

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/271076865>

Influência do fenótipo HLA e da razão CD4/CD8 na expressão da Doença hepática em bebedores

Article · January 1995

CITATIONS

0

READS

5

13 authors, including:



[Graça Porto](#)

University of Porto

114 PUBLICATIONS 2,052 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Helena Alves](#)

National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge

220 PUBLICATIONS 1,303 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Fernanda Leite](#)

University of Porto

22 PUBLICATIONS 12 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Maria de Sousa](#)

University of Porto

221 PUBLICATIONS 6,113 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

All content following this page was uploaded by [Fernanda Leite](#) on 24 October 2016.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

Citation: Cruz E, Porto G, Fraga J, Moreira R, Castro D, Alves H, Leite F, Bravo F, Lacerda R, Cabeda JM, Cardoso E, Justiça B, Sousa M. Influência do fenótipo HLA e da razão CD4/CD8 na expressão da doença hepática em bebedores. *Revista da Sociedade Portuguesa de Alcoologia*, 1995; 2 (11):47-54.

INFLUÊNCIA DO FENÓTIPO HLA E DA RAZÃO CD4/CD8 NA EXPRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA EM BEBEDORES

Eugénia Cruz^{1*}, Graça Porto^{1,2}, José Fraga³, Rui Moreira⁴, Delfim Castro⁵, Helena Alves⁶, Fernanda Leite², Fernanda Bravo⁷, Rosa Lacerda¹, José Manuel Cabeda¹, Elsa Cardoso¹, Benvido Justiça² e Maria de Sousa¹

RESUMO

Estudos anteriores em doentes com hemocromatose hereditária (HH) demonstraram que a expressão clínica da doença é influenciada pelo fenótipo HLA e pela razão CD4/CD8. Face à conhecida heterogeneidade da expressão clínica da doença hepática ligada à ingestão de álcool este estudo teve como objectivo avaliar se os mesmos parâmetros influenciam essa expressão clínica. Para isso foi estudada uma população de 48 indivíduos, grandes bebedores, da região de Montalegre, nos quais os parâmetros bioquímicos de lesão hepática e parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro foram analisados em função do fenótipo HLA-A3 e razão CD4/CD8. Os resultados demonstraram que indivíduos com fenótipo HLA-A3+ apresentam alterações bioquímicas mais severas do que indivíduos que não possuem aquele fenótipo e que na ausência do fenótipo HLA-A3+, são os indivíduos com razão CD4/CD8 anormalmente elevadas que possuem alterações mais severas, relativamente aos que têm razão CD4/CD8 normais. O impacto do álcool na lesão hepática parece assim ser influenciado por dois parâmetros claramente imunológicos.

ABREVIATURAS:

MHC complexo maior de histocompatibilidade
HLA antígenos leucocitários humanos.

INTRODUÇÃO

Estudos realizados em doentes com hemocromatose hereditária (HH) demonstraram que, nestes doentes, a severidade da sobrecarga de ferro, está correlacionada com baixa proporção de células CD8 (¹) e que essa correlação depende do fenótipo HLA (²), isto é, indivíduos com fenótipo HLA-A3+ apresentam formas clinicamente mais severas de doença. Estes estudos vieram assim contribuir para a identificação do envolvimento de factores imunológicos na heterogeneidade clínica da HH.

É hoje aceite que noutras formas de doença hepática crónica, nomeadamente na doença hepática alcoólica, a expressão clínica da doença

1. Sector de Patologia e Imunologia Molecular, Lab. Mestrado de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto.
2. Serviço de Hematologia Clínica, Hospital Geral de Santo António, Porto.
3. Serviço de Gastroenterologia, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia.
4. Centro Regional de Alcoologia do Porto.
5. Centro de Saúde de Montalegre.
6. Centro de Histocompatibilidade do Norte, Porto.
7. Serviço de Química Clínica, Hospital Geral de Santo António, Porto.

Trabalho financiado pela JNICT (projecto n.º PECS/C/SAU/59/95).

*Bolsista da JNICT (bolsa n.º PECS/BIC/1449/95).

