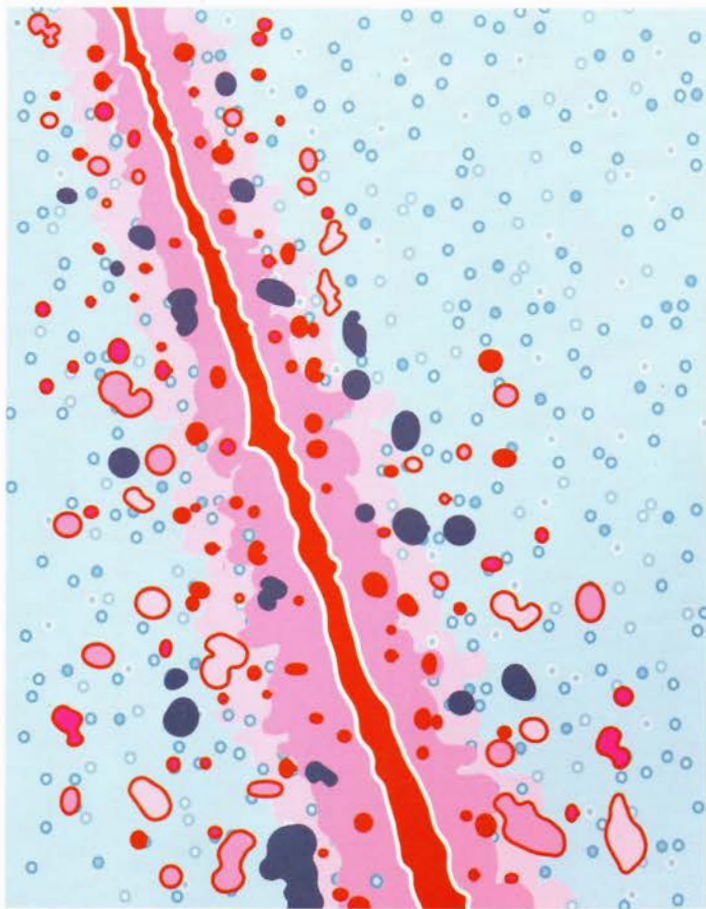


# CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA ECOLOGIA E DA BIOLOGIA DO SISTEMA TIMO-DEPENDENTE

MEMÓRIAS, PERCURSOS E ESBOÇO DE UMA NOVA TEORIA

*MARIA DE SOUSA*



Grande Prémio **Bial**  
de Medicina 1994

1º CLASSIFICADO



MARIA DE SOUSA

CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO  
DA ECOLOGIA E DA BIOLOGIA  
DO SISTEMA TIMO-DEPENDENTE

MEMÓRIAS, PERCURSOS E ESBOÇO DE UMA NOVA TEORIA

EDIÇÃO BILINGUE

Porto – 1995

O livro «Contribuição para a caracterização da ecologia e da biologia do sistema timo-dependente» foi publicado em 1.ª edição pelos Laboratórios Bial com uma tiragem de 10.000 exemplares.

Execução Gráfica: Inova-Artes Gráficas

Depósito Legal n.º 91.441/95

Ilustração da capa: Cândido Xavier

© COPYRIGHT 1995. Maria Ângela de Sousa. Este trabalho está sujeito a Copyright. Todos os direitos estão reservados tanto no que diz respeito à totalidade como a qualquer das suas partes, especificamente os de tradução, reimpressão, transmissão por qualquer forma, reprodução por fotocopiadoras ou sistemas semelhantes e arquivo em sistema de informática.



*So, if you prosper, suspect those bright  
Mornings when you whistle with a light  
Heart. You are loved; you have never seen  
The harbour so still, the park so green,  
So many wellfed pigeons upon  
Cupolas and triumphal arches,  
So many stags and slender ladies  
Beside the canals. Remember when  
Your climate seems a permanent home  
For marvellous creatures and great men,  
What griefs and convulsions startled Rome,  
Ecbatana, Babylon.*

W. H. AUDEN



## BIOGRAFIA DA AUTORA





**Maria de Sousa** nasceu em Lisboa onde frequentou o antigo Liceu Rainha D. Leonor, à Junqueira, e onde se começou a fascinar pelas vidas dos grandes cientistas com os seus professores de Física (que também tocaram Clara Pinto Gouveia inspirando o seu livro “Vitória! Vitória!”) e de Ciências Naturais. Frequentou a Faculdade de Medicina de Lisboa onde muito cedo teve oportunidade de começar a participar em trabalhos de investigação com o seu Professor da Anatomia Patológica, José Cortês Pimentel, no Departamento de Jorge da Silva Horta.

Também muito cedo no curso de Medicina foi aliciada pelo projecto do Instituto Gulbenkian de Ciência dos Drs. David Ferreira, Horácio Menano, Peres Gomes e Van Udden.

Com o encorajamento dos dois primeiros e o apoio da Fundação Gulbenkian fez o seu estágio pós-licenciatura em Medicina como bolsista da Fundação Gulbenkian no Imperial Cancer Research Fund em Mill Hill. Durante este estágio no Laboratório da Dr.<sup>a</sup> Delphine Pavvott, demonstrou a existência de áreas ocupadas por células derivadas do timo, posteriormente denominadas áreas timo-dependentes. Voltou a Portugal onde foi assistente de investigação no Instituto Gulbenkian de Ciência por um período breve que não conseguiu competir com o seu interesse em continuar o trabalho iniciado em Londres. Partiu assim para Glasgow como Leitora de Imunologia. Doutorou-se na Universidade de Glasgow, estendeu o trabalho à demonstração de áreas T e B não só no ratinho, mas também nas aves e no homem. Teve como seus primeiros alunos de doutoramento dois portugueses, António Freitas e Benedita Rocha, hoje com posições e contribuições distintas a trabalhar no Instituto Pasteur e Hospital Necker em Paris. Na continuidade da preocupação de perceber como é que as células do sistema linfóide “parecem saber para onde ir” (fenómeno que designou ecotaxis) seguiu para New York a convite de Robert A. Good, então Director do Sloan Kettering Institute for Cancer Research. Dirigiu a Unidade de Ecologia Celular como Membro Associado e Professora Associada de Cornell University Medical College.

De estudos da distribuição de linfócitos no linfoma de Hodgkin demonstrou a existência de “ecotaxopatias”, i. e. de imunodeficiências por má-distribuição de linfócitos no Homem.

O seu laboratório durante esse período teve o enriquecimento de numerosos estagiários de outras culturas hoje a trabalhar nos Estados Unidos, Japão, Inglaterra e França.

Durante esse período começou o trabalho sobre as interações recíprocas do ferro e linfócitos, estudando modelos *in vitro* e doentes com sobrecarga de ferro devido a múltiplas transfusões de sangue. Esses estudos pioneiros vieram a ter a sua continuação no trabalho feito nos últimos dez anos sobre uma doença genética de sobrecarga do ferro, a hemocromatose, com uma alta prevalência no norte do País, no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar no Porto onde é Professora Catedrática. Nos anos de transição entre New York e o Porto foi Professora Associada convidada em Harvard onde fez trabalhos experimentais na área da artrite experimental e radiologia experimental que contribuíram para o desenvolvimento de um novo método de diagnóstico precoce da artrite reumatóide.

Desde 1985 é também responsável pela coordenação do Mestrado de Imunologia, um Curso Pós-graduado com módulos nas várias vertentes na Biologia Moderna possível pela diversidade de professores com Laboratórios de Investigação dentro da Universidade do Porto e outras instituições universitárias no país.

Deste curso obtiveram ou estão no processo de obter até hoje graus de Mestre 20 alunos. Destes, 19 iniciaram a sua carreira científica com doutoramentos em Oxford, Harvard, Londres, Estocolmo, Utrecht, etc.

O seu curriculum e o êxito do trabalho da sua equipa no Porto agora premiado, são bem o reflexo da mudança que se tem verificado no país com a disponibilização de financiamentos nacionais e comunitários sujeita a critérios de avaliação respeitados internacionalmente. Embora reconhecidos como insuficientes pela Comunidade Científica portuguesa estes financiamentos têm permitido “fotografar” a existência de uma comunidade real e potencial que Portugal não deverá deixar de acarinhar.

Considera que o Prémio Bial, reconhecendo a existência dessa comunidade, contribui para a dignificar colectivamente. Sabe que a investigação científica no fim do século XX só é possível se percebida como um empreendimento colectivo.

Assim, um êxito é, de certo modo, o êxito de todos os que participam nesse empreendimento.

## AGRADECIMENTOS





## «UM SOSSEGO ENTRE DOIS TEMPOS»

*Texto lido por Maria de Sousa em 2 de Maio de 1995 na Cerimónia  
de Atribuição do Grande Prémio Bial de Medicina 1994*



Sei que tendo pedido para usar da palavra nesta cerimónia quebrei um pouco uma tradição. Fi-lo por dois motivos: o primeiro, porque este momento é singularmente especial para mim, e para o pequeno colectivo a que pertença. O segundo, porque sendo a atribuição do Prémio feita nesta casa, eu não podia deixar de referir que a Imunologia portuguesa lhe está muito ligada por duas razões: porque no Prof. Machado Caetano, o país tem uma das primeiras figuras académicas a inspirar jovens nos anos setenta a iniciarem a sua carreira em Imunologia; porque dois antigos professores desta casa, os Profs. António Freitas e Benedita Rocha, foram os meus 2 primeiros alunos de doutoramento na Universidade de Glasgow, ocupando hoje, pelas suas contribuições, lugares destacados no mundo da Imunologia<sup>1-3</sup>. É impossível a um professor não se regozijar e não divulgar o êxito do seu 1.º aluno de doutoramento e poder portanto usar esta oportunidade para me regozijar e dizer a todos que o Prof. António Freitas é desde o princípio deste ano, director de uma nova unidade do Instituto Pasteur, em Paris.

Seria um pouco injusto, no entanto, regozijar-me só com um antigo aluno. Entre doutorados, pós-doutorados, doutorandos e mestrados, somos hoje à roda de trinta e cinco, alguns, entre os mais velhos a ensinar, a dirigir laboratórios de investigação, serviços clínicos, nos E.U.<sup>4-6</sup>, no Japão<sup>7</sup>, na Inglaterra<sup>8</sup> e na França<sup>1-3</sup>.

O êxito dos mais novos está talvez também a ser premiado, mas o êxito é deles e a única possível contribuição de um professor para esse êxito é acreditar neles e procurar ajudar a colocá-los nos melhores centros em que se está a fazer investigação no mundo. E prepará-los bem. Mas ninguém pode mais preparar ninguém bem, sozinho.

O pequeno êxito dos nossos alunos do Mestrado<sup>9-10</sup> ou dos nossos alunos de doutoramento, por onde quer que andem depois de fazer o Mestrado de que sou coordenadora<sup>11-20</sup>, é um êxito da responsabilidade dos meus colegas, 14 a 15, professores na Universidade do Porto e de outros, convidados, vindos de outras Universidades no país ou fora dele.

É este lento perceber que em Portugal somos muito poucos e que, se nos dividirmos, não seremos nenhuns. É reconhecer que os penalizados, se não abrirmos as nossas escolas entre nós, não seremos nós, mas aqueles que acolhermos como alunos e a sociedade que eles vão poder construir num mundo muito diferente daquele em que nós crescemos.

O que me conduz ao outro motivo que me levou a pedir para falar.

A probabilidade no mundo em que eu cresci, que uma mulher nos anos 60, saída de um país com um pequeno reconhecimento internacional da sua produtividade científica, onde ainda se esperava sobretudo de uma mulher que casasse e tivesse filhos, com um grau de licenciatura em Medicina, considerada uma licenciatura quase de 2.<sup>a</sup> classe pelos melhores cientistas na Inglaterra daquele tempo, a probabilidade que uma tal jovem portuguesa estivesse aqui hoje, pelas razões que está, era quase nula à partida.

Mas, de facto, essa mulher tão nova e tão distante de mim própria, vista dos 30 anos que nos separam, fez uma observação nova em Inglaterra<sup>21</sup> precisamente pela qualidade da preparação que tinha tido em Lisboa, na área da Microscopia, obrigando aquelas com quem foi trabalhar e que, a princípio, não acreditavam muito no que lhes mostrava, a reconhecer a observação como uma descoberta e, muito prontamente, a adoptá-la como «*nossa*».

A descoberta que linfócitos com origem em diferentes órgãos centrais, como o timo, quando circulam, ocupam territórios distintos dentro dos órgãos que atravessam. Territórios que designámos então áreas timo-dependentes, hoje vulgarmente conhecidas como *áreas T*<sup>22,23</sup>.

Destemida rapariga essa que não se contentou com coisa nenhuma que a impedisse de prosseguir as perguntas que essa primeira observação tinha evocado<sup>24,25</sup>.

Deixando assim Oeiras onde tinha voltado depois de Londres, para ir para Glasgow. Cansando-se da insuficiência das respostas dadas pelo trabalho experimental com animais<sup>26</sup> e *in vitro*<sup>27</sup>. Continuando. Passando a perguntar não só como, mas porquê. Em busca de respostas na doença de Hodgkin, em Nova York<sup>28</sup>. Encontrando finalmente uma pequena luz. Frágil<sup>29</sup>. Que considerou forte e transformou em hipótese<sup>30</sup>. De hipótese em experimentos<sup>31-33</sup>. De hipótese para o estudo de vários tipos de cancro e modelos clínicos de sobrecarga de ferro<sup>34-36</sup>. Modelos esses em que, muito cedo, começou a estudar os linfócitos por que a hipótese dizia que essas células podiam ter uma função na protecção da toxicidade do ferro.

Mas também outros modelos clínicos e experimentais: em áreas aplicadas aparentemente distantes da imunologia básica, a reumatologia<sup>37</sup>, a medicina nuclear<sup>38</sup>, a hematologia<sup>39</sup>, a oncologia<sup>40</sup>. Olhada com a suspeita de não estar bem da cabeça. Sendo vista como tendo completamente perdido o juízo, mesmo pelos seus melhores amigos, ao deixar Nova York para ir

estudar uma doença genética de sobrecarga de ferro em Portugal, no Porto! Audaz. Indiferente à adversidade. Sem perceber se a adversidade vinha pelo facto de ela ser mulher ou simplesmente alguém que se afirmava chegada de sítio nenhum especial.

Sem se aperceber que para chegar a algum lugar de destaque no seu próprio tempo, diz-se habitualmente aos homens ser necessário negociar. Trocar a simplicidade pela aparência de ser importante. Trocar a ingenuidade pela aparência de ser sofisticado. Trocar o que se é pelo que se deve parecer ser. Aparentar ter estilo. Esconder o essencial. Não deixar transparecer a força do entusiasmo. Parecer indiferente: *aloof*, em inglês. *Cool* em americano.

Tudo isto é talvez necessário para se chegar a qualquer *outro* lugar. Mas não à clareira onde o verdadeiro perguntar leva. O estilo do verdadeiro perguntar de natureza científica, não importa em que tempo, em que mundo é que estamos, acabará sempre por residir na importância da simplicidade que unifica. Na sofisticação educada da ingenuidade que esclarece e acredita, mesmo com fortes razões para suspeitar.

Mas esses valores não são geralmente reconhecidos no seu próprio tempo. E de facto, quem se rege por eles aprende a viver num outro tempo. «*Amanhã*», como dirá o poeta<sup>49</sup>, passa a ser a «*morada permanente*», exigindo a reconciliação com a condição só, que vai com o poder de duvidar o conhecimento estabelecido e não deixar de perguntar. Não o poder de mandar. Não o poder de ditar. Não o poder de manipular. Não o poder de influenciar decisões. Nem mesmo o poder de seduzir.

O poder simples, cristalino, cortante como um diamante, de perguntar. O poder que transforma engenhos em máquinas de voar.

E um dia, o tempo e o espaço que nos rodeiam mudam. Como uma palavra num jogo de palavras cruzadas. Ganhando sílabas e significado do tecer das palavras dos outros. E a percepção da pertinência da pergunta que parecia sem juízo, muda. A evidência a favor, muda. A compreensão de alguém ter deixado Nova York pelo Porto muda. A incursão em áreas eminentemente aplicadas muda.

A luz frágil transforma-se em evidência forte. Dos resultados do trabalho do grupo no Porto<sup>41-45</sup> e do progresso do trabalho d'outros em áreas afins ou distantes<sup>46</sup>. Trabalho com características de investigação básica, mas baseado e totalmente dependente da clínica. Clínica essa que, pela com-

preensão não só dos médicos responsáveis nos nossos grandes centros urbanos, mas pela crescente participação de outros clínicos nos seus postos, centros de saúde, pequenos hospitais de pequenas cidades e, pela excepcional resposta dos doentes eles próprios e das suas famílias e das populações a que pertencem, pode ser feita unicamente bem em Portugal.

Perdoar-me-ão todos se neste momento eu destaco uma outra primeira aluna de doutoramento, a primeira em Portugal licenciada em Medicina, a Sra. Dra. Graça Porto, trabalhando entre o Serviço de Sangue do HGSA e do meu laboratório. E o Sr. Dr. Francisco Meireles, médico decano da aldeia de S. Nicolau, em Cabeceiras de Basto, e o seu inesperado sobrinho Dr. José Fraga, hoje Director Clínico do Serviço de Gastroenterologia no Hospital de Vila Nova de Gaia. Todos mobilizados porque um médico no Hospital de S. Marcos, que nunca esperou ser reconhecido ou lembrado em cerimónias públicas, tinha cumprido o seu dever de enviar as peças da autópsia de um homem muito jovem da aldeia de S. Nicolau, morto subitamente com uma doença inexplicada a um anatomopatologista com grande experiência e interesse pela doença em causa<sup>47,48</sup>. E o primeiro dos nossos doentes vivos, «diagnosticado» pela mulher de um amigo, com base no entusiasmo e informações trazidas por uma outra colega que tinha visitado o meu laboratório em Nova York.

Perdoar-me-ão.

Mas para quem começa uma vida nova como eu comecei no Porto em 1985, os primeiros encontros são os lembrados mais vividamente. Embora não sabendo ao certo, a pessoa que os lembra sente que se esses tivessem falhado nada do que se seguiu se teria seguido, assim, até este sossego.

Por isso o título desta intervenção é *Um Sossego entre Dois Tempos*. Porque tudo parece serenar entre o tempo certo que se sabia difícil e este novo tempo, improvável, de tudo parecer começar a ser percebido.

Entre dois tempos: *o tempo certo e o tempo incerto*. O tempo em que um Prémio diz que o poder de perguntar transformou aquela probabilidade incerta dos anos sessenta, numa realidade visível, com corpo, pompa e a circunstância desta cerimónia.

Entre pares académicos. Entre colegas que ao longo dos anos nos apoiaram. Entre velhos amigos e professores. Com os mais novos do laboratório. Entre outros que aqui e ali transformaram o impossível só porque estavam no seu posto, prontos a partilhar o tal outro poder, em que ninguém em Ciência, sozinho, pode ser particularmente importante.

Um sossego como tréguas. Como oásis. Como bancos de pedra fresca debaixo de árvores frondosas ao fim de uma caminhada num dia quente.

Um sossego em que a evidência diz que os linfócitos têm um papel na regulação do metabolismo do ferro mas que, naturalmente, não o fazem ao acaso. Porque, como a primeira contribuição tinha demonstrado, os linfócitos têm a capacidade de discriminar entre pequenos territórios e grandes órgãos dentro de cada um de nós.

E de responder com o que é necessário, *onde é necessário*. E esse necessário inclui tudo o que vem nos livros. E também o que se começa a saber de novo com o trabalho que agora foi premiado. Um pequeno passo na grande jornada de desvendar.

Porque durante 30 anos, *amanhã* foi a nossa *morada permanente*.

Porque, citando com exactidão o poeta norte-americano e.e. cummings<sup>49</sup>:

*«Amanhã é a nossa morada permanente  
onde dificilmente nos encontrarão (se encontrarem fugimos para mais  
longe ainda: para este momento presente»*

*Para o dia de Hoje. Dia da festa de agradecer: a todos vós.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freitas AA, Rocha BB. (1993) Lymphocyte life spans. Homeostasis selection and competition. *Immunol. Today* **14**: 25.
2. Freitas AA, Rosado M, Viale AC, Graudieu A. (1995) The role of cellular competition in B cell survival and selection of peripheral B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.*
3. Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D. (1994) Thymic and extrathymic origins of Gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J. Exp. Med.*, **180**: 681-686.
4. Carroll AM. (1995) Associate Professor, Albany Medical College, New York.
5. Newcomb EW. (1994) Director, the Kaplan Center's Transgenic Mouse Research Facility, NY U Medical Center, New York.
6. Potaznik D. (1994) Head, Pediatric Hematology, Staten Island Hospital, New York.
7. Nishiya K. (1994) Associate Professor, Kochi Medical School, Okou, Japan.
8. Akbar A. (1995) Senior Lecturer, Royal Free Hospital School of Medicine, London.
9. Antunes S. (1995) The Optical Fractionator. *Zoological Studies*, **34**, suppl. 1, 180-183
10. Cordeiro da Silva A, Lepresle T, Capron A, Pierce RJ. (1992) Molecular cloning. of a 16-kilodalton Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **52**: 275-8.
11. Arosa FA, da Silva AJ, Godinho MI, ter Steege JCA, Porto G, Rudd CE, de Sousa M. (1994) Decreased CD8-p56lck activity in peripheral blood T lymphocytes from patients with Hereditary Hemochromatosis. *Scand. J. Immunol.*, **39**: 426-432.
12. Cabeda JM, Porto G, Lacerda R, *et al.* (1995) Anomalies of the CD8<sup>+</sup> populations in Genetic Hemochromatosis: characterization of the T-cell receptor repertoire. *FASEB J.*, **9** A 527.
13. Cardoso AA, Li-Mu-Lin, Batard P, Hatzfeld A. *et al.* (1993) Release from quiescence of CD34 super(+)CD38 super(-) human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA*, **90**: 8707-8711.
14. Carmo AM, Mason DW, Beyers AB. Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56<sup>lck</sup> and p59<sup>lyn</sup>. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 2196-2201.
15. Coito AJ, Binder J, Brown LF, de Sousa M., van de Water L, Kupiec-Weglinski JW. (1995) Anti-TNF- $\alpha$  treatment downregulates the expression of fibronectin and decreases cellular infiltration of cardiac allografts in rats. *J. Immunol.* (in press).



16. Rodrigues P, Hermsen T, Egberts E, Stet R. (1995) Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio L.*) *Developmental and Comparative Immunol.* (in press).
17. Russel-Pinto F. (1990) Differences in infestation intensity and incidence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus metacercariae* (*Gymnophallidae*) in *Cerastodrema edule* (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Aveiro. *J. Parasitol.*, **76**: 635-659.
18. Santos M, de Sousa M. (1994) *In vitro* modulation of T cell surface molecules by iron. *Cell. Immunology*, **154**: 498-506.
19. Ying S, Tabora-Barata L, Meng Q, Humbert M, Kay AB. (1995) The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) and RANTES in the skin of human atopic subjects: relationship to eosinophil, T-cell and macrophage recruitment. *J. Exp. Med.* (in press).
20. Teixeira AM, Fawcett J, Simmons DL, Watt SM. (1994) The N-domain of the *Biliary Glycoprotein* (BGP) adhesion molecule mediates homotypic binding: domain interactions and epitope analysis of BGPC. *Blood*, **84** (1): 211-219
21. de Sousa MAB. (1964) First description of the changes in the tissues of neonatally thymectomized mice. *ICRF 62nd Annual Report*.
22. Parrott DMV, de Sousa MAB, East J. (1966) Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, **123**: 191.
23. de Sousa MAB, Parrott DMV, Pantelouris EM. (1969) The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus. *Clin. Exp. Immunol.*, **4**: 637.
24. de Sousa MAB. (1973) The ecology of thymus-dependency. Contemporary Topics in Immunology. RL Carter and AJS Davies, eds. New York: *Plenum Press*, **2**: 119.
25. de Sousa M. (1976) Cell traffic. In «Receptors and Recognition». Series A. P Cuatrecasas and M Greaves, eds.. London: *Chapman and Hall*, **2**: 103.
26. Freitas AA, de Sousa M. (1976) The role of cell interactions in the control of lymphocyte traffic. *Cell Immunol*, **22**: 345.
27. de Sousa M, Heston W. (1976) Modulation of B cell interaction by T cells. *Nature.*; **260**: 429.
28. de Sousa M, Yang M, Lopes-Corrales E, Tan C, Du Pont B, Good RA. (1977) Ecotaxis: the principle and its application to the study of Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **27**: 143-151.
29. de Sousa M, Smithyman A, Tan, C. (1978) Suggested models of ecotaxopathy in lymphoreticular malignancy: A role for iron binding proteins in the control of lymphoid cell migration. *Am. J. Pathol.*, **90**: 497.

