich Z, Martinez-Tarquino C, Seidman JG, Duby AD, Quertermous T, et al. Nonlinkage of the T cell receptor alpha, beta, and gamma genes to systemic lupus erythematosus in multiplex families. *Arthritis Rheum* 1988;31:1371-6.
213. Manavalan SJ, Valiando JR, Reeves WH, Arnett FC, Necker A, Simantov R, 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* 2004;50:187-98.
214. Tebib JG, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D, Schur PH. Association between a T cell receptor restriction fragment length polymorphism and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1990;86:1961-7.
215. Huang DF, Siminovitch KA, Liu XY, Olee T, Olsen NJ, Berry C, et al. Population and family studies of three disease-related polymorphic genes in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1995;95:1766-72.
216. Frank MB, McArthur R, Harley JB, Fujisaku A. Anti-Ro(SSA) autoantibodies are associated with T cell receptor beta genes in systemic lupus erythematosus patients. *J Clin Invest* 1990;85:33-9.
217. Kay RA, Hutchings CJ, Ollier WE. A subset of Sjogren's syndrome associates with the TCRBV13S2 locus but not the TCRBV2S1 locus. *Hum Immunol* 1995;42:328-30.
218. Lawson CA, Donaldson IJ, Bowman SJ, Shefta J, Morgan AW, Gough A, 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* 2005;64:468-70.

219. Sumida T, Yonaha F, Maeda T, Tanabe E, Koike T, Tomioka H, et al. T cell receptor repertoire of infiltrating T cells in lips of Sjogren's syndrome patients. *J Clin Invest* 1992;89:681-5.
220. Dresch C, Nardi NB, Chies JA. TCRBV3S1 and TCRBV18 gene segment polymorphisms in Brazilian Caucasoid and Black populations. *Eur J Immunogenet* 2002;29:11-5.
221. 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* 1995;154:4836-41.

6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

TCRBV20S1 AND TCRBV3S1 GENE SEGMENTS POLYMORPHISMS IN SYSTEMIC SCLEROSIS

Markus Bredemeier¹, MD, MSc; Ricardo Machado Xavier¹, MD, PhD; Andréia Wieck², biologist; Karina Gatz Capobianco¹, MD, PhD; Eduardo Hennemann Pitrez³, MD; Luis Eduardo Paim Rohde⁴, MD, PhD; Antônio Fernando Furlan Pinotti⁴, MD, MSc; João Carlos Tavares Brenol¹, MD, PhD; José Artur Bogo Chies², PhD.

From the Divisions of ¹Rheumatology, ³Radiology, and ⁴Cardiology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and from the ²Genetics Department of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

Supported in part by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

Address reprint requests to:

Dr. Markus Bredemeier, Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 645, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

E-mail: markbred@terra.com.br

Address correspondence to:

Dr. Ricardo M. Xavier, Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 645, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

Telephone: +55 51 2101-8340; Fax: +55 51 3331-3834.

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Objective. To compare the frequencies of variants of TCRBV20S1 and TCRBV3S1 gene segments in systemic sclerosis (SSc) patients and in controls. The null allele (allele 2) of TCRBV20S1 is associated with reduced levels of V β 20+ T cells in the peripheral blood, while the allele 1 of the TCRBV3S1 is related to a low frequency of V β 3.1+ T cells.

Methods. One hundred thirty patients with SSc and 118 controls (healthy volunteers) were genotyped for TCRBV20S1 and 117 patients and 85 controls were genotyped for TCRBV3S1 variants by restriction fragment length polymorphism (RFLP) preceded by PCR. Patients were clinically evaluated using the m-Rodnan skin score, serology, pulmonary function tests, high resolution computed tomography (HRCT), and Doppler echocardiography.

Results. The genotypic frequencies of TCRBV20S1 were 0.46 (allele 1/allele 1), 0.43 (allele 1/allele 2), and 0.11 (allele 2/ allele 2) in SSc patients, while in controls the frequencies were 0.70, 0.26, and 0.04, respectively ($P < 0.001$). The Mantel-Haenszel odds ratio (stratified by race) of the allele 2 carrier state was 2.66 (95% CI: 1.58 to 4.49). The allelic and genotypic frequencies of the TCRBV3S1 gene segment did not differ significantly in patients and controls. However, among patients, allele 1 (TCRBV3S1) carriers had greater extent of interstitial lung disease on HRCT ($P = 0.034$).

Conclusion. Our results demonstrate that the null allele of the TCRBV20S1 and the allele 1 of TCRBV3S1 gene segments can be risk factors for the development of SSc and pulmonary fibrosis, respectively, suggesting a protective role of V β 20+ and V β 3.1+ cells in the pathogenic immune responses in this disease.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a disease characterized by a variable degree of vascular dysfunction, skin and visceral fibrosis, and circulating autoantibodies. The associated lung disease (interstitial fibrosis or vascular disease) is currently the most important cause of mortality in SSc (1). The etiology of SSc is unknown, although environmental and genetic factors have been implicated in the susceptibility to the disease (2).

The pathologic hallmarks of SSc are excessive collagen deposition and microvascular injury. The mechanisms leading to these changes are not completely understood, but immune system activation seems to play a central role in this process. In early phases of the disease, a mononuclear infiltrate consisting primarily of T cells and macrophages has been identified (3, 4). The activation of Th2 CD4⁺ T cells in the skin leads to the production of large amounts of interleukin-4 (IL-4). This enlarged production of interleukin-4 stimulates the production of transforming growth factor- β (TGF- β) by macrophages, which in turn induces fibroblasts collagen synthesis and proliferation (5). CD8⁺ T cells, which predominate in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of patients with fibrosing alveolitis associated with SSc, also produce mainly IL-4 (6). Oligoclonal expansion of T cells has been reported in skin biopsy specimens (7), BAL fluid (8, 9), and in peripheral blood (8, 9) from SSc patients. These findings probably reflect the proliferation of particular clones of T cells in response to certain antigens, suggesting that SSc is a specific antigen-driven autoimmune disease (5). T cells recognize antigens through the coupling of the T cell receptor (TCR) with antigenic peptides bound to MHC molecules in the surface of antigen presenting cells.

The TCRs most frequently expressed by peripheral T cells are composed by α and β chains, each of these being constituted by a variable and a constant region. The variable region of functional α and β chains is constituted by rearrangement of variable (V), diversity (D, in β chains only), and joining (J) gene segments (10). These gene segments present polymorphic variants (alleles), which affect the capacity to produce specific TCRs, influencing the T cell receptor repertoire. The TCR repertoire plays a central role in shaping

immune responses. Therefore, variation in the TCR genes may be related to the development of autoimmune diseases (11).

There are few studies investigating genetic polymorphisms of TCR gene segments in SSc (12, 13). None of these studies addressed polymorphisms in the gene segments encoding the variable beta ($V\beta$) chain of the TCR. In the present study, we analyzed polymorphisms in two different TCR beta variable (TCRBV) gene segments. The first polymorphism studied is located in the TCRBV20S1 gene segment (named TRBV30 by the HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee (14)) and results from a single nucleotide substitution (C/T) that introduces a stop codon inside the gene segment. Individuals homozygous for this null allele (here denominated allele 2, but previously known as BV20S1A2P (15), BV20S1*4 (16), or $V\beta$ 18C (17)) 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 (17). An intermediary level of functional $V\beta$ 20+ T cells is observed in the peripheral blood of individuals heterozygous for this polymorphism (18).

The second polymorphism is a single nucleotide polymorphism (C/T) located within the 23 bp spacer region of the TCRBV3S1 gene segment (TRBV3-1 in the HGNC nomenclature (14)) recombination signal sequence (RSS). This variation is associated with the level of $V\beta$ 3.1+ T cells in the peripheral pool. Individuals homozygous for allele 1 have a low frequency of $V\beta$ 3.1+ T cells (around 1% of the total CD3+ CD4+ T cells), whereas individuals homozygous for allele 2 have a higher frequency of $V\beta$ 3.1+ T cells (8.1%) and heterozygous individuals present an intermediate frequency (4.7%) (19).

In an attempt to identify new susceptibility markers for SSc we studied the frequencies of these two TCRBV polymorphisms in South Brazilian patients with SSc and compared them to the frequencies observed in healthy individuals from the same population.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls. One hundred fifty four patients with definite or strongly suspected SSc (according to the evaluation of experienced rheumatologists) were prospectively evaluated between April/2000 and December/2004. The patients were referred from the rheumatology units of four clinical centers (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital São Lucas da PUCRS, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, and Hospital Nossa Senhora da Conceição) and from private clinics in the city of Porto Alegre. All patients were Brazilian; most of them had European and/or African ancestry, and the great majority inhabited the urban area of Porto Alegre/RS. The sample was constituted by patients with long-standing or recently diagnosed disease. The evaluation of race was based in the observation of phenotypic characteristics (skin color, hair color and type); race was described as white (Caucasians), mixed or black. There were neither individuals of Asiatic origin nor Amerindians among the patients. To be included in the study, the patient should meet de American College of Rheumatology (ACR) criteria for SSc (20) or the criteria suggested by LeRoy and Medsger for diagnosis of early forms of SSc (objective evidence of Raynaud's phenomenon plus SD pattern on nailfold capillary microscopy or SSc selective autoantibodies; alternatively, subjective evidence of Raynaud's phenomenon plus SD pattern on capillaroscopy and SSc selective autoantibodies) (21). Patients with overlapping syndromes were excluded. However, patients with definite diagnosis of SSc (according to the ACR criteria) who developed inflammatory myopathy or secondary Sjögren's syndrome were not excluded from the analysis. All patients signed written informed consent before entry in the study.

The DNA of controls was obtained from a bank maintained at the Genetics Department from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). The bank was constituted by samples of unrelated subjects from the urban population of Porto Alegre/RS (the majority had European and/or African ancestry). These individuals were healthy blood donors, students, professors, or employees from the university. The recruitment of controls, the collection of blood samples, and the DNA extraction occurred between the years 1990

and 2000. Individuals presenting chronic or acute diseases were excluded from the sample, as well as those presenting family history of genetic diseases. The assessment of race was performed observing phenotypic characteristics. Amerindians and subjects with Asiatic origin were excluded.

Clinical evaluation. All patients were interviewed and examined according to an extensive questionnaire directed to the evaluation of end-organ damage. The severity and extent of cutaneous disease was quantified using the modified Rodnan skin score (22). Disease subtype was classified as follows: diffuse cutaneous SSc (truncal and acral skin tautness), limited cutaneous SSc (skin tautness restricted to extremities and/or face), and limited SSc (absence of skin tautness) (21, 23). Clinical characteristics of the disease were observed and recorded as previously described (24). The presence of 'SD pattern' on nailfold capillary microscopy was defined qualitatively by the observation of avascular areas and/or dilated capillaries according to the description of Maricq et al. (25). Blood samples were collected for DNA extraction, complete blood count, serology, erythrocyte sedimentation rate (ESR), and biochemistry. The presence of antinuclear antibodies (ANA) and antitopoisomerase I antibodies was tested by indirect immunofluorescence method (HEp-2 cells as substrate) and by enzyme immunoassay (QUANTA lite® Scl-70 ELISA, INOVA Diagnostics), respectively. ANA was considered positive in titers $\geq 1:80$. The presence of anticentromere antibodies was determined based on the observation of the typical fluorescence pattern on HEp-2 cells.

Pulmonary high-resolution computed tomography (HRCT) was performed in most patients. All HRCT scans were assessed for the presence of interstitial disease (ground-glass opacities, reticular pattern, and honeycombing) by two radiologists. Additionally, they estimated the percentage of parenchyma affected by honeycombing/reticular pattern in both lungs, according to the method proposed by Staples et al. (26). Intraobserver and interobserver (comparing with a third radiologist) agreement for the extent of honeycombing/reticular pattern were moderate (Fleiss weighted Kappa 0.51 and 0.57, respectively). The patients were also submitted to spirometry and carbon monoxide diffusing

capacity test (DLCO). FVC (forced vital capacity) and DLCO were considered reduced when $< 80\%$ and $< 75\%$ of the predicted values, respectively. Doppler echocardiography was used to estimate the pulmonary systolic arterial pressure (PSAP). Patients with PSAP ≥ 40 mmHg were considered to have pulmonary arterial hypertension. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

DNA extraction and genomic analysis. DNA was extracted from peripheral blood using the method described by Lahiri and Nurnberger (27). 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, the digestion of the PCR product by 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 TCRBV20S1 gene segment. For the analysis of TCRBV20S1 polymorphism, the specific primers 5'-ATTCATCAATGGCCAGCGAC-3' and 5'-GGAGCTTCTTAGAACTCAG-3' were used (17, 28). The primers were mixed with 1 μ l of DNA, 2.5 μ l 10 \times PCR buffer (containing 30 mM MgCl₂), 1 μ l dNTP solution (final amount of 10 mM each per reaction), and 0.2 μ l of Taq polymerase (5 U/ μ l). The samples were subjected to 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 in a DNA thermal cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). The resultant 235 bp fragment was digested with *Kpn* I and the products were visualized by electrophoresis in a 1% agarose gel containing ethidium bromide. A single nucleotide substitution (a C–T base transition) leads to the introduction of a stop codon at the V β 20 gene segment sequence and simultaneously eliminates a restriction site for the enzyme *Kpn* I. Individuals homozygous for the null allele (allele 2) can be identified by the presence of a single band in agarose gel (235 bp) when the PCR amplification product is digested with *Kpn* I. DNA from homozygotes for allele 1 is identified by the presence of two bands (100 and 135 bp), whereas heterozygote show three bands (100, 135, and 235 bp) (28).