é também variável. O facto de apenas 10 a 15% dos alcoólicos desenvolverem cirrose, sugere que outros factores devem afectar o impacto do álcool na lesão hepática (3). Entre os factores descritos como provavelmente implicados na patogénese da doença hepática, encontra-se a sobrecarga de ferro (4,5) embora, clinicamente, o seu papel ainda não esteja completamente esclarecido.

Com o objectivo de avaliar a influência do fenótipo HLA e do perfil de linfócitos T na expressão de doença hepática alcoólica, foi estudada uma população de grandes bebedores da região de Montalegre, nos quais os parâmetros bioquímicos de lesão hepática foram analisados em função do fenótipo HLA-A3 e da razão CD4/CD8, parâmetros associados à sobrecarga de ferro.

MATERIAL E MÉTODOS

População Estudada

Para o presente estudo foram seleccionados 48 indivíduos (42 homens e 6 mulheres), naturais da região de Montalegre, com idades compreendidas entre 27 e 73 anos, classificados como grandes bebedores, segundo o critério de ingestão diária de álcool superior a 100g durante pelo menos 10 anos. Como controlo foi também estudado um grupo de 15 indivíduos (7 homens e 8 mulheres) do mesmo grupo etário e oriundos da mesma região, cujo consumo diário de álcool não excedia 40g nos homens e 20g nas mulheres. Os indivíduos participaram voluntariamente no estudo, após lhes ter sido explicado o objectivo pelos médicos assistentes no Centro de Saúde de Montalegre. Todos os participantes foram entrevistados tendo sido preenchido um questionário com informação sobre o seu estado geral de saúde, hábitos alimentares e consumo de álcool. Para determinação do consumo de álcool foi avaliada a quantidade, o tempo de ingestão e o tipo de bebidas ingeridas (cerveja, vinho verde, vinho maduro, vinho americano ou bebidas brancas).

A todos os indivíduos foram colhidas amostras de sangue venoso periférico para determinação de parâmetros bioquímicos de lesão hepática, ou seja, gamaglutamiltransferase (GGT), aminotransferase do aspartato (AST) e aminotransferase da alanina (ALT), e parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro (ferro, ferritina e transferrina séricos). Adicionalmente foram avaliados os parâmetros imunológicos que anteriormente demonstramos estarem associados à expressão clínica da doença hepática na HH, ou seja, a razão CD4/CD8 e o fenótipo HLA (2). Todos os indivíduos incluídos no estudo eram seronegativos para marcadores de infecção por HBV, HCV e HIV 1 e 2 (dados não apresentados).

Parâmetros Bioquímicos

As enzimas GGT, AST, ALT, o ferro e transferrina séricas foram analisadas por métodos standard em analisador automático (Olimpus System) e a ferritina sérica por teste imunoenzimático (Cobas Core Ferreitin EIA). A saturação da transferrina foi calculada pela razão entre o ferro sérico e a transferrina. Utilizando como limites de referência os dados da população controlo, valores de GGT superiores a 54 U/L, de AST superiores a 75 U/L e de ALT superiores a 72 U/L, ou seja, duas vezes o limite superior da normalidade, foram considerados indicadores de lesão hepática. Os valores de ferritina sérica foram considerados anormalmente elevados de acordo com os valores de referência previamente estabelecidos para a população portuguesa (6).

Parâmetros Imunológicos

A tipagem HLA foi feita pelo teste standard de microlinfotoxicidade de Terasaki. A quantificação de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi realizada por citometria de fluxo (FACScan Becton & Dickinson) utilizando anticorpos monoclonais contra os antigénios CD4 e CD8