30. de Sousa M. (1978) Lymphoid cell positioning: New proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **32**: 393.
31. Nishiya K, de Sousa M, Tsoi E, Bognacki JJ, De Harven E. (1980) Regulation of expression of a human lymphoid cell surface marker by iron. *Cell Immunol.*, **53**: 71-83.
32. Bryan C, Nishiya K, Pollack M, Dupont B, de Sousa M. (1981) Differential inhibition of the MLR by iron. *Immunogenetics.*, **12**: 129-140.
33. Dörner MH, Silverstone A, Nishiya K, de Sostoa A, Munn G, de Sousa M. (1980) Ferritin synthesis by human T-lymphocytes. *Science.*, **209**: 1019-1021.
34. Kapadia A, de Sousa M, Markenson A, Miller B, Good RA, Gupta S. (1980) Lymphocyte sets and immunoglobulins in patients with thalassemia intermedia. *Brit. J. Haematol.*; **45**: 405-416.
35. Grady RW, Akbar AA, Giardina PJ, Hilgartner MW, de Sousa M. (1985) Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassemia major: the relative contributions of transfusion and splenectomy. *Brit. J. Haematol.*, **59**: 713-724.
36. Akbar AN, Fitzgerald-Bocarsly PA, de Sousa M, Giardina PJ, Hilgartner MW, Grady R. (1986) Decreased natural killer activity in thalassemia major: A possible consequence of iron overload, *J. Immunology*, **126**: 1635-1640.
37. de Sousa M, Dynesius-Trentham R, Mota-Garcia F, Teixeira da Silva M, Trentham DE. (1988) Activation of rat synovium by iron. *Arth. Rheum.* **31**: 653-661.
38. de Sousa M, Bastos AL, Dynesius-Trentham R, Kerr S, Bernardo A, Duarte JG, Trentham DE. (1986) Potential of Indium-III to measure inflammatory arthritis. *J. Rheum.*, **13**: 1108-1116.
39. Potaznik D, de Sousa M, Helson L., Bagin R, Groshen S., Bhalla RB. (1985) Ferritin in neuroblastoma: impact of tumor load and blood transfusions. *Canc. Invest.*, **3**: 327-338.
40. Potaznik D, Groshen S., de Sousa M, Bagin R, Bhalla R, Schwartz M, and Miller D. (1987) Association of serum iron serum transferrin saturation and serum ferritin with survival in acute lymphocytic leukemia. *Am. J. Pediatric. Hematol Oncol.*, **9**: 350-355.
41. de Sousa M, Porto G, Fraga J, Martins da Silva B, Lacerda R, Carvalho Santos, Serrão D, Salgadinho A, Vicente C. (1988) •Hereditary Hemochromatosis (HH) in the north of Portugal. 1. Preliminary characterisation of first 15 cases. • *Ann. N.Y. Acad.*, **526**: 349-351.
42. Reimão R, Porto G, de Sousa, M. (1991) Stability of CD4/CD8 ratios in man: New correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic haemochromatosis patients. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. **313**, Série III, p. 481-487.
43. Porto G, Vicente C, Fraga J, Martins da Silva, B and de Sousa M. (1992) The importance of establishing appropriate local reference values for the screening of Hemochromatosis: a study of 3 different control populations and 136 Hemochromatosis family members. *J. Lab. Clin. Med.*, **119**: 295-305.

44. Porto G, Reimão R, Gonçalves C, Vicente C, Justiça B, de Sousa M. (1994) Haemochromatosis as a window into the study of the immunological system in man: a novel correlation between CD8<sup>+</sup> lymphocytes and iron overload. *European Journal of Haematology*, **52**: 283-290.
45. Vicente C, Porto G, de Sousa M. (1990) Method for establishing serum ferritin reference value depending on sex and age. *J. Lab. Clin. Med.*, **116**: 779-784.
46. de Sousa M, Reimão R, Lacerda R, Hugo P, Kaufman S. (1994) Iron overload in B2 microglobulin deficient mice. *Immunol. Lett.*, **39**: 105-111.
47. Serrão D, (1986) v. ref. 48.
48. Dias F, Peixoto MR. (1986) Hemocromatose idiopática (a propósito de um caso clínico). *Bol. H. S. Marcos*, **11**: 117-123.
49. cummings, e.e. *A selection of poems*. A Harvest Book, p. 128, New York.



CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO  
DA ECOLOGIA E DA BIOLOGIA  
DO SISTEMA TIMO-DEPENDENTE  
(1964-1994)

MEMÓRIAS, PERCURSOS E ESBOÇO DE UMA NOVA TEORIA

**PARTE A**

DO ESTABELECIDO E ANTEVISTO COM ALGUMA CERTEZA

**PARTE B**

ESBOÇO DE UMA TEORIA DA EVOLUÇÃO DOS DOIS GRANDES  
SISTEMAS DE CÉLULAS CIRCULANTES (*POST-SCRIPTUM*)



# ÍNDICE





## ÍNDICE

### **PARTE A: Do estabelecido e antevisto com alguma certeza**

A 1. INTRODUÇÃO: MEMÓRIAS E PERCURSOS .....	31
A 2. SOBRE O PROGRESSO CIENTÍFICO .....	33
A 3. RAZÕES PARA O COMO E PORQUÊ DA CIRCULAÇÃO DOS LINFÓCITOS T .....	34
3.a Repercussões .....	39
3.a.1 Estabelecidas .....	39
3.a.2 Emergentes.....	40
A 4. POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T EM SITUAÇÕES CLÍNICAS DE SOBRECARGA DE FERRO .....	
4.a Beta-talassêmia major.....	42
4.b Hemocromatose hereditária .....	43
4.c Evidência para anomalias das proporções das células T precederem a desregulação da absorção e da mobilização do ferro .....	44
4.d Extensões.....	46
4.e Repercussões .....	47
A 5. BIBLIOGRAFIA .....	48

### **PARTE B: Esboço de uma teoria da evolução dos dois sistemas de células circulantes (*Post-scriptum*)**

SUMÁRIO .....	55
INTRODUÇÃO .....	57
B 1. DA EVIDÊNCIA .....	58
B 2. DAS CÉLULAS.....	60
B 3. DOS MECANISMOS.....	64
B 4. CONCLUSÃO .....	65
B 5. BIBLIOGRAFIA .....	67



# **PARTE A**

DO ESTABELECIDO E ANTEVISTO COM ALGUMA CERTEZA



## PARTE A

### A 1. INTRODUÇÃO: MEMÓRIAS E PERCURSOS

Gostaria de começar o texto desta candidatura contrastando duas formas de Memória: a memória individual e a memória colectiva.

O que cada um de nós se lembra de si próprio e aquilo que não devemos esquecer de contar aos outros para que não se perca a memória do contexto histórico a que pertencemos, donde vimos, porque chegámos aqui, para onde vamos.

Assim, em contraste com a memória individual, que deve ser privada, a memória colectiva deve ser pública. Em contraste com a persistência da memória pessoal que, a não ser por doença, é “constitutiva” e portanto “fácil”, a construção da memória colectiva nem sempre é fácil. Tem que ser “induzida”, construída com trabalho, com tempo, com o conhecimento e o respeito de factos armazenados na memória d’outros, com a atenção de ouvir os mais velhos, com a generosidade de organizar encontros com antigos alunos (1), de criar prémios distinguindo vidas de compromisso a causas públicas. Desafio, este último, no cruzamento entre a memória pessoal e a memória colectiva, como claramente está no espírito do Grande Prémio Bial, na área da Medicina.

Defendi a minha tese de fim de curso de Medicina na Faculdade de Medicina de Lisboa em Outubro de 1963 (Fig.1). Um trabalho feito no Departamento de Anatomia Patológica de que era director o Prof. J. da Silva Horta, sob a orientação do Prof. Cortês Pimentel sobre o “*Carcinoma in situ do pulmão em doenças respiratórias crónicas.*” (2)

Como vim a redescobrir recentemente no rascunho de uma carta escrita ao Dr. David Ferreira então nos NIH em Bethesda, tinha acabado de escrever a tese em Setembro. Nessa carta dizia assim: “Acabei de escrever a minha tese. Esperei ansiosamente este momento, para lhe dizer que o fiz tal como me tinha dito para fazer. Já me foi concedida a bolsa. A ausência de notícias suas desde que escrevi para Londres tem-me vivamente preocupado, como deve calcular”. Ao que o Dr. David Ferreira respondeu prontamente dizendo-me: “Como provavelmente sabe, nos últimos meses estive em vias de tomar decisões que poderiam vir a afectar a minha entrada no Instituto da Fundação” (3).

O Dr. David Ferreira voltou valorosamente para Portugal, de Bethesda em 64 ou 65. Fui eu que, ao partir para Londres em Fevereiro de 1964 para



**Fig. 1 – Memória:** três pessoas decisivas na formação da investigadora em mim: **a)** O Prof. Cortês Pimentel com quem dei os primeiros passos no mundo de fazer perguntas; **b)** A Dra. Delphine Parrott com quem vim a alargar a capacidade de fazer perguntas, não só observando, mas criando novas observações com a prática experimental; **c)** O Prof. Jorge da Silva Horta, cujo ensino da Anatomia Patológica constituiu para todos nós alunos nos anos cinquenta e sessenta da Faculdade de Medicina de Lisboa a primeira grande experiência de perguntar em Medicina.

a Divisão de Experimental Biology do ICRF, só vim a passar uns meses no Instituto Gulbenkian de Ciência em 67 e, efectivamente, só voltei a trabalhar em Portugal vinte anos mais tarde, em 1984, no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar no Porto.

O trabalho que constitui a presente candidatura, representa dois trechos de um percurso científico entre 1964 e 1994. Entre 1964 e 1984, procurando razões para o como e o porquê da recirculação dos linfócitos T. Entre 1984 e 1994, utilizando o estudo de populações linfocitárias T em doentes com hemocromatose hereditária em busca de evidência para um porquê da circulação de linfócitos T: protecção da toxicidade do ferro. Porque este último trabalho foi feito exclusivamente em Portugal, vindo enriquecer o percurso de uma forma imprevisível mesmo em 1984, colaboradores e amigos fizeram-me sentir que eu poderia candidatar-me justamente ao Prémio Bial da Medicina.

Foi decidido que eu o faria sozinha porque, muito embora não haja percurso científico com êxito no fim do Séc. XX que não seja o de um colectivo, o colectivo neste caso é tão alargado, tão partilhado por dezenas de colegas, portugueses e estrangeiros, médicos, biólogos, bioquímicos, alunos, pessoal de apoio técnico no laboratório, que nos pareceu mais fácil “falar um(a) por todos”. Aquela que, porque mais só à partida, melhor pode apreciar a companhia neste ponto de chegar. Se algum chegar há, em Ciência.

## **A 2. SOBRE O PROGRESSO CIENTÍFICO <sup>1</sup>**

De pequenas chegadas como achegas feito  
Amor desfeito  
em escolher  
em duvidar  
em perguntar  
em observar  
em experimentar  
em decidir morrer  
este vazio no peito,  
emprestadas vidas como se d'uma vida feito.

---

<sup>1</sup> Sobre a dificuldade da contribuição de uma mulher para o progresso científico.

### A 3. RAZÕES PARA O COMO E PORQUÊ DA CIRCULAÇÃO DOS LINFÓCITOS T

A circunstância de ter começado a minha vida científica na Divisão de Biologia Experimental do Imperial Cancer Research Fund (ICRF) em Mill Hill, em 1964, no laboratório da Dra. Delphine Parrott, veio a ser decisiva para tudo o que se seguiu nos trinta anos que nos separam de 1964.

Os cinco anos entre 1961 e 1966 foram anos de considerável importância para o desenvolvimento da compreensão da constituição do sistema imunológico em duas grandes famílias de células: uma dependente da presença do timo no período neonatal, hoje vulgarmente conhecidas como células T; outra constituída por células que permaneciam inalteradas na ausência do timo, hoje conhecidas por células B, pela sua origem na *Bursa de Fabricius* nas aves e na medula óssea nos mamíferos.

A Dra. Delphine Parrott tinha publicado em 1962 um artigo sobre a variação do efeito da timectomia neonatal em várias estirpes de ratinhos (4) confirmando as conclusões do trabalho publicado em 1961 por Jacques Miller, considerado o trabalho fundador do reconhecimento da importância do timo em Imunologia (5). Havia em Mill Hill a noção de que a timectomia neonatal resultava em depleção linfocitária, mas não era de todo claro que essa depleção seria exclusiva de uma só população de linfócitos. A observação histológica de cortes de baço e gânglios de animais timectomizados, responsabilidade que me foi atribuída quando cheguei a Mill Hill em 1964 (6), na altura contribuiu decisivamente, não só para a caracterização de uma população timodependente mas também para a demonstração que essa população ocupava zonas específicas dos órgãos linfóides periféricos, nomeadamente o baço e os gânglios linfáticos. No baço, as células T ocupam a zona à volta das arteríolas centrais do foliculo de Malpighi e nos gânglios linfáticos, a zona média ou para-cortical, zonas que viemos a designar timo-dependentes (7, 8) (Fig. 2). Mil novecentos e sessenta e quatro viu também a publicação vinda de Oxford do trabalho de Gowans demonstrando que linfócitos retirados da linfa do canal torácico no rato marcados *in vitro* com radioisótopos e reinjectados nos mesmos animais, recirculavam para a linfa passando em números consideráveis pelos gânglios e pelo baço (9). Os linfócitos pareciam passar do sangue para a linfa através de veias





post-capilares com um endotélio caracteristicamente alto e cubóide (9). O facto de nos animais timectomizados as veias post-capilares não terem o endotélio alto e as células marcadas com radioisótopos e transferidas por via endovenosa entrarem igualmente, a substância do gânglio (7, 10) veio a constituir para mim a base de uma dissidência fundamental do pensamento dominante nesta área. Desde as primeiras observações atribuí sempre mais importância ao posicionamento específico das células do que à interacção com endotélios altos ou baixos nos gânglios linfáticos. Posicionamento que vim a demonstrar mais tarde nos peixes (11) e na galinha (12). Mas a primeira grande vaga de interesse veio a ser a interacção linfócito / endotélio e só nos últimos 5 anos é que a questão da importância dos microambientes está a ganhar interesse (13, 14).

Considereei a capacidade das células de diferentes origens de migrarem e se arranjamem em microambientes específicos tão importante para a compreensão da Biologia do sistema que criei um neologismo para a definir em 1971: *ecotaxis* (15). Em 1973 escrevi o meu 1º artigo de revisão com o título “Ecologia da timodependência” (16).

O que era claro para mim então e parece ser claro para muitos hoje, é que a capacidade das células circulantes de reconhecerem “self within self”, “próprio dentro do próprio” é uma propriedade fundamental do sistema imunológico precedendo claramente a importância do sistema imunológico no reconhecimento do não próprio (14).

Assim, a importância exclusiva atribuída à circulação contínua de linfócitos entre o sangue e a linfa no reconhecimento de antigénios vindos do exterior poderia ser questionada e outras razões, imprevisíveis no desenho das experiências que fazíamos, poderiam também constituir uma poderosa razão biológica para a circulação dos linfócitos.

Gostaria neste ponto de singularizar dois outros antigos alunos da Faculdade de Medicina de Lisboa, hoje colaboradores no ensino pós-graduado do Mestrado, ambos a trabalhar em França, o Dr. António Freitas no Instituto Pasteur e a Dra. Benedita Rocha no Hospital de Necker, que se doutoraram comigo em Glasgow com trabalho sobre os mecanismos de regulação da circulação e da distribuição de linfócitos. Ambos têm hoje contribuições notáveis na área da dinâmica das populações linfocitárias B (17) e da maturação de células timo-dependentes e timo-independentes (18).

A procura na clínica de razões para a migração de linfócitos para sítios específicos levou-me em seguida ao Instituto Sloan-Kettering, em Nova

York. Aí tive a oportunidade de utilizar a imunodeficiência da doença de Hodgkin como modelo para ilustrar: **a)** a existência de ecotaxopatias na clínica (19, 20); **b)** começar a procurar outras razões para a migração de linfócitos a sítios específicos que embora suspeitadas, continuavam imprevisíveis (21, 22); **c)** com Ann Carroll, uma outra aluna de doutoramento, fizemos as primeiras experiências na área da migração de subpopulações de linfócitos T no ratinho (23).

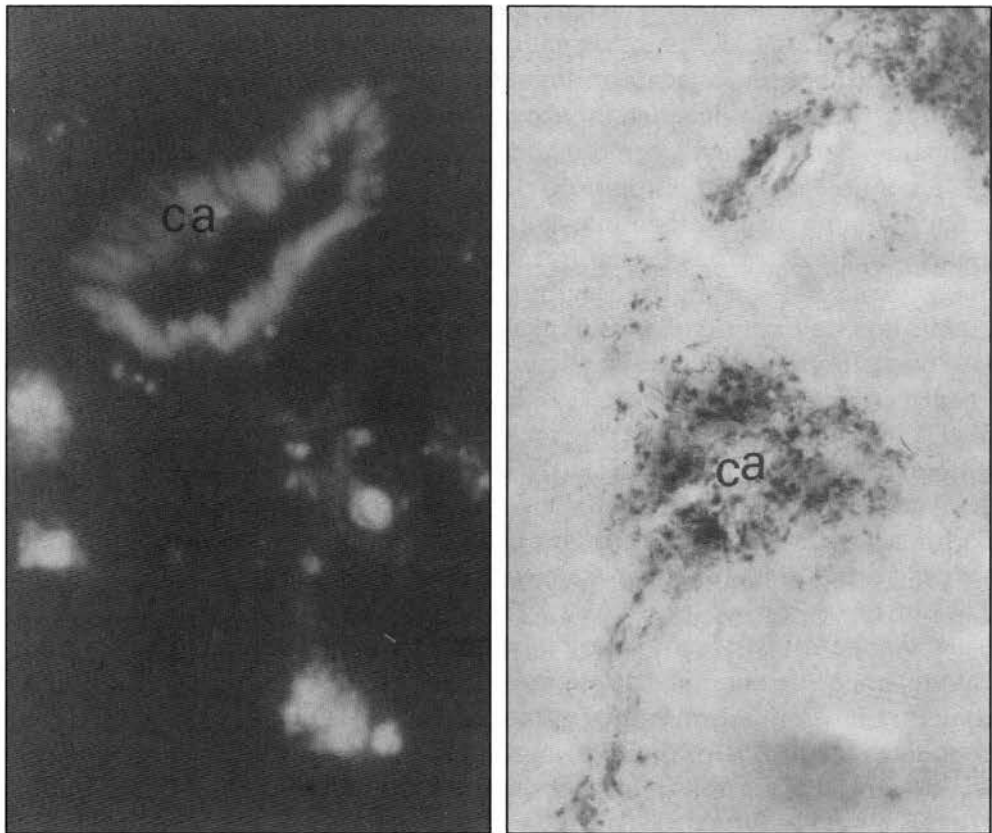
O estudo de funções linfocitárias T em vários compartimentos em doentes com doença de Hodgkin, permitiram efectivamente demonstrar que uma imunodeficiência detectada no sangue, pode simplesmente significar que os linfócitos deixaram de estar no sangue para estar “armadilhados”, noutro compartimento, nomeadamente o baço, os gânglios, o fígado, etc. (20).

É com o estudo da distribuição de linfócitos na doença de Hodgkin que surge um motivo suspeitado mas imprevisível, para a circulação dos linfócitos. Na busca de razões de natureza mais bioquímica do que imunológica que pudessem estar na base da migração fisiológica das células T, lembrámo-nos da experiência de clínicos com doentes de Hodgkin, doentes que frequentemente dizem sentir uma dor na zona afectada pela doença imediatamente após ingerirem álcool (25). Entre as acções bioquímicas imediatas do etanol, estava descrita a activação do enzima- $\alpha$ -amino-levulínico sintetase, um enzima na cadeia da síntese da hemoglobina que se pode detectar nos tecidos pelo aparecimento de autofluorescência na região da porfirina. Assim viemos a encontrar um aumento de células autofluorescentes nas áreas T esplénicas em doentes de Hodgkin (22) (Fig. 3).

Isto levou-me a postular em 1978 que uma das possíveis funções de “surveillance” do sistema imunológico da circulação dos linfócitos T seria a “surveillance” da acumulação de ferro nos tecidos, cuja toxicidade *in vivo* começara também a tornar-se aparente no fim dos anos setenta (21, 22). Este postulado levou-nos primeiro a uma série de estudos da interacção entre sais de ferro e linfócitos *in vitro*, o que, por sua vez, conduziu à demonstração de um efeito imunoregulador do ferro *in vitro* e ao estudo de situações experimentais e clínicas da sobrecarga do ferro *in vivo*. (v. refs. 26 e 27 para revisão).

Uma situação experimental *in vivo*, simplicíssima, feita no laboratório de David E. Trentham enquanto visitante, em Harvard Medical School, levou-me, curiosa e também algo inesperadamente em 1989 a voltar ao campo de estudo dos mecanismos de regulação da migração de linfóci-

tos (29, 30). A provocação de uma sobrecarga de ferro transitória da transferrina por uma injeção endovenosa de citrato de ferro em ratos, conduziu à demonstração de modificações na articulação do joelho, consistindo num aumento de células T identificadas por imunocitoquímica, e em modificações na estrutura dos capilares e de componentes da matrix extracelular,



**Fig. 3 – Primeiros passos** no percurso procurando definir uma associação entre linfócitos T e acumulação de ferro nos tecidos. Cortes congelados de amostras de baços de doentes com linfoma de Hodgkin (**a**) e com um linfoma B (**b**). Notar a presença de células auto-fluorescentes na zona timo-dependente à roda da arteríola central (**ca**) no corte congelado de baço de Hodgkin. Notar a ocupação das áreas timo-dependentes por células carregadas de ferro, azul, na coloração de Perls de um corte também congelado de baço no caso de um linfoma B. Dados publicados em *de Sousa, et al.* (22).

nomeadamente colagénio (28). Este trabalho foi para mim um trabalho particularmente grato porque representou o meu primeiro trabalho de transição entre os Estados Unidos e o Porto, em que a colaboração e a experiência de Manuel Teixeira da Silva ao microscópio electrónico, e a de Fernando Mota Garcia no estudo da imunocitoquímica provaram ser decisivas para o “êxito” dos resultados (28, 29).

Ao mesmo tempo, no mesmo ano, uma série de estudos independentes da interacção linfócito/endotélio caracterizando antigénios de superfície das células T, levavam à identificação de receptores nas células T para o colagénio e outros componentes da matrix extracelular (30, 31). A observação ao microscópio electrónico de M. Teixeira da Silva de um aumento inexplicado de colagénio nas articulações dos animais tratados com citrato de ferro com aumento dos números das células T tornava-se um complemento significativo da caracterização dos novos receptores para componentes da matrix extracelular nos linfócitos.

Assim, a importância do microambiente definido pela matrix extracelular fazia a sua (e a minha) reentrada neste domínio (14, 29, 32-35).

Interesse no ferro como motivo de migração de células T levava-me a reactivar trabalho de investigação na área de posicionamento dos linfócitos, desta vez, em colaboração primeiro, com o meu colega norte-americano J. Kupiec-Weglinski (32), e depois com o doutoramento de uma mestre portuguesa, Ana, J. Coito (34, 35) em Harvard Medical School sob a nossa co-orientação.

### **3.a. Repercussões**

Creio que as contribuições deste primeiro trecho do meu percurso científico tiveram dois tipos de repercussões na prática clínica: *estabelecidas e emergentes*.

#### **3.a.1 Repercussões estabelecidas**

Uma repercussão pode considerar-se estabelecida quando entra o livro de texto como um parágrafo, uma linha, uma fotografia. As repercussões estabelecidas são as que deram entrada nos livros de texto (36) (Fig. 2c), a confirmação independente da existência de uma ecotaxopatia na doença de

Hodgkin (37). A demonstração recente da localização de tenascina e fibronectina “especificamente” nas áreas T, vem ao encontro de uma busca muito antiga de diferenças na estrutura do estroma das áreas T e B, feita primeiro com impregnações pela prata (38) (Fig. 4).

O artigo “Thymus-dependent areas in the organs of neonatally thymectomised mice” (7), está entre os 91 artigos considerados clássicos (“Citation Classics”) publicados no *Journal of Experimental Medicine* entre 1955-1985 (39), com um número de citações superior a 500. Hoje em dia, esta é também uma forma de qualificar, quantificando, o impacto de um trabalho na literatura científica.

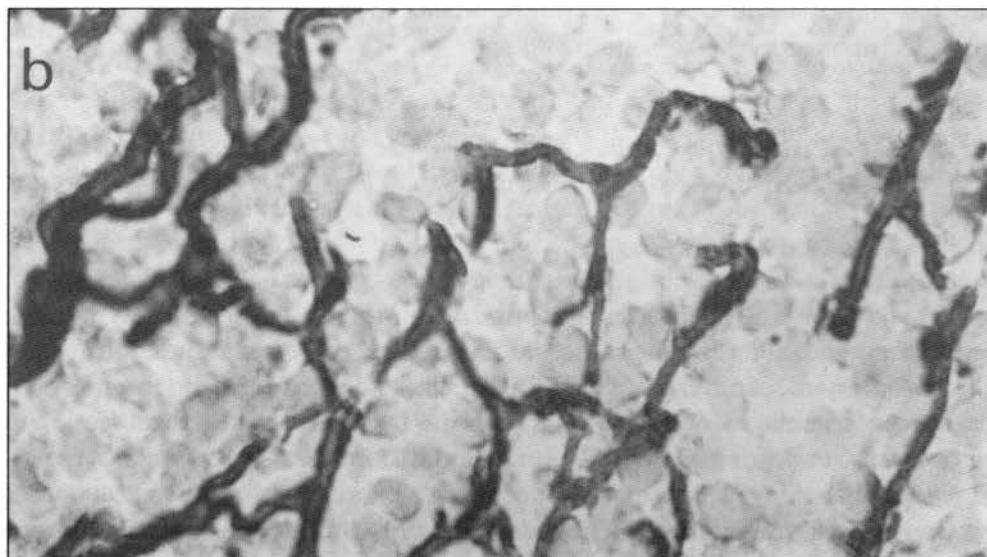
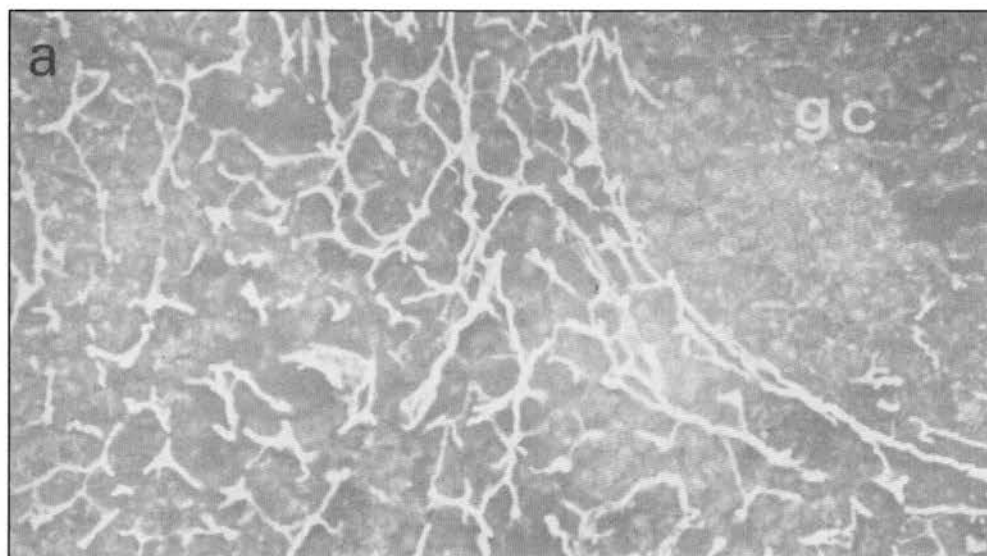
### **3.a.2 Repercussões Emergentes**

Se, componentes da célula endotelial e da matrix extracelular podem habitualmente funcionar como sinais para a ecotaxis dos linfócitos em órgãos linfóides, uma consequência possível é que modificações desses mesmos componentes em órgãos não linfóides possam levar à expressão de “ecossinais” semelhantes aos “emitidos” por componentes dos gânglios linfáticos normais. Este último aspecto está a ser estudado por Ana J. Coito, num modelo experimental de alotransplantação de coração no rato (34).