Identification of variants in the recombination signal sequence (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' (19, 28). PCR was performed under the same conditions described to the TCRBV20S1 polymorphism in 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, preceded by 1 min at 94 °C and followed by 5 min at 72 °C. The resultant 431 bp fragment was digested with *Pvu* II and the products were visualized by electrophoresis. 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 *Pvu* II site inside the TCRBV3S1 RSS. 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 1% agarose gel), whereas in heterozygote two bands (352 and 431 bp) can be observed (28).

Statistical analysis. Data were analyzed using EPI-INFO version 6. The association between categorical variables was tested using Pearson chi-square, Yates corrected chi-square or Fisher's exact test. Variables with normal distribution were presented as mean and standard deviation (SD) and between groups comparisons were performed using Student's t test. Continuous variables with non-normal distributions were presented as median and (25th, 75th) percentiles and the Mann-Whitney test was used for comparisons between groups. The crude and Mantel-Haenszel (for stratified analysis) odds ratios, along with 95% confidence intervals, were calculated for the carriers of the allele 2 (null allele) of TCRBV20S1 and the allele 1 of TCRBV3S1. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested comparing the observed genotypic frequencies with the expected ones (considering the observed allelic frequencies) using the chi-square goodness-of-fit test. A two-tailed P value ≤ 0.05 was considered statistically significant. When testing for associations of the TCRBV20S1 and TCRBV3S1 alleles with clinical and laboratory characteristics (secondary endpoints), Bonferroni

correction of the P value was applied considering the number of comparisons performed and the mean correlation coefficient between outcome variables.

RESULTS

Six out of the 154 patients initially evaluated were excluded from the study for not fulfilling the entry criteria or for meeting the exclusion criteria. Other two patients have not performed blood collections for DNA extraction. Of the remaining patients, 130 were genotyped for the TCRBV20S1 and 117 for TCRBV3S1 gene segments. One hundred eighteen and 85 controls were genotyped for TCRBV20S1 and TCRBV3S1 gene segments, respectively. The characteristics of patients genotyped for the TCRBV20S1 are described in table I. The respective controls presented a mean age of 43.8 (standard deviation 6.4) years; 82 (69.5%) were male and 100 (84.7%) were Caucasians. The patients and controls genotyped for TCRBV3S1 had similar features (data not shown), and most of them (96.6% of patients and 74.1% controls) were also included in the sample genotyped for the TCRBV20S1 gene segment.

The allelic and genotypic frequencies of TCRBV20S1 variants are described in table II, and the distributions were significantly different in patients and controls. The crude and Mantel-Haenszel (stratified by race) odds ratios of the presence of the allele 2 (null allele) were 2.66 (95% CI: 1.52 to 4.66) and 2.66 (95% CI: 1.58 to 4.49), respectively. Restricting the analysis to patients fulfilling the ACR criteria, the results for the presence of the null allele were similar (Mantel-Haenszel odds ratio, stratified by race: 2.38; 95% CI: 1.37 to 4.12; $P = 0.003$). Patients and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium.

The comparisons of the clinical and laboratory features according to the TCRBV20S1 genotype are presented in table III. No significant differences between carriers and non-carriers of the allele 2 were observed.

The frequencies of TCRBV3S1 variants are described in table IV. No differences in the distributions were observed between patients and controls. The crude and Mantel-Haenszel (stratified by race) odds ratios of the presence of the allele 1 were 1.06 (95% CI: 0.51 to 2.21) and 1.07 (95% CI: 0.55 to 2.12), respectively. No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in patients and controls.

Table V compares clinical features according to the TCRBV3S1 genotype. Allele 1 carriers presented a greater extent of interstitial lung disease on HRCT and a non-significant reduction in forced vital capacity. Other features did not differ significantly between the groups.

Considering the description of predominant use of V β 20 in topoisomerase I-specific CD4+ T cells (29), we additionally compared the prevalences of antitopoisomerase I antibodies among the carriers of the null allele of TCRBV20S1. Patients homozygous for the null allele tended to have lower prevalence of antitopoisomerase I (1/14, 7.1%) than heterozygote (17/56, 30.4%) ($P = 0.095$). The one antitopoisomerase I-positive patient among the homozygote for the null allele presented low titers of these antibodies (20.9 U/ml, where the minimum value for a positive test is 20.0 U/ml).

DISCUSSION

It is known that T cell receptor (TCR) plays a central role in immune responses. T cells recognize antigens through the binding of the TCR with the antigen (coupled with a MHC/HLA molecule) present in the surface of antigen presenting cells. Thus, any change at the TCR repertoire and/or MHC molecules could potentially alter a given immune response. For example, alterations in TCR may prevent some antigens to be recognized (thus preventing the emergence of a given autoimmune disease); alternatively, the genetically determined absence or reduction of a regulatory subset of T cells that uses a specific TCR variable α or β chain might allow the development of autoimmune activity. The MHC molecules also affect the ability to develop immune responses. Some studies have demonstrated the association between the inheritance of particular HLA alleles and susceptibility to SSc. However, the correlations are stronger and more consistent between specific HLA genes and autoantibody subsets than with the disease itself (2). Therefore, the search for other genetic markers of disease susceptibility remains an important task. Several single-nucleotide polymorphisms have been tested in SSc (30), but few studies have addressed polymorphisms involving TCR gene segments.

Kratz et al. (13), studying 60 SSc patients and 150 controls, observed an association between SSc and a TCR constant gamma gene polymorphism. However, no association with polymorphisms in the tested TCR constant alpha, variable alpha, and constant beta gene segments was observed. Arnett et al. (12), studying the same β constant region polymorphism tested by Kratz et al. (a *Bgl* II RFLP located near the C2 region of the TCR β gene) (13), observed different segregation patterns in patients with systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus, but no differences with control subjects. As far as we aware, there are no studies testing TCR beta variable polymorphisms in SSc published to date. Nevertheless, polymorphisms of TCR β gene variable regions are of special interest because they may influence the immune response to both specific antigens and superantigens. In the present study, the results suggested that the null allele of the

TCRBV20S1 gene segment is associated with susceptibility to SSc; in a secondary analysis, the allele 1 of TCRBV3S1 was associated with more severe interstitial lung disease.

Both polymorphisms tested here are related to important changes in the T cell receptor repertoire. The allele 2 of TCRBV20S1 is associated to a reduction (or absence, if in homozygosis) of V β 20+ peripheral T cells (17, 18), while the allele 1 of TCRBV3S1 is related to reduced levels of V β 3.1+ cells (19). Therefore, our results suggest that V β 20+ cells may be protective for the development of SSc and that V β 3.1+ cells may exert a protective role against the progression of interstitial lung disease. It is possible that V β 20+ and V β 3.1+ cells are involved in the clearance of some specific antigens whose persistence, caused by the reduced availability of these cells, could trigger the pathogenic immune response in the disease. Another possible explanation is that these subsets could represent an important element of the regulatory CD4+ or CD8+ compartment, inhibiting the activity of autoreactive cells or altering the production of key regulatory cytokines. In the murine models of experimental autoimmune encephalitis (EAE) (31) and nonobese diabetes (NOD) (32), specific regulatory CD4+ cells were found to make preferential usage of certain V β families (V β 14 and V β 12, respectively). Previous studies observed a relative and/or absolute reduction in the number of suppressor CD8+ T cells in systemic sclerosis (33, 34). Filaci et al. (35) reported impaired function of CD8+CD28- (non antigen-specific T suppressor cells) in active systemic sclerosis. These evidences suggest that a reduction on the immunoregulatory activity is important in the pathogenesis of the disease.

The cooperation of topoisomerase I-specific CD4+ T cells is essential for the production of antitopoisomerase I antibody by B cells (36). Kuwana et al. (29) have observed that topoisomerase I-specific CD4+ T cells of HLA-DR11+ patients and control subjects showed a predominant V β 20.1a usage (in 14 out of 15 clones analyzed). Therefore, the finding that the null allele of TCRBV20S1 (associated with a lower or absent capacity to produce cells using V β 20) is associated with susceptibility to systemic sclerosis may be rather surprising. However, it is unlikely that topoisomerase I-specific CD4+ cells are essential for the development of SSc, since antitopoisomerase I antibodies are absent in the

majority of the patients. Additionally, in topoisomerase I-specific T cells from individuals presenting HLA-DR7 or HLA-DR15 (MHC molecules also associated to the production of antitopoisomerase I antibodies (37)), the usage of V β chains has not been studied. Therefore, it is possible that the T cells bearing V β 20.1 chains are involved in the production of antitopoisomerase I antibodies only in HLA-DR11+ patients. Anyway, the observation of only one patient with antitopoisomerase I antibodies (in low titer) amongst the homozygote for the null allele, which are incapable of producing V β 20+ cells, is in agreement with the findings reported by Kuwana et al. (29).

Frequently, the study of the association of genetic markers with susceptibility to systemic sclerosis has contradictory results in different populations (30). Because of the involvement of multiple loci or alleles in the risk to a specific disease and due to the existence of different selective pressures, it is possible that the alleles which interfere in the predisposition to a given disease are not the same in populations with different genetic background. It is also possible that certain observed associations resulted from genes (which, in turn, would be the "real" susceptibility markers) that are in linkage disequilibrium with the ones tested (38). These considerations seem to be relevant in the interpretation of our results, since the V β 20 gene segment is located near the 3' end of the C β 2 gene segment and the V β 20 alleles have already been demonstrated to be in linkage disequilibrium with polymorphisms of the C β 2 gene segment (17). However, the V β 20 polymorphisms were in linkage disequilibrium neither with the C β 2 *Bgl* II RFLP previously tested in systemic sclerosis (12, 13) nor with polymorphisms of V β 1, V β 8, and V β 11 gene segments (17). The V β 20 gene segment is also located next to the gene that encodes EphB6, a member of the receptor tyrosine kinase family which seems to be involved in the regulation of T cell differentiation and modulation of the responses of mature T cells (39).

The appropriate selection of cases and controls is also an important issue surrounding case-control studies (40). In the present study, we included some patients who did not fulfill the ACR criteria for systemic sclerosis, but fulfilled the criteria suggested by LeRoy and Medsger for diagnosis of early forms of the disease. We decided to study these

patients since the strict application of ACR criteria would exclude an important and increasingly recognized subset of patients with limited forms of the disease (21, 41, 42). However, the exclusion of patients not fulfilling the ACR criteria from the analysis did not change the results significantly.

Considering the evidences presented in this study and in previous ones, we conclude that genetic variations that interfere with the TCR repertoire may be important factors in the susceptibility to systemic sclerosis. We suggest that TCRBV20S1 and TCRBV3S1 polymorphisms are respectively associated with the development of systemic sclerosis and pulmonary interstitial disease in patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Drs. Flávio Danni Fuchs, Lenita Wannmacher, Vicente Gregório Restelli, Gustavo do Santos Mello, Maria Ângela Fontoura, Dolores Heloísa de Campos Ludwig, Sérgio Saldanha Menna Barreto, Raquel Faccioni, Marcus Franck, Tatiana Freitas Tourinho, Marcelo Maltchick, Paulo Sérgio Thys, Patrícia Minuzzi da Motta, Max Brenner, Tamara Mucenic, Adriano Barbiero, Tatiana Karenini Müller, Carmen Both Schenatto, Charles Lubianca Kohem, Lilian Scussel-Lonzetti, Claiton Viegas Brenol, Sandra Helena Machado, Rejane Oravec, Júlio Cesar Simon, Ilóite Scheibel, and Odirlei André Monticielo on their valuable support. We also thank Eliane Regina Moreira Pereira, Cleidia Rodrigues Guerra, Janie Pires dos Santos, Leila Krammer, Lorena Koglin, Denílson dos Santos Marques, Rossimar Rocha, Andréia da Silva Ramiro, Juliana Rios, Letícia Souza, Marcello Baquero, Iara Salin Gonçalves, and Juliana Bredemeier.