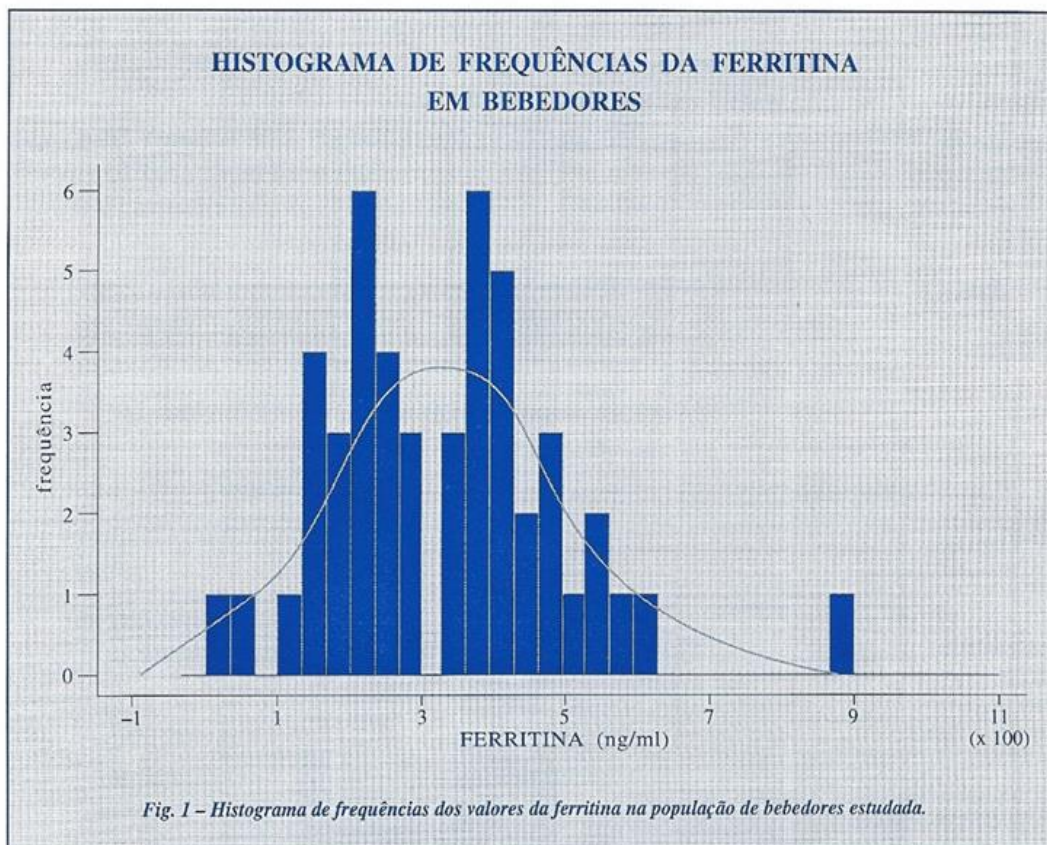
(CD4 tri-color, Caltag Laboratories - San Francisco; CD8-PE, DAKOPATS-Denmark). De acordo com dados publicados anteriormente razões CD4/CD8 superiores a 3.0 foram consideradas anormalmente elevadas (⁷).

Análise Estatística

A análise estatística teve como objectivo avaliar o impacto das variáveis: fenótipo HLA e razão CD4/CD8, nos parâmetros bioquímicos de lesão hepática e parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro na população de bebedores. Para a análise do fenótipo HLA os bebedores foram classificados de acordo com a positividade ou negatividade para o antígeno A3, antígeno associado a severidade da lesão hepática na HH (²). Uma vez que não se encontraram diferenças significativas entre bebedores classificados de

acordo com positividade ou negatividade para todos os outros antígenos HLA classe I, esses resultados não são apresentados. Para a análise da razão CD4/CD8 os bebedores foram classificados segundo razões CD4/CD8 anormalmente elevadas (>3.0) ou normais (<3.0). Em relação ao perfil bioquímico de lesão hepática, os bebedores foram classificados em três grupos: 1. com perfil bioquímico normal; 2. com GGT elevada e AST e normal; 3. com AST elevada sendo a $AST > ALT$.

Para a análise estatística foi usada a transformação logarítmica nas variáveis GGT, AST e ALT, que teve como objectivo obter uma distribuição dos valores compatível com a distribuição normal (Gaussiana). Em contraste com a população normal de referência (⁸), a distribuição dos valores da ferritina sérica na população de bebedores não é logarítmica por isso não foi usada transformação (figura 1).



As médias dos grupos foram comparadas utilizando o teste "T Student". A independência entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste Chi-quadrado com a correção de Yates para pequenas amostras.