Em experiências preliminares, demonstrámos que a injeção de um anticorpo anti-laminina em recipientes de um alotransplante reduzia a entrada de linfócitos nos gânglios linfáticos periféricos e no coração transplantado (32). Posteriormente, Ana J. Coito veio a concentrar a atenção do trabalho da sua tese de doutoramento sobre a fibronectina. Num coração transplantado 3-6 horas após a transplantação, há um aumento da expressão da fibronectina (34). Este aumento pode estar associado à produção de factor necrosante tumoral (TNF). Animais tratados com anticorpos anti-TNF, têm uma menor expressão de fibronectina e uma menor entrada de linfócitos também para o coração transplantado e para os gânglios linfáticos periféricos (35).

Estas observações de uma espécie de “resposta cruzada” entre o alotransplante e o gânglio periférico podem resultar naquilo que frequentemente se chama de “beginner’s luck”, “sorte do noviço”; com enormes repercussões, no entanto.





**Fig. 4 – Percurso** na caracterização da matrix extracelular como componente regulador da ecotaxis dos linfócitos. **a)** Impregnação pela prata permitindo ver o contraste entre a área T e a área B, neste caso ocupada por um centro germinativo (gc) num gânglio linfático <sup>(38)</sup>. **b)** Distribuição selectiva da tenascina na área T de um gânglio linfático humano (cortesia de Mario Chilosi, 1994).

Se a matrix extracelular num coração, numa tiróide, num rim, em suma, em qualquer órgão não linfóide pode sofrer modificações que tornem esse órgão semelhante a um gânglio linfático, a expectativa é que os linfócitos migrarão e localizar-se-ão preferencialmente nesse órgão como habitualmente se localizam nos gânglios linfáticos. As consequências serão, no entanto, diferentes. No gânglio “próprio”, os linfócitos circulantes não encontram habitualmente antígenos diferentes.

Num alotransplante, esses antígenos diferentes serão reconhecidos pelos linfócitos em trânsito com o resultado de que iniciarão processos de ativação, de produção de citoquinas, etc., que levarão à rejeição do órgão. Pode antever-se assim que o reconhecimento da componente da matrix extracelular poderá vir a ter um papel central na modulação da resposta imunológica em transplantação. Mas não só. Um mecanismo semelhante pode antever-se para o desenvolvimento de lesões autoimunes.

Um trabalho recente em que animais “knock-out” para o gene TGF-  $\beta$  receberam um cocktail de peptídeos sintéticos de FN, diminuindo a extensão das habituais lesões “autoimunes” no coração e pulmões nestes ratinhos, é encorajador neste sentido (40).

#### **A 4. POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS T EM SITUAÇÕES CLÍNICAS DE SOBRECARGA DE FERRO**

##### **4.a Beta-talassémia major**

Tornava-se ao mesmo tempo imperativo testar, tal como no caso do posicionamento e da migração de linfócitos, a relevância para a clínica e na clínica da interação de linfócitos T e ferro. Comecei por estudar, em colaboração com colegas no New York Hospital e em Cornell Medical College, as populações linfocitárias B e T em doentes com Beta-talassémia intermédia (41) e major (42) e com uma consequente sobrecarga de ferro resultante de transfusões múltiplas. Os resultados dos primeiros trabalhos, feitos antes do aparecimento do que veio subsequentemente a ser conhecido como marcadores de diferenciação (CD), indicavam que se podiam observar diferenças nas populações T (41). Foi, no entanto, o segundo trabalho desta série, usando marcadores T4 e T8, que trouxe a primeira indicação de que as duas grandes populações T se comportavam diferentemente na presença



da sobrecarga de ferro <sup>(42)</sup>. Este resultado de observações feitas *in vivo*, veio subseqüentemente a confirmar-se de uma forma clara *in vitro*, em trabalhos já feitos no laboratório no Porto, por Manuela Santos <sup>(43)</sup> e Fernando Arosa <sup>(38)</sup>, alunos de Mestrado e doutoramento, respectivamente. (ver também Fig. 5).

#### **4.b Hemocromatose hereditária**

Muito embora os estudos de populações T na sobrecarga de ferro transfusional tivessem resultados de interesse, o modelo tem em si próprio muitas deficiências para um estudo imunológico porquanto estes doentes têm frequentemente infecções concomitantes e são esplenectomizados. Para além destes aspectos que influenciam a fiabilidade dos resultados de um estudo imunológico, a sobrevivência mais prolongada dos doentes está assegurada pela terapêutica continuada com desferroxamina, causando perturbações na exactidão da estimativa do próprio grau de sobrecarga de ferro.

Pelo contrário, a sobrecarga de ferro associada à hemocromatose hereditária, depende exclusivamente de uma falha de regulação da absorção do ferro. Numa situação normal, a concentração de ferro circulante determina a quantidade de ferro que é absorvida. Face a uma concentração alta, a absorção baixa. Face a uma concentração baixa, a absorção aumenta. Na hemocromatose hereditária, este mecanismo “sensor e regulador” falha. Os doentes, embora com concentrações altas de ferro circulante, continuam a absorver ferro que, com o tempo, se vai acumulando em diversos órgãos-alvo, nomeadamente o fígado, coração, pâncreas, articulações, pele, etc., provocando patologias relacionadas com a respectiva deposição i.e., cirrose, cardiomiopatia, diabetes, artrose, mudança da cor da pele, etc.. O tratamento consiste na remoção intensiva de ferro por flebotomias repetidas, semanais, de grandes volumes de sangue (400-500cc). Porque a doença tem uma base genética, ligada a antigénios da classe I do MHC (complexo major/maior da histocompatibilidade) é possível a partir de um probando e estudo familiar acompanhar os familiares em risco da expressão clínica da doença.

A hemocromatose hereditária apresentava-se assim para o laboratório como o modelo “de preferência” para estudar *in vivo* a relação entre os dois

sistemas: o sistema de células T circulantes e o sistema do metabolismo do ferro; para a clínica, como a possibilidade de tratar uma doença genética com uma prevalência muito alta no norte do país (45-48).

Se porventura a desregulação da absorção do ferro fosse consequência de uma anomalia das proporções ou do balanço de populações T, o tratamento conduzindo à remoção do ferro, não modificaria em nada essa anomalia. Pelo contrário, se como é o caso *in vitro*, o ferro é a causa das anomalias das células ou das proporções das diferentes populações celulares T, a normalização dos níveis de ferro resultaria na correcção das anomalias celulares.

Hoje, sabemos que as anomalias das células, do balanço de diferentes populações celulares T precedem a deposição descontrolada do ferro nos tecidos (49-51).

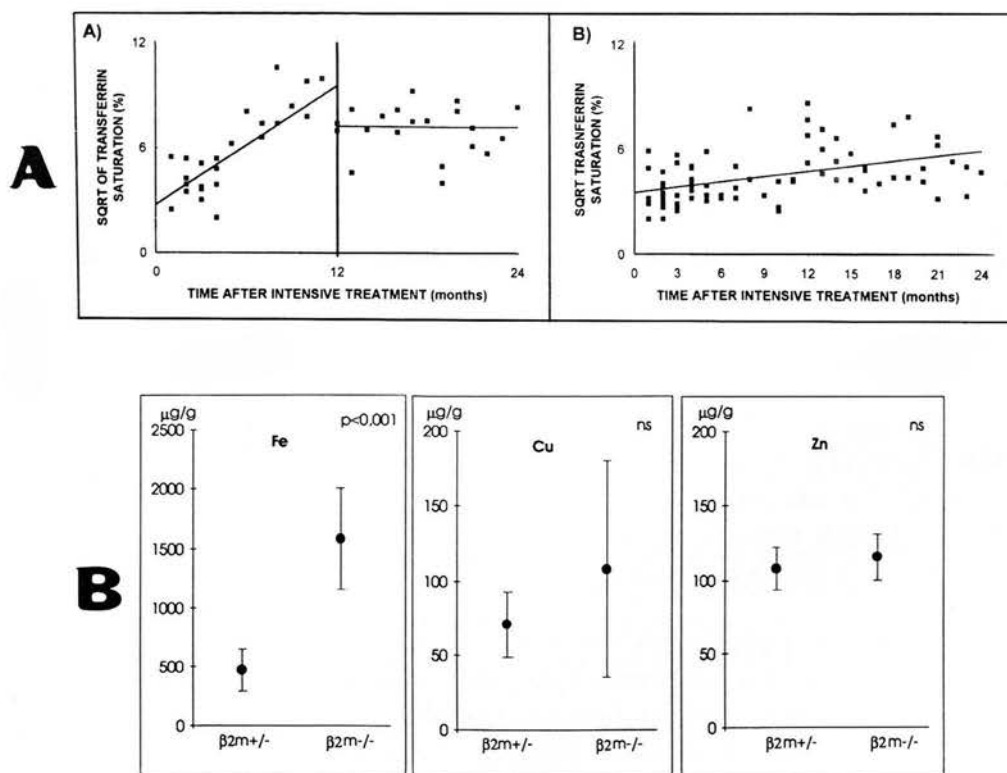
Nesta candidatura referir-me-ei exclusivamente aos aspectos em que eu própria tive uma intervenção directa. Presentemente, a intervenção da Dra. Graça Porto no meu grupo está a tornar-se cada vez mais decisiva na percepção da imunogenética da doença, em trabalho que pode conduzir à localização de genes, na caracterização de anomalias de marcadores de activação, de anomalias mais finas de subpopulações T dentro das grandes populações CD4 e CD8. Porque ela própria por este trabalho poderá vir a ser, um dia, uma candidata natural a este Prémio, referirei os nossos resultados mais recentes na alínea “*Repercussões*”.

#### **4.c Evidência para anomalias das proporções das células T precederem a desregulação da absorção e da mobilização do ferro**

O estudo de amostras de sangue removidas regularmente por flebotomia, veio, ao fim de 2 ou 3 anos, demonstrar que havia doentes em que a correcção da sobrecarga de ferro ocorria rapidamente, e doentes em que a necessidade de fazer flebotomias se prolongava por muito mais tempo, independentemente da quantidade de ferro armazenado à partida (49, 50).

A análise detalhada destes dois grupos de doentes no que respeita às populações CD4 e CD8 veio a demonstrar que os doentes com razões CD4:CD8 superior a 3 constituíam o grupo com a necessidade de um número maior de flebotomias enquanto que o grupo com razões normais

parecia responder mais rapidamente à terapêutica (49). Esperámos então que o tratamento em ambos os grupos terminasse para podermos observar o padrão da cinética da reentrada do ferro nos dois grupos. Verificámos que a reentrada do ferro nos doentes com razões altas foi muito mais rápida (Fig. 5), levando em menos de um ano a saturações de transferrina superiores a 60% (50).



**Fig. 5 – Gráficos-sumário** da evidência que anomalias na representação relativa das populações T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, estão relacionadas com sobrecargas de ferro no homem (A) e em ratinhos (B). **a.** aumentos da saturação da transferrina em 2 grupos de doentes com hemocromatose hereditária após terem completado a terapêutica intensiva de flebotomias. **5.A.a** a doentes com razões CD4:CD8 > 2.9; **5.A.b** doentes com razões normais; **5.B** Ferro hepático em ratinhos  $\beta 2m^{-/-}$  e  $\beta 2m^{+/-}$ , valores significativamente mais altos nos ratinhos homocigóticos. Notar que não parece haver diferenças nos dois outros metais testados, cobre e zinco (51).

Este trabalho, na sua forma preliminar, foi publicado na revista da Academia das Ciências Francesa, com o patrocínio dos académicos Raymond Latarjet e Jean-François Bach, em 1990 (49). Aproximadamente ao mesmo tempo, aparecia vinda do outro lado do Atlântico, a descrição da criação por manipulação genética de ratinhos em que o gene da  $\beta 2$ -microglobulina tinha sido eliminado (“knocked-out”), ratinhos esses que se apresentavam sem expressão de antigénios MHC da classe I e, consequentemente, sem células CD8<sup>+</sup>. Porque, entretanto, no laboratório no Porto, a análise estatística mais extensa dos resultados tinha demonstrado uma associação significativa entre as taxas de sobrecarga de ferro e as percentagens de células CD8<sup>+</sup> mas não CD4<sup>+</sup>, iniciámos contactos com colegas que estavam a trabalhar com os animais “ $\beta 2$ -microglobulina knock-out”, para que nos enviassem amostras de fígado. Assim, em colaboração com os laboratórios de Philippa Marrack, em Denver, nos Estados Unidos e Stefan Kaufman em Ulm, na Alemanha, pudemos confirmar a existência de uma sobrecarga de ferro na ausência de células CD8<sup>+</sup> e expressão de MHC classe I (51) (Fig. 5).

#### **4.d Extensões**

Um dos grandes problemas, hoje em dia, com uma observação nova feita, primeiro na clínica e num país cientificamente periférico como Portugal, é a sua aceitação num mundo em que a investigação biomédica é dominada pela biologia molecular, pelo trabalho experimental em animais e por países cientificamente desenvolvidos como os EU e os países da Europa do Norte.

A estratégia para vermos esta nova observação aceite pelo mundo científico dominante foi iniciarmos uma política de “laboratório sem paredes” com laboratórios nos EU, na Suécia e na Holanda.

Com o laboratório de Chris Rudd em Harvard, tivemos a oportunidade, com uma visita de Fernando Arosa a Boston após uma visita ao Porto de Rudd e António Silva (antigo professor auxiliar no Instituto) de vir estudar a actividade de um enzima nas cascatas de activação das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, a p56 lck (52). Com esse estudo, Arosa demonstrou haver uma deficiência da actividade do enzima associada às células CD8<sup>+</sup>, mas não CD4<sup>+</sup> nos doentes com HH. Presentemente está planeada com uma visita mais

longa (6 meses) do mesmo F.Arosa ao laboratório em N.Y. de David Posnett, para estudar a interacção de células CD8 com células epiteliais intestinais *in vitro*. Isto porque entretanto na Holanda, Manuela Santos, uma aluna de Mestrado e agora de doutoramento, tem estado a estudar a absorção de ferro *in vivo* em ratinhos sem células linfóides, e a regulação da absorção de ferro após transferência de suspensões de células linfóides. Os resultados até à data indicam que, de facto, as células linfóides têm a capacidade de contribuir para a regulação da absorção do ferro. Uma observação “revolucionária” se nos lembrarmos que ainda hoje não se sabe qual é o mecanismo que permite uma tão estrita regulação da entrada do ferro através da célula epitelial intestinal no organismo.

A colaboração com a Suécia, na área da caracterização de reportório do gene receptor da célula T em células CD8 e CD4 feita por um outro aluno de doutoramento, José M. Cabeda, permitiu acesso a doentes oriundos de um outro país em que se veio a confirmar os resultados obtidos no Porto em primeira mão, relativos às razões CD4:CD8 e também à diminuição selectiva de algumas cadeias variáveis dentro das populações CD8 e não CD4, no contexto de antígenos do HLA. Um trabalho mais enriquecido pela análise perspicaz e uma sólida análise estatística feita com a supervisão directa de Graça Porto. Supervisão essa também na área da genética e da localização de genes próximos do gene da HH, no cromossoma 6.

Este último trabalho recente, do Verão de 94, feito por Joris Veltman, um aluno holandês de uma rede ERASMUS em colaboração com um laboratório em Toulouse.

“*Last but not least*”, última mas talvez de primeira importância, foi a extensão ao nível nacional, conduzindo ao reconhecimento da importância de estabelecer valores de referência regionais para os indicadores do metabolismo do ferro. Um trabalho possível com a colaboração de Corália Vicente cuja formação básica em Matemática tem enriquecido a análise bioestatística de todo o trabalho no Instituto, e do nosso em particular (53).

#### **4.e Repercussões**

Para a fisiologia: a necessidade de rever a uma nova luz o papel fisiológico do sistema imunológico (ver *Post-Scriptum*).

Para a patologia: alargamento da compreensão de patologias em que provavelmente o metabolismo do ferro e o balanço das populações celulares T estão alterados recíproca e simultaneamente, mas em que, tradicionalmente, se olham um ou outro separadamente. Exemplos: resposta ao tratamento com IFN de doentes com hepatites virais. Estão documentadas diferenças na resposta ligada a taxas de ferro hepático, será portanto necessário olhar células T CD8<sup>+</sup> e ferro *ao mesmo tempo*. Anemia das doenças crónicas: também necessário olhar os dois sistemas *ao mesmo tempo*. Doença do enxerto contra o hospedeiro (GVH): necessário examinar efeitos na absorção do ferro. Síndrome de imunodeficiência adquirida: indispensável olhar a queda dos números de células CD8<sup>+</sup> e modificações nos valores do ferro circulante, ao mesmo tempo que se manifestam infecções por patógenos, chamados oportunistas e se observam deteriorações fatais de função hepática.

## A 5. BIBLIOGRAFIA

1. Parte desta introdução foi apresentada pela 1ª vez numa reunião organizada pelo Prof. Palma Carlos em Out.º de 1994, levando à Faculdade de Medicina de Lisboa alguns antigos alunos com contribuições em Imunologia.
2. de Sousa MAB. (1964) Estudo das modificações do epitélio brônquico em algumas doenças bronco-pulmonares crónicas. *Gaz Med.*, **27**: 511.
3. David-Ferreira J. (1963) (em carta pessoal)
4. Parrott DMV. (1962) Strain variation in mortality and runt disease in mice thymectomised at birth. *Transplant. Bull.*, **29**: 102.
5. Miller JFAP. (1964) Analysis of the thymus influence in leukaemogenesis. *Nature*, **191**: 248.
6. Parrott DMV. (1988) Lymphocyte traffic-historical perspectives and future directions. In "Migration and Homing of Lymphoid Cells." vol.1, Alan.J.Husband, ed., p. 5
7. Parrott DMV, de Sousa MAB., East J. (1966) Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, **123**: 191.
8. de Sousa MAB, Parrott DMV. (1967) The definition of a germinal center area as distinct from the thymus-dependent area in the lymphoid tissue of the mouse. In "Germinal Centers in Immune Responses.", p.361 Springer Verlag, New York.

9. Gowans JL, Knight EJ. (1964) The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, **159**: 257.
10. de Sousa MAB, Parrot DMV, Pantelouris EM. (1969) The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus. *Clin. Exp. Immunol.*, **4**: 637.
11. Ellis AE, de Sousa MAB. (1974) Phylogeny of the lymphoid system. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Eur. J. Immunol.*, **4**: 333.
12. de Sousa M. (1981) in: "Lymphocyte Circulation: experimental and clinical aspects. John Wiley & Sons, U.K.
13. Shimizu Y, Shaw S. (1991) Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J.*, **5**: 2292-2299.
14. de Sousa M, Tilney N, Kupiec-Weglinski J. (1991) Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. *Immunol. Today*, **12**: 262-266.
15. de Sousa MAB. (1971) Kinetics of the distribution of thymus and marrow cells in the peripheral lymphoid organs of the mouse: ecotaxis. *Clin. Exp. Immunol.*, **9**: 371.
16. de Sousa MAB. (1973) The ecology of thymus-dependency. Contemporary Topics in Immunology. R.C. Carter and A.J.S. Davies eds. New York. Plenum Press, **2**: 119.
17. Freitas AA, Viale AC, Sundblad A, Henser C, Coutinho A. (1991) Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, **88**: 2640.
18. Rocha B, Vassalli P, Gy-Grand D. (1992) The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol. Today*, **13**: 449.
19. de Sousa M. (1978) Ecotaxis, ecotaxopathy and lymphoreticular malignancy. In "Immunopathology and lymphomas". R.A. Good and J. Toomey eds., New York. Plenum Press, p. 325.
20. de Sousa M. (1980) Lymphocyte maldistribution in immunodeficiency. *Hospital Practice*, **15**: 71-87.
21. de Sousa M. (1978) Lymphoid cell positioning: new proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **32**: 393.
22. de Sousa M, Smithyman A, Tan C. (1978) Suggested models of ecotaxopathy in lymphoreticular malignancy: a role for iron binding proteins in the control of lymphoid cell migration. *Am. J. Pathol.*, **90**: 497.



23. Carroll AM, de Sousa M. (1984) Lyt phenotype, lymphocyte migration and the selective tissue positioning of mouse T cell sets. *Immunology*, **52**: 331-339.
24. de Sousa M, Yang M, Lopes-Corrales E, Tan C, Du Pont B, Good RA. (1977) Ecotaxis: the principle and its application to the study of Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **27**: 143-151.
25. Sáros J. (1978) *Semiologia Medica y Tecnica Exploratoria*, *Salvat*, p. 80.
26. de Sousa M. (1988) Le fer et l'immunité. *La Recherche*, **19**: 762-773.
27. de Sousa M. (1989) Immune cell functions in iron overload. *Clin. Exp. Immunol.*, **75**: 1-6.
28. de Sousa M, Dynesius-Trentham R, Mota-Garcia F, Silva MT, Trentham DE. (1988) Activation of rat synovium by iron. *Arth. Rheum.*, **31**: 653-661.
29. de Sousa M, Silva MT, Kupiec-Weglinski JW. (1990) Collagen, the circulation and positioning of lymphocytes: a unifying clue? *Scand. J. Immunol.*, **32**: 249-256.
30. Hemler ME. (1990) VLA proteins in the integrin family: structure, functions and their role on leucocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, **8**: 365-400.
31. Butcher EC. (1986) The regulation of lymphocyte traffic. *Immunol.*, **128**: 85-122.
32. Kupiec-Weglinski JW, de Sousa, M. (1991) Lymphocyte traffic is modified in vivo by anti-laminin antibody. *Immunology*, **12**: 312-313.
33. Kupiec-Weglinski JW, Coito AJ, Binder J., de Sousa M. (1993) The expression of extracellular matrix proteins represents an integral part of the host immune response in organ transplantation. *Surgical Forum*, *XLIV*: 415.
34. Coito AJ, Binder J, de Sousa M, Kupiec-Weglinski JW. (1994) The expression of extracellular matrix proteins during accelerated rejection of cardiac allografts in sensitized rats. *Transplantation*, **57**: 599-605.
35. Coito AJ, Binder J, Vandewater L, Brown L., de Sousa M, Kupiec-Weglinski JW. (1995) Anti-TNF $\alpha$  antibody treatment downregulates the expression of fibronectin and decreases cellular infiltration of cardiac allografts in rats. *J. Immunol.* **154**: 2949-2958.
36. Roitt I, Delves P. (1992) *Slide Atlas of essential immunology*. *Blackwell Scientific publications*.
37. Grimfors G, Holm G, Mellstedt H, Schnell P-O, Tullgren O, Björkholm M. (1990) Increased Blood Clearance Rate of Indium-III Oxine Labeled Autologous CD4<sup>+</sup> Blood Cells in Untreated Patients with Hodgkin's Disease. *Blood*, **76**: 583-589.