REFERENCES

1. Medsger TA, Jr. Classification, Prognosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. Systemic Sclerosis. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 17-28.
2. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:211-37.
3. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984;27:645-53.
4. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995;63:48-56.
5. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004;50:1721-33.
6. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1168-78.
7. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002;168:3649-59.
8. Yurovsky VV, Wigley FM, Wise RA, White B. Skewing of the CD8+ T-cell repertoire in the lungs of patients with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 1996;48:84-97.
9. White B, Yurovsky VV. Oligoclonal expansion of V delta 1+ gamma/delta T-cells in systemic sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci* 1995;756:382-91.
10. LaRocque R, Robinson MA. Diversity in the human T cell receptor beta chain. *Hum Immunol* 1996;48:3-11.
11. Mackelprang R, Carlson CS, Subrahmanyam L, Livingston RJ, Eberle MA, Nickerson DA. Sequence variation in the human T-cell receptor loci. *Immunol Rev* 2002;190:26-39.

12. Arnett FC, Bias WB, McLean RH, Engel M, Duvic M, Goldstein R, et al. Connective tissue disease in southeast Georgia. A community based study of immunogenetic markers and autoantibodies. *J Rheumatol* 1990;17:1029-35.
13. Kratz LE, Boughman JA, Pincus T, Cohen DI, Needleman BW. Association of scleroderma with a T cell antigen receptor gamma gene restriction fragment length polymorphism. *Arthritis Rheum* 1990;33:569-73.
14. Eyre TA, Ducluzeau F, Sneddon TP, Povey S, Bruford EA, Lush MJ. The HUGO Gene Nomenclature Database, 2006 updates. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D319-21.
15. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995;42:455-500.
16. Barron KS, Deulofeut H, Robinson MA. TCRBV20S1 allele frequencies vary among human populations. *Immunogenetics* 1995;41:383-5.
17. 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* 1993;177:135-43.
18. Malhotra U, Spielman R, Concannon P. Variability in T cell receptor V beta gene usage in human peripheral blood lymphocytes. Studies of identical twins, siblings, and insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Immunol* 1992;149:1802-8.
19. Posnett DN, Vissinga CS, Pambuccian C, Wei S, Robinson MA, Kostyu D, 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* 1994;179:1707-11.
20. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
21. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28:1573-6.

22. Brennan P, Silman A, Black C, Bernstein R, Coppock J, Maddison P, et al. Reliability of skin involvement measures in scleroderma. The UK Scleroderma Study Group. *Br J Rheumatol* 1992;31:457-60.
23. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
24. Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Rohde LE, Pinotti AF, et al. Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonary disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:286-94.
25. Maricq HR, LeRoy EC, D'Angelo WA, Medsger TA, Rodnan GP, Sharp GC, et al. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23:183-9.
26. Staples CA, Müller NL, Vedal S, Abboud R, Ostrow D, Miller RR. Usual Interstitial Pneumonia: Correlation of CT with Clinical, Functional, and Radiologic Findings. *Radiology* 1987;162:377-81.
27. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
28. 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* 2003;90:77-80.
29. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. Highly restricted TCR-alpha beta usage by autoreactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I: recognition of an immunodominant epitope. *J Immunol* 1997;158:485-91.
30. Assassi S, Tan FK. Genetics of scleroderma: update on single nucleotide polymorphism analysis and microarrays. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:761-7.
31. Kumar V, Sercarz EE. The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med* 1993;178:909-16.

32. Quinn A, McInerney B, Reich EP, Kim O, Jensen KP, Sercarz EE. Regulatory and effector CD4 T cells in nonobese diabetic mice recognize overlapping determinants on glutamic acid decarboxylase and use distinct V beta genes. *J Immunol* 2001;166:2982-91.
33. Whiteside TL, Kumagai Y, Roumm AD, Almendinger R, Rodnan GP. Suppressor cell function and T lymphocyte subpopulations in peripheral blood of patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1983;26:841-7.
34. Gustafsson R, Totterman TH, Klareskog L, Hallgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:40-5.
35. Filaci G, Fravega M, Fenoglio D, Rizzi M, Negrini S, Viggiani R, et al. Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes. *Clin Exp Med* 2004;4:86-92.
36. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Immunol* 1995;155:2703-14.
37. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T cell proliferative response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J Clin Invest* 1995;96:586-96.
38. Khoury MJ, Beaty TH. Applications of the case-control method in genetic epidemiology. *Epidemiol Rev* 1994;16:134-50.
39. Freywald A, Sharfe N, Rashotte C, Grunberger T, Roifman CM. The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem* 2003;278:10150-6.
40. Lasky T, Stolley PD. Selection of cases and controls. *Epidemiol Rev* 1994;16:6-17.
41. Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000;43:444-51.
42. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E, et al. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for

systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001;44:735-6.

TABLES

Table I. Clinical, demographic, and laboratory features of patients genotyped for the TCRBV20S1 gene segment according to the fulfillment of ACR criteria for SSc and disease subtype*.

	ACR positive		ACR negative		All patients N = 130
	Diffuse form N = 36	Limited cutaneous form N = 68	Limited cutaneous form N = 10	Limited form N = 16	
Female	28 (77.8)	63 (92.6)	7 (70.0)	16 (100.0)	114 (87.7)
Caucasians	27 (75.0)	58 (85.3)	8 (80.0)	14 (87.5)	107 (82.3)
Age, years – mean (SD)	43.3 (14.2)	53.6 (12.8)	49.6 (13.4)	49.4 (14.4)	49.9 (14.0)
Raynaud's phenomenon	36 (100.0)	68 (100.0)	10 (100.0)	16 (100.0)	130 (100.0)
Disease duration, years – median (percentiles 25, 75)	3.2 (1.3, 10.0)	10.0 (4.0, 21.0)	12.5 (3.0, 24.0)	12.0 (3.5, 15.0)	8.0 (3.0, 19.0)
Sclerodactyly	34 (94.4)	68 (100.0)	7 (70.0)	0 (0.0)	109 (83.8)
Digital pitting scars, amputations or loss of digital pad tissue	28 (77.8)	55 (80.9)	1 (10.0)	3 (18.8)	87 (66.9)
Calcinoses	8 (22.2)	22 (32.4)	1 (10.0)	0 (0.0)	31 (23.8)
Telangiectases	21 (58.3)	46 (67.6)	5 (50.0)	8 (50.0)	80 (61.5)
Puffy hands	3 (8.3)	9 (13.2)	3 (30.0)	9 (56.2)	24 (18.5)
Total skin score – median (percentiles 25, 75)	18.5 (11.0, 31.5)	6.0 (3.5, 11.0)	2.0 (1.0, 2.0)	0.0 (0.0, 0.0)	6.0 (2.0, 14.0)
SD pattern on NCM†	29/33 (87.9)	64/65 (98.5)	10/10 (100.0)	15/16 (93.8)	118/124 (95.2)
ANA ≥ 1:80	32 (88.9)	58 (85.3)	8 (80.0)	12 (75.0)	110 (84.6)
Anticentromere antibodies	4 (11.1)	34 (50.0)	5 (50.0)	6 (37.5)	49 (37.7)
Antitopoisomerase I antibodies	13 (36.1)	11 (16.2)	3 (30.0)	1 (6.3)	28 (21.5)
Interstitial lung disease on HRCT†	24/35 (68.6)	38/65 (58.5)	3/9 (33.3)	7/15 (46.7)	72/124 (58.1)
Reduced FVC†	19/32 (59.4)	27/63 (42.9)	2/9 (22.2)	4/16 (25.0)	52/120 (43.3)
Reduced DLCO†	30/32 (93.8)	55/61 (90.2)	6/9 (66.7)	12/16 (75.0)	103/118 (87.3)
Pulmonary arterial hypertension†	2/30 (6.72)	14/66 (21.2)	0/9 (0.0)	1/15 (6.7)	17/120 (14.2)

* Data are presented as number (percentage) of patients, except when indicated otherwise. † Data not available for all patients; the values represent the number of patients with the indicated abnormalities over the number of patients that were examined, with percentages given in parentheses. NCM: Nailfold capillary microscopy; ANA: antinuclear antibodies; HRCT: high resolution computed tomography; FVC: forced vital capacity; DLCO: carbon monoxide pulmonary diffusing

capacity.

Table II. TCRBV20S1 gene segment frequencies in patients with systemic sclerosis and control subjects.

TCRBV20S1	Systemic Sclerosis (SSc)	Controls	P*
Alleles, no. of alleles (%)			
allele 1	176 (67.7)	195 (82.6)	<0.001
allele 2	84 (32.3)	41 (17.4)	
Genotype, no. of subjects (%)			
allele 1/ allele 1	60 (46.1)	82 (69.5)	<0.001
allele 1/ allele 2	56 (43.1)	31 (26.3)	
allele 2/ allele 2	14 (10.8)	5 (4.2)	

* Pearson chi-square test or Yates corrected chi-square.

Table III. Comparison of clinical and laboratory characteristics of patients according to the genotype of the TCRBV20S1 gene segment.

Clinical Features	Allele 2 carriers (N=70)	Allele 2 non- carriers (N=60)	P*
Signs of peripheral ischemia † – no. (%)	46 (65.7)	41 (68.3)	1.000
Skin score – median (percentiles 25, 75)	5.0 (2.0, 13.0)	6.5 (3.0, 15.5)	1.000
Anticentromere antibodies – no. (%)	25 (35.7)	24 (40.0)	1.000
Antitopoisomerase I antibodies – no. (%)	18 (25.7)	10 (16.7)	1.000
Extent (%) of reticular pattern/honeycombing on HRCT – median (percentiles 25, 75) ‡	0.0 (0.0, 4.6)	0.0 (0.0, 1.8)	1.000
Ground-glass opacities on HRCT – no. (%) ‡	30/68 (44.1)	30/56 (53.6)	1.000
Percent of predicted FVC – mean (SD) ‡	81.6 (18.5)	78.9 (19.8)	1.000
Percent of predicted DLCO – mean (SD) ‡	57.2 (19.1)	52.5 (18.3)	1.000
Systolic pulmonary arterial pressure – mean (SD) ‡	29.5 (12.3)	31.5 (12.6)	1.000

* Yates corrected chi-square, Mann-Whitney or Student t test. P values were adjusted for multiple comparisons (9 tests), considering the mean correlation coefficient between the outcome variables (0.20). † Pitting scars, loss of substance from the finger pad, or amputations. ‡ Data not available for all patients. HRCT: high resolution computed tomography; FVC: forced vital capacity; DLCO: carbon monoxide pulmonary diffusing capacity.

Table IV. TCRBV3S1 gene segment frequencies in patients with systemic sclerosis and control subjects.

TCRBV3S1	Systemic Sclerosis (SSc)	Controls	P*
Alleles, no. of alleles (%)			
allele 1	126 (53.8)	96 (56.5)	0.673
allele 2	108 (46.2)	74 (43.5)	
Genotype, no. of subjects (%)			
allele 1/ allele 1	34 (29.0)	30 (35.3)	0.555
allele 1/ allele 2	58 (49.6)	36 (42.3)	
allele 2/ allele 2	25 (21.4)	19 (22.4)	

* Pearson chi-square test or Yates corrected qui-square.

Table V. Comparison of clinical and laboratory characteristics of patients according to the genotype of the TCRBV3S1 gene segment.

Clinical Features	Allele 1 carriers (N=92)	Allele 1 non- carriers (N=25)	P*
Signs of peripheral ischemia † – no. (%)	63 (68.5)	15 (60.0)	1.000
Skin score – median (percentiles 25,75)	6.0 (2.0, 13.0)	5.0 (3.0, 18.0)	1.000
Anticentromere antibodies – no. (%)	37 (40.2)	9 (36.0)	1.000
Antitopoisomerase I antibodies – no. (%)	20 (21.7)	4 (16.0)	1.000
Extent (%) of reticular pattern/honeycombing on HRCT – median (percentiles 25, 75) ‡	0.3 (0.0, 12.5)	0.0 (0.0, 0.0)	0.034
Ground-glass opacities on HRCT – no. (%) ‡	48/87 (55.2)	9/24 (37.5)	1.000
Percent of predicted FVC – mean (SD) ‡	77.0 (18.5)	86.2 (14.4)	0.152
Percent of predicted DLCO – mean (SD) ‡	53.4 (17.0)	56.9 (17.8)	1.000
Systolic pulmonary arterial pressure – mean (SD) ‡	30.7 (12.5)	29.4 (12.4)	1.000

* Yates corrected chi-square, Mann-Whitney or Student t test. P values were adjusted for multiple comparisons (9 tests), considering the mean correlation coefficient between the outcome variables (0.20). † Pitting scars, loss of substance from the finger pad, or amputations. ‡ Data not available for all patients. HRCT: high resolution computed tomography; FVC: forced vital capacity; DLCO: carbon monoxide pulmonary diffusing capacity.

7. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE TCRBV20S1 E TCRBV3S1 NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Markus Bredemeier¹, MD, MSc; Ricardo Machado Xavier¹, MD, PhD; Andréia Wieck², bióloga; Karina Gatz Capobianco¹, MD, PhD; Eduardo Hennemann Pitrez³, MD; Luis Eduardo Paim Rohde⁴, MD, PhD; Antônio Fernando Furlan Pinotti⁴, MD, MSc; João Carlos Tavares Brenol¹, MD, PhD; José Arthur Bogo Chies², PhD.

¹Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Serviço de Radiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Financiado em parte por recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

Endereço para solicitação de cópias do artigo:

Dr. Markus Bredemeier

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 645, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brasil.

E-mail: markbred@terra.com.br

Endereço para correspondência:

Dr. Ricardo M. Xavier

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 645, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brasil.

Telefone: (51) 2101-8340; Fax: (51) 3331-3834.

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

Objetivo: comparar as freqüências das variantes de dois segmentos gênicos codificadores de cadeias variáveis beta (TCRBV20S1 e TCRBV3S1) na esclerose sistêmica (ES) e controles. O alelo nulo (alelo 2) do TCRBV20S1 está associado à redução (ou ausência, em homozigose) do número de células V β 20+ no sangue periférico, enquanto o alelo 1 do TCRBV3S1 está associado a níveis reduzidos de células V β 3.1+.

Métodos: cento e trinta pacientes com ES e 118 controles (voluntários saudáveis) foram genotipados para o segmento gênico TCRBV20S1, e 117 pacientes e 85 controles foram genotipados para as variantes do TCRBV3S1 por polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) precedido por PCR. Os pacientes foram avaliados clinicamente usando o escore cutâneo de Rodnan modificado, sorologia, provas de função pulmonar, tomografia computadorizada de alta resolução pulmonar (TCAR) e ecocardiografia com Doppler.

Resultados: as freqüências genotípicas dos alelos do TCRBV20S1 foram 0,46 (alelo 1/alelo 1), 0,43 (alelo 1/ alelo 2) e 0,11 (alelo 2/ alelo 2) nos pacientes, enquanto nos controles as freqüências foram 0,70, 0,26 e 0,04, respectivamente ($P < 0,001$). A razão de chances de Mantel-Haenszel (estratificada por raça) da presença do alelo 2 foi 2.66 (IC de 95%: 1,58 a 4,49). Entre os pacientes, não houve associação significativa dos alelos do TCRBV20S1 com a extensão da doença cutânea e pulmonar, pressão sistólica na artéria pulmonar ou perfil de auto-anticorpos. As freqüências alélicas e genotípicas dos alelos do TCRBV3S1 não foram significativamente diferentes em pacientes e controles. No entanto, entre os pacientes, portadores do alelo 1 apresentaram maior extensão de doença intersticial na TCAR ($P = 0,034$).

Conclusão: os resultados sugerem que o alelo nulo do segmento gênico TCRBV20S1 e o alelo 1 do TCRBV3S1 podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de esclerose sistêmica e fibrose pulmonar, respectivamente, sugerindo um papel protetor das células V β 20+ e V β 3.1+ nas respostas imunes patogênicas nessa doença.

ABSTRACT

Objective. To compare the frequencies of variants of two TCR beta variable gene segments (TCRBV20S1 and TCRBV3S1) in systemic sclerosis (SSc) patients and controls. The null allele (allele 2) of TCRBV20S1 gene segment is associated with absent (if in homozygosis) or reduced levels of V β 20+ T-cells in the peripheral blood, while the allele 1 of the TCRBV3S1 is related to a low frequency of V β 3.1+ T-cells.

Methods. One hundred thirty patients with SSc and 118 controls (healthy volunteers) were genotyped for TCRBV20S1, and 117 patients and 85 controls for TCRBV3S1 gene segments variants by restriction fragment length polymorphism preceded by PCR (PCR-RFLP). Patients were clinically evaluated using the modified Rodnan skin score, serology, pulmonary function tests, high resolution computed tomography (HRCT) and Doppler echocardiography.

Results. The genotypic frequencies of the TCRBV20S1 alleles were 0.46 (allele 1/allele 1), 0.43 (allele 1/allele 2), and 0.11 (allele 2/ allele 2) in SSc patients, while in controls the frequencies were 0.70, 0.26 and 0.04, respectively ($P < 0.001$). The Mantel-Haenszel odds ratio (stratified by race) of the presence of the allele 2 was 2.66 (95% CI: 1.58 to 4.49). Among patients, there were no significant associations of the TCRBV20S1 alleles with the extent of skin and pulmonary disease, pulmonary systolic arterial pressure or autoantibody profile. The allelic and genotypic frequencies of the TCRBV3S1 alleles were not significantly different in patients and controls. However, among patients, allele 1 carriers had significantly greater extent of interstitial lung disease on HRCT ($P = 0.034$).

Conclusion. Our results suggested that the null allele of the TCRBV20S1 and the allele 1 of TCRBV3S1 gene segments can be risk factors for the development of SSc and pulmonary fibrosis, respectively, suggesting a protective role of V β 20+ and V β 3.1+ cells in the pathogenic immune responses in this disease.

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença caracterizada por graus variáveis de disfunção vascular, fibrose cutânea e visceral e auto-anticorpos circulantes. O acometimento pulmonar (intersticial ou vascular) associado à doença é atualmente a causa mais importante de mortalidade na ES (1). A etiologia da esclerose sistêmica é desconhecida, embora fatores ambientais e genéticos tenham sido implicados na suscetibilidade à doença (2).

As principais características histopatológicas da ES são deposição excessiva de colágeno e dano microvascular. Os mecanismos levando a essas alterações não são completamente compreendidos, mas a ativação do sistema imune parece desempenhar um papel central nesse processo. Em fases iniciais da doença, um infiltrado mononuclear consistindo primariamente de linfócitos T e macrófagos foi identificado (3, 4). A ativação de células T CD4⁺ Th2 na pele leva à produção de grandes quantidades de interleucina 4 (IL-4), que promove a produção de fator de crescimento transformador beta (TGF- β) por macrófagos, que, por sua vez, leva à ativação e proliferação dos fibroblastos (5). Células T CD8⁺, que predominam no lavado bronquíolo-alveolar (LBA) de pacientes com alveolite fibrosante associada à ES, também produzem principalmente IL-4 (6). A expansão oligoclonal de células T tem sido relatada em biópsias de pele (7), no LBA (8, 9) e sangue periférico (8, 9) de pacientes com ES. Esses achados provavelmente refletem a proliferação e expansão de clones específicos de células T em resposta a certos antígenos, sugerindo que a esclerose sistêmica seja uma doença auto-imune associada à imunidade específica contra antígenos próprios (5). As células T reconhecem antígenos através do acoplamento do receptor da célula T (TCR) com peptídeos antigênicos ligados a moléculas do MHC (complexo de histocompatibilidade principal), presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos.

Os TCRs mais freqüentemente expressados por células T periféricas são compostos por cadeias α (alfa) e β (beta), cada uma delas sendo constituída por uma região variável e uma constante. As regiões variáveis das cadeias α e β são constituídas pelo rearranjo dos

seguintes segmentos gênicos: variável (V), diversidade (D, somente cadeias beta) e junção (J) (10). Esses segmentos gênicos apresentam variantes polimórficas (alelos), que podem afetar a capacidade de produzir TCRs específicos ou modificar sua especificidade antigênica, influenciando, portanto, o repertório de receptores de células T. O repertório de TCRs tem um papel central no desenvolvimento das respostas imunológicas, e variações nos genes que codificam os TCRs podem estar relacionadas ao surgimento de doenças auto-imunes (11).

Há poucos estudos abordando os polimorfismos genéticos dos segmentos gênicos dos TCRs na ES (12, 13). Nenhum desses estudos avaliou polimorfismos em genes codificando as cadeias variáveis beta ($V\beta$) dos TCRs. No presente estudo foram analisados dois polimorfismos em dois diferentes segmentos gênicos codificadores de cadeias variáveis beta (TCRBV). O primeiro polimorfismo estudado está localizado no segmento TCRBV20S1 (denominado TRBV30 pelo HGNC – *HUGO Gene Nomenclature Committee* (14)) e resulta de uma substituição de nucleotídeos (citosina por timina) que cria um códon de terminação (*stop codon*) dentro do segmento gênico. Indivíduos homozigotos para esse alelo nulo (aqui denominado de alelo 2, mas previamente conhecido como TCRBV20S1A2P (15), BV20S1*4 (16) ou $V\beta$ 18C (17)) são incapazes de produzir TCRs usando cadeias $V\beta$ 20, o que resulta na ausência de células T $V\beta$ 20+ no sangue periférico (17). Um nível intermediário de células T $V\beta$ 20+ funcionais é observado no sangue periférico de indivíduos heterozigotos para esse polimorfismo (18).

O segundo é um polimorfismo de um único nucleotídeo (substituição de citosina por timina) localizado dentro da região espaçadora de 23 pares da sequência de sinal de recombinação (SSR) do segmento gênico TCRBV3S1 (TRBV3-1 na nomenclatura do HGNC (14)). Essa variante alélica está associada com o nível de células $V\beta$ 3.1+ no sangue periférico. Indivíduos homozigotos para o alelo 1 têm uma baixa frequência de células T $V\beta$ 3.1+ (em torno de 1% das células CD3+ CD4+), enquanto indivíduos homozigotos para o alelo 2 têm maior quantidade dessas células (8,1% em média) e heterozigotos têm uma frequência intermediária (em média 4,7%) (19).

Numa tentativa de identificar novos marcadores de suscetibilidade para esclerose sistêmica, foram estudadas as frequências desses dois polimorfismos em pacientes com esclerose sistêmica, sendo essas comparadas com as frequências observadas em indivíduos hígidos provenientes da mesma população.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e controles: foram avaliados prospectivamente, no período de abril de 2000 a dezembro de 2004, 154 pacientes consecutivos com diagnóstico definitivo ou forte suspeita de ES, de acordo com a avaliação de reumatologistas experientes. Os pacientes foram encaminhados de serviços de reumatologia de quatro centros clínicos (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital São Lucas da PUCRS, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e Hospital Nossa Senhora da Conceição) e de clínicas privadas na cidade de Porto Alegre/RS. Todos os pacientes eram brasileiros, a maioria deles com ascendência européia e/ou africana, e a maior parte residente na área urbana de Porto Alegre. A avaliação das características raciais foi feita através da observação do fenótipo dos pacientes (cor da pele, cor e tipo de cabelo); a raça foi descrita como branca (caucaseanos), mista ou preta. Não havia indivíduos de origem asiática ou ameríndios entre os pacientes. A amostra foi composta por pacientes com longa evolução e casos recém-diagnosticados. Para inclusão no presente estudo, os pacientes deveriam enquadrar-se nos critérios do Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR) (20) ou nos critérios sugeridos por LeRoy e Medsger para o diagnóstico de formas precoces de ES (evidência objetiva de fenômeno de Raynaud mais padrão SD na CPU ou auto-anticorpos específicos p/ ES; alternativamente, evidência subjetiva de fenômeno de Raynaud mais padrão SD na CPU e auto-anticorpos específicos para ES) (21). Foram excluídos pacientes que apresentavam síndromes de sobreposição com outras doenças difusas do tecido conjuntivo. No entanto, pacientes com diagnóstico definido de esclerose sistêmica (de acordo com os critérios do ACR) que desenvolveram miopatia inflamatória ou síndrome de Sjögren secundária não foram excluídos da amostra. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado.

O DNA dos controles foi obtido de um banco mantido no Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que se constitui de amostras de indivíduos não aparentados da população urbana de Porto Alegre/RS (a maioria de ascendência européia e/ou africana). Esses indivíduos eram doadores de sangue,

estudantes, professores ou funcionários da universidade. O recrutamento dos controles, a coleta de amostras de sangue e extração do DNA ocorreram entre os anos de 1990 e 2000. A descrição da raça baseou-se na observação de características fenotípicas das pessoas estudadas. Indivíduos de origem asiática e ameríndios, aqueles com doenças crônicas ou agudas, bem como aqueles apresentando história familiar de doenças genéticas, foram excluídos da amostra.