O nível de significância considerado nas estatísticas realizadas foi de 0,05. Todos os dados foram analisados usando o programa informático Statgraphics-Statistic Graphics System - STSC.

RESULTADOS

1. Caracterização da população estudada

O grupo dos bebedores estudados apresenta uma média de consumo diário de álcool de 200 g (entre 100 g e 400 g) com um tempo médio de consumo de 35±14 anos. Como está sumarizado na Tabela I, os bebedores diferem dos controlos nos parâmetros bioquímicos de lesão hepática apresentando, em média, valores significativamente mais elevados de GGT (108 U/L, AST (52 U/L) e ALT (39 U/L). Os valores da ferritina sérica são também, em média, significativamente mais elevados nos bebedores do que nos controlos (p=0.005).

Como foi referido na análise estatística (ver material e métodos) a distribuição dos valores da ferritina na população de bebedores não é uma distribuição logarítmica, mas antes uma distribuição bimodal que sugere a existência de duas populações de bebedores uma das quais com valores de ferritina anormalmente elevados e a outra com valores normais (figura 1). A saturação da transferrina não difere significativamente entre os dois grupos

2. Distribuição dos bebedores de acordo com o perfil bioquímico de lesão hepática e do metabolismo do ferro, em função do fenótipo HLA A3 e da razão CD4/CD8 (tabela 2)

Para a caracterização quanto ao perfil bioquímico de lesão hepática, os bebedores foram divididos em três grupos: 1. perfil bioquímico normal; 2. perfil bioquímico com GGT elevada e AST normal; 3. perfil bioquímico com AST elevada sendo AST>ALT. A distribuição dos bebedores pelos três grupos de acordo com o fenótipo HLA e razão CD4/CD8, está representada na tabela 2.

Dos bebedores com fenótipo HLA A3+, 57% apresentam perfil bioquímico do grupo 3, 43% pertencem ao grupo 2 e nenhum tem perfil

Tabela 1. População estudada: parâmetros bioquímicos de lesão hepática e do metabolismo do ferro em bebedores e controlos caracterizados por consumo de álcool*

	Bebedores (n=48)	Controlos (n=15)	
Consumo diário de álcool (g)	200 [100-400]	<40 (Homens) <20 (Mulheres)	
Tempo de consumo (anos)	35±14		
Idade (anos)	56±13	49±13	
Homens/Mulheres	42/6	7/8	
GamaGT (U/L)	108±132	18±14	p=0.00001
AST (U/L)	52±48	25±11	p=0.00558
ALT (U/L)	39±28	24±12	p=0.04506
Ferritina (ng/ml)	335±165	200±130	p=0.005
Saturação da Transferrina (%)	44±16	36±10	n.s.

*Amostras comparadas utilizando o teste "T Student"

p=nível de significância

n.s.=não significativo

bioquímico normal. Dos bebedores com HLA A3-, apenas 15% têm perfil bioquímico do grupo 3, 42.5% pertencem ao grupo 2 e 42.5% têm perfil bioquímico normal. Assim a frequência de alterações da função hepática é significativamente mais elevada nos indivíduos com fenótipo A3+ do que nos indivíduos com fenótipo A3- ($p=0.0003$).

Dos bebedores com razão CD4/CD8 anormalmente elevada, 57% pertencem ao grupo 3, 29% ao grupo 2 e 14% ao grupo 1. Dos

que têm razão CD4/CD8 normal, apenas 14% pertencem ao grupo 3, 46% ao grupo 2 e 40% ao grupo 1. Assim a frequência de alterações da função hepática é também significativamente mais elevada nos indivíduos com razão CD4/CD8 anormalmente elevada, do que nos indivíduos com razão CD4/CD8 normais ($p=0.0013$). Este resultado é ainda mais significativo ($p=0.0002$) se as razões Cd4/CD8 forem comparadas entre indivíduos HLA A3- apenas (ver tabela).