38. de Sousa MAB. (1969) Reticulum arrangement related to the behavior of cell populations in the mouse lymph node. Lymphatic Tissue and Germinal Centers in Immune Response. New York. *Plenum Press*, p. 49.
39. Garfield E. (1987) Ninety-one Citation Classics from the Journal of Experimental Medicine. *Current Contents*, **28**: 3-13.
40. Hines KL, Kulkarni AB, McCarthy JB, Tian H, Ward JM, Christ M, McCartney-Francis NL, Furcht LT, Karlsson S, Wahl SM. (1994) Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltration in transforming growth factor  $\beta$ 1 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 5187-5191.
41. Kapadia A, de Sousa M, Markenson A, Miller B, Good RA, Gupta S. (1980) Lymphocyte sets and immunoglobulins in patients with thalassemia intermedia. *Brit. J. Haematol.*, **45**: 405-416.
42. Grady RW, Akbar AA, Giardina PJ, Hilgartner MW, de Sousa, M. (1985) Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassemia major: the relative contributions of transfusion and splenectomy. *Brit. J. Haematol.*, **59**: 713-724.
43. Santos M, de Sousa M. (1994) In vitro modulation of T cell surface molecules by iron. *Cell. Immunol.*, **154**: 498-506.
44. Arosa F, de Sousa, M. (1995) Iron differentially modulates the CD4-Ick and CD8-Ick complexes in resting peripheral blood T-lymphocytes. *Cell Immunol.*, (in press).
45. de Sousa M, Porto G, Fraga J, Martins da Silva B, Lacerda R, Carvalho Santos, Serrão D, Salgado A, Vicente C. Hereditary Hemochromatosis (HH) in the north of Portugal. 1. Preliminary characterisation of first 15 cases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1988; **526**: 349-351.
46. Porto G, da Silva BM, Vicente C, Branco H, Fraga J, Soares JM, de Sousa M. Hereditary Hemochromatosis (HEI) in the north of Portugal 2. HLA haplotypes found in first six families studied. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1988; **526**: 352-354.
47. Porto G, Martins da Silva B, Vicente C, de Sousa M. Idiopathic haemochromatosis in north of Portugal: association with haplotype A3B7 (Letter). *J. Clin. Pathol.* 1989; **42**: 667-670.
48. Porto G, Vicente C, Fraga J, Martins da Silva B, de Sousa M. The importance of establishing appropriate local reference values for the screening of Hemochromatosis: a study of 3 different control populations and 136 Hemochromatosis family members. *J. Lab. Clin. Med.*, 1992; **119**: 295-305.
49. Reimão R, Porto G, de Sousa M. (1991) Stability of CD4/CD8 ratios in man: New correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic haemochromatosis patients. *C. R. Acad. Sci., Paris, serie III t* **313**: 481-487.

50. Porto G, Reimão R, Gonçalves C, Vicente C, Justiça B, de Sousa M. (1994) Haemochromatosis as a window into the study of the immunological system in man: a novel correlation between CD8<sup>+</sup> lymphocytes and iron overload. *Eur. J. Haematol.*, **52**: 283-290.
51. de Sousa M, Reimão R, Lacerda R, Hugo P, Kaufman S. (1994) Iron overload in  $\beta$ 2 microglobulin deficient mice. *Immunol. Lett.* 1994; **39**: 105-111.
52. Arosa F, da Silva AJ, ter Steege JCA, Porto G, Rudd CE, de Sousa M. (1994) Decreased CD8-p56lck activity in peripheral blood T-lymphocytes from patients with Hereditary Haemochromatosis. *Scand. J. Immunol.*, **39**: 426-432.
53. Vicente C, Porto G, de Sousa M. Method for establishing serum ferritin reference value depending on sex and age. *J. Lab. Clin. Med.*, 1990; **116**: 779-784.

## **PARTE B**

ESBOÇO DE UMA TEORIA  
DA EVOLUÇÃO DOS DOIS SISTEMAS  
DE CÉLULAS CIRCULANTES  
(*POST-SCRIPTUM*)



## SUMÁRIO

*“Suivant moi, la méthode expérimentale renferme l’observation et l’expérimentation, sans qu’on puisse les séparer. L’observation n’est que le premier degré et dans certains cas simples elle suffit pour connaître les choses et pour en trouver les lois (astronomie). Mais quand il s’agit de phénomènes compliqués, il faut aller plus loin, ce qui équivaut à dire: il faut faire d’autres sciences; il faut analyser et séparer les phénomènes complexes afin de pouvoir les observer à un état plus simple. C’est cette séparation qu’on pourrait appeler l’expérimentation.”*

Claude Bernard

“Le Cahier Rouge”, ed. Gallimard, 1942, p.41

O presente trabalho representa um percurso de 30 anos (1964-1994) de uma obra intelectual e experimental passando por vários ramos da Medicina (imunologia, oncologia, hematologia), entre duas descobertas: a descoberta e definição de áreas timo-dependentes nos órgãos linfáticos periféricos (ICRF, Annual Report, 1964) com a posterior demonstração de que células linfóides de diferentes origens têm a capacidade de migrar e de se alojar em microterritórios específicos dos órgãos linfáticos (*Clin. Exp. Immunol.*, 10: 673, 1971), e a descoberta de uma associação entre as proporções relativas de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e a regulação do metabolismo sistémico do ferro no contexto do MHC I (Reimão et al., 1991, CR.Acad.Sci., série III, 313: 481-487; de Sousa et al., 1994, *Immunol. Lett.*, 39: 105-111).

Ambas com demonstradas e crescentes implicações e aplicações clínicas. A primeira, com a sua incorporação em Livros de Texto de Imunologia, de Histologia, de Patologia, com implicações estabelecidas para a compreensão da estrutura funcional do sistema linfático, o estudo da patologia dos linfomas e dos mecanismos de algumas imunodeficiências, a alargar-se agora à compreensão de novos mecanismos de rejeição em alotransplantação e à autoimunidade.

A segunda, feita exclusivamente em Portugal, resultante de um estudo da caracterização imunogenética e clínica de doentes e famílias com hemo-

cromatose hereditária (HH), levando à confirmação em ratinhos com depleções selectivas de células linfóides T, de uma nova função do sistema imunológico. Esta nova função, resultante da acção de células T na regulação da absorção do ferro e da mobilização intracelular do ferro, vem exigir uma reanálise do significado de numerosas patologias em que, tradicionalmente, só se olha ou o sistema imunológico ou o metabolismo do ferro, nomeadamente, algumas formas de anemia, de sobrecarga de ferro, da influência do teor do ferro na resposta ao tratamento por IFN- $\gamma$  de hepatites virais, de factos clínicos dispersos apontando para a associação de altos níveis de ferro com algumas formas de infecção, neoplasias, cardiomiopatias, etc.

Há quem neste momento tenha dito que “o ferro vai ser o colesterol dos anos noventa”, o nosso trabalho exige que se questione o papel do sistema timo-dependente nesta afirmação.

Os dois sistemas são interdependentes ao ponto de podermos usar a constância atingida na evolução pelo ciclo de ferro, como evidência para uma nova função do sistema imunológico: a de assegurar a constância do meio interior, condição de “uma vida livre”, segundo Claude Bernard.

O trabalho acaba com o esboço de uma nova teoria da evolução dos 2 sistemas de células circulantes, inspirada também um pouco pela afirmação de Claude Bernard: “*la fixité du milieu intérieur est la condition d'une vie libre.*”

Argumenta-se que a primeira função do sistema imunológico seria assegurar essa “fixidez”, a que preferimos chamar constância. Porque a constância de uma função nutritiva vai dar origem automaticamente à sua vulnerabilidade face à invasão de (micro)organismos necessitando o mesmo nutriente para a sua sobrevivência, parece fazer o maior sentido que o mesmo sistema que fisiologicamente assegura a constância, assegurará, pela evolução da simultânea capacidade de reconhecer um número ilimitado de variáveis, a defesa a esses mesmos (micro)organismos.

O frágil equilíbrio em que a vida se desenrola é um mistério a quem o vê por tão pouco tempo, como cada um de nós. O ferro, ao ter sido “escolhido” como o elemento transportador do oxigénio, não pode ser estranho ao grande jogo de constantes e vulneráveis na evolução. O polimorfismo do sistema imunológico e a capacidade das células linfóides de migrarem e funcionarem em microterritórios específicos não podem ser estranhos à variabilidade indispensável ao reconhecimento de tudo o que pode tornar uma espécie de membros altamente complexos, vulnerável.

## INTRODUÇÃO

*E da análise da dinâmica da cristalização dos componentes simples de fenómenos complexos é preciso fazer nascer teorias que nos permitam encontrar novos denominadores comuns à expressão clínica das mais antigas e/ou mais incompreendidas doenças.*

Terminada a revisão do estabelecido, do incorporado no conhecimento global, das consequências que se podem antever com alguma certeza, parecia desejável e oportuno terminar esta candidatura com um *post-scriptum* teórico. Como quem procura colocar um selo numa carta já fechada, na esperança de que essa carta chegará um dia a um outro destino.

Neste *post-scriptum* procurarei delinear assim a moldura teórica muito simples que me parece emergir dos resultados apresentados na Parte A. Estes resultados indicam duas coisas principais: **1.** que os linfócitos, particularmente os linfócitos T, têm a capacidade de circular em grandes números e de reconhecer microambientes específicos; **2.** que na ausência destes mesmos linfócitos, ou na presença de alterações das proporções relativas das duas populações linfocitárias T, se manifesta uma sobrecarga de ferro, resultante de uma absorção de ferro descontrolada.

Inspirados um pouco por Claude Bernard que é citado como tendo dito: “*La fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre*” (citado por Wolvekamp, 1961), propomos nesta nova forma da teoria, iniciada com os postulados de 1978 (de Sousa, 1978,81) e continuada em discussões escritas em 1991 (de Sousa, et al., 1991) e 1992 (de Sousa, 92), que o sistema de células circulantes do sistema imunológico tem como principal função “fisiológica”, assegurar a independência e a constância indispensáveis à distribuição do oxigénio pelas células vermelhas e à regulação do teor do ferro circulante. Usaremos a palavra “constância” em vez de fixidez, não só para definir “a qualidade daquilo ou daquele que é constante”, mas como colectivo de constantes.

Reconhecemos, no entanto, que o ferro, o seu metabolismo, em suma, o seu “ciclo” representa uma, porventura uma das mais antigas e mais importantes constantes, asseguradas pelo sistema imunológico. Outras, sem

dúvida, poderão emergir no contexto desta nova teoria de uma função. Consideraremos três aspectos: **a) Da Evidência;** **b) Das Células;** **c) Dos Mecanismos.**

## **B1. DA EVIDÊNCIA**

Gostaríamos de considerar primeiro a evolução do transporte de oxigênio. Se as nossas artérias contivessem uma solução aquosa simples de O<sub>2</sub>, como consequência da sua baixa solubilidade, um litro de uma tal solução conteria apenas 3ml de O<sub>2</sub>. Foi calculado que para corresponder à energia necessária a uma corrida rápida seria necessário a um coração humano fazer sair 100 litros dessa solução aquosa imaginária por minuto, para que o oxigênio chegasse em quantidade suficiente aos tecidos (Weibel, 1984).

Um número de transportadores de oxigênio parecem ter aparecido na evolução dos quais a hemoglobina foi seleccionada para transportar o oxigênio nos vertebrados.

Se, no entanto, no homem a própria hemoglobina circulasse numa forma solúvel, a sua vida média seria de 40 minutos; mais, o excesso de peso imposto pela viscosidade da hemoglobina em forma fluída seria equivalente a um volume de 20 l (Lehmann & Huntsman, 1961).

O heme na hemoglobina é usado como um transportador reversível de O<sub>2</sub>, porque o ferro passa ciclicamente da forma reduzida Fe (II) para a forma oxidada Fe (III). A evolução de uma célula contendo uma hemoglobina altamente solúvel em altas concentrações significa um aumento considerável da capacidade do sangue de ligar O<sub>2</sub>. Assim, num litro de sangue humano normal encontramos 150 g de hemoglobina, os quais podem ligar 8.7 nmol de O<sub>2</sub>, aumentando a capacidade de ligar O<sub>2</sub> aproximadamente 30 vezes relativamente a uma simples solução aquosa de hemoglobina (Weibel, 1984). A hemoglobina ocupa aproximadamente um quarto do espaço interno da célula vermelha (33g/100ml de eritrócitos). Uma célula vermelha madura por ter perdido a capacidade de sintetizar proteínas, é uma célula extremamente vulnerável com uma vida média baixa, 140 dias em média. Isto significa que aproximadamente 0.7% de todos os eritrócitos ( $175 \times 10^9$  células) deverão ser substituídos cada dia.

Este sistema celular de transporte de oxigênio parece também ser aquele que precisa de um sistema circulatório cardiovascular. Sistema esse



que é partilhado pelas células circulantes do sistema linfomielóide. Citando Wolvekamp (1961) "*entre as múltiplas funções do sangue, o transporte do oxigénio e do dióxido de carbono é aquele que precisa na maioria dos casos de um sistema cardiovascular elaborado*". Segundo o mesmo autor, esta conclusão "*parece ser apoiada pelo facto que em insectos altamente diferenciados em que o transporte de gases é efectuado por difusão, o sistema circulatório é de um tipo mais simples do que em muitos anelídeos e crustáceos*" (Wolvekamp, 1961).

A evolução deste primeiro sistema de células circulantes parece extraordinariamente simples de se compreender. O ganho em eficácia de uma função de distribuição primordial é óbvio. A eficácia e a estabilidade da distribuição do oxigénio está dependente, no entanto, de um teor constante de ferro como elemento transportador. Não é assim surpreendente que este primeiro sistema "nutriente" tenha evoluído de forma a ter a sua autonomia assegurada, vindo a tornar-se quase completamente independente ("livre") das variações e possível escassez do metal no meio exterior.

Esta autonomia é assegurada não directamente por produtos das células vermelhas, mas pela intervenção de um sistema fagocítico capaz de distinguir entre células vermelhas senescentes e novas, fagocitando só as primeiras a uma velocidade estimada em  $3-4 \times 10^6$  células por segundo (Harris & Kellermeyer, 1974), reciclando o ferro contido nessa população. Está calculado que a quantidade de ferro absorvida e excretada por dia é igual a 1mg.

Verifica-se uma notável constância de volume globular médio nos mamíferos, que varia entre  $20-120 \mu^3$  em espécies que podem variar em peso entre 2g e 4 toneladas (o elefante). O hematócrito e a concentração da hemoglobina são também semelhantes em todos os mamíferos, de forma que a capacidade de ligar oxigénio no sangue dos mamíferos varia num leque de  $\pm 20\%$  (Weibel, 1984). Embora se observe uma maior variação no tamanho das células vermelhas de outros vertebrados, o conteúdo da hemoglobina do sangue não é muito mais baixo do que nos mamíferos (Weibel, 1984).

Não parece haver tantos dados relativamente a espécies para além da humana, no que se refere à constância dos valores do ferro circulante, "transportado", não "transportador". As funções dependentes da presença de ferro ligam-se, para além do transporte de oxigénio na hemoglobina a enzimas envolvidas no transporte de electrões como os citocromos, outros compostos envolvidos no metabolismo oxidativo incluindo a NADH-desidroge-

nase, a redução do peróxido de hidrogénio pela catalase e pela peroxidase. O armazenamento de oxigénio para utilização durante o exercício muscular está assegurado pela mioglobina.

O ferro também é necessário para a síntese de ADN para a redução pela ribonucleótido-redútase dos ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (Chitambar et al., 1988).

A capacidade de manter a constância dos valores do ferro no homem é tal que, num homem adulto, Harris & Kellermeyer (1974) concluíram que *“o desenvolvimento de uma anemia ferropénica por falta de ingestão de ferro é praticamente impossível. Para se chegar a um estado de deficiência de ferro é preciso haver um aumento de perda de ferro.”*

Num homem normal, a quantidade de ferro armazenado é aproximadamente 1g, e o ferro na hemoglobina é de 2.500mg (a quantidade reciclada pelos macrófagos). Assim, ainda segundo Harris & Kellermeyer, se considerarmos o ferro armazenado igual a zero, a quantidade total de ferro-hemoglobina é ainda 1.250mg. Assumindo uma completa ausência de entrada de ferro, e a excreção de 1mg de ferro por dia, levaria 2.250 dias (6.3 anos) para se chegar a um balanço negativo de ferro.

Em suma, o ciclo do ferro pode dividir-se em 3 compartimentos (Fig. B1): um compartimento central, de transporte, praticamente fechado, autónomo e constante, independente do meio exterior, como resultado da reciclagem contínua do ferro entre as células vermelhas senescentes e a medula óssea, transportado na transferrina; dois compartimentos de “zelo”, capazes, pela sua capacidade de variar e de serem regulados, de “zelar” pelo compartimento vital de transporte do oxigénio e de distribuição de ferro a todas as células: o compartimento de absorção em condições normais com a função de compensar a perda diária de 1mg de ferro, e o compartimento de armazenamento, localizado maioritariamente na célula hepática.

## **B 2. DAS CÉLULAS**

Muito embora imunologistas clássicos considerem a função dos macrófagos “menor” e comparável à função de “recolher o lixo” (garbage collection), a verdade é que os macrófagos têm um papel central na reciclagem do ferro das células vermelhas senescentes dependente da sua capacidade de “distinguir” células senescentes de células jovens.

Com o trabalho referido anteriormente (Parte A.4.c), começou a tornar-se claro que as proporções relativas de linfócitos T CD4 e CD8, tanto no homem, como no ratinho, estão estreitamente associadas à regulação da absorção do ferro e à regulação do teor de ferro acumulado nos tecidos (ver referências, A.5).

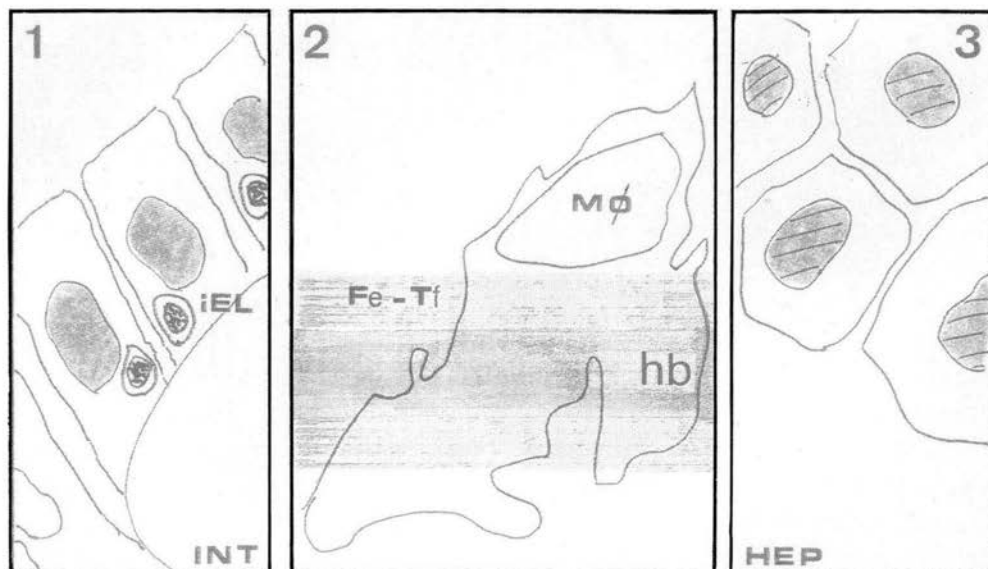
Extensão destas observações a subpopulações CD4 e CD8 vieram demonstrar que uma maior sobrecarga de ferro em doentes com hemocromatose hereditária está ligada a reduções significativas de populações CD8<sup>+</sup> Vβ 6.7 (J.M. Cabeda, submetido para publicação). Animais deficientes em expressão de MHC class I têm grandes reduções nos números de células CD4-8<sup>+</sup> αβ normalmente encontradas no epitélio intestinal (iIEL). A combinação destes resultados significa, portanto, que as células CD4-8<sup>+</sup> parecem ter uma função de regulação da absorção do ferro ao nível do intestino. E, em circulação, com a capacidade de migrar para ambientes específicos (ecotaxis), uma função de regulação da acumulação intracelular do ferro mediada por citocinas (ver Dos Mecanismos, B.3), no contexto ambiental em que essa função é necessária.

Uma vez que uma função nutritiva essencial como a necessária e indispensável ao transporte de oxigénio e do ferro, se estabelece como virtualmente constante na evolução de algumas espécies, o elemento-nutriente, mantido constante, torna-se automaticamente vulnerável por poder vir a ser utilizado por outros (micro) organismos cuja viabilidade depende do uso desse mesmo nutriente (Fig. B.2).

A aquisição de ferro por bactérias capazes de excretar quelantes de baixo peso molecular (sideróforos) com grande afinidade para o ferro transportado, por exemplo, na transferrina de hospedeiros está amplamente documentada (Weinberg, 1978). O ferro pode, no entanto, ser também extraído do heme e da hemoglobina por agentes patogénicos (Létoffé et al., 1994). No caso da malária, minutos após um hospedeiro vertebrado ser mordido por um mosquito *Anopheles*, os esporozoítos migram para o fígado e invadem os hepatócitos. Na célula hepática, durante alguns dias, o parasita “amadurece”, os hepatócitos são lisados, milhares de merozoítos entram em circulação e infectam as células vermelhas. Neste último caso, está documentado que as células T CD8<sup>+</sup> são as células que conferem imunidade protectora mediada pela produção de IFN-γ e a indução de NO sintase (Seguin et al., 1994, ver *Dos Mecanismos*, B.3).

Parece-nos da maior economia e eficácia que o sistema de células circulantes responsável pela manutenção e regulação da estabilidade de um elemento venha a ser o mesmo usado numa função de “surveillance” ou de zelo, “contra” agentes patogénicos vindos do meio exterior. Assim pode

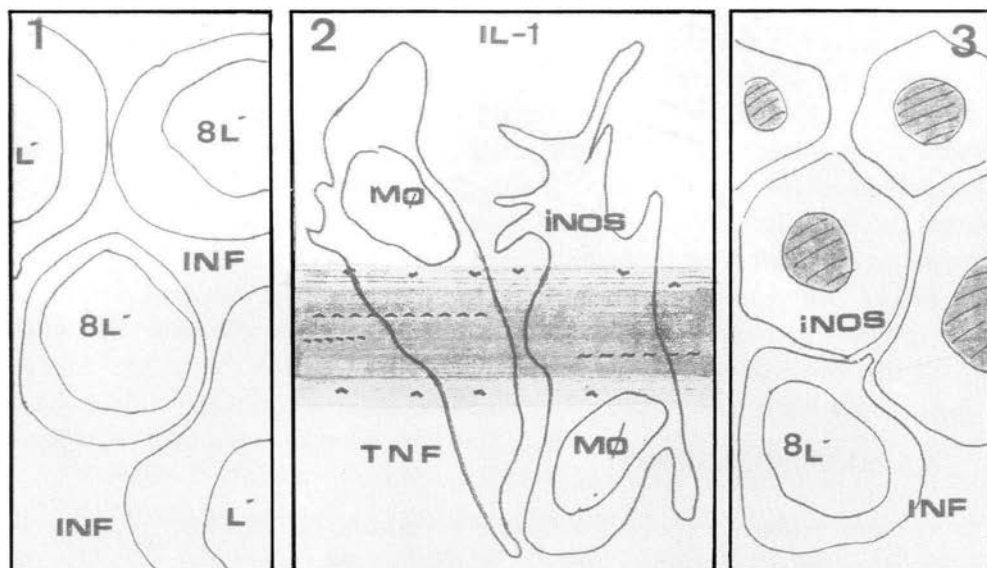
**B. 1**



**Fig. B.1 – Da Evidência e Das Células.** O ciclo do ferro pode dividir-se em 3 compartimentos: um compartimento central (2), de transporte, praticamente fechado, autónomo, quasi-independente do meio exterior, como resultado da reciclagem contínua do ferro entre a hemoglobina das células vermelhas senescentes (hb) e a medula óssea, transportado na transferrina (Fe-Tf). Os macrófagos (MØ) têm um papel crucial na manutenção da “constância” observada no compartimento 2. Os dois outros compartimentos são neste texto designados “de zelo”. Compartimentos que, pela sua capacidade de variação e resposta a sinais reguladores, podem “zelar” pela constância do compartimento vital de transporte do oxigénio e de distribuição de ferro a todas as células: o compartimento de absorção (1), localizado no intestino delgado (INT) onde se encontra o maior número de linfócitos intraepiteliais (iEL), com a função de compensar a perda diária de 1mg de ferro, e o compartimento de armazenamento (3), localizado maioritariamente na célula hepática (HEP).

antecipar-se que a função de manutenção depende da capacidade de reconhecimento por células do sistema imunológico de um número limitado de moléculas do meio interior, como por exemplo, moléculas expressas em células senescentes, moléculas expressas em células epiteliais do intestino,

## B.2



**Fig. B.2 – Dos Equilíbrios e Mecanismos.** Uma vez que uma função nutritiva essencial se estabelece como virtualmente constante na evolução, o elemento mantido constante torna-se automaticamente “vulnerável” por poder vir a ser utilizado por outros (micro)organismos, incluindo bactérias (Λ Λ Λ ; - - -) e parasitas (~ ~ ~). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> e IFN-γ (8L<sup>+</sup>, INF) são reconhecidamente necessários ao desenvolvimento de imunidade protectora, por exemplo, na fase hepática do ciclo de malária. Tanto o IFN-γ, como o TNF-α (TNF) têm uma acção reguladora do metabolismo do ferro intracelular através da indução da iNOS. O TNF-α e IL-1 têm também uma acção no metabolismo sistémico do ferro, conduzindo a uma baixa do teor do ferro circulante. Assim, o sistema responsável pela manutenção da constância de um outro sistema (B.1) é também aquele que, com a evolução, adquire a capacidade de resposta específica a “invasores” patogénicos (B.2). A produção em grandes quantidades, **nos microambientes onde são necessárias**, de citocinas aparece como uma “caricatura” da fisiologia e como a fotografia fiel da imunologia que conhecemos.

componentes de matrix extracelular, etc., enquanto que a função de zelo dependerá de uma capacidade de reconhecimento de um número ilimitado de antígenos vindos do meio exterior.

Se, em resposta aos últimos, por exemplo no caso de graves infecções intestinais, se verifica uma expansão da população de células CD4-8<sup>+</sup>, poderíamos esperar uma considerável diminuição da absorção do ferro. Uma consequente diminuição das taxas de ferro circulante teria naturalmente uma função protectora se as bactérias em questão utilizam ferro para a sua multiplicação. Esta possibilidade, de que células circulantes com uma função de manutenção são as que mais “naturalmente” poderiam ser mobilizadas para uma função de “surveillance”, tem uma consequência dupla: baixa da taxa de ferro e expansão de populações capazes de uma resposta específica no sentido imunológico clássico. Esta dupla consequência poderia conciliar o conflito entre os dados já referidos da quase impossibilidade de se manifestar uma anemia ferropénica (Harris & Kellermeyer, 1974), e os dados da Organização Mundial de Saúde, segundo a qual 500-600 milhões de pessoas no mundo sofrem de anemia ferropénica.