Avaliação clínica: os pacientes foram entrevistados e examinados de acordo com um extenso questionário padronizado voltado para a avaliação dos órgãos-alvo da esclerose sistêmica. Utilizou-se o escore de Rodnan modificado para avaliação da extensão do acometimento cutâneo (22). Os pacientes foram classificados de acordo com o subtipo de doença em três categorias: forma difusa cutânea (espessamento cutâneo no tronco e extremidades); forma limitada cutânea (espessamento cutâneo restrito às extremidades e/ou face); forma limitada (ausência de espessamento cutâneo) (21, 23). As características clínicas da doença foram observadas e registradas conforme descrito previamente (24). A presença do padrão SD foi definida qualitativamente como a ocorrência de áreas avasculares e/ou a presença de capilares definitivamente dilatados, de acordo com descrição de Maricq (25). Foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA, hemograma, sorologia, velocidade de sedimentação globular (VSG) e testes bioquímicos. As presenças do fator antinuclear (FAN) e de anticorpos antitopoisomerase I (anti-ScI-70) foram avaliadas através das técnicas de imunofluorescência indireta (utilizando-se como substrato células HEP-2) e ensaio imunoenzimático (QUANTA lite® ScI-70 ELISA, INOVA Diagnostics), respectivamente. O FAN foi considerado positivo quando reagente em diluições $\geq 1:80$. A presença de anticorpos anticentrômero foi determinada de acordo com a observação do padrão típico da fluorescência em células HEP-2.

Tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) pulmonar foi realizada na maioria dos pacientes. A presença de doença intersticial pulmonar (infiltrado em vidro-fosco, padrão reticular e faveolamento) foi avaliada por dois radiologistas. Adicionalmente, eles estimaram o percentual de parênquima acometido por faveolamento/padrão reticular

em ambos os campos pulmonares, de acordo com o método proposto por Staples et al. (26). Concordância intra e interobservador (comparando-se com um terceiro radiologista) para a extensão de faveolamento/padrão reticular foi moderada ($kappa$ ponderado 0,51 e 0,57, respectivamente). Os pacientes também foram submetidos à espirometria e ao teste de capacidade difusional de monóxido de carbono (DLCO). A CVF (capacidade vital forçada) e a DLCO foram consideradas anormais quando $< 80\%$ e $< 75\%$ do valor previsto, respectivamente. A ecocardiografia com Doppler foi utilizada para a estimativa da pressão sistólica na artéria pulmonar (PSAP). Pacientes com PSAP ≥ 40 mmHg foram considerados como apresentando hipertensão arterial pulmonar (HAP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre antes do início de sua execução.

Extração do DNA e análise genômica: o DNA foi extraído do sangue periférico usando o método descrito por Lahiri and Nurnberger (27). Ambos os polimorfismos foram analisados por polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) precedido por PCR, que envolveu a amplificação das amostras de DNA com *primers* específicos e a digestão dos produtos do PCR por endonucleases. A presença ou a ausência dos sítios de restrição, criando padrões visualmente distintos de migração na eletroforese em gel de agarose, fazem a distinção entre os dois alelos.

Identificação das variantes no segmento gênico TCRBV20S1: para análise do polimorfismo do TCRBV20S1, os *primers* específicos 5'-ATTCATCAATGGCCAGCGAC-3' e 5'-GGAGCTTCTTAGAACTCAG-3' foram utilizados (17, 28). Os *primers* foram misturados com 1 μ l de DNA, tampão para PCR 2.5 μ l 10 \times (contendo 30 mM de MgCl₂), 1 μ l de solução dNTP (quantidade final de 10 mM cada por reação) e 0.2 μ l de Taq polimerase (5 U/ μ l). As amostras foram submetidas a 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, um minuto de recozimento (*annealing*) a 60 °C, e 2 minutos de extensão a 72 °C, precedidos por 1 minuto a 94 °C e seguidos por 5 minutos a 72 °C num ciclador termal de DNA (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). O fragmento resultante de 235 pb (pares de bases) foi digerido com

enzima de restrição *Kpn* I, e os produtos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio. Uma substituição de nucleotídeo (citosina por timina) leva à introdução de um códon interruptor na seqüência do segmento gênico TCRBV20S1 e simultaneamente elimina um sítio de restrição da enzima *Kpn* I. Indivíduos homozigotos para o alelo nulo (alelo 2) podem ser identificados pela presença de uma banda única no gel de agarose (235 pb) quando o produto de amplificação do PCR é digerido por *Kpn* I. O DNA dos homozigotos para o alelo 1 é identificado pela presença de duas bandas (100 e 135 pb), enquanto heterozigotos mostram 3 bandas (100, 135 e 235 pb) (28).

Identificação das variantes na seqüência de sinal de recombinação (SSR) do segmento gênico TCRBV3S1: para análise do polimorfismo do TCRBV3S1, localizado na SSR desse segmento gênico, as amostras de DNA foram amplificadas por PCR, e os *primers* específicos 5'-CCTTGATGGCCTGTTTTTCAC-3' e 5'-GTGCCATCGGAGCCAGCAC-3' foram utilizados (19, 28). O PCR foi realizado nas mesmas condições descritas para o polimorfismo do TCRBV20S1. As amostras foram submetidas a 36 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, um minuto de recozimento (*annealing*) a 51 °C, e 2 minutos de extensão a 72 °C, precedida por 1 minuto a 94 °C e seguida por 5 minutos a 72 graus. O fragmento resultante de 431 pb (pares de bases) foi digerido com enzima de restrição *Pvu* II, e os produtos foram visualizados em eletroforese. As duas variantes alélicas do TCRBV3S1 diferem somente em um nucleotídeo (C/T); a transição C-T cria um sítio para a enzima *Pvu* II dentro da SSR desse segmento gênico. Indivíduos homozigotos para o alelo 1 podem ser identificados pela presença de uma banda única de DNA no gel de agarose (431 pb), refletindo a ausência do sítio de restrição. Os homozigotos para o alelo 2 são identificados pela presença de uma banda de 352 pb (o fragmento de 79 pb não pode ser observado no gel de agarose a 1%), enquanto que em heterozigotos duas bandas (352 e 431 pb) são visualizadas (28).

Análise estatística: os dados foram analisados usando-se o programas EPI-INFO versão 6. A análise da associação entre variáveis categóricas foi feita utilizando-se o teste

do qui-quadrado de Pearson, qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher. Variáveis com distribuição normal foram apresentadas como média e desvio-padrão (DP), e as comparações entre grupos foram feitas com o teste t de Student. Variáveis contínuas com distribuição não-normal foram apresentadas como mediana e percentis (25 e 75%), e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações entre os grupos. As razões de chances (*odds ratios*) bruta e de Mantel-Haenszel (para análise estratificada), juntamente com os respectivos intervalos de confiança de 95%, foram calculadas para os portadores do alelo 2 (alelo nulo) do TCRBV20S1 e para o alelo 1 do TCRBV3S1. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado comparando-se as frequências genotípicas observadas com as esperadas (considerando-se as frequências alélicas) usando-se o teste do qui-quadrado de qualidade de ajuste (*goodness-of-fit*). Considerou-se estatisticamente significativo um $P \leq 0,05$ (bicaudal). Quando da testagem de associações dos alelos do TCRBV20S1 e TCRBV3S1 com características clínicas e laboratoriais (desfechos secundários), correção de Bonferroni para o valor P foi aplicada considerando-se o número de comparações realizadas e o coeficiente de correlação médio entre as variáveis dependentes.

RESULTADOS

Seis dos 154 pacientes inicialmente avaliados foram excluídos do estudo por não preencherem os critérios de inclusão ou apresentarem critérios de exclusão. Outros dois pacientes não tiveram seu sangue coletado para extração do DNA. Dos pacientes remanescentes, 130 foram genotipados para o segmento gênico TCRBV20S1, e 117 para o TCRBV3S1. Cento e dezoito controles foram genotipados para o segmento gênico TCRBV20S1, e 85 para o TCRBV3S1. As características dos pacientes genotipados para o TCRBV20S1 estão descritas na tabela I; os respectivos controles apresentaram uma média de idade de 43,8 anos (DP 6,4), 82 (69,5%) eram do sexo masculino e 100 (84,7%) eram caucasóides. As características dos pacientes e controles testados para o polimorfismo do TCRBV3S1 são semelhantes às dos testados para o TCRBV20S1 (dados não mostrados), e a maioria deles (96,6% dos casos e 74,1% dos controles) também estava incluída na amostra genotipada para o segmento TCRBV20S1.

As frequências alélicas e genotípicas das variantes do TCRBV20S1 são descritas na tabela II, e as distribuições foram significativamente diferentes em pacientes e controles. As razões de chances bruta e de Mantel-Haenszel (estratificada por raça) da presença do alelo nulo foram 2,66 (IC 95%: 1,52 a 4,66) e 2,66 (IC 95%: 1,58 a 4,49), respectivamente. Restringindo a análise para pacientes que preenchem os critérios do ACR, os resultados para a presença do alelo nulo foram semelhantes (razão de chances de Mantel-Haenszel, estratificada por raça: 2,38; IC 95%: 1,37 a 4,12; $P = 0,003$). Os pacientes e controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As comparações das características clínicas e laboratoriais de acordo com a presença do alelo nulo do TCRBV20S1 estão apresentadas na tabela III. Não foram observadas diferenças significativas entre portadores e não-portadores do alelo nulo.

As frequências das variantes do TCRBV3S1 são descritas na tabela IV. Nenhuma diferença nas distribuições foi observada entre pacientes e controles. As razões de chances bruta e de Mantel-Haenszel (estratificada por raça) da presença do alelo 1 foram

1,06 (IC 95%: 0,51 a 2,21) e 1,07 (IC 95%: 0,55 a 2,12), respectivamente. Não foram observados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em pacientes e controles.

A tabela V compara as características clínicas de acordo com a presença do alelo 1 do TCRBV3S1. Os carreadores do alelo 1 apresentaram maior extensão de doença intersticial na TCAR pulmonar e redução não-significativa da capacidade vital forçada. Outras características não diferiram significativamente entre os grupos.

Considerando-se a descrição do uso predominante de V β 20 em células T CD4+ específicas para topoisomerase I (29), adicionalmente foram comparadas as prevalências de anticorpos antitopoisomerase I entre os portadores do alelo nulo do TCRBV20S1. Pacientes homozigotos para o alelo nulo tenderam a ter prevalência mais baixa de antitopoisomerase I (1/14, 7,1%) do que os heterozigotos (17/56, 30,4%) (P=0,095). O único paciente com anticorpos antitopoisomerase I entre os homozigotos para o alelo nulo apresentou baixos títulos desses anticorpos (20,9 U/ml, onde o mínimo valor para um teste positivo é 20,0 U/ml).

DISCUSSÃO

O receptor de células T (TCR) tem um papel fundamental nas respostas imunes. As células T reconhecem antígenos através da ligação do TCR com o antígeno (acoplado a uma molécula de MHC/HLA) presente na superfície das células apresentadoras de antígenos. Portanto, qualquer alteração no repertório de TCRs ou das moléculas de MHC pode potencialmente alterar uma determinada resposta imune. Por exemplo, alterações no TCR podem evitar que certos antígenos sejam reconhecidos (assim evitando o aparecimento de uma determinada doença auto-imune); alternativamente, a ausência ou redução geneticamente determinadas de um subgrupo de células T reguladoras que usam, especificamente, um determinado subtipo de cadeias alfa ou beta poderiam promover a atividade auto-imune. As moléculas do MHC também afetam a habilidade para desenvolver auto-imunidade. Alguns estudos demonstraram associação entre a herança de certos alelos do HLA e suscetibilidade à esclerose sistêmica. No entanto, as correlações são mais fortes e consistentes entre os genes do HLA e auto-anticorpos específicos do que com a doença em si (2). Portanto, a busca de outros marcadores genéticos para a suscetibilidade à doença permanece sendo uma tarefa importante. Vários polimorfismos de nucleotídeo único têm sido testados na esclerose sistêmica (30), mas poucos estudaram polimorfismos envolvendo segmentos gênicos do TCR.

Kratz et al. (13), estudando 60 pacientes com ES e 150 controles, observou associação entre ES e um polimorfismo das cadeias constantes gama, mas não havia associação dos polimorfismos dos segmentos gênicos constante alfa, variável beta e constante beta testados nesse estudo. Arnett et al. (12), estudando o mesmo polimorfismo na região constante β testada por Kratz et al. (*Bg*/ II RFLP, localizado próximo à região do segmento C β 2) (13), observou diferentes padrões de segregação em pacientes com esclerose sistêmica e lupus eritematoso sistêmico, mas sem diferença com relação a indivíduos controle. Segundo nosso conhecimento, não há estudos testando polimorfismos de segmentos gênicos variáveis beta na esclerose sistêmica publicados até o momento. Mesmo assim, polimorfismos das regiões variáveis do gene do TCR β são de especial

interesse, pois eles podem influenciar a resposta tanto a antígenos específicos como a superantígenos. No presente estudo, os resultados sugerem que o alelo nulo do TCRBV20S1 está associado à suscetibilidade para esclerose sistêmica; numa análise secundária, o alelo 1 do TCRBV3S1 foi associado a doença intersticial mais severa.