Tabela 2. Distribuição dos bebedores de acordo com o perfil bioquímico, em função do fenótipo HLA e da razão CD4/CD8*

	Perfil Bioquímico			
	Normal	GGT elevada AST normal	GGT elevada AST>ALT	
HLA-A3+ (n=7)	0 (0%)	3 (43%)	4 (57%)	$p=0.0003$
HLA-A3- (n=40)	17 (42.5%)	17 (42.5%)	6 (15%)	
CD4/CD8>3 (n=7)	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)	$p=0.0013$
CD4/CD8<3 (n=37)	15 (40%)	17 (46%)	5 (14%)	
Indivíduos HLA-A3-				
CD4/CD8>3 (n=7)	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)	$p=0.0002$
CD4/CD8<3 (n=32)	15 (47%)	15 (47%)	2 (6%)	

*Amostras comparadas utilizando o teste Chi-quadrado
p=nível de significância

Tabela 3. Comparação de parâmetros bioquímicos de lesão hepática e do metabolismo do ferro entre bebedores caracterizados de acordo com o fenótipo HLA-A3*

	HLA-A3- (n=40)	HLA-A3+ (n=7)	
Idade (anos)	57±13	53±12	n.s.
Tempo de consumo (anos)	34±15	37±13	n.s.
GamaGT (U/L)	88±105	219±220	$p=0.0097$
AST (U/L)	44±35	104±81	$p=0.0031$
ALT (U/L)	35±27	55±30	$p=0.0505$
Ferritina (ng/ml)	309±142	502±206	$p=0.0030$
Saturação da Transferrina (%)	43±12	53±30	n.s.

*Amostras comparadas utilizando o teste "T Student"
p=nível de significância
n.s.=não significativo

3. Comparação de parâmetros bioquímicos, entre bebedores caracterizados de acordo com o fenótipo HLA A3 (tabela 3)

Conforme apresentado na tabela 3, os bebedores com fenótipo HLA A3+ diferem significativamente dos bebedores com fenótipo HLA A3-, apresentando valores médios mais elevados para as variáveis GGT ($p=0.0097$), AST ($p=0.0031$), ALT ($p=0.0505$) e ferritina ($p=0.0030$). A saturação da transferrina não apresenta valores significativamente diferentes entre os dois grupos.

4. Comparação de parâmetros bioquímicos, entre bebedores HLA A3- caracterizados de acordo com a razão CD4/CD8 (tabela 4).

Conforme apresenta na tabela 4, verifica-se que entre o grupo de bebedores com fenótipo HLA A3-, os que apresentam razões CD4/CD8 anormalmente elevadas têm, em média, valores significativamente mais elevados para os parâmetros GGT ($p=0.0156$), AST ($p=0.0026$), ALT ($p=0.0101$) e ferritina ($p=0.0363$) do que os que apresentam razões CD4/CD8 normais. A saturação da transferrina não apresenta valores significativamente diferentes entre os dois grupos.

DISCUSSÃO

A existência de interações reguladoras entre o sistema imunológico e o metabolismo do ferro é um facto hoje bem documentado (⁸⁻¹⁰). No caso da hemocromatose essa interacção está demonstrada pela correlação entre a sobrecarga de ferro e a baixa proporção de células CD8+ circulantes no contexto do HLA (²). Num estudo de distribuição do ferro em tecidos de ratinhos deficientes no gene para a $\beta 2$ -microglobulina ("knock out" $\beta 2m^{-/-}$) confirmou-se existir sobrecarga de ferro hepático semelhante à encontrada na hemocromatose (11). Estes ratinhos não expressam os antígenos do MHC-classe I e por isso, não possuem linfócitos T CD8+. Os estudos descritos constituem forte evidência do envolvimento de subpopulações de linfócitos T, no contexto do MHC-classe I, na regulação da sobrecarga de ferro e, consequentemente, na regulação da expressão clínica da hemocromatose. A recente descoberta de duas mutações num mesmo gene HLA, HLA-H, associadas à hemocromatose (¹²), veio dar um novo impacto à compreensão do papel do MHC na patogénese da sobrecarga do ferro.