Talvez que um sistema imunológico mobilizado para responder a infecções “saiba” que uma primeira grande linha de defesa é baixar o teor de ferro circulante e intracelular (Fig. B.2)

### **B 3. DOS MECANISMOS**

Se assim fosse, a expectativa seria que produtos chamados “não específicos” da activação dos linfócitos e dos macrófagos teriam a capacidade de causar uma ferropénia. Trabalhos nos últimos anos analisando os múltiplos efeitos de produtos libertados por macrófagos e linfócitos T, identificaram o IL-1, o TNF- $\alpha$  como substâncias capazes de diminuir as taxas de ferro circulante (sistémico) e o TNF- $\alpha$  e o INF- $\gamma$  como citoquinas reguladoras do metabolismo intracelular do ferro via indução da NO sintase (Drapier *et al.*, 1993, Weiss *et al.*, 1993, 1994, Ward *et al.*, 1994).

No caso da regulação do metabolismo intracelular do ferro, a sequência passou a estar particularmente bem dissecada no último ano (Drapier *et al.*, 1993, Ward *et al.*, 1994, Weiss *et al.*, 1993, 1994). A expressão de genes que codificam para as ferroproteínas intracelulares “maioritárias”, a ferritina e o receptor da transferrina é regulada pelo ferro ao nível post-transcricional



através de um factor regulador citoplásmico denominado IRF ou IRE-BP. A ligação do IRF a elementos capazes de responder à presença de ferro nas regiões não traduzidas dos mRNAs, denominados IRE, aumentam a estabilidade do mRNA para o receptor da transferrina e inibem a tradução da ferritina (Drapier et al., 1993, Weiss et al., 1993). Em roedores, uma segunda proteína de ligação aos IRE denominada IRF<sub>B</sub> foi identificada recentemente (Cairo e Pietrangelo *et al.*, 1994). A regulação via IRE faz-se através da linhagem NO/NO sintase. Está hoje documentado que o ferro regula a expressão do gene da NO sintase induzível (Weiss *et al.*, 1994).

A NO sintase é expressa constitutivamente nas células endoteliais, em células epiteliais do pulmão, nos neurónios e é regulada pelo Ca<sup>2+</sup> (daí o termo cNOS). Em contraste com a cNOS, numa resposta imunológica, há indução de NOS em resposta a citoquinas. Esta resposta é independente do Ca<sup>2+</sup> (designada iNOS).

As citoquinas capazes de induzir a iNOS são o TNF, o IL-1 e o TNF- $\alpha$ .

Curiosamente, trabalhos recentes que levaram à demonstração *in vitro* que a produção de NO pelas células epiteliais está aumentada em cultura na presença de IFN-g, IL-1 e TNF- $\alpha$  levaram os autores a afirmar: “*A coexistência de NOS constitutiva e induzível em células epiteliais brônquicas e alveolares é consistente com um complexo mecanismo que as células epiteliais evoluíram para proteger o hospedeiro do assalto microbial na interface de ar/superfície...*” (Assano *et al.*, 1994).

A existência de um sistema linfocitário circulante associado às células epiteliais é sempre esquecido por aqueles que trabalham com os epitélios excepto, hoje em dia, pelos imunologistas interessados na origem dos linfócitos intraepiteliais intestinais (Poussier e Julius, 1994).

A regulação do metabolismo intracelular do ferro parece indissociável de produtos de activação de linfócitos T circulantes e de macrófagos.

#### **B 4. CONCLUSÃO**

Ao desenvolver a capacidade de regular os níveis sistémicos de ferro circulante, contribuir para a constância do ferro (reciclado) utilizado para a síntese da hemoglobina e transporte do oxigénio, o sistema imunológico parece ter assim um papel determinante na manutenção da constância de,

pelo menos, um sistema vital do meio interior (Fig. B.1). Tudo indica que essa função, com a evolução, a exposição dos vertebrados ao mundo microbial em que se movem, se veio a tornar indissociável da outra função do sistema imunológico que todos conhecemos: “de defesa contra agentes patogénicos invasores” (Fig. B.2).

O princípio de que uma constante em evolução se pode tornar um dia vulnerável parece um princípio geral simples da Biologia. Este princípio é bem ilustrado pela utilização da molécula CD4 pelo HIV-1. O primeiro encontro na evolução de uma constante com um outro microrganismo que “a descobre” deverá conduzir a epidemias explosivas.

O frágil equilíbrio em que a Vida se desenrola é um mistério a quem o vê por tão pouco tempo, como cada um de nós. O ferro, ao ter sido “escolhido” como o elemento essencial ao transporte do oxigénio, não pode ser estranho ao grande jogo das constantes e vulneráveis na evolução. E o polimorfismo do sistema imunológico não pode ser estranho à variabilidade indispensável ao reconhecimento de tudo o que pode tornar uma espécie vulnerável.

Mas o reconhecimento de que o sangue é um elemento reciclável, essencial à vida, não é só coisa, nem de agora, nem de microrganismos capazes de libertar sideróforos ou hemolisinas. É também antigo na História e reconhecido sustento de deuses em algumas culturas.

*“Permeating this creation myth as well as many parallel myths from other Mesoamerican peoples is the concept of a reciprocal relationship between humans and the Gods. The earth and its creatures were created through a sacrificial act of the Gods, and human beings, in turn, were required to strengthen and nourish the Gods. Gods and humans cannot exist without each other. It is clear from Classic Maya art and inscriptions, that blood drawn from all parts of the body was sustenance for the Gods.”* (Schele & Miller, 1986).

26.12.94

MARIA DE SOUSA



## B 5. BIBLIOGRAFIA

- Asano K, Chee CBE, Gaston B et al. (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 10089-10093.
- Cairo G, Pietrangelo A. (1994) Transferrin receptor gene expression during rat liver regeneration. Evidence for post-transcriptional regulation by iron regulatory factor B, a second iron-responsive element-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **269**: 6405-6409.
- Chitambar CR et al. (1988) Inhibition of leukemic HL-60 cell growth by transferrin-gallium: effects of ribonucleotide reductase and demonstration of drug synergy with hydroxyurea. *Blood*, **72**: 1930-1936.
- de Sousa M. (1978) Lymphoid cell positioning: a new proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration. *Soc. Exp. Biol. Symp.*, **32**: 393-410.
- de Sousa M. (1981) Lymphocyte circulation: experimental and clinical aspects. John Wiley & Sons. Chichester, UK, p. 259.
- de Sousa M. (1989) Iron and the lymphomyeloid system: a growing knowledge. p.3-16. *In*: M de Sousa J. Brock (eds). "Iron in Immunity, Cancer and Inflammation." John Wiley & Sons.
- de Sousa M. Reimão, R, Porto, G et al. (1991) Iron and lymphocytes: reciprocal regulatory interactions. p.171-177. *In*: A. Albertini, C.L. Lenfant, P.M. Mannucci and J.J. Sixone (eds) *Curr. Studies Hematol. Blood Transf.*, Basel Karger, n. 58.
- de Sousa M. (1992) T lymphocytes and iron overload: novel correlations of possible significance to the biology of the immunological system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **87** (supp. V) 23-29.
- Drapier JC, Hirling H, Wietzubin J et al. (1993) Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J.*, **12**: 3643-3649.
- Harris JW e Kellermeier RW. (1974) The red cell. Harvard University Press, p. 124.
- Lehmann H, Huntsman RE. (1961) Why are red cells the shape they are? The evolution of the human red cell. p.78-148. *In*: R.G. MacFarlane & AHT Robb Smith (eds). Functions of the blood. Blackwell Scientific Publications, UK.

- Létoffé S, Ghigo JM, Wandersman C. (1994) Iron acquisition from heme and hemoglobin by a serratia marcescens extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 9876-9880.
- Poussier P and Julius M. (1994) Intestinal intraepithelial lymphocytes: the plot thickens. *J. Exp. Med.*, **180**: 1185-1189.
- Schele L, Miller ME. (1986) Blood letting and the vision Queen. *In*: "The Blood of Kings: Dynasty and Ritual in Maya Art." George Brazillia, Inc., New York. p. 176.
- Seguin AC, Klotz FW, Schneider I et al. (1994) Induction of Nitric Oxide synthase protects against Malaria in Mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected Mosquitos: Involvement of interferon- $\gamma$  and CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.*, **180**: 353-358.
- Ward RJ, Kuhn LC, Kaldy P et al. (1994) Control of cellular iron homeostasis by iron responsive elements *in vivo*. *Eur. J. Biochem.*, **220**: 927-931.
- Weibel ER. (1984) The pathway for oxygen. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Weinberg ED. (1978) Iron and infection. *Microbiol. Rev.*, **42**: 45-66.
- Weiss G, Goossen B, Doppler W et al. (1993) Translational regulation in iron responsive elements by the nitric oxide / NO-synthase pathway. *EMBO J.*, **12**: 3651-3657.
- Weiss G, Werner-Felmayer, G, Werner, ER et al. (1994) Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J. Exp. Med.*, **180**: 969-976.
- Wolvekamp HP. (1961) The evolution of oxygen transport. *In* MacFarlane, RG and Robb-Smith, AHT (eds). Functions of the blood. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pgs. 2-71.



TOWARDS THE CHARACTERISATION  
OF THE ECOLOGY AND THE BIOLOGY  
OF THE THYMUS-DEPENDENT SYSTEM

MEMORIES, WALKS AND FIRST DRAFT OF A THEORY



## ACKNOWLEDGEMENTS

*I wish to thank Rui Marçal for his understanding and compensatory overwork of my difficulty in translating the text in time. He was also responsible for setting the Portuguese version of the text. Most of what I have written in the last ten years has reached printing with the support of his perfectionism and dedication.*

*I wish also to thank Bial for having accepted to do this bi-lingual edition and having been so sensitive and understanding of the reasons of my slow progress in writing the English version.*



«BETWEEN THE FLOW OF TWO TIMES»

*Maria de Sousa acceptance speech, May 2, 1995  
in the Great Bial Prize of Medicine 1994*





By having asked to talk today, I know I have broken the ritual of the ceremony of the award of this Prize. I did it for two reasons: first, because this is a special moment in my scientific life, and I would like, somehow, to have the opportunity to mark it. Secondly because this school is deeply linked to the History of Portuguese Immunology. In Prof. Machado Caetano we have one of the first academic figures to inspire young students to start a life in Immunology. Two ex-assistant professors of this house, António Freitas and Benedita Rocha, were my first Ph. D. students in Glasgow University. Their continued contributions place them among the most distinguished in Immunology<sup>1-3</sup>. It is very difficult for a Professor of my age not to take some pride in the success of her first Ph.D. student, and I would like to use this opportunity to tell you all that Prof. António Freitas is, from the beginning of the year, Head of a new Unit at the Institut Pasteur in Paris. But it would be unfair to rejoice just in the success of one student. Between Ph.D.(s), postdocs, and M.Sc. students, we are about 35; the older, in University teaching positions, directing research labs, clinical departments, in the U.S.<sup>4,6</sup>, Japan<sup>7</sup>, the UK<sup>8</sup>, and France<sup>1-3</sup>

The success of the younger would deserve perhaps a Prize but the success is theirs, and the only contribution of a modern University Professor to that success is to trust their ability and to help to place them in the best medical research centers in the world. And prepare them well. But we can no longer prepare students well, alone. The small success of our M.Sc. students<sup>9,10</sup> or of students doing their Ph. D.(s) in this or other countries<sup>11-20</sup>, is the success of my colleagues, 14 or 15 professors at the University of Porto plus other professors in other universities within or outside the country. It is this slow understanding that in Portugal we are very few, and if we are divided there will be none left. We will not be the ones penalized if we do not open our schools and our courses among ourselves. But our students and the society that they are to build, in a world very different from the world we grew up in. Which takes me to my other reason to ask to speak: this unique moment in my scientific life.

The moment is unique because if you look at a young woman in the 60s, from a country with very little international recognition of its scientific productivity in the medical sciences, where women were above all expected to marry and have children, with a medical degree, considered a second-class degree among the best English scientists of the time, the chances that such a woman would one day come to do anything worthy of this Prize,

were close to nill. But, from the 30 years that separate us, I too can watch, dispassionately, that young woman making a novel observation in England<sup>21</sup>, precisely because of the quality of training she had in this country in the examination of tissues and cells under the microscope. Forcing people, who first thought little of it, to recognize it as a discovery and soon claiming it "ours"<sup>22</sup>. Moving on to Glasgow<sup>23</sup>.

Possessed by the power of questioning why lymphocytes seemed to know where they went<sup>24,25</sup>. Unsatisfied with the answers encountered in mice<sup>26</sup> or *in vitro*<sup>27</sup>. Moving on: to New York. Looking for other answers not only for *how* but *why* lymphocytes circulated through special territories of the lymphoid organs, into the pathology of human lymphomas<sup>28</sup>. Pursuing the most fragile clue<sup>29</sup>. Seeing it as strong. Transforming clue into hypothesis<sup>30</sup>. Hypothesis into experiment(s)<sup>31-33</sup>. Into the observation of diseases<sup>34-36</sup>. Exploring areas outside immunology: rheumatology<sup>37</sup>, experimental radiology<sup>38</sup>, hematology<sup>39</sup>, oncology<sup>40</sup>. Thought a little mad even by her best friends. Thought completely mad by all when the final move was to study a genetic disease of iron overload in Oporto! Watching the fragile clue growing in strength. From the work of her Portuguese group<sup>41-45</sup> and the evidence from work in collaboration with others<sup>46</sup>. Like a word in a cross-work puzzle. A word growing syllables from the weaving of other words. Unabashed by adversity. Unaware whether that adversity came because she was a woman, or simply someone arriving somewhere, from nowhere. Unaware that to get somewhere in your own time, usually, men are told that they must negotiate. Exchange simplicity for the appearance of importance. Exchange naivety for the appearance of great sophistication. Conceal the enthusiasm. Look aloof, in English. Cool, in American. To get somewhere-else.

Not where true questioning leads. True scientific questioning, no matter in which time or space it is done, will end always in the importance of a simplicity that unifies, in the sophistication of a naivety that keeps trusting, against all reason to mistrust.

But the recognition of the importance of simplicity is generally not a thing of one's own time. So one grows to learn to live outside of one's own time. "**Tomorrow**" becomes our "**permanent address**"<sup>49</sup>. One develops an enormous sense of conciliation with the aloneness that grows with the power of questioning. Not the power of commanding, not the power of manipulating. Not the power of deciding or influencing decisions. Not even

the power of seducing. The power of questioning. Like the power of engines. Like the power that transforms engines into flying machines. The power of going somewhere else unseen in our own time and our own space.

And one day, surrounding time and surrounding space change. The perception of the pertinence of the questioning changes. The understanding of why one exchanged New York for Oporto change. The understanding of why one ventured into eminently applied areas changes. The work with characteristics of basic research, but it self based and dependent on clinical work. Clinical work whose success depends on physicians distributed not only through our large urban centers, but throughout our national health network of small health centers, small hospitals in small towns and also the exceptional response of the patients themselves, their families and the populations where they belong. Work that can be done exceptionally well in Portugal.

You will forgive me if I single out one other "first" Ph.D. student, my first medically qualified Ph.D. student in Portugal, Dr. Graça Porto, securing now the hemochromatosis outpatient clinic at the Santo António Hospital, and Dr. Meireles, the veteran general physician in S. Nicolau, a village in Cabeceiras de Basto, and his "unexpected" nephew Dr. José Fraga, today Director of Gastroenterology Service in the Hospital of Vila Nova de Gaia. All mobilized because a doctor in the Hospital de S. Marcos in Braga, who never expected to be acknowledged in public ceremonies such as this one, had fulfilled his duty and autopsied a very young man dead suddenly with an unexplained disease and sent the samples to a pathologist interested, knowledgeable and aware of the disease<sup>47,48</sup>.

You will forgive me these personal notes. But for someone who started a completely new life, as I did in Oporto in 1985, those first encounters are remembered most vividly. Although one cannot for sure, the person who remembers them feels that if those first moments had failed, nothing of what followed would have followed, thus, to this moment of Quietness.

Hence my original title "*A Quietness Between the Flow of Two Times*."

Because everything appears to quiet down between that certain time that one knew difficult and this other new time, improbable, when everything begins to appear to be understood.

Between two times: the certain and the uncertain. The time when a prize says that the power of questioning transformed that unlikely probability of the 60's, in this visible reality, with the body, the pomp and the circumstance of this ceremony.

Among academic peers. Among colleagues. Among old friends. Like a truce. Like an oasis. Like a cool seat under a large tree at the end of a long walk on a very hot day.

A quietness where the evidence indicates that lymphocytes have a role in the regulation of intracellular iron metabolism. But that they do not do it at random. Because they do not travel at random, as the first observation of the young woman had shown. Because cells of the immunological system have that unique capacity of discriminating between small territories and large organs within our own bodies. Doing what is needed where it is needed. And that may range from all that we already know and is in the textbooks, to much of what we do not know and this contribution begins, gently, to unveil. Because for 30 years, "Tomorrow" was "our permanent address"<sup>49</sup>.

Because, to conclude with e.e. cummings, the North-American poet<sup>49</sup>:

*«Tomorrow is our permanent address  
and there they'll scarcely find us (if they do  
we'll move away still further: into now»*

*Into this hour of thanksgiving: to you all.*

## REFERENCES

1. Freitas AA, Rocha BB. (1993) Lymphocyte life spans. Homeostasis selection and competition. *Immunol. Today* **14**: 25.
2. Freitas AA, Rosado M, Viale AC, Graudieu A. (1995) The role of cellular competition in B cell survival and selection of peripheral B cell repertoire. *Eur. J. Immunol.*
3. Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D. (1994) Thymic and extrathymic origins of Gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J. Exp. Med.*, **180**: 681-686.
4. Carroll AM. (1995) Associate Professor, Albany Medical College, New York.
5. Newcomb EW. (1994) Director, the Kaplan Center's Transgenic Mouse Research Facility, NY U Medical Center, New York.

6. Potaznik D. (1994) Head, Pediatric Hematology, Staten Island Hospital, New York.
7. Nishiya K. (1994) Associate Professor, Kochi Medical School, Okou, Japan.
8. Akbar A. (1995) Senior Lecturer, Royal Free Hospital School of Medicine, London.
9. Antunes S. (1995) The Optical Fractionator. *Zoological Studies*, **34**, suppl. 1, 180-183
10. Cordeiro da Silva A, Lepresle T, Capron A, Pierce RJ. (1992) Molecular cloning. of a 16-kilodalton Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **52**: 275-8.
11. Arosa FA, da Silva AJ, Godinho MI, ter Steege JCA, Porto G, Rudd CE, de Sousa M. (1994) Decreased CD8-p56lck activity in peripheral blood T lymphocytes from patients with Hereditary Hemochromatosis. *Scand. J. Immunol.*, **39**: 426-432.
12. Cabeda JM, Porto G, Lacerda R, *et al.* (1995) Anomalies of the CD8<sup>+</sup> populations in Genetic Hemochromatosis: characterization of the T-cell receptor repertoire. *FASEB J.*, **9** A 527.
13. Cardoso AA, Li-Mu-Lin, Batard P, Hatzfeld A. *et al.* (1993) Release from quiescence of CD34 super(+)CD38 super(-) human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA*, **90**: 8707-8711.
14. Carmo AM, Mason DW, Beyers AB. Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56<sup>lck</sup> and p59<sup>lyn</sup>. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 2196-2201.
15. Coito AJ, Binder J, Brown LF, de Sousa M, van de Water L, Kupiec-Weglinski JW. (1995) Anti-TNF- $\alpha$  treatment downregulates the expression of fibronectin and decreases cellular infiltration of cardiac allografts in rats. *J. Immunol.* (in press).
16. Rodrigues P, Hermsen T, Egberts E, Stet R. (1995) Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio L.*) *Developmental and Comparative Immunol.* (in press).
17. Russel-Pinto F. (1990) Differences in infestation intensity and incidence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus metacercariae* (*Gymnophallidae*) in *Cerastodrema edule* (Bivalvia): possible species coexistence in Ria de Aveiro. *J. Parasitol.*, **76**: 635-659.
18. Santos M, de Sousa M. (1994) *In vitro* modulation of T cell surface molecules by iron. *Cell. Immunology*, **154**: 498-506.
19. Ying S, Taborda-Barata L, Meng Q, Humbert M, Kay AB. (1995) The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) and RANTES in the skin of human atopic subjects: relationship to eosinophil, T-cell and macrophage recruitment. *J. Exp. Med.* (in press).

20. Teixeira AM, Fawcett J, Simmons DL, Watt SM. (1994) The N-domain of the *Biliary Glycoprotein* (BGP) adhesion molecule mediates homotypic binding: domain interactions and epitope analysis of BGPC. *Blood*, **84** (1): 211-219
21. de Sousa MAB. (1964) First description of the changes in the tissues of neonatally thymectomized mice. *ICRF 62nd Annual Report*.
22. Parrott DMV, de Sousa MAB, East J. (1966) Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, **123**: 191.
23. de Sousa MAB, Parrott DMV, Pantelouris EM. (1969) The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus. *Clin. Exp. Immunol.*, **4**: 637.
24. de Sousa MAB. (1973) The ecology of thymus-dependency. Contemporary Topics in Immunology. RL Carter and AJS Davies, eds. New York: *Plenum Press*, **2**: 119.
25. de Sousa M. (1976) Cell traffic. In «Receptors and Recognition». Series A. P Cuatrecasas and M Greaves, eds.. London: *Chapman and Hall*, **2**: 103.
26. Freitas AA, de Sousa M. (1976) The role of cell interactions in the control of lymphocyte traffic. *Cell Immunol*, **22**: 345.
27. de Sousa M, Heston W. (1976) Modulation of B cell interaction by T cells. *Nature*., **260**: 429.
28. de Sousa M, Yang M, Lopes-Corrales E, Tan C, Du Pont B, Good RA. (1977) Ecotaxis: the principle and its application to the study of Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **27**: 143-151.
29. de Sousa M, Smithyman A, Tan C. (1978) Suggested models of ecotaxopathy in lymphoreticular malignancy: A role for iron binding proteins in the control of lymphoid cell migration. *Am. J. Pathol.*, **90**: 497.
30. de Sousa M. (1978) Lymphoid cell positioning: New proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **32**: 393.
31. Nishiya K, de Sousa M, Tsoi E, Bognacki JJ, De Harven E. (1980) Regulation of expression of a human lymphoid cell surface marker by iron. *Cell Immunol.*, **53**: 71-83.
32. Bryan C, Nishiya K, Pollack M, Dupont B, de Sousa M. (1981) Differential inhibition of the MLR by iron. *Immunogenetics.*, **12**: 129-140.
33. Dörner MH, Silverstone A, Nishiya K, de Sostoa A, Munn G, de Sousa M. (1980) Ferritin synthesis by human T-lymphocytes. *Science.*, **209**: 1019-1021.
34. Kapadia A, de Sousa M, Markenson A, Miller B, Good RA, Gupta S. (1980) Lymphocyte sets and immunoglobulins in patients with thalassemia intermedia. *Brit. J. Haematol.*; **45**: 405-416.

35. Grady RW, Akbar AA, Giardina PJ, Hilgartner MW, de Sousa M. (1985) Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassemia major: the relative contributions of transfusion and splenectomy. *Brit. J. Haematol.*, **59**: 713-724.
36. Akbar AN, Fitzgerald-Bocarsly PA, de Sousa M, Giardina PJ, Hilgartner MW, Grady R. (1986) Decreased natural killer activity in thalassemia major: A possible consequence of iron overload, *J. Immunology*, **126**: 1635-1640.
37. de Sousa M, Dynesius-Trentham R, Mota-Garcia F, Teixeira da Silva M, Trentham DE. (1988) Activation of rat synovium by iron. *Arth. Rheum.* **31**: 653-661.
38. de Sousa M, Bastos AL, Dynesius-Trentham R, Kerr S, Bernardo A, Duarte JG, Trentham DE. (1986) Potential of Indium-III to measure inflammatory arthritis. *J. Rheum.*, **13**: 1108-1116.
39. Potaznik D, de Sousa M, Helson L, Bagin R, Groshen S, Bhalla RB. (1985) Ferritin in neuroblastoma: impact of tumor load and blood transfusions. *Canc. Invest.*, **3**: 327-338.
40. Potaznik D, Groshen S, de Sousa M, Bagin R, Bhalla R, Schwartz M, and Miller D. (1987) Association of serum iron serum transferrin saturation and serum ferritin with survival in acute lymphocytic leukemia. *Am. J. Pediatric. Hematol Oncol.*, **9**: 350-355.
41. de Sousa M, Porto G, Fraga J, Martins da Silva B, Lacerda R, Carvalho Santos, Serrão D, Salgadinho A, Vicente C. (1988) Hereditary Hemochromatosis (HH) in the north of Portugal. 1. Preliminary characterisation of first 15 cases. *Ann. N.Y. Acad.*, **526**: 349-351.
42. Reimão R, Porto G, de Sousa M. (1991) Stability of CD4/CD8 ratios in man: New correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic haemochromatosis patients. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. **313**, Série III, p. 481-487.
43. Porto G, Vicente C, Fraga J, Martins da Silva, B, de Sousa M. (1992) The importance of establishing appropriate local reference values for the screening of Hemochromatosis: a study of 3 different control populations and 136 Hemochromatosis family members. *J. Lab. Clin. Med.*, **119**: 295-305.
44. Porto G, Reimão R, Gonçalves C, Vicente C, Justiça B, de Sousa M. (1994) Haemochromatosis as a window into the study of the immunological system in man: a novel correlation between CD8<sup>+</sup> lymphocytes and iron overload. *European Journal of Haematology*, **52**: 283-290.
45. Vicente C, Porto G, de Sousa M. (1990) Method for establishing serum ferritin reference value depending on sex and age. *J. Lab. Clin. Med.*, **116**: 779-784.
46. de Sousa M, Reimão R, Lacerda R, Hugo P, Kaufman S. (1994) Iron overload in B2 microglobulin deficient mice. *Immunol. Lett.*, **39**: 105-111.
47. Serrão D, (1986) see ref. 48.
48. Dias F, Peixoto MR. (1986) Hemocromatose idiopática (a propósito de um caso clínico). *Bol. H. S. Marcos*, **11**: 117-123.
49. cummings, e.e. *A selection of poems*. A Harvest Book, p. 128, New York.