Ambos os polimorfismos testados no presente estudo estão relacionados a importantes modificações no repertório de receptores de células T. O alelo 2 do TCRBV20S1 está associado à redução (ou ausência, se em homozigose) do número de células V β 20+ no sangue periférico (17, 18), enquanto o alelo 1 do TCRBV3S1 está associado a níveis reduzidos de células V β 3+ (19). Portanto, nossos resultados sugerem que as células V β 20+ podem ser protetoras para o desenvolvimento de esclerose sistêmica; células V β 3.1+ podem exercer uma atividade protetora contra a progressão da doença intersticial pulmonar. É possível que células V β 20+ e V β 3.1+ estejam envolvidas na remoção de determinados antígenos cuja persistência, causada pela redução do número dessas células, poderia ativar a resposta inum patogênica que ocorre na doença. Outra explicação possível é que esses subtipos celulares poderiam estar incluídos no compartimento regulador das células CD4+ ou CD8+, inibindo a atividade de células auto-reativas ou alterando a produção de citocinas reguladoras. Nos modelos animais de encefalomielite auto-imune experimental (EAE) (31) e diabetes não-obeso (32), células CD4+ reguladoras específicas faziam uso preferencial de determinadas cadeias V β (V β 14 e V β 12, respectivamente). Estudos prévios observaram uma redução relativa ou absoluta no número de células CD8+ supressoras na esclerose sistêmica (33, 34). Filaci et al. (35) relataram disfunção de células CD8+CD28- (células T supressoras não antígeno-específicas) na esclerose sistêmica ativa. Essas evidências sugerem que a redução da atividade reguladora do sistema imune tenha um papel importante na patogênese da doença.

A cooperação de células CD4+ específicas para topoisomerase I é essencial para a produção de anticorpos antitopoisomerase I por células B (36). Kuwana et al. (29) observaram que células T CD4+ antitopoisomerase I de pacientes e controles usavam preferencialmente cadeias V β 20.1a (em 14 de 15 clones analisados). Portanto, a

observação de que o alelo nulo do TCRBV20S1 (associado à redução ou ausência de capacidade de produzir células usando V β 20) esteja associado à suscetibilidade para esclerose sistêmica pode parecer surpreendente. Entretanto, é improvável que células CD4+ específicas para topoisomerase I sejam essenciais para o desenvolvimento de ES, já que anticorpos antitopoisomerase I são encontrados numa minoria dos pacientes. Adicionalmente, em células T antitopoisomerase I de indivíduos apresentando HLA-DR7 ou HLA-DR15 (moléculas de MHC também associadas à produção de anticorpos antitopoisomerase I (37)), o uso de cadeias V β não foi estudado. Portanto, é possível que as células V β 20.1a+ estejam envolvidas na produção de anticorpos antitopoisomerase I somente em pacientes HLA-DR11+. De qualquer modo, a observação de somente um paciente com anticorpos antitopoisomerase I (em baixos títulos) entre os homozigotos para o alelo nulo, que são incapazes de produzir células V β 20+, está de acordo com as observações de Kuwana et al. (29).

Freqüentemente, o estudo de associações de marcadores genéticos com suscetibilidade para esclerose sistêmica tem resultados contraditórios em diferentes populações (30). Devido ao envolvimento de múltiplos *loci* ou alelos no risco para uma doença específica e a diferentes pressões seletivas, é possível que os alelos envolvidos na predisposição a uma doença específica não sejam os mesmos em populações diferentes. Outra possibilidade é que as associações observadas sejam confundidas por genes (que, por sua vez, seriam os verdadeiros marcadores de suscetibilidade) que estão em desequilíbrio de ligação com aqueles testados (38). Essa consideração parece ser relevante na interpretação dos resultados do presente estudo, tendo-se em mente que o segmento gênico V β 20 está localizado próximo ao final 3' do segmento C β 2, e demonstrou-se que os alelos do V β 20 estão em desequilíbrio de ligação com polimorfismos do segmento C β 2 (17). Entretanto, os polimorfismos do V β 20 não estão em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo C β 2-*Bgl* II RFLP testado previamente na ES (12, 13) nem com polimorfismos de V β 1, V β 8 e V β 11 (17). O segmento gênico V β 20 também está localizado próximo ao gene que codifica EphB6, um membro da família de receptores tirosina-quinase que parece

estar envolvida na regulação da diferenciação de células T e na modulação da resposta de células T maduras (39).

A seleção apropriada de casos e controles também é uma questão importante circundando os estudos caso-controle (40). No presente estudo, foram incluídos pacientes que não preenchem os critérios do ACR para esclerose sistêmica, mas preenchem os critérios sugeridos por LeRoy e Medsger para o diagnóstico de formas precoces de ES. Decidiu-se estudar esses pacientes, pois a estrita aplicação dos critérios do ACR excluiria uma importante e crescentemente reconhecida parcela de pacientes com formas limitadas da doença (21, 41, 42). Entretanto, a exclusão de pacientes que não preenchem os critérios do ACR não modificou significativamente os resultados.

Considerando-se as evidências apresentadas nesse estudo e em estudos prévios, concluímos que as variações genéticas que influenciam o repertório de TCRs podem ser fatores importantes na suscetibilidade à esclerose sistêmica. Os resultados sugerem que os polimorfismos dos segmentos gênicos TCRBV20S1 e TCRBV3S1 estão associados ao desenvolvimento de esclerose sistêmica e à doença intersticial nos pacientes, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos aos Drs. Flávio Danni Fuchs, Lenita Wannmacher, Vicente Gregório Restelli, Gustavo do Santos Mello, Maria Ângela Fontoura, Dolores Heloísa de Campos Ludwig, Sérgio Saldanha Menna Barreto, Raquel Faccioni, Marcus Franck, Tatiana Freitas Tourinho, Marcelo Maltchick, Paulo Sérgio Thys, Patrícia Minuzzi da Motta, Max Brenner, Tamara Mucenic, Adriano Barbiero, Tatiana Karenini Müller, Carmen Both Schenatto, Charles Lubianca Kohem, Lilian Scussel-Lonzetti, Claiton Viegas Brenol, Sandra Helena Machado, Rejane Oravec, Júlio Cesar Simon, Ilóite Scheibel, e Odirlei André Monticielo pelo seu valioso auxílio. Também agradecemos a Eliane Regina Moreira Pereira, Cleidia Rodrigues Guerra, Janie Pires dos Santos, Leila Krammer, Lorena Koglin, Denílson dos Santos Marques, Rossimar Rocha, Andréia da Silva Ramiro, Juliana Rios, Letícia Souza, Marcello Baquero, Iara Salin Gonçalves e Juliana Bredemeier.

REFERÊNCIAS

1. Medsger TA, Jr. Classification, Prognosis. In: Clements PJ, Furst DE, editors. Systemic Sclerosis. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 17-28.
2. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:211-37.
3. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Jr., Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984;27:645-53.
4. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995;63:48-56.
5. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004;50:1721-33.
6. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1168-78.
7. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002;168:3649-59.
8. Yurovsky VV, Wigley FM, Wise RA, White B. Skewing of the CD8+ T-cell repertoire in the lungs of patients with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 1996;48:84-97.
9. White B, Yurovsky VV. Oligoclonal expansion of V delta 1+ gamma/delta T-cells in systemic sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci* 1995;756:382-91.
10. LaRocque R, Robinson MA. Diversity in the human T cell receptor beta chain. *Hum Immunol* 1996;48:3-11.
11. Mackelprang R, Carlson CS, Subrahmanyam L, Livingston RJ, Eberle MA, Nickerson DA. Sequence variation in the human T-cell receptor loci. *Immunol Rev* 2002;190:26-39.

12. Arnett FC, Bias WB, McLean RH, Engel M, Duvic M, Goldstein R, et al. Connective tissue disease in southeast Georgia. A community based study of immunogenetic markers and autoantibodies. *J Rheumatol* 1990;17:1029-35.
13. Kratz LE, Boughman JA, Pincus T, Cohen DI, Needleman BW. Association of scleroderma with a T cell antigen receptor gamma gene restriction fragment length polymorphism. *Arthritis Rheum* 1990;33:569-73.
14. Eyre TA, Ducluzeau F, Sneddon TP, Povey S, Bruford EA, Lush MJ. The HUGO Gene Nomenclature Database, 2006 updates. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D319-21.
15. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995;42:455-500.
16. Barron KS, Deulofeut H, Robinson MA. TCRBV20S1 allele frequencies vary among human populations. *Immunogenetics* 1995;41:383-5.
17. 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* 1993;177:135-43.
18. Malhotra U, Spielman R, Concannon P. Variability in T cell receptor V beta gene usage in human peripheral blood lymphocytes. Studies of identical twins, siblings, and insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Immunol* 1992;149:1802-8.
19. Posnett DN, Vissinga CS, Pambuccian C, Wei S, Robinson MA, Kostyu D, 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* 1994;179:1707-11.
20. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
21. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001;28:1573-6.

22. Brennan P, Silman A, Black C, Bernstein R, Coppock J, Maddison P, et al. Reliability of skin involvement measures in scleroderma. The UK Scleroderma Study Group. *Br J Rheumatol* 1992;31:457-60.
23. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
24. Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Rohde LE, Pinotti AF, et al. Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonary disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:286-94.
25. Maricq HR, LeRoy EC, D'Angelo WA, Medsger TA, Rodnan GP, Sharp GC, et al. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23:183-9.
26. Staples CA, Müller NL, Vedal S, Abboud R, Ostrow D, Miller RR. Usual Interstitial Pneumonia: Correlation of CT with Clinical, Functional, and Radiologic Findings. *Radiology* 1987;162:377-81.
27. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
28. 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* 2003;90:77-80.
29. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. Highly restricted TCR-alpha beta usage by autoreactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I: recognition of an immunodominant epitope. *J Immunol* 1997;158:485-91.
30. Assassi S, Tan FK. Genetics of scleroderma: update on single nucleotide polymorphism analysis and microarrays. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:761-7.
31. Kumar V, Sercarz EE. The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med* 1993;178:909-16.

32. Quinn A, McInerney B, Reich EP, Kim O, Jensen KP, Sercarz EE. Regulatory and effector CD4 T cells in nonobese diabetic mice recognize overlapping determinants on glutamic acid decarboxylase and use distinct V beta genes. *J Immunol* 2001;166:2982-91.
33. Whiteside TL, Kumagai Y, Roumm AD, Almendinger R, Rodnan GP. Suppressor cell function and T lymphocyte subpopulations in peripheral blood of patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1983;26:841-7.
34. Gustafsson R, Totterman TH, Klareskog L, Hallgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:40-5.
35. Filaci G, Fravega M, Fenoglio D, Rizzi M, Negrini S, Viggiani R, et al. Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes. *Clin Exp Med* 2004;4:86-92.
36. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Immunol* 1995;155:2703-14.
37. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T cell proliferative response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J Clin Invest* 1995;96:586-96.
38. Khoury MJ, Beaty TH. Applications of the case-control method in genetic epidemiology. *Epidemiol Rev* 1994;16:134-50.
39. Freywald A, Sharfe N, Rashotte C, Grunberger T, Roifman CM. The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem* 2003;278:10150-6.
40. Lasky T, Stolley PD. Selection of cases and controls. *Epidemiol Rev* 1994;16:6-17.
41. Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000;43:444-51.
42. Scussel-Lonzetti L, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E, et al. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for

systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001;44:735-6.

TABELAS

Tabela I. Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes genotipados para o segmento gênico TCRBV20S1 de acordo com os critérios do ACR e subtipo de doença*.