Neste estudo foi avaliado o impacto do fenótipo HLA e da razão CD4/CD8 na expressão

Tabela 4. Comparação de parâmetros bioquímicos de lesão hepática e do metabolismo do ferro entre bebedores HLA-A3- caracterizados de acordo com a razão CD4/CD8*

	CD4/CD8>3 (n=7)	CD4/CD8<3 (n=32)	
CD4 (%)	52±7	42±8	
CD8 (%)	13±3	28±10	
CD4/CD8	4.3±1.2	1.6±0.5	
Idade (anos)	53±14	57±13	n.s.
Tempo de consumo (anos)	29±9	36±16	n.s.
GamaGT (U/L)	140±73	78±110	p=0.0156
AST (U/L)	79±49	36±27	p=0.0026
ALT (U/L)	59±41	30±20	p=0.0101
Ferritina (ng/ml)	410±166	286±130	p=0.0363
Saturação da Transferrina (%)	44±14	42±12	n.s.

*Amostras comparadas utilizando o teste "T Student"
p=nível de significância
n.s.=não significativo

sistema imunológico, particularmente as células T, através da sua função na regulação do metabolismo do ferro, podem influenciar a expressão clínica de doenças até hoje não consideradas de natureza imunológica.

AGRADECIMENTOS

Este estudo não seria possível sem a preciosa colaboração dos médicos do Centro de Saúde de Montalegre na seleção e convocação dos doentes, da enfermeira Alcina Sobral do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia nas colheitas de sangue e dos técnicos dos laboratórios de Hematologia Clínica e Química do Hospital Geral de Santo António e do Laboratório do Centro de Histocompatibilidade do Norte na receptividade que mostraram ao aumento significativo do trabalho de rotina que o presente trabalho representou.

BIBLIOGRAFIA

1. PORTO G., REIMÃO R., GONÇALVES C., VICENTE C., JUSTIÇA B. & DE SOUSA M. Hemochromatosis as a window into the study of the immunological system: novel correlation between CD4/CD8 populations and iron absorption in man. *Eur. J. Haematology*, 52: 283-290 (1994).
2. PORTO G., VICENTE C., TEIXEIRA M. A., MARTINS O., CABEDA J. M., GONÇALVES C., SILVA B. M., FRAGA J., MACEDO G., JUSTIÇA B. & DE SOUSA M. Relativ impact of HLA phenotype and CD4/CD8 ratios on the clinical expression of Haemochromatosis. *Hepatology* (em publicação).
3. SORENSEN T. I. A., BENTSEN K. D., EGHOJE K., ORHOLM M., HOYBYE G., CHRISTOFFERSEN P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet*, 2: 241-244 (1984).
4. TSUKAMOTO H., HORNE W., KAMIMURA S. et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J. Clinical Invest.*, 96: 620-630 (1995).
5. PIETRANGELO A., GUALDI R., CASALGRANDI G., MONTOSI G. & VENTURA E. Molecular and cellular aspects of iron-induced Hepatic Cirrhosis in Rodents. *J. Clinical Invest.*, 95: 1824-1831 (1995).
6. VICENTE C., PORTO G. & DE SOUSA M. Method for establishing serum ferritin reference values depending on sex and age. *J. Lab. Clin. Med.*, 116: 779-784 (1990).
7. REIMÃO R., PORTO G. & DE SOUSA M. Stability of CD4/CD8 ratios in man: new correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic hemochromatosis patients. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 313 (III): 481-483 (1991).
8. DE SOUSA M. T. lymphocytes and iron overload: novel correlation of possible significance to the biology of the immunological system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: suppl. V, 23-29 (1992).
9. KONIJN A. M. Iron metabolism in inflammation. *Baillière's Clinical Haematology*, 7: 829-849 (1994).
10. KUHN L. C. Molecular regulation of iron proteins. *Baillière's Clinical Haematology*, 7: 763-785 (1994).
11. DE SOUSA M., REIMÃO R., LACERDA R., HUGO P., KAUFMANN S. H. E. & PORTO G. Iron overload in β 2-microglobulin deficient mice. *Immunol. letters*, 39: 105-111 (1994).
12. FERDER J. N., GNIRKE A., THOMAS W., TSUCHIHASHI Z. et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics*, 13: 399-408 (1996).