TOWARDS THE CHARACTERISATION  
OF THE ECOLOGY AND THE BIOLOGY  
OF THE THYMUS-DEPENDENT SYSTEM  
(1964-1994)

MEMORIES, WALKS AND FIRST DRAFT OF A THEORY

**SECTION A**

FROM THE ESTABLISHED TO THE ANTICIPATED  
WITH SOME CERTAINTY

**SECTION B**

FIRST DRAFT OF A THEORY OF THE EVOLUTION OF THE TWO  
MAJOR SYSTEMS OF THE CIRCULATION OF CELLS



# INDEX



## INDEX

### **SECTION A: From the Established to the Anticipated with some Certainty**

A 1. INTRODUCTION: MEMORIES AND WALKS .....	93
A 2. ON SCIENTIFIC PROGRESS .....	95
A 3. REASONS FOR THE HOW AND WHY OF THE CIRCULATION OF T LYMPHOCYTES.....	96
3.a Repercussions.....	101
3.a.1 The established .....	101
3.a.2 The emerging .....	103
A 4. T LYMPHOCYTE POPULATIONS IN CLINICAL SITUATIONS OF IRON OVERLOAD .....	104
4.a Beta-thalassemia major .....	104
4.b Hereditary Hemochromatosis.....	104
4.c Evidence showing that anomalies of the proportions of T cells precede the disregulation of iron absorption and mobilization .....	106
4.d Extensions .....	108
4.e Repercussions.....	109
A 5. REFERENCES .....	110

### **SECTION B: First Draft of a theory of the Evolution of the Two Major Systems of the Circulation of Cells (*post-scriptum*)**

SUMMARY.....	117
INTRODUCTION.....	119
B 1. THE EVIDENCE.....	119
B 2. THE CELLS.....	122
B 3. THE MECHANISMS .....	125
B 4. CONCLUSION .....	127
B 5. BIBLIOGRAPHY .....	128



## **SECTION A**

FROM THE ESTABLISHED TO THE ANTICIPATED  
WITH SOME CERTAINTY





## SECTION A

### A 1. INTRODUCTION: MEMORIES AND WALKS

I would like to start the text of this application by contrasting two kinds of Memory: the individual and the collective.

What each one remembers of himself privately and what one should tell others in order that it is not lost from the historical context to which it belongs: where we come from, how we arrived here, where we are going.

Thus, in contrast with the individual memory that should be kept private, the collective memory should be made public. In contrast with the persistence of the personal memory which, unless affected by illness, is “constitutive” and therefore “easy”, the building up of a collective memory is not always easy. It must be “induced”, built with work, with time, with the acquaintance and the respect for facts stored in the memory of others, with care to listen to the older, with the generosity to organize alumni events (1), to create prizes distinguishing lives dedicated to public life, etc. A challenge placed by this Bial Prize of Medicine, standing for me at the crossroads between the personal and the collective memory.

I submitted my thesis for my first degree (MD) to the Lisbon School of Medicine in October, 1963 (Fig. 1). The work had been done at the Pathology Department, directed by Prof. J. da Silva Horta under the supervision of Prof. Cortez Pimentel. It was entitled “*Carcinoma in situ of the lung in chronic respiratory diseases.*”

As I came to rediscover recently reading the draft of a letter to Dr. David-Ferreira, working at the time at the NIH, I had finished writing the thesis in September. In that letter I said: “I finished writing my thesis. I waited anxiously for this moment, to tell you as you requested. I now have the Fellowship. As you may imagine, your lack of news is beginning to preoccupy me.” To which Dr. David-Ferreira replied promptly: “As you may know, in the last months I was about to make decisions that might affect my going to work at the Foundation Institute.” (3)

Dr. David-Ferreira returned bravely to Portugal from Bethesda in 64 or 65. It was I who having left for the Division of Experimental Biology of the ICRF at Mill Hill in February 64, returned to work for some months to the just started Gulbenkian Institute for Science in 1967, and only came to work



**Fig. 1 – Memory:** three decisive people in the construction of the researcher I am today: **a)** Prof. Cortez Pimentel, with whom I walked the first steps in the world of questioning; **b)** Dr. Delphine Parrott, with whom I came to enlarge my capacity of asking questions, not only by “observing”, but by creating new observations experimentally; **c)** Prof. Jorge da Silva Horta, whose teaching constituted the first great inspiration “in asking” for many medical students at the Lisbon Medical School in the fifties and sixties.

again in Portugal, twenty years later, in 1984, in the Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences in Oporto.

The work submitted now, represents two periods of a scientific life that stretches from 1964 to 1994. Between 1964 and 1984, searching for reasons of the how and why of the recirculation of T lymphocytes. Between 1984 and 1994, using the study of T lymphocyte populations in patients with hereditary hemochromatosis (HH) in search of evidence for **one** “why” of the circulation of T lymphocytes: protection from the toxicity of iron. Because this last piece of work done exclusively in Portugal, was to bring a wealth of data unforeseeable even in 1984, colleagues and friends made me feel that I should justly submit an application to this Prize.

It was decided that I would do it alone. Although a successful scientific journey at the end of the XX century is of necessity “collective”, the collection in this case is so large, shared by many others, Portuguese and foreign colleagues, medical doctors, biologists, biochemists, students, technicians, that it seemed easier for one to speak alone for all the others. The one who by being more lonely at the start, can best appreciate the company at this point of arrival. If one ever “arrives” in Science.

## **A 2. ON SCIENTIFIC PROGRESS <sup>1</sup>**

Of small arrivals made  
Love undone  
in choosing  
in doubting  
in asking  
in observing  
in experimenting  
in deciding to die  
a life of borrowed lives done  
heart empty  
love undone

---

<sup>1</sup> And difficulty of the contribution of women to scientific progress.

### A 3. REASONS FOR THE HOW AND WHY OF THE CIRCULATION OF T LYMPHOCYTES

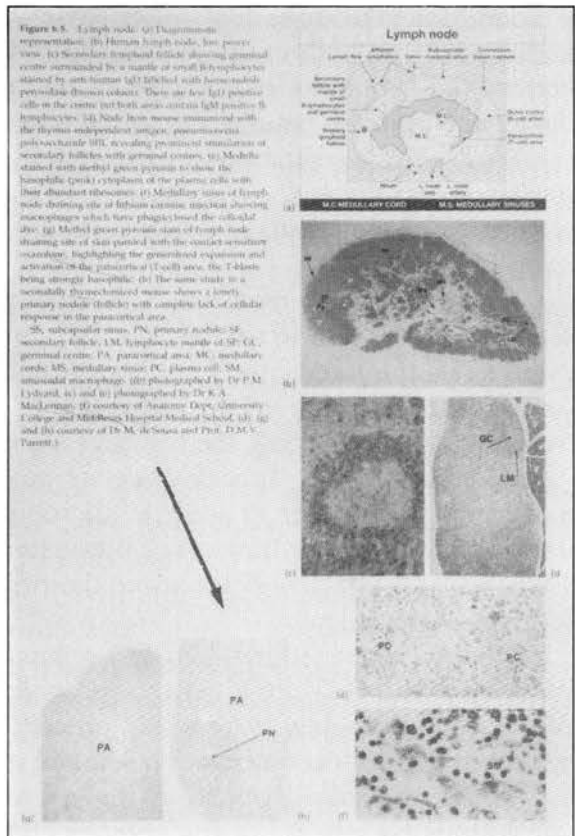
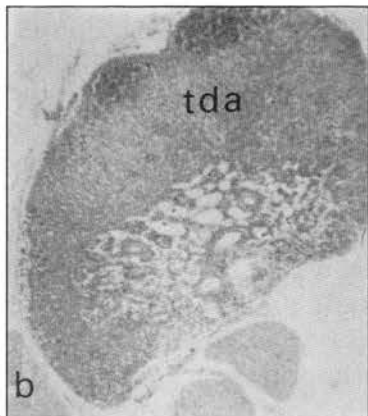
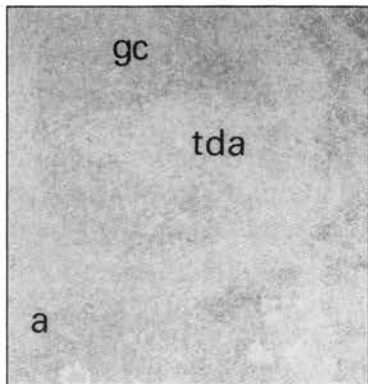
The fact that I started my scientific life at the Division of Experimental Biology of the ICRF in Mill Hill, in Delphine Parrott's lab, turned out to be decisive for all that was to happen in the 30 years that separate us from 1964.

The 5 years between 1961 and 1966, were years of considerable importance for the development of the understanding that the immunological system consisted of two large families of cells: dependent on the presence of the thymus in the neonatal period, known today as T cells, and those that remained unaltered in the absence of the thymus, known today as B cells, from their origin in the *Bursa of Fabricius* in the chicken and the Bone Marrow in mammals.

Delphine Parrott had published in 1962 an article on the strain variation of the effects of neonatal thymectomy in mice <sup>(4)</sup> confirming the results of a paper published by Jacques Miller in 1961, considered the founding work on the establishment of the importance of the thymus <sup>(5)</sup>. There was in Mill Hill the evidence that neonatal thymectomy resulted in lymphocyte depletion but it was not at all clear at the time that this depletion was exclusive of **one** cell population.

On arrival to Mill Hill in 1964, I was assigned the job of examining tissue sections of spleen and lymph nodes from neonatally thymectomised mice <sup>(6)</sup>. This assignment contributed decisively not only for the demonstration of the existence of a thymus-dependent population but also for the demonstration that that population occupied specific areas of the peripheral lymphoid organs, namely the spleen and the lymph nodes. In the spleen, T cells occupy the area round the central arterioles in the white pulp and in the lymph nodes, the mid cortex or paracortical zone, areas that we came to call thymus-dependent <sup>(7, 8)</sup> (Fig.2).

Ninety sixty four saw also the publication coming from Oxford of the work of Gowans demonstrating that lymphocytes taken from rat thoracic duct lymph, labelled *in vitro* with radioisotopes and reinjected in the same animals, recirculated to the lymph, crossing in large numbers the spleen and the lymph nodes <sup>(9)</sup>. The lymphocytes appeared to go from the blood to the lymph across postcapillary venules in the lymph nodes, venules with a characteristic high cuboidal endothelium <sup>(9)</sup>.



**Fig. 2 – Scientific “walk”** in the definition of thymus-dependent areas (tda) after the observation and description of areas selectively depleted of lymphocytes in mice thymectomised in the neonatal period: round the central arterioles in the spleen (a) and in the para-cortical (PA) zone of the lymph nodes. Going to Glasgow in 1967, gave us the opportunity of having access to the first samples of lymphoid organs from nude mice (10). These mice are born without thymus as one of many congenital anomalies, an observation made by Pantelouris in Edinburgh. The examination of lymph node sections from nude mice permitted the confirmation of the selective depletion of lymphocytes in the congenital absence of the thymus (b). The definition of T cell areas entered the literature as still referred to and illustrated (c, arrow) in the 92 edition of the Atlas of Immunology, by Roitt and Delves (36).

The fact that in the neonatally thymectomised mice the post-capillary venules had no high endothelium and radioisotopically labelled cells still entered the lymph nodes normally, came to constitute for me the basis for a dissidence from the main stream of thinking in this area.

From the very first observations I always attributed a much greater importance to the specific positioning of cells within the organs than to the interaction of the circulating cells with high or low endothelia in the lymph nodes.

I came later to demonstrate that such specific positioning could also be seen in fish (11) and in the chicken (12). But the first large wave of interest came to be the interaction lymphocyte/endothelium and only in the last 5 years the importance of the existence of microenvironments within the lymphoid system is being the object of some interest (13, 14).

I considered the capacity of cells from different origins to migrate and to arrange themselves in specific microenvironments so important to the understanding of the Biology of the system that I created a neologism in 1971: ecotaxis (15). In 1973, I wrote the first review article on "The ecology of thymus-dependency" (16).

What was clear to me then and seems clear to others today, is that the capacity of the circulating cells to recognize "self within self" is a property of the immunological system that precedes clearly the importance of the system in the distinction between self and nonself (14).

Thus, one could question the exclusive importance given to the continuous circulation of lymphocytes between blood and lymph in the recognition of foreign antigens. Other reasons, unforeseeable in the design of the experiments that were being done at the time, could also constitute a powerful biological reason for the circulation of lymphocytes.

I would like at this point to single out two other alumni from the Lisbon Medical School, today collaborating in the postgraduate teaching of the M.Sc. in Immunology that I coordinate, both working in France, Drs. António Freitas and Benedita Rocha, who did their Ph.Ds with me in Glasgow on mechanisms of the regulation of the circulation and on distribution of lymphocytes. Both with noted contributions in the area of lymphocyte population dynamics (17) and maturation of thymus-dependent and independent cells (18).

The search in the clinic for reasons for lymphocyte ecotaxis took me to the Sloan-Kettering Institute in New York. There I had the opportunity of

using the immunodeficiency seen in Hodgkin's disease (HD) as a model to illustrate: **a)** the existence of ecotaxopathies in the clinic (19, 20), **b)** to start the search for other reasons for the circulation of lymphocytes (21, 22) **c)** with Ann M. Carroll, another Ph.D. student, we made the first experiments on the migration of T lymphocyte sub-populations in the mouse (23). The study of T lymphocyte functions in different compartments in HD, permitted to demonstrate that an immunodeficiency detected in the blood, could signify simply that the lymphocytes were no longer in the blood but "trapped" in another compartment, namely, the spleen, the lymph nodes, the liver, etc. (20).

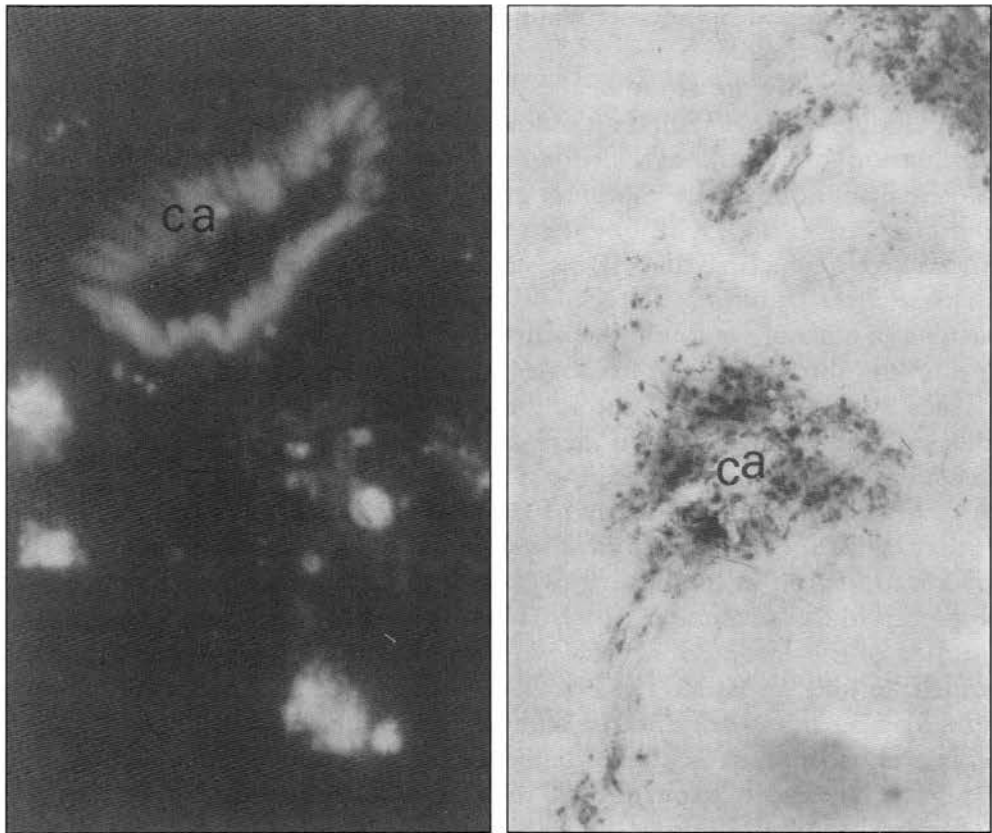
It was during the study of the distribution of lymphocytes in patients with Hodgkin's disease that an unforeseeable but suspected reason for the circulation of lymphocytes, emerged. In the search for reasons of a biochemical rather than immunological nature for a physiological role for the circulation of T lymphocytes, we were reminded of the often told anecdote by clinicians, that HD patients had pain in the area affected by the disease after drinking alcohol (25). Among the immediate biochemical actions of ethanol we found the activation of the  $\alpha$ -amino-levulinic synthase, a rate limiting enzyme of hemoglobin synthesis, that can be detected in tissues by the presence of autofluorescence in the porphyrin region. Thus one came to demonstrate an increase in autofluorescent cells in splenic T cell areas in Hodgkin's disease (22) (Fig. 3).

This took me to postulate in 1978 that one of the possible surveillance functions of the immunological system could be the surveillance of the overload of iron in the tissues, whose toxicity *in vivo* started to become apparent in the seventies (21, 22). This postulate took us first to a series of studies of the interaction between iron salts and lymphocytes *in vitro*, which, in turn, provided the first demonstration of an immuno-regulatory role for iron *in vitro* and to the study of experimental clinical situations of iron overload *in vivo* (see refs. 26 and 27, for reviews).

A very simple experimental model of transient iron overload of transferrin saturation, done, while visiting the lab of David E. Trentham at Harvard Medical School, took me, rather unexpectedly, back in 1989 to the study of mechanisms involved in the regulation of lymphocyte migration (29, 30). Indeed, a transient over saturation of transferrin by an intravenous injection of ferric citrate, in the rat, led to the demonstration of changes occurring in the knee, which included an increase in the numbers



of T lymphocytes, changes in the structure of capillary vessels and of components of the extracellular matrix, namely, collagen (28). This work was for me particularly meaningful, because it meant the first work in the transition between the United States and Oporto, in which the collaboration and the experience of Manuel Teixeira da Silva with the electron



**Fig. 3 – First steps** of the “walk” trying to define an association between T lymphocytes and the accumulation of iron in tissues. Frozen sections of spleen of patients with a Hodgkin’s lymphoma **(a)** and a B cell lymphoma **(b)**. Note the presence of autofluorescent cells in the thymus-dependent area **(ca)** in the HD section. Note the presence in the thymus-dependent area of the spleen in the B cell lymphoma of cells loaded with iron, stained blue with Perls. Additional data from work published in de Sousa et al. (22).

microscope and that of Fernando Mota Garcia with immunocytochemistry proved invaluable for the success of the results (28, 29).

At about the same time, in the same year, a series of independent studies were published on the lymphocyte/endothelium interaction characterising some surface antigens for T cells as receptors for collagen and other ECM components (30, 31). Silva's observation at the ultrastructural level of an unexplained increase in collagen in the joints of the animals that had received ferric citrate i.v., where, at the same time, increased T cell numbers could be found, became thus a complementary part of the characterisation of new lymphocyte receptors for ECM components and of its possible "physiological" significance.

Thus also, the importance of a microenvironment defined by the extracellular matrix made its (and mine) reentrance in this area (14, 29, 32-35).

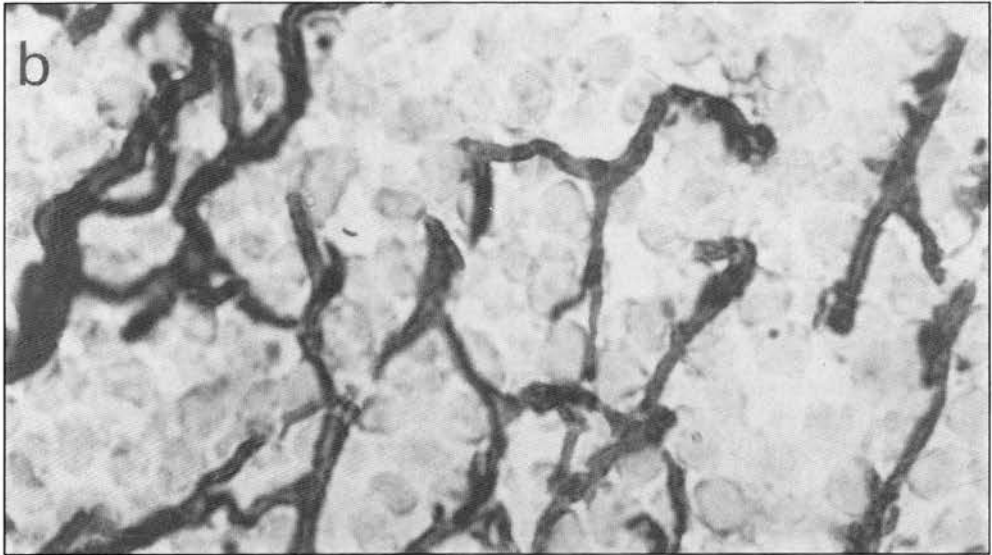
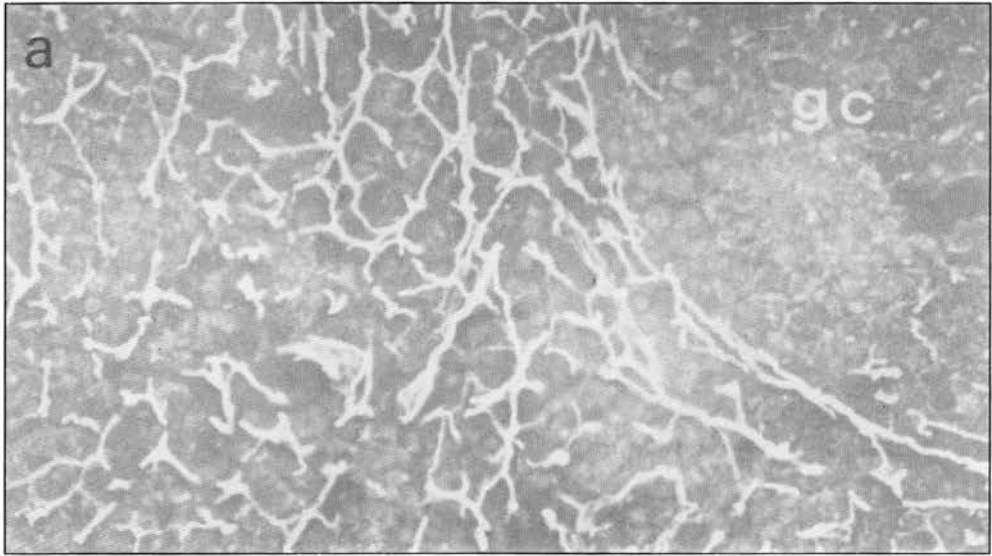
Interest in iron as a signal for the migration of T lymphocytes took me to reactivate work in the area of lymphocyte ecotaxis, this time, in collaboration first with my colleague J. Kupiec-Weglinski (32) and, later, with the Ph.D. work of a Portuguese M.Sc., Ana J. Coito (34, 35) in Harvard Medical School, done under our co-supervision.

### **3.a. Repercussions**

The first contributions of this first "walk" of my scientific journey, had two kinds of repercussions in clinical practice: the established and the emerging.

#### **3.a.1 *The established***

A repercussion can be considered "established" when it enters a textbook as a paragraph, as a line, as a photograph. What I am calling established repercussions are thus those that entered the textbooks (36) (Fig. 2c) and the independent confirmation of the existence of ecotaxopathies in Hodgkin's disease (37). The recent demonstration that tenascin and fibronectin are localized "specifically" in the thymus-dependent areas, corroborates an ancient search for differences in the stromal structure of T and B cell areas, done originally with silver stains (38) (Fig.4)



**Fig. 4 – “Walk”** in the characterisation of the extracellular matrix as a regulatory component of lymphocyte ecotaxis. **a)** Silver stain of mouse lymph node illustrating the differences between T and B cell areas <sup>(38)</sup>. **b)** Selective distribution of tenascin in a human lymph node T cell area (courtesy of M. Chilosi, 1994).

The article “Thymus-dependent areas in the organs of neonatally thymectomised mice” (7) is among the 91 articles considered “classic” (citation classics) published in the *Journal of Experimental Medicine* between 1955-1985 (39), with more than 500 citations. This day and age, to quantify number of citations is also a way of qualifying the impact of a piece of work.

### **3.a.2 *The emerging***

If, components of the endothelial cell and of the ECM can function as signals for lymphocyte ecotaxis, one foreseeable consequence is that modifying those same components in non lymphoid organs may lead to the expression of “ecosignals” similar to those “sent” by the components of normal lymph nodes. This last aspect is being presently studied by Ana J. Coito in an experimental model of heart allotransplantation in the rat (34).

In early experiments, we demonstrated that one single injection of an anti-laminin antibody in heart allotransplant recipients reduced significantly lymphocyte entry in peripheral lymph nodes and in the heart transplant (32). Later, Coito came to focus her Ph.D. work in fibronectin. Three to 6 hours after transplantation, there is an increase in FN expression in the transplanted heart (34). This increase may be associated to TNF production. Animals pretreated with anti-TNF antibodies, have a diminished expression of fibronectin and a reduction in lymphocyte entry in the transplanted heart and peripheral lymph nodes (35).