	ACR positivos		ACR negativos		Todos os pacientes N = 130
	Forma difusa N = 36	Forma limitada cutânea N = 68	Forma limitada cutânea N = 10	Forma limitada N = 16	
Sexo feminino	28 (77,8)	63 (92,6)	7 (70,0)	16 (100,0)	114 (87,7)
Caucasóides	27 (75,0)	58 (85,3)	8 (80,0)	14 (87,5)	107 (82,3)
Idade, anos – média (DP)	43,3 (14,2)	53,6 (12,8)	49,6 (13,4)	49,4 (14,4)	49,9 (14,0)
Fenômeno de Raynaud	36 (100,0)	68 (100,0)	10 (100,0)	16 (100,0)	130 (100,0)
Duração de doença, anos – mediana (percentil 25; 75)	3,2 (1,3; 10,0)	10,0 (4,0; 21,0)	12,5 (3,0; 24,0)	12,0 (3,5; 15,0)	8,0 (3,0; 19,0)
Esclerodactilia	34 (94,4)	68 (100,0)	7 (70,0)	0 (0,0)	109 (83,8)
Cicatrizes puntiformes digitais, amputações ou reabsorção das extremidades das falanges distais	28 (77,8)	55 (80,9)	1 (10,0)	3 (18,8)	87 (66,9)
Calcinoses	8 (22,2)	22 (32,4)	1 (10,0)	0 (0,0)	31 (23,8)
Teleangiectasias	21 (58,3)	46 (67,6)	5 (50,0)	8 (50,0)	80 (61,5)
Edema de mãos (<i>puffy hands</i>)	3 (8,3)	9 (13,2)	3 (30,0)	9 (56,2)	24 (18,5)
Escore cutâneo – mediana (percentil 25; 75)	18,5 (11,0; 31,5)	6,0 (3,5; 11,0)	2,0 (1,0; 2,0)	0,0 (0,0; 0,0)	6,0 (2,0; 14,0)
Padrão SD na CPU†	29/33 (87,9)	64/65 (98,5)	10/10 (100,0)	15/16 (93,8)	118/124 (95,2)
FAN ≥ 1:80	32 (88,9)	58 (85,3)	8 (80,0)	12 (75,0)	110 (84,6)
Anticorpos anticentrômero	4 (11,1)	34 (50,0)	5 (50,0)	6 (37,5)	49 (37,7)
Anticorpos antitopoisomerase I	13 (36,1)	11 (16,2)	3 (30,0)	1 (6,3)	28 (21,5)
Doença intersticial pulmonar na TCAR†	24/35 (68,6)	38/65 (58,5)	3/9 (33,3)	7/15 (46,7)	72/124 (58,1)
CVF reduzida†	19/32 (59,4)	27/63 (42,9)	2/9 (22,2)	4/16 (25,0)	52/120 (43,3)
DLCO reduzida†	30/32 (93,8)	55/61 (90,2)	6/9 (66,7)	12/16 (75,0)	103/118 (87,3)
Hipertensão arterial pulmonar	2/30 (6,72)	14/66 (21,2)	0/9 (0,0)	1/15 (6,7)	17/120 (14,2)

*Os dados são apresentados como número (percentagem) de pacientes, exceto quando indicado.

†Dados não disponíveis para alguns pacientes; os valores representam o número de pacientes com as anormalidades indicadas sobre o total de pacientes que realizaram os exames, com os percentuais indicados entre parênteses. CPU: capilaroscopia periungueal; FAN: anticorpos

antinucleares; TCAR: tomografia computadorizada de alta resolução; CVF: capacidade vital forçada; DLCO: capacidade difusional de monóxido de carbono.

Tabela II. Frequências dos alelos do segmento gênico TCRBV20S1 em pacientes e controles.

TCRBV20S1	Esclerose Sistêmica	Controles	P*
Alelos, nº de alelos (%)			
alelo 1	176 (67,7)	195 (82,6)	<0,001
alelo 2	84 (32,3)	41 (17,4)	
Genótipo, nº de indivíduos (%)			
alelo 1/ alelo 1	60 (46,1)	82 (69,5)	<0,001
alelo 1/ alelo 2	56 (43,1)	31 (26,3)	
alelo 2/ alelo 2	14 (10,8)	5 (4,2)	

*Qui-quadrado de Pearson ou qui-quadrado corrigido de Yates.

Tabela III. Comparação das características clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com o genótipo do segmento gênico TCRBV20S1.

Características clínicas	Portadores do alelo 2 (N=70)	Não-portadores do alelo 2 (N=60)	P*
Sinais de isquemia periférica† – n° (%)	46 (65,7)	41 (68,3)	1,000
Escore cutâneo – mediana (percentil 25; 75)	5,0 (2,0; 13,0)	6,5 (3,0; 15,5)	1,000
Anticorpos anticentrômero – n° (%)	25 (35,7)	24 (40,0)	1,000
Anticorpos antitopoisomerase I – n° (%)	18 (25,7)	10 (16,7)	1,000
Extensão (%) de padrão reticular/faveolamento na TCAR – mediana (percentil 25; 75)‡	0,0 (0,0; 4,6)	0,0 (0,0; 1,8)	1,000
Opacidades em vidro-fosco na TCAR – n° (%)‡	30/68 (44,1)	30/56 (53,6)	1,000
Percentual da CVF prevista – média (DP)‡	81,6 (18,5)	78,9 (19,8)	1,000
Percentual da DLCO prevista – média (DP)‡	57,2 (19,1)	52,5 (18,3)	1,000
Pressão sistólica na artéria pulmonar – média (DP)‡	29,5 (12,3)	31,5 (12,6)	1,000

*Qui-quadrado com correção de Yates, teste de Mann-Whitney ou teste t de Student. Os valores P foram ajustados para múltiplas comparações (9 testes), considerando-se a correlação média entre as variáveis dependentes (0,20). †Cicatrizes puntiformes digitais, amputações ou reabsorção das extremidades das falanges distais. ‡Dados não disponíveis para todos os pacientes. TCAR: tomografia computadorizada de alta resolução; CVF: capacidade vital forçada; DLCO: capacidade difusional de monóxido de carbono.

Tabela IV. Frequências dos alelos do segmento gênico TCRBV3S1 em pacientes e controles.

TCRBV3S1	Esclerose Sistêmica	Controles	P*
Alelos, nº de alelos (%)			
alelo 1	126 (53,8)	96 (56,5)	0,673
alelo 2	108 (46,2)	74 (43,5)	
Genótipo, nº de indivíduos (%)			
alelo 1/ alelo 1	34 (29,0)	30 (35,3)	0,555
alelo 1/ alelo 2	58 (49,6)	36 (42,3)	
alelo 2/ alelo 2	25 (21,4)	19 (22,4)	

*Qui-quadrado de Pearson ou qui-quadrado corrigido de Yates.

Tabela V. Comparação das características clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com o genótipo do segmento gênico TCRBV3S1.

Características clínicas	Portadores do alelo 1 (N=92)	Não-portadores do alelo 1 (N=25)	P*
Sinais de isquemia periférica† – n° (%)	63 (68,5)	15 (60,0)	1,000
Escore cutâneo – mediana (percentil 25; 75)	6,0 (2,0; 13,0)	5,0 (3,0; 18,0)	1,000
Anticorpos anticentrômero – n° (%)	37 (40,2)	9 (36,0)	1,000
Anticorpos antitopoisomerase I – n° (%)	20 (21,7)	4 (16,0)	1,000
Extensão (%) de padrão reticular/faveolamento na TCAR – mediana (percentil 25; 75)‡	0,3 (0,0; 12,5)	0,0 (0,0; 0,0)	0,034
Opacidades em vidro-fosco na TCAR – n° (%)‡	48/87 (55,2)	9/24 (37,5)	1,000
Percentual da CVF prevista – média (DP)‡	77,0 (18,5)	86,2 (14,4)	0,152
Percentual da DLCO prevista – média (DP)‡	53,4 (17,0)	56,9 (17,8)	1,000
Pressão sistólica na artéria pulmonar – média (DP)‡	30,7 (12,5)	29,4 (12,4)	1,000

*Qui-quadrado com correção de Yates, teste de Mann-Whitney ou teste t de Student. Os valores P foram ajustados para múltiplas comparações (9 testes), considerando-se a correlação média entre as variáveis dependentes (0,20). †Cicatrizes puntiformes digitais, amputações ou reabsorção das extremidades das falanges distais. ‡Dados não disponíveis para todos os pacientes. TCAR: tomografia computadorizada de alta resolução; CVF: capacidade vital forçada; DLCO: capacidade difusional de monóxido de carbono.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Atualmente, alguns projetos de pesquisa estão sendo desenvolvidos a partir de dados coletados durante a realização desse trabalho. Um estudo caso-controle associando polimorfismos genéticos de CCR5 (receptor de algumas quimiocinas inflamatórias, principalmente RANTES – *regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted*) e CCR2 (receptor da quimiocina MCP-1 – *monocyte chemoattractant protein 1*) com a esclerose sistêmica está aguardando a análise estatística. Outro estudo, associando os níveis de Nt-pró-BNP (*N-terminal pro-brain natriuretic peptide*) com a medida da pressão na artéria pulmonar (obtida através de ecocardiografia), encontra-se próximo do envio para publicação. Polimorfismos genéticos de KIR (*killer cell Ig-like receptor*) também estão sendo estudados. Os últimos dois trabalhos citados estão sendo desenvolvidos como teses de mestrado por alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Com o objetivo de prosseguir com a realização de diversos estudos sobre a etiologia, terapêutica e prognóstico da esclerose sistêmica, a coleta de dados iniciada em abril de 2000 deverá ser retomada em breve, com a avaliação de novos pacientes. Para isso, contamos há alguns anos com o Ambulatório de Esclerose Sistêmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde foram realizadas as avaliações clínicas e são acompanhados e tratados diversos pacientes com a doença. A partir disso, deseja-se desenvolver novos projetos de pesquisa, com a participação de alunos de graduação, mestrado e doutorado.

9. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS (EM AUTORIA OU CO-AUTORIA) INTERNACIONALMENTE DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

1: Pitrez EH, Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Vieira MV, Ludwig DH, Brenol JC, Furtado AP, Fonseca LM, Gutfilen B. Oesophageal dysmotility in systemic sclerosis: comparison of HRCT and scintigraphy. *Br J Radiol* 2006;79:719-24.

2: Schenatto CB, Xavier RM, Bredemeier M, Portela LV, Tort AB, Dedavid e Silva TL, Souza DO, Brenol JC. Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis* 2006;65:829-31.

3: Souza L, Machado SH, Bredemeier M, Brenol JC, Xavier RM. Effect of inflammatory activity and glucocorticoid [corrected] use on nutritional variables in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:601-8.

4: Capobianco KG, Xavier RM, Bredemeier M, Restelli VG, Brenol JC. Nailfold capillaroscopic findings in primary Sjogren's syndrome: clinical and serological correlations. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:789-94.

5: Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Rohde LE, Pinotti AF, Pitrez EH, Vieira MV, Fontoura MA, Ludwig DH, Brenol JC. Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonary disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:286-94.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A – Protocolo de Pesquisa

Níveis de ET-1 e alterações capilaroscópicas em pacientes com esclerose sistêmica
 Serviço de Reumatologia -HCPA
 Markus Bredemeier

CASO: _____

DATA DA ENTREVISTA: ___/___/___

NOME: _____ REGISTRO: _____ / ___ IDADE: _____ anos

SEXO ___ (1-masc 2-fem) COR: ___ (1-branco 2-preto 3-misto)

ENDEREÇO: _____

NOME E ENDEREÇO DE PARENTE: _____

TELEFONE : casa: _____ celular: _____ TELEFONE DE PARENTE: _____

Falta de ar (MRC mod): _____

- 0- não tem falta de ar, exceto com atividade extrema;
- 1- incomodado pela falta de ar quando caminha rapidamente no plano ou sobe lomba leve;
- 2- anda mais devagar no plano que pessoas da mesma idade devido à falta de ar ou tem que parar quando caminha no seu ritmo no plano;
- 3- pára para respirar após caminhar mais ou menos 100 metros ou após poucos minutos no plano;
- 4- muita falta de ar para sair de casa ou falta de ar ao vestir ou trocar de roupa.

NYHA: ___ (classe)

- 1- sem limitação; atividade rotineira sem fadiga exagerada ou dispnéia ou palpitação;
- 2- com pequena limitação de atividade física; bem em repouso; atividade rotineira causa fadiga, dispnéia ou palpitação;
- 3- limitação importante; dispnéia aos mínimos esforços; bem em repouso;
- 4- dispnéia em repouso; qualquer atividade com muito desconforto;

Fumo: _____ (1-sim 2-não 3- no passado) dos _____ aos _____ anos _____ cigs/dia.