This observation of a kind of “Cross reaction” between the heart allotransplant and the peripheral lymph node, may be a kind of “beginner’s luck”; with some repercussions, however.

If, the ECM, in a heart, a thyroid, a kidney, in any non-lymphoid organ, may undergo changes that make that organ “appear” to lymphocytes similar to peripheral nodes the expectation is that lymphocytes will enter preferentially that organ as they usually enter lymph nodes. The consequences are, however, different. In the “self” lymph node, the circulating lymphocytes do not meet non self antigens.

In an allotransplant, the non-self antigens are recognized by lymphocytes, with the result that an activation process will start, with cytokine production, etc. resulting in organ rejection. One can thus foresee

that the recognition of an ECM component may come to have a central role in the modulation of the immunological response in transplantation.

A similar mechanism can be foreseen in the development of autoimmune lesions.

A recent piece of work done with knock-out animals for the TGF- $\beta$  gene is encouraging along these lines: the “autoimmune” lesions seen normally in these mice were reduced after treatment with a cocktail of synthetic FN peptides (40).

#### **A 4. T LYMPHOCYTE POPULATIONS IN CLINICAL SITUATIONS OF IRON OVERLOAD**

##### **4.a $\beta$ -Thalassemia Major**

Just like in the case of lymphocyte positioning and migration, it was imperative to test the clinical relevance of the interaction between iron and T lymphocytes. With the collaboration of colleagues at the New York Hospital and at the Cornell Medical College, I started studying B and T lymphocyte populations in patients with  $\beta$ -thalassemia intermedia (41) and major (42). Those patients have iron overload secondary to multiple blood transfusions. The results of the first studies, done at a time when the differentiation markers (CD) were still not known, indicated the existence of differences in T cell populations (41). It was, however, the second work in this series, using T4 and T8 markers, that brought the first indication that the two main T cell populations had a differential behavior in the presence of iron overload (42). This result, from observations done *in vivo*, was subsequently confirmed *in vitro*, in studies done at the lab in Oporto, by Manuela Santos (43) and Fernando Arosa (38), (see also Fig. 5).

##### **4.b Hereditary Hemochromatosis**

Although the studies of T cell populations in transfusional iron overload showed interesting results, the model itself had many deficiencies for an immunological study. Those patients have frequently associated infections and some are splenectomised. Besides these aspects, which influence the correct interpretation of the immunological results, the long term survival of

patients is dependent on the continuous treatment with desferrioxamine, which will affect the exact estimation of the level of iron overload.

On the contrary, the iron overload of hereditary hemochromatosis is exclusively dependent on a failure of regulation of iron absorption. In a normal situation, the concentration of circulating iron determines the amount of iron to be absorbed. In face of a high concentration, iron absorption is reduced. In face of a low concentration, iron absorption is increased. In hereditary hemochromatosis, this "sensory and regulatory" mechanism fails. Although patients have high concentrations of circulating iron, they continue to absorb iron and, with time, it will be accumulated in several target organs like the liver, heart, pancreas, joints, skin, etc. This will induce several pathologies related to iron deposition i.e., cirrhosis, cardiomyopathy, diabetes, arthropathy, skin pigmentation, etc. Treatment consists of the intensive depletion of iron by means of repeated phlebotomies with removal of large volumes of blood (400-500cc weekly). Because the disease is known to have a genetic basis linked to class I antigens of the MHC (Major Histocompatibility Complex), it is possible to detect and follow-up those family members of a proband who are at risk of developing the disease.

Hemochromatosis thus appears as the "preferential" model to study *in vivo* the relationship between the two systems: the system of circulating T lymphocytes and the system of the metabolism of iron. From the clinical point of view, this model appeared as a unique possibility to study well and to treat a genetic disease, with a high prevalence in the north of the country (45, 48).

If anomalies in the proportions of T cell subsets or their balance were the cause of the dysregulation of iron absorption, the depletion of iron by treatment would not modify those anomalies. On the contrary, if iron is the cause of the anomalies in the proportions of T cell subsets or their balance, the correction of the circulating levels of iron would result in the correction of the T cell anomalies.

Today, we know that anomalies in T cells and in the balance of their different subsets precede the dysregulated accumulation of iron in tissues (49, 51).

In this application I will exclusively refer to those aspects in which I was directly involved. Presently, the involvement of Dr. Graça Porto in my group, is becoming increasingly decisive in the perception of the

immunogenetics of the disease. This work may eventually lead to the localization of genes, characterization of anomalies in activation markers or the refinement of anomalies in subsets of cells within the main CD4 and CD8 T cell populations. Because she may herself be someday a natural candidate to this Prize, I will refer to our more recent results in the Section 4.c.

#### **4.c Evidence showing that anomalies of the proportions of T cells precede the dysregulation of iron absorption and mobilization**

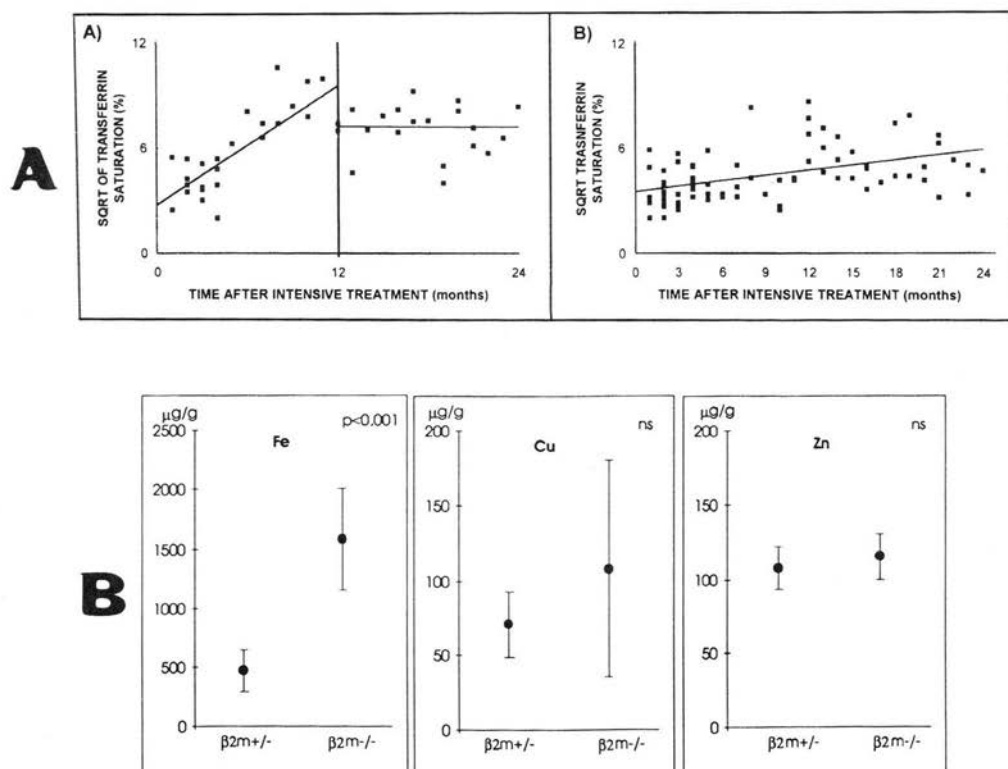
Studies of blood samples taken at regular intervals during phlebotomy treatment came to demonstrate, after 2-3 years, that in some patients iron overload could be corrected quite rapidly while other patients needed to be phlebotomised for much longer periods of time, independently of the starting amount of iron stores (49, 50).

A detailed analysis of these two groups of patients with respect to their CD4 and CD8 populations demonstrated that the group of patients with CD4:CD8 ratios greater than 3 needed a far greater number of phlebotomies than patients with normal CD4:CD8 ratios, who seemed to respond more rapidly to treatment (49). We had to wait until the end of treatment in all patients to observe the pattern of the reentry of iron in both groups. We observed that patients with high ratios had a more rapid reentry of iron (Fig. 5), leading, in less than one year, to transferrin saturations greater than 60% (50).

This work, in its preliminary form, was published in the journal of the French Academy of Sciences, with the support of the academics Raymond Latarjet and Jean-François Bach in 1990 (49). Approximately at the same time it appeared, from the opposite side of the Atlantic, the description of mice in which the  $\beta 2$ -microglobulin gene had been deleted (knocked-out). These KO mice do not express MHC class I antigens and, therefore, do not have CD8<sup>+</sup> cells. In the meantime, at the Oporto lab, a more extensive statistical analysis of the results in patients showed a significant correlation between the amount of iron overload and the percentage of CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> cells.



Because of that, we started to contact colleagues working with “ $\beta 2$ -microglobulin knock-out” mice, to get liver samples. In collaboration with the labs of Philippa Marrack, in Denver, U.S.A., and Stefan Kaufman in Ulm, Germany, we confirmed the existence of iron overload in the absence of CD8<sup>+</sup> cells and MHC class I expression (51) (Fig. 5).



**Fig. 5 – Summary graphs** showing that anomalies in the relative proportions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T populations are related to iron overload in man (A) and in mice (B). **A:** increase in transferrin saturation in two groups of patients with hereditary hemochromatosis after completing intensive phlebotomy treatment. **5.A.a** patients with CD4:CD8 ratios greater than 2.9; **5.A.b** patients with normal ratios. **5.B.** Hepatic iron in  $\beta 2m^{-/-}$  and in  $\beta 2m^{+/-}$  mice. Values in homozygous mice are significantly higher. Note that there seem to be no significant differences in the two other metals measured, copper and zinc (51).



#### 4.d Extensions

Nowadays, one of the greatest problems when a new observation is done, first at the clinical level, and in a scientifically peripheral country like Portugal, is its acceptance in a world in which biomedical research is dominated by molecular biology, experimental work in animals, and by scientifically developed countries like the U.S.A. or the Northern European countries. The strategy used to see our observation accepted by the dominant scientific world was to start a new policy of “laboratory without walls” with labs in the U.S.A., in Sweden and in Holand.

With the laboratory of Chris Rudd, in Harvard, we had the opportunity, after a visit of Fernando Arosa to Boston following a visit of Rudd and António Silva (former Assistant Professor at the Institute) to Oporto, to study the activity of p56<sup>lck</sup>, an enzyme of the activation cascade in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (52). With this study, Arosa demonstrated that, in hemochromatosis patients, there was a defective activity of the enzyme associated with CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> cells. Presently, it is planned a longer visit (6 months) of Fernando Arosa to the laboratory of David Posnett in New York, to study the interaction of CD8 cells with intestinal epithelial cells *in vitro*. In the meantime, Manuela Santos a former Msc and now PhD student in the Netherlands, has been studying iron absorption *in vivo*, in mice without lymphoid cells, as well as the regulation of iron absorption after lymphoid cell transfer. The results until now indicate that, in fact, lymphoid cells do contribute to the regulation of iron absorption and storage. This is a “revolutionary” observation considering that today, it is still not known the mechanism that regulates so strictly the entry of iron through the intestinal epithelial cell.

The collaboration with Sweden, in the area of the characterization of the T cell receptor gene repertoire in CD4 and CD8 cells, done by another PhD student, José Manuel Cabeda, has permitted the access to patients from another country, confirming the results, first obtained in Oporto, relative to the CD4:CD8 ratios and to the selective decrease of some T cell receptor variable chains within CD8 but not CD4 cells, in the context of HLA antigens. This study was enriched by a solid statistical analysis done under the direct supervision of Graça Porto, who also supervises the work in the area of genetics, such as the localization of gene markers close to the hemochromatosis gene, on chromosome 6.

This last recent work, from the Summer of 94, was done by Joris Veltman, a Dutch student from an ERASMUS network in collaboration with a lab in Toulouse.

Last but not least, and perhaps of the greatest importance, was the extension of the work at the national level, leading to the recognition of the importance of establishing regional reference values for the parameters of iron metabolism. This work was possible by the collaboration of Corália Vicente whose background in Mathematics has enriched the biostatistical analysis of all the work at the Institute, particularly ours (53).

#### **4.e Repercussions**

To physiology: the need to review, under a new light, the physiological role of the immunological system (*see Post-Scriptum*).

To pathology: widening the comprehension of pathologies where probably the metabolism of iron and the balance of T cell populations are reciprocally and simultaneously altered, but are traditionally looked upon separately. Examples: response to treatment with IFN in patients with viral hepatitis. Differences in response linked to the level of hepatic iron are documented, therefore it is necessary to look at CD8<sup>+</sup> T cells and iron *at the same time*. Anemia of chronic diseases: it is also necessary to look at the two systems *at the same time*. Graft versus host disease (GVH): it is necessary to examine the effects on iron absorption. Acquired Immunodeficiency Syndrome: it is indispensable to look at the decrease in CD8<sup>+</sup> cells and changes in the circulating levels of iron at the time when the so called opportunistic infections and the fatal damage of hepatic function are manifested.

## A 5. REFERENCES

1. Part of this introduction was presented for the first time at an Immunology alumni meeting of the Lisbon Medical School, organized by Prof. Palma Carlos in Oct. 94.
2. de Sousa MAB. (1964) Estudo das modificações do epitélio brônquico em algumas doenças bronco-pulmonares crónicas. *Gaz Med.*, **27**: 511.
3. David-Ferreira J. (1963) (private letter)
4. Parrott DMV. (1962) Strain variation in mortality and runt disease in mice thymectomised at birth. *Transplant. Bull.*, **29**: 102.
5. Miller JFAP. (1964) Analysis of the thymus influence in leukaemogenesis. *Nature*, **191**: 248.
6. Parrott DMV. (1988) Lymphocyte traffic-historical perspectives and future directions. In "Migration and Homing of Lymphoid Cells." vol.1, Alan.J.Husband, ed., pg. 5
7. Parrott DMV, de Sousa MAD, East J. (1966) Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, **123**: 191.
8. de Sousa MAB, Parrott DMV. (1967) The definition of a germinal center area as distinct from the thymus-dependent area in the lymphoid tissue of the mouse. In "Germinal Centers in Immune Responses.", p.361 Springer Verlag, New York.
9. Gowans JL, Knight EJ. (1964) The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc.Roy.Soc. London, Ser.B*, **159**: 257.
10. de Sousa MAB, Parrot DMV, Pantelouris EM. (1969) The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus. *Clin. Exp. Immunol.*, **4**: 637.
11. Ellis AE, de Sousa MAB. (1974) Phylogeny of the lymphoid system. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Eur. J. Immunol.*, **4**: 333.
12. de Sousa M. (1981) in: "Lymphocyte Circulation: experimental and clinical aspects. John Wiley & Sons, U.K.
13. Shimizu Y, Shaw S. (1991) Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEBJ.*, **5**: 2292-2299.
14. de Sousa M, Tilney N, Kupiec-Weglinski J. (1991) Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. *Immunol. Today*, **12**: 262-266.

15. de Sousa MAB. (1971) Kinetics of the distribution of thymus and marrow cells in the peripheral lymphoid organs of the mouse: ecotaxis. *Clin. Exp. Immunol.*, **9**: 371.
16. de Sousa MAB (1973) The ecology of thymus-dependency. Contemporary Topics in Immunology. R.C. Carter and A.J.S. Davies eds. New York. *Plenum Press*, **2**: 119.
17. Freitas AA, Viale AC Sundblad A, Henser C, Coutinho A. (1991) Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires *Proc. Natl.Acad. Sci.*, (USA), **88**: 2640.
18. Rocha B, Vassalli P, Gy-Grand D. (1992) The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol.Today*, **13**: 449.
19. de Sousa M. (1978) Ecotaxis, ecotaxopathy and lymphoreticular malignancy. In "Immunopathology and lymphomas". R.A. Good and J. Toomey eds., New York. Plenum Press, p. 325.
20. de Sousa M. (1980) Lymphocyte maldistribution in immunodeficiency. *Hospital Practice*, **15**: 71-87.
21. de Sousa M. (1978) Lymphoid cell positioning: new proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **32**: 393.
22. de Sousa M, Smithyman A, Tan C. (1978) Suggested models of ecotaxopathy in lymphoreticular malignancy: a role for iron binding proteins in the control of lymphoid cell migration. *Am. J. Pathol.*, **90**: 497.
23. Carroll AM, de Sousa M. (1984) Lyt phenotype, lymphocyte migration and the selective tissue positioning of mouse T cell sets. *Immunology*, **52**: 331-339.
24. de Sousa M, Yang M Lopes-Corrales E, Tan C., Du Pont B, Good RA. (1977) Ecotaxis: the principle and its application to the study of Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **27**: 143-151.
25. Sáros J. (1978) *Semiologia Medica y Tecnica Exploratoria*, *Salvat*, p. 80.
26. de Sousa M. (1988) Le fer et l'immunité. *La Recherche*, **19**: 762-773.
27. de Sousa M. (1989) Immune cell functions in iron overload. *Clin. Exp. Immunol.*, **75**: 1-6.
28. de Sousa M, Dynesius-Trentham R, Mota-Garcia F, Silva MT, Trentham DE. (1988) Activation of rat synovium by iron. *Arth. Rheum.*, **31**: 653-661.
29. de Sousa M, Silva MT, Kupiec-Weglinski JW. (1990) Collagen, the circulation and positioning of lymphocytes: a unifying clue? *Scand. J. Immunol.*, **32**: 249-256.

30. Hemler ME. (1990) VLA proteins in the integrin family: structure, functions and their role on leucocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, **8**: 365-400.
31. Butcher EC. (1986) The regulation of lymphocyte traffic. *Immunol.*, **128**: 85-122.
32. Kupiec-Weglinski JW, de Sousa, M. (1991) Lymphocyte traffic is modified in vivo by anti-laminin antibody. *Immunology*, **12**: 312-313.
33. Kupiec-Weglinski JW, Coito AJ, Binder J., de Sousa M. (1993) The expression of extracellular matrix proteins represents an integral part of the host immune response in organ transplantation. *Surgical Forum*, *XLIV*: 415.
34. Coito AJ, Binder J, de Sousa M, Kupiec-Weglinski JW. (1994) The expression of extracellular matrix proteins during accelerated rejection of cardiac allografts in sensitized rats. *Transplantation*, **57**: 599-605.
35. Coito AJ, Binder J, Vandewater L, Brown L., de Sousa M, Kupiec-Weglinski JW. (1995) Anti-TNF $\alpha$  antibody treatment downregulates the expression of fibronectin and decreases cellular infiltration of cardiac allografts in rats. *J. Immunol.* **154**: 2949-2958.
36. Roitt I, Delves P. (1992) Slide Atlas of essential immunology. *Blackwell Scientific publications*.
37. Grimfors G, Holm G, Mellstedt H, Schnell P-O, Tullgren O, Björkholm M. (1990) Increased Blood Clearance Rate of Indium-III Oxine Labeled Autologous CD4<sup>+</sup> Blood Cells in Untreated Patients with Hodgkin's Disease. *Blood*, **76**: 583-589.
38. de Sousa MAB. (1969) Reticulum arrangement related to the behavior of cell populations in the mouse lymph node. Lymphatic Tissue and Germinal Centers in Immune Response. New York. *Plenum Press*, p. 49.
39. Garfield E. (1987) Ninety-one Citation Classics from the Journal of Experimental Medicine. *Current Contents*, **28**: 3-13.
40. Hines KL, Kulkarni AB, McCarthy JB, Tian H, Ward JM, Christ M, McCartney-Francis NL, Furcht LT, Karlsson S, Wahl SM. (1994) Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltration in transforming growth factor  $\beta$ 1 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 5187-5191.
41. Kapadia A, de Sousa M, Markenson A, Miller B, Good RA, Gupta S. (1980) Lymphocyte sets and immunoglobulins in patients with thalassemia intermedia. *Brit. J. Haematol.*, **45**: 405-416.
42. Grady RW, Akbar AA, Giardina PJ, Hilgartner MW, de Sousa, M. (1985) Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassemia major: the relative contributions of transfusion and splenectomy. *Brit. J. Haematol.*, **59**: 713-724.

43. Santos M, de Sousa M. (1994) In vitro modulation of T cell surface molecules by iron. *Cell. Immunol.*, **154**: 498-506.
44. Arosa F, de Sousa, M. (1995) Iron differentially modulates the CD4-lck and CD8-lck complexes in resting peripheral blood T-lymphocytes. *Cell Immunol.*, (in press).
45. de Sousa M, Porto G, Fraga J, Martins da Silva B, Lacerda R, Carvalho Santos, Serrão D, Salgado A, Vicente C. Hereditary Hemochromatosis (HH) in the north of Portugal. 1. Preliminary characterisation of first 15 cases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1988; **526**: 349-351.
46. Porto G, da Silva BM, Vicente C, Branco H, Fraga J, Soares JM, de Sousa M. Hereditary Hemochromatosis (HEI) in the north of Portugal 2. HLA haplotypes found in first six families studied. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1988; **526**: 352-354.
47. Porto G, Martins da Silva B, Vicente C, de Sousa M. Idiopathic haemochromatosis in north of Portugal: association with haplotype A3B7 (Letter). *J. Clin. Pathol.* 1989; **42**: 667-670.
48. Porto G, Vicente C, Fraga J, Martins da Silva B, de Sousa M. The importance of establishing appropriate local reference values for the screening of Hemochromatosis: a study of 3 different control populations and 136 Hemochromatosis family members. *J. Lab. Clin. Med.*, 1992; **119**: 295-305.
49. Reimão R, Porto G, de Sousa M. (1991) Stability of CD4/CD8 ratios in man: New correlation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic haemochromatosis patients. *C. R. Acad. Sci., Paris, serie III t* **313**: 481-487.
50. Porto G, Reimão R, Gonçalves C, Vicente C, Justiça B, de Sousa M. (1994) Haemochromatosis as a window into the study of the immunological system in man: a novel correlation between CD8<sup>+</sup> lymphocytes and iron overload. *Eur. J. Haematol.*, **52**: 283-290.
51. de Sousa M, Reimão R, Lacerda R, Hugo P, Kaufman S. (1994) Iron overload in  $\beta 2$  microglobulin deficient mice. *Immunol. Lett.* 1994; **39**: 105-111.
52. Arosa F, da Silva AJ, ter Steege JCA, Porto G, Rudd CE, de Sousa M. (1994) Decreased CD8-p56lck activity in peripheral blood T-lymphocytes from patients with Hereditary Haemochromatosis. *Scand. J. Immunol.*, **39**: 426-432.
53. Vicente C, Porto G, de Sousa M. Method for establishing serum ferritin reference value depending on sex and age. *J. Lab. Clin. Med.*, 1990; **116**: 779-784.



## **SECTION B**

FIRST DRAFT OF A THEORY OF THE EVOLUTION  
OF THE TWO MAJOR SYSTEMS  
OF THE CIRCULATION OF CELLS  
(*POST-SCRIPTUM*)





## SUMMARY

*“Suivant moi, la méthode expérimentale renferme l’observation et l’expérimentation, sans qu’on puisse les séparer. L’observation n’est que le premier degré et dans certains cas simples elle suffit pour connaître les choses et pour en trouver les lois (astronomie). Mais quand il s’agit de phénomènes compliqués, il faut aller plus loin, ce qui équivaut à dire: il faut faire d’autres sciences; il faut analyser et séparer les phénomènes complexes afin de pouvoir les observer à un état plus simple. C’est cette séparation qu’on pourrait appeler l’expérimentation.”*

Claude Bernard

“Le Cahier Rouge”, ed. Gallimard, 1942, pg. 41

The present work represents a scientific journey of 30 years (1964-1994) crossing several branches of Medicine (immunology, oncology, haematology) between two discoveries; the discovery and the definition of thymus-dependent areas in the peripheral lymphoid organs (ICRF, Annual Report, 1964) with the subsequent demonstration that lymphoid cells from different origins have the capacity to migrate and to arrange themselves in specific microenvironments of the lymphoid organs (*Clin. Exp. Immunol.*, 10: 673, 1971) and the discovery of the existence of an association between the relative proportions of CD4+, CD8+, T cells and the regulation of the systemic metabolism of iron in the context of the expression of MHC class I antigens (Reimão *et al.*, 1991, CR Acad. Sci., série III, 313: 481-487, de Sousa, *et al.*, 1994, *Immunol. Lett.* 39: 105-111).

Both contributions have established and growing clinical implications. The first, entered textbooks of Immunology, Histology and Pathology with established implications for the understanding of the functional structure of the lymphoid system, the study of the pathology of lymphomas and of the mechanisms of some immunodeficiencies, moving now to the further understanding of new mechanisms of allograft rejection and autoimmunity.

The second contribution, resulted from a study done exclusively in Portugal, of the immunogenetic and clinical characterisation of patients and

families of patients with hereditary haemochromatosis leading to the confirmation in mice with selective depletions of T cells, of a new function of the immunological system. This new function associated to the action of T lymphocytes in the regulation of the absorption and intracellular mobilisation of iron, is going to force us to re-examine the meaning of numerous pathologies in which, traditionally, the clinician either looks at the immunological system or at iron metabolism, namely, some anemias, some clinical situations of iron overload, of the influence of iron stores on the response to IFN-treatment in viral hepatitis, of clinical observations pointing to significant associations between high iron levels, infections, malignancies, cardioamyopathies, etc.

Someone has said that “iron is going to be the cholesterol of the nineties”, our work demands that one includes the role of the thymus-dependent system in that statement.

The two systems are interdependent to a point enabling us to use the constancy reached by the evolution of the iron cycle, as evidence for a new function of the immunological system, i.e., securing the constancy of the internal milieu, condition of “a free life”, according to Claude Bernard.

The work ends with the first draft of a theory of the evolution of the major systems of circulating cells, inspired also a little by Claude Bernard’s phrase: “la fixité du milieu intérieur est la condition d’une vie libre.”

I am arguing that the first function of the immunological system is to secure that “fixité” of the internal milieu, which I prefer to call constancy.

The constancy of a nutrient function in an organism creates automatically its own vulnerability when confronted with other (micro)organisms using that same nutrient for their own survival. It seems to make sense that the system that secures the constancy will be the same that secures the defense against invading pathogenes.

## INTRODUCTION

Once finished the review of established facts that entered the wider body of knowledge, it appeared opportune to conclude this candidature with a theoretical post-scriptum.

Like trying to place a stamp in a closed envelope, in the hope that the letter will arrive one day to another destination.

In this post-scriptum, I shall try to delineate the theoretical framework that appears to emerge from the results presented in Section A. These results can be summarised as follows:

1. Lymphocytes, particularly T lymphocytes have the capacity to circulate in large numbers and to recognize specific microenvironments.

2. In the absence of those same lymphocytes, or in the case of alterations of the relative proportions of the two T lymphocyte sub-populations iron overload develops possibility as the result of an altered iron absorption.

Inspired a little in Claude Bernard's statement "La fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre" (cited by Wolvekamp, 1961), we propose, in this new form of the theory started with the postulates of 1978 (de Sousa, 78, 81) and continued with discussions written in 91 (de Sousa et al, 1991) and 1992 (de Sousa, 92), that the system of circulating cells of the immunological system has as its principal function to secure the independence and the constancy indispensable to the distribution of oxygen by the red blood cells and the regulation of the levels of circulating iron. We will use the word constancy not just to define the quality of what is constant but as a collective of constants.

We must acknowledge, however, that the metabolism of iron, i.e., its cycle represents one, probably, one of the most ancient and important constants maintained by the immunological system. Others, undoubtedly, may emerge in the context of this new theory of a new function. I shall consider three aspects: **a)** The Evidence; **b)** The Cells; **c)** The Mechanisms.

### **B1. THE EVIDENCE**

We shall consider first the evolution of the transport of oxygen. If our arteries contained a simple aqueous solution, one liter of such a fluid would

contain only approximately 3 ml of O<sub>2</sub>. To meet the demands of energy exacted by the muscles involved in a strenuous run, a heart would have to pump over 1000 liters of that solution per minute, for O<sub>2</sub> to be adequately distributed to the tissues (Weibel, 1984).

Thus, a number of oxygen carriers evolved, of which hemoglobin became the one selected for oxygen transport in mammalian life. If human hemoglobin itself circulated in soluble form, its half life would have been approximately 40 mins; the excess weight imposed by the circulation of such a viscous fluid to carry O<sub>2</sub> throughout the body of a normal adult man would have been equivalent to a 20 l volume (Lehmann & Huntsman, 1961).

Heme in hemoglobin is used as a reversible transporter of O<sub>2</sub>, because iron passes from the reduced form Fe(II) to the oxidized form Fe(III). The evolution of a cell containing a highly soluble hemoglobin in high concentrations results in a considerable increase in the capacity of the blood to bind O<sub>2</sub>.

Thus, in one liter of human blood we find about 150g of hemoglobin (15g/100ml) which can bind 8,7 nmol of O<sub>2</sub>, thus increasing the O<sub>2</sub> by about 30 times that of a single water solution (Weibel, 1984).

Hemoglobin occupies approximately a quarter of the volume of an erythrocyte internal space (33g/100ml). A mature mammalian red blood cell has lost its capacity to synthesize proteins, consequently its repair ability and probably the capacity to maintain its disc shape, becoming a cell with a limited lifespan, that, in man, lasts about 140 days. This signifies that 0,7% of all erythrocytes, i.e.  $175 \times 10^9$  cells must be replaced by new ones every day.

This cellular system of oxygen transport appears also as the one system that requires a cardiovascular system. A system shared by the circulating cells of the lymphomyeloid system. Citing Wolvekamp (1961) "among the multiple functions of the blood the transport of oxygen and of carbon dioxide, seems to be the one that needs in most cases a cardiovascular system." According to the same author, this conclusion "appears to be supported by the fact that in highly differentiated insects in which gas transport is effected by diffusion, the circulatory system is of a much simpler kind than that in many anelidea and crustaceans" (Wolvekamp, 1961).

The evolution of that first system of circulating cells appears quite simple to understand. There is an obvious gain in efficacy of a primordial

distribution function. The efficacy and the stability of oxygen transport is dependent, however, in a constant level of iron as carrier. It is perhaps not surprising that this first nutrient system should have evolved to have its internal autonomy ensured, in such a way that it became almost completely independent ("free") of variations in supply and possible scarcity of the metal in the external environment.

This autonomy is ensured not directly by the products of the red blood cells by themselves but by the intervention of a phagocytic system capable of discriminating between senescent and young red blood cells, resulting in the phagocytosis of the senescent but not the young cells, at a speed of  $3-4 \times 10^6$  cells per second (Harris & Kellermayer, 1974), recycling the iron contained in that population. It is estimated that the quantity of iron absorbed and excreted every day is 1mg.

There is a remarkable constancy of the mean corpuscular volume in mammals which varies between  $20-120 \mu^3$ ; compared to a range in body mass from 2g for the shrew to 4 tons for the elephant. Similarly little variations are seen in the hematocrit and the hemoglobin concentration in all mammals resulting in a variation of no more than  $\pm 20\%$  of the  $O_2$  capacity. Although a greater variation can be seen in the size of the red blood cells in other vertebrates, the hemoglobin content of the blood is not much lower in mammals (Weibel, 1984).

There do not appear to exist data relative to the stability of iron levels in other species concerning species other than humans. The iron-dependent functions are linked, in addition to oxygen transport by hemoglobin, to enzymes involved in electron transport such as the cytochromes, and other non-hem components of the oxidative metabolism such as NADH-deshydrogenase, the reduction of endogeneously generated hydrogen peroxide by catalase and peroxidase. The storage of oxygen to be used during exercise occurs in myoglobin.

Iron is also necessary in DNA synthesis for the reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides by ribonucleotide reductase (Chitambar et al, 1988).

Harris & Kellermeyer (1974) have estimated that "the development of iron deficiency-anemia in the adult male and post-menopausal female because of lack of ingestion of iron is therefore for practical purposes just about impossible. For iron deficiency to occur iron loss must be "increased".

In a normal man, the amount of iron in storage is approximately 1g and the total haemoglobin iron 2.5g (recycled by macrophages). Thus, and still according to Harris & Kellermeyer, considering storage iron 0, the total amount of haem iron is still 1.25g.

Assuming that no iron is absorbed and 1mg is excreted per day, it would take 2.250 days (6.3 years) for negative iron balance to develop.

In summary the iron cycle can be divided in 3 compartments (Fig. B1): a central compartment of transport, practically closed, autonomous and constant, independent of the external environment, as the result of the continuous recycling of the iron between the senescent red blood cells and the bone marrow, carried by transferrin two "zeal" compartments, capable by their capacity to vary and to be regulated, to "zeal" for the vital compartment of oxygen transport and distribution of iron to all cells; the absorption compartment that in normal conditions compensates for the daily loss of 1mg of iron and the storage compartment, localized largely in the hepatocyte.

## **B 2. THE CELLS**

In spite of the fact that immunologists have disregarded the function of macrophages as comparable to garbage collection, the truth is that macrophages have a central role in the recycling of iron from the senescent red blood cells. With the work reviewed earlier (A.4.c) it became apparent that the relative proportions of T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells both in man and in mice are closely associated with the regulation of the absorption of iron and with the regulation of intracellular iron levels (v. refs. A.5).

More recent observations of the T cell receptor repertoire in CD4 and CD8 came to demonstrate that a greater iron load was seen in patients with hereditary haemochromatosis with significant reductions in populations CD8<sup>+</sup> Vβ6.7 (Cabeda, submitted). Mice deficient in the expression of MHC class I have reductions in the numbers of CD4-CD8<sup>+</sup> αβ, normally found in the intestinal epithelium. These two sets of results indicate, therefore, that the CD4-CD8<sup>+</sup> cells may have a function in the regulation of iron absorption at the intestine level. And, in circulation, together with the capacity to migrate to specific microenvironments they may have a function of the regulation of the intracellular accumulation of iron, mediated by cytokines

(see Mechanisms, B.3) in the microenvironment which that function is needed.

Once an essential nutrient function, such as the transport of oxygen and iron becomes virtually constant in the evolution of a species, the element, in becoming constant becomes also automatically vulnerable because it may be utilized by other (micro) organisms using it for their own survival (Fig. B.2)

The withdrawal of iron from transferrin by bacterial siderophores is amply documented (Weinberg, 1978). Iron can be, however, extracted from haem and hemoglobin by pathogens (Létoffé et al., 1994). In the case of malaria, minutes after a vertebrate host is bitten by a mosquito *Anopheles*, the sporozoites migrate to the liver and invade the hepatocytes.

Within the hepatic cell, for some days, the parasite matures, the hepatocytes are lysed and thousands of merozoites enter the circulation and infect the red blood cells. In the last case, it is documented that the T CD8<sup>+</sup> cells are the cells that confer protective immunity mediated by IFN- $\gamma$  and the induction of NO synthase (Seguin et al., 1994; see also Mechanisms, B.3).

A great economy and efficacy would be attained if the system of circulating cells responsible for the maintenance and the regulation of the stability of an element could be utilized in a function of surveillance, against invading pathogens. One can thus anticipate that the maintenance function would depend on the recognition by the cells of the immunological system of a limited number of molecules of the internal milieu, as, for example, the molecules expressed on senescent cells, on epithelial cells of the intestine, ECM components, etc.

The “zeal” or surveillance function, on the other hand, would depend on recognition of unlimited number of antigens coming from the external milieu.

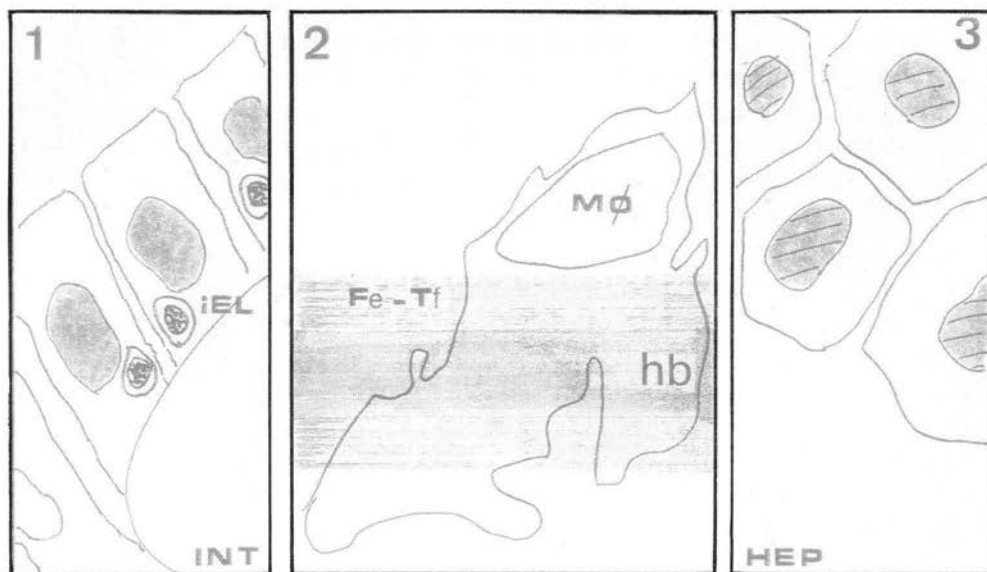
If, in response to the latter, for example, in the case of severe intestinal infections, one observes an expansion of CD8<sup>+</sup> cells, one could anticipate a considerable reduction in iron absorption. The resulting reduction in iron levels would have naturally a protective function if the bacteria utilize iron for their multiplication. This possibility, i.e. that circulating cells that have a maintenance function are the ones that could more easily be mobilized for “surveillance” function has a doubly valuable consequence: lowering iron levels and expansion of populations capable of a specific “classical” immune response. This double consequence could conciliate the conflict



between the already mentioned data signifying the near impossibility of the manifestation of an iron-deficiency anemia (Harris & Kellermeyer, 1974) and the WHO numbers of 500-600 million people having iron deficiency anemia in the world.

Perhaps an immunological system mobilized to respond to infections “knows” that to lower serum iron levels is a good first line of defense against infection.

**B. 1**

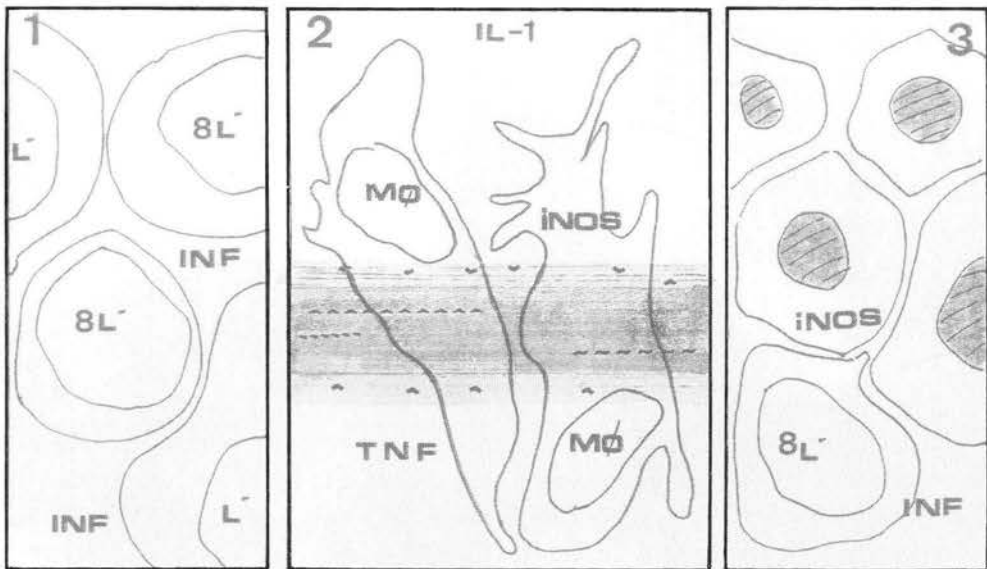


**Fig. B.1 – The Evidence and the Cells.** The iron cycle can be divided in 3 compartments: a central compartment (2) of transport, practically closed, autonomous, near-independent of the external environment, as the result of the continuous recycling of iron between the hemoglobin in senescent red blood cells (hb) and the bone marrow, carried on transferrin (Fe-Tf). Macrophages have a crucial role in the maintenance of the stability observed in this compartment. The two other compartments are designated in this text of “zeal” or “surveillance”. Compartments that, because of their capacity of variation and response to regulatory signals, can ensure the constancy of the vital compartment of oxygen transport and iron distribution to all cells: the iron absorption compartment (1) localised in the small intestine (INT) where the greatest number of intraepithelial lymphocytes (iEL) can be found, with the function of correcting the daily loss of 1 mg of iron, and the compartment of storage (3), localised mostly in hepatocytes (HEP).

### B 3. MECHANISMS

Accordingly, one could expect that non-specific products of lymphocyte and macrophage activation would have the capacity to cause iron deficiency. Work in recent years, analysing the multiple effects of cytokines, has identified IL-1 and TNF- $\alpha$  as substances capable of diminishing serum iron levels (systemic) and TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  as cytokines capable of

#### B.2



**Fig. B.2 – Balances and Mechanisms.** Once an essential nutrient function establishes itself in evolution, the element that is kept constant becomes automatically “vulnerable” because it can be utilized by other (micro)organisms including bacteria (^^^);- - -) and parasites (~~~~) CD8<sup>+</sup> lymphocytes, and IFN- $\gamma$  (INF) are necessary to the development of protective immunity, for example, in the hepatic phase of the cycle of malaria. Both IFN- $\gamma$  and TNF  $\alpha$  (TNF) have a regulatory effect on the intracellular metabolism of iron through the induction of iNOS. TNF  $\alpha$  and IL-1 have also an effect on the systemic metabolism of iron, leading to ferropenia. Thus, the system responsible for the maintenance of the constancy of another system (B.1) is also the one, that, with evolution acquires the capacity to respond specifically to invading pathogens (B.2). The production in large quantities, in the microenvironments where they are necessary, of cytokines appears as a “caricature” of the physiology and a faithful photography of immunology as we know, it today.

regulating intracellular iron metabolism via the induction of NO synthase (Drapier et al., 1993, Weiss et al., 1993, 1994, Ward et al., 1994).

In the last year, the sequence regarding the intracellular iron metabolism has become particularly well delineated (Drapier et al., 1993, Ward et al., 1994, Weiss et al., 1993, 1994).

The expression of genes that code for the major intracellular ferroproteins, ferritin and the transferrin receptor, is regulated at the post-transcriptional level by a regulatory factor called IRF or IRE-BP. The binding of the IRF to elements that can respond to the presence of iron in the untranslated regions of the mRNAs, called IRE, increases the stability of the mRNA for the Tf receptor and inhibits the translation of ferritin (Drapier et al., 1993, Weiss et al., 1993). In rodents a second binding protein to the IRE, denominated IRF<sup>B</sup> has been identified recently (Cairo and Pietrangelo et al., 1994). The regulation via IRE is done through the NO/NO synthase sequence. It is documented today that iron regulates the expression of the gene of the inducible NO synthase (Weiss et al., 1994). NO synthase is expressed constitutively in endothelial cells, in lung epithelial cells, in neurons and it is regulated by Ca<sup>2+</sup> (hence its designation cNOS). In contrast, during an immune response, there is induction of NOS in response to cytokines. This response is Ca<sup>2+</sup> independent (designated iNOS).

The cytokines capable of inducing iNOS are TNF, IL-1 and IFN.

It is interesting to note that in a recent study demonstrating that the production of NO by lung epithelial cells *in vitro* is increased in culture in the presence of IFN- $\gamma$ , IL-1 and TNF- $\gamma$ , led the authors to say "The coexistence of constitutive and inducible NOS in bronchial epithelial and alveolar cells is consistent with a complex mechanism that the epithelial cells evolved to protect the host from the microbial assault at the interface air/surface" (Assano et al., 1994).

The existence of a circulating lymphocyte system associated to the epithelial cells is always forgotten by those that work with the epithelia except today by those immunologists interested in intraepithelial lymphocytes (Poussier and Julius, 1994).

The regulation of the intracellular metabolism of iron appears thus unseparable from the products of the activation of T lymphocytes and macrophages.

#### **B 4. CONCLUSION**

In developing the capacity to regulate the systemic levels of circulating iron levels, to contribute to the stability of the iron (recycled) utilised for hemoglobin synthesis and oxygen transport, the immunological system appears to have a determining role in the maintenance of the constancy of, at least, one vital system of the internal milieu (Fig. B.1). All the indications are that with evolution, that function, with the exposure of vertebrates to the surrounding microbial world, came to become unseparable of that other well established function of the immunological system: "defense against invading pathogens" (Fig. B.2).

The principle that a constant in evolution may become vulnerable appears as a relatively simple principle of Biology.

This principle is well illustrated by the utilization of the molecule CD4 by HIV-I. The first encounter in evolution between a constant and the microorganism that has just "discovered" it, should lead to explosive epidemic episodes.

The fragile balance within which life evolves, is a mystery for those of us who see it for so short a time. Iron, in having been "chosen" for the transport of oxygen, must have become central to the great evolutionary game of constants and vulnerables. Likewise, the polymorphism of the immunological system and the capacity of lymphoid cells to migrate and to function within specific microenvironments, are probably central to the necessity of a variability that will secure the recognition of non-self living forms that may be at the heart of the vulnerability of a species.

But the acknowledgement that the blood is a recyclable element, essential to life, is not of now, or of microorganisms capable of making siderophores or haemolysins. It is also ancient in History and well known food of gods in some cultures.

*"Permeating this creation myth as well as many parallell myths from other Mesoamerican peoples is the concept of a reciprocal relationship between humans and the Gods. The earth and its creatures were created through a sacrificial act of the Gods, and human beings, in turn, were required to strengthen and nourish the Gods. Gods and humans cannot*

*exist without each other. It is clear from Classic Maya art and inscriptions, that blood drawn from all parts of the body was sustenance for the Gods.*" (Schele & Miller, 1986).

26.12.94

MARIA DE SOUSA

## **B 5. BIBLIOGRAPHY**

- Asano K, Chee CBE, Gaston B et al. (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 10089-10093.
- Cairo G, Pietrangelo A. (1994) Transferrin receptor gene expression during rat liver regeneration. Evidence for post-transcriptional regulation by iron regulatory factor B, a second iron-responsive element-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **269**: 6405-6409.
- Chitambar CR et al. (1988) Inhibition of leukemic HL-60 cell growth by transferrin-gallium: effects of ribonucleotide reductase and demonstration of drug synergy with hydroxyurea. *Blood*, **72**: 1930-1936.
- de Sousa M. (1978) Lymphoid cell positioning: a new proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration. *Soc. Exp. Biol. Symp.*, **32**: 393-410.
- de Sousa M. (1981) Lymphocyte circulation: experimental and clinical aspects. John Wiley & Sons. Chichester, UK, p. 259.
- de Sousa M. (1989) Iron and the lymphomyeloid system: a growing knowledge. p.3-16. *In*: M de Sousa and J. Brock (eds). "Iron in Immunity, Cancer and Inflammation." John Wiley & Sons.
- de Sousa M, Reimão, R, Porto, G et al. (1991) Iron and lymphocytes: reciprocal regulatory interactions. p.171-177. *In*: A. Albertini, C.L. Lenfant, P.M. Mannucci and J.J. Sixone (eds) *Curr. Studies Hematol. Blood Transf.*, Basel Karger, n. 58.
- de Sousa M. (1992) T lymphocytes and iron overload: novel correlations of possible significance to the biology of the immunological system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **87** (supp. V) 23-29.

- Drapier JC, Hirling H, Wietzubin J et al. (1993) Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J.*, **12**: 3643-3649.
- Harris JW and Kellermeier RW. (1974) The red cell. Harvard University Press, p. 124.
- Lehmann H and Huntsman RE. (1961) Why are red cells the shape they are? The evolution of the human red cell. p.78-148. *In*: R.G. MacFarlane & AHT Robb Smith (eds). Functions of the blood. Blackwell Scientific Publications, UK.
- Létoffé S, Ghigo JM, Wandersman C. (1994) Iron acquisition from heme and hemoglobin by a serratia marcescens extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 9876-9880.
- Poussier P and Julius M. (1994) Intestinal intraepithelial lymphocytes: the plot thickens. *J. Exp. Med.*, **180**: 1185-1189.
- Schele L, Miller ME. (1986) Blood letting and the vision Queen. *In*: "The Blood of Kings: Dynasty and Ritual in Maya Art." George Brazillia, Inc., New York. p. 176.
- Seguin AC, Klotz FW, Schneider I et al. (1994) Induction of Nitric Oxide synthase protects against Malaria in Mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected Mosquitos: Involvement of interferon- $\gamma$  and CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.*, **180**: 353-358.
- Ward RJ, Kuhn LC, Kaldy P et al. (1994) Control of cellular iron homeostasis by iron responsive elements *in vivo*. *Eur. J. Biochem.*, **220**: 927-931.
- Weibel ER. (1984) The pathway for oxygen. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Weinberg ED. (1978) Iron and infection. *Microbiol. Rev.*, **42**: 45-66.
- Weiss G, Goossen B, Doppler W et al. (1993) Translational regulation in iron responsive elements by the nitric oxide / NO-synthase pathway. *EMBO J.*, **12**: 3651-3657.
- Weiss, G, Werner-Felmayer, G, Werner, ER et al. (1994) Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J. Exp. Med.*, **180**: 969-976.
- Wolvekamp, HP. (1961) The evolution of oxygen transport. *In* MacFarlane, RG and Robb-Smith, AHT (eds). Functions of the blood. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pgs. 2-71.

Ao comemorar o seu 60.º aniversário, em Abril de 1984, os Laboratórios Bial criaram o **PRÉMIO BIAL DE MEDICINA CLÍNICA**. Dado o êxito obtido, efectuaram-se novas edições do prémio em 1986, 1988, 1990, 1992 e 1994.

No sentido de incentivar ainda mais o trabalho desenvolvido em prol da Medicina, Bial decidiu alargar a partir de 1992 o âmbito da iniciativa, criando cumulativamente o **GRANDE PRÉMIO BIAL DE MEDICINA**.

Na edição de 1994 o Júri foi constituído pelos Professores Mário Quina, que presidiu, Armando Porto, Amândio Tavares, José Manuel Pereira Miguel, Nuno Cordeiro Ferreira e Nuno Rodrigues Grande.

De entre os 49 trabalhos concorrentes, o Júri atribuiu o **GRANDE PRÉMIO BIAL DE MEDICINA** à Professora Maria Ângela de Sousa, com a obra «*Contribuição para a Caracterização da Ecologia do Sistema Timo-Dependente: Memórias, Percursos e Esboço de uma Nova Teoria*»; o **Prémio Bial de Medicina Clínica**, à obra «*Hipertensão Arterial do Idoso*», da autoria do Grupo de Investigação e Tratamento do Hipertenso Idoso, liderado pelo Professor Gorjão Clara e, ainda, quatro menções honrosas.

Ainda em 1994 o **Prémio Bial** passou a ser administrado pela então criada **Fundação Bial**, que decidiu manter as características gerais do prémio na sua edição de 1996, disponibilizando para o **GRANDE PRÉMIO BIAL DE MEDICINA 15.000.000\$00**, para o **Prémio Bial de Medicina Clínica 5.000.000\$00**, e para cada uma das quatro possíveis **menções honrosas 500.000\$00**.

O **Prémio Bial** tem o patrocínio do Senhor Presidente da República, do Conselho de Reitores das Universidades Portuguesas e da Ordem dos Médicos.