O Sr.(a) tem pressão alta? _____ (1-sim 2-não) PA1: _____ / _____ PA2: _____ / _____ BRAÇO: _____ cm D E

Sr. (a) tem algum problema cardíaco) _____ Qual? _____

O Sr(a) tem diabetes? _____

Usa inibidor da ECA: _____ Verapa: _____ Nifedi: _____ Amlo: _____ Diltia _____

betabloqueador _____ diurético _____ AINE : _____ Qual? _____ outros (anotar): _____,

_____, _____, _____, _____,

A medição vasoativa será suspensa: ___ (1-sim 2-não)

Quantos dias antes ? ___ Por quê? _____

AINE será suspenso? _____ (1-sim 2-não)

Quantos dias antes? ___ Por quê? _____

CASO: _____

Dificuldade de deglutição: _____ (0-não; 1- sim, para pedaços de carne; 2- sim, para comer arroz e feijão; 3- sim, para líquidos) ou _____

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou ___ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ___ (0-não tem 1- leve 2-moderado 3- severo)

Tem azia ou pirose (queimação na boca do estômago ou atrás do peito)? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou ___ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ___ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Tem dor ao engolir? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou ___ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ___ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Vomita ou sente o conteúdo do estômago voltar até a garganta após as refeições ou longe delas? ___

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou ___ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ___ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Costuma ter dor no peito ou atrás do peito? ___

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou ___ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ___ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Usa omeprazol ? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou sempre

Usa rantidina, cimetidina, famotidina? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou sempre

Usa cisaprida (prepusid) ou metoclopramida (plasil)? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou sempre

Desde quando começou a ter Raynaud? Há ___ anos.

Desde quando notou que a pele começou a ficar endurecida e lisa? Há ___ anos.

Quando foi diagnosticada a ES? Há ___ anos.

Responder a essas perguntas no dia da capilaroscopia (data ___/___/___):

CASO: ___

Temperatura na Zona 16: ___ °C

Temperatura do dia pela manhã: ___ °C

Horário em que entrou na Z16: ___

Horário da capilaroscopia: ___ (deve ser pelo menos 20 min após entrada na Z16)

Horário da coleta: ___ (logo após a capilo e em repouso). Raynaud durante a coleta? ___

PA1: ___/___ FC1: ___ PA2: ___/___ FC2: ___ (após as coletas)

Quantas vezes teve episódios de Raynaud (crises em que as mãos ficam pálidas -seguido ou não por cianose e/ou eritema- ou cianóticas) nos últimos 2 dias?

Anteontem: ____ minutos: ____ RCS: ____

Ontem: ____ minutos: ____ RCS: ____

Hoje: ____ minutos: ____ RCS: ____

Raynaud durante a capilo: ____

ESCALA : (nenhum Raynaud) **0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10** (o pior Raynaud que teve)

Fumou ontem? ____ (1-sim 2-não) Quantos cigarros? ____

Usou medicação vasoativa nos últimos 7 dias: ____ (1-sim 2-não)

Quais? _____

Usou medicação vasoativa nas últimas 24 horas: ____ Quais? _____

Usou AINE nos últimos 7 dias: ____ Qual? _____

Usou AINE nas últimas 24 horas: ____ Qual? _____

EXAME FÍSICO:

Critérios:

Maior (esclerodermia simétrica proximal às MCFs ou MTFs): ____ (1-sim 2-não)

Menores:

esclerodactilia: ____ (1-sim 2-não)

pitting scars: ____

perda de substância distal: ____

fibrose em bases pulmonares ao Rx: ____

espessamento da pele proximal aos joelhos e cotovelos: ____ (1-sim 2-não)

calcinoses: ____ (1- sim 2- não)

teleangiectasias: ____ (1-sim 2-não)

Apresenta amputação de extremidades MsSs: ____ Quantos dedos: ____

Apresenta amputação de extremidades MsIs: ____ Quantos dedos: ____ CASO: ____

Apresenta úlceras ativas em MsSs: ____ Quantas: ____

Maior diâmetro das úlceras em MsSs em mm: ____

Apresenta úlceras ativas em MsIs: ____ Quantas: ____

Maior diâmetro das úlceras em MsIs em mm: ____

Crepitantes pulmonares: ____ (1-sim 2-não) escala (0- não 1- discreto 2- moderado 3- severo)

Área de crepitantes: (marcas: 5 cm abaixo das bordas inf. escapulares, metade das escápulas)

direita: 1/3inf ____ 1/3 médio ____ 1/3 sup ____

esquada: : 1/3inf ____ 1/3 médio ____ 1/3 sup ____

pulso radial D: ____ (número de cruces em 4) pulso radial esquerdo: ____

pulso femoral D: ____ femoral E: ____ pedioso D: ____ pedioso E: ____

ESCORE CUTÂNEO

Rodnan modificado por Clements: 0= normal 1- espessamento leve 2- moderado 3-severo

	DIREITA	ESQUERDA
quirodáticos	0 1 2 3	0 1 2 3
mãos	0 1 2 3	0 1 2 3
antebraços	0 1 2 3	0 1 2 3
braços	0 1 2 3	0 1 2 3
face		0 1 2 3
tórax anterior		0 1 2 3
ABD		0 1 2 3
coxas	0 1 2 3	0 1 2 3
pernas	0 1 2 3	0 1 2 3
dorso dos pés	0 1 2 3	0 1 2 3

abertura oral máxima: _____ mm (maior de 3 tentativas)

extensão ativa mão direita: _____ mm extensão ativa mão esquerda: _____ mm (maior de 3 tentativas)

fechamento ativo da mão (**menor** de 3 tentativas) direita: _____ mm esquerda: _____ mm

PESO: _____ Kg ALTURA: _____ cm.

CASO: _____

PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR (data ___/___/___)

EXAMINADOR: _____

Capacidade pulmonar total: _____ ml (_____% do previsto)

Volume residual: _____ ml (_____% do previsto)

capacidade vital: : _____ ml (_____% do previsto)

capacidade vital forçada: : _____ ml (_____% do previsto)

VEF1: : _____ ml (_____% do previsto)

difusão de CO: _____% do previsto

coeficiente de transferência: _____% do previsto

CINTILOGRAFIA DE TRÂNSITO ESOFÁGICO (data ___/___/___)

EXAMINADOR: _____

líquido em pé: _____ % de estase em 60 seg, trânsito (80%) _____ seg; trânsito (90%) _____ ; área : _____
 semi-sólido em pé: _____ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) _____ seg; ; trânsito (90%) _____ ; área: _____
 líquido deitado: _____ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) _____ seg; ; trânsito (90%) _____ ; área: _____
 semi-sólido deitado: _____ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) _____ seg; ; trânsito (90%) _____ ; área: _____
 OBS: área corresponde à area em que houva retenção.

EXAMES DE LABORATÓRIO:

Última creatinina sérica _____ mg/dl (data ___/___/___)

Última glicemia de jejum _____ mg/dl (data ___/___/___)

Última TGO _____ U/ml (data ___/___/___)

Última TGP _____ U/ml (data ___/___/___)

Última hemoglobina sérica _____ g/dl (data ___/___/___)

QUE (___/___/___): _____

Último FAN em fígado de rato: 1/_____ data (___/___/___) padrão: _____, _____

Último FAN positivo em fígado de rato: 1/_____ data (___/___/___) padrão: _____, _____

Anti-DNA positivo : ___ (1-sim 2-não) ; título: 1/___ ; data (___/___/___)

U1-RNP: _____ Anti-SM: _____ Anti SS-A: _____ Anti SS-B: _____ Scl70: _____ (data ___/___/___)

FAN em HEP-2 (título): 1/_____ padrão _____, _____

Centrômero: ___ (1-sim 2-não) U1RNP: _____ Scl70: _____ **DOSAGEM DE ET-1: _____**

APÊNDICE B – Termo de Consentimento

Estamos convidando o Sr. (a) para participar de um estudo clínico sobre esclerose sistêmica. Nesse estudo, os pacientes deverão passar por :

- **coleta de sangue** (aprox. 20 ml);
- **entrevista e exame físico**;
- **capilaroscopia periungueal**, que é feita com uma lupa (aparelho parecido com um microscópio) que examina a pele de perto das unhas. É um exame que **não** causa dor e **não** leva qualquer risco para o paciente;
- **tomografia computadorizada (TC) de alta resolução do pulmão** , que **não** utiliza contraste endovenoso (e que **não** tem risco de causar reações na hora do exame) e utiliza menos da metade da radiação de uma TC normal de tórax. É um exame que faz parte da avaliação de pacientes com fibrose pulmonar causada pela esclerose sistêmica;
- **cintilografia de trânsito esofágico**, exame no qual o paciente deve engolir mais ou menos 10 ml de comida pastosa (que libera quantidades muito pequenas de radiação) e avalia o funcionamento do esôfago. O esôfago é um órgão que funciona como um tubo que transporta a comida da boca para o estômago. Esse exame faz parte da avaliação dos pacientes com esclerose sistêmica;
- **espirometria ,teste de difusão pulmonar e volumes pulmonares**, que são exames da capacidade de funcionamento do pulmão e que **não** causam qualquer dor. Todos os pacientes com esclerose sistêmica devem fazer esses exames pelo menos uma vez em cada ano.
- **ecocardiografia** (ecografia do coração) e **eletrocardiograma**.

Todas as informações derivadas dos exames acima podem ter importância clínica na avaliação de sua doença, sendo que todos os dados significativos serão comunicados ao Sr.(a) e ao seu médico assistente.

CONSENTIMENTO PARA PESQUISA:

Eu, _____, autorizo a utilização dos dados coletados durante a investigação, estando ciente que serão utilizados com finalidade científica e clínica, respeitando os todos preceitos da ética.

Assinatura: _____
 Data: ___/___/_____

Pesquisador responsável: Prof. Ricardo Machado Xavier - CRM 15491
 Doutor em imunologia. Professor de Reumatologia e do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da UFRGS.

APÊNDICE C – Termo de Consentimento para Extração do DNA

Estamos solicitando a sua permissão para análise do DNA da amostra de sangue que já foi coletada em nosso estudo prévio. O DNA é a molécula que contém o código genético (os genes) de cada indivíduo. Nos genes estão contidas várias informações sobre as pessoas, como sua altura, cor dos olhos, tendência a ter uma ou outra doença, entre outras informações. O objetivo de nosso estudo é somente caracterizar melhor a relação entre as características genéticas e os problemas clínicos apresentados pelos pacientes com esclerose sistêmica. Esses problemas clínicos já foram avaliados nos exames e consultas prévios que o (a) Sr. (a) realizou. Somente características genéticas que podem ter importância na sua doença serão estudadas. Asseguramos que preservaremos sua privacidade quanto aos dados obtidos e que sua identidade não será revelada fora do estrito âmbito dessa pesquisa.

CONSENTIMENTO PARA PESQUISA:

Eu, _____, autorizo a utilização dos dados coletados durante a investigação, estando ciente que serão utilizados com finalidade científica e clínica, respeitando os todos preceitos da ética.

Assinatura: _____

Data: ___/___/_____

Pesquisador responsável: Prof. Ricardo Machado Xavier - CRM 15491
Doutor em imunologia. Professor de Reumatologia e
do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da
UFRGS.

Markus Bredemeier

APÊNDICE D – Protocolo de Capilaroscopia Periungueal

I. IDENTIFICAÇÃO

NOME:

DATA DE NASCIMENTO:

SEXO:

ESTADO CIVIL:

ENDEREÇO:

Prontuário:

IDADE:

COR:

PROFISSÃO:

TELEFONE(S):

MÉDICO(A) SOLICITANTE:

DATA DO EXAME:

II. MACROSCOPIA PERIUNGUEAL

COR PERIUNGUEAL: ()Rósea ()Pálida ()Cianótica ()Eritematosa

TRAUMATISMO: () Sim () Não

VISIBILIDADE GERAL ADEQUADA: () Sim () Não

FENÔMENO DE RAYNAUD NO MOMENTO DO EXAME: () Sim () Não

III. MICROSCOPIA PERIUNGUEAL: (MAGNIF. 10 A 65X)

	MÃO D				MÃO E			
	V	IV	III	II	II	III	IV	V
NÚMERO DE CAPILARES/mm:	—	—	—	—	—	—	—	—
GRAU DE DELEÇÃO:	—	—	—	—	—	—	—	—
PRESENÇA DE HEMORRAGIAS:	—	—	—	—	—	—	—	—
ÍNDICE DE VISIBILIDADE DO PLEXO VENOSO SUBPAPILAR (IVPV):	—	—	—	—	—	—	—	—
ENOVELAMENTOS:	—	—	—	—	—	—	—	—
ARBUSTOS:	—	—	—	—	—	—	—	—
ECTASIAS:	—	—	—	—	—	—	—	—
MEGACAPILARES:	—	—	—	—	—	—	—	—
BIZARROS :	—	—	—	—	—	—	—	—

PADRÃO DE FLUXO SANGÜÍNEO CAPILAR

() Homogêneo () Granular () Granular com estase () Estase

MORFOLOGIA CAPILAR NORMAL PREDOMINANTE

() abertos () tortuosos () cruzados () indefinida () cuticulite

HALO DISTAL () Presente () Ausente

OBSERVAÇÕES:
