

MARIA HELENA STANGLER KRAEMER

Este exemplar corresponde ao receptivo da
tese defendida pela candidata Maria Helena
S. Kraemer e aprovada pela Comissão Julgadora.

15.12.89



O COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
E SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA DE GRAVES

Tese de Doutorado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação na
Área de Imunologia do Institu-
to de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas.

Campinas-SP

1989

Trabalho realizado na Disciplina de
Imunologia Clínica do Departamento
de Patologia Clínica da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas.

Orientador

Prof. Dr. Luiz Sebastião Prigenzi

Aos meus pais,

à memória póstuma de meus irmãos

Ao Sergio,

às minhas filhas, Veronica e Tatiana

Agradecimentos

Meus Agradecimentos,

- Ao Professor Dr. *Luiz Sebastião Prigenzi*, pela orientação científica e pelas valiosas apreciações introdutórias ao longo deste estudo.

- Ao Professor Dr. *Marcos Garcia Costa*, pela confiança construtiva que nos dispensou.

- Ao Professor Dr. *Marcos Antonio Tambascia* por possibilitar o acesso aos pacientes e pelo auxílio na implantação do painel de células dos indivíduos do grupo controle.

- À Professora Dra. *Cecilia Mattos Ulson*, Chefe do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela compreensão e confiança, possibilitando a efetivação deste trabalho.

- Aos biólogos *Arthur Macoto Sakamoto*, *Margareth Araújo Bastistela* e *Ana Lucia Erbolato Catalan*, pelo auxílio na assistência técnica durante o decorrer do presente trabalho.

- Aos colegas da disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela prestimosa colaboração.

- Ao Departamento de Tocoginocologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, por nos possibilitar o acesso às

mulheres gestantes múltiplas formadoras do painel de células do grupo controle.

- Aos *colegas e funcionários* do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo suporte de ajuda na complementação do painel de células do grupo controle.
- Ao 28º Batalhão de Infantaria Blindada (BIB), sediado na cidade de Campinas, São Paulo, por nos possibilitar o acesso aos indivíduos formadores do painel de células.
- Aos *professores e colegas* do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela total solidariedade.
- À Professora Dra. *Celia Regina Garlip* do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela eficiente cooperação.
- À Professora Dra. *Beatriz Maria Machado de Medeiros* do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara, São Paulo), pelo auxílio nos experimentos de absorção dos soros de pacientes.
- Ao Professor Dr. *Jorge Elias Kalil Filho* da Faculdade de Medicina da USP e Laboratório de Imunologia de Transplantes do INCOR, pela cooperação no suprimento dos antissoros HLA da França (Laboratório do Professor Dr. J. Dausset) ao Brasil.
- Aos Professores Drs. *Ligia Beatriz Persoli; Leonilda Maria Barbosa dos Santos e Morton Aaron Scheinberg*, pela

valiosa doação de antissoros HLA.

- Aos Professores Drs. *Jean Dausset, Virginia Lepage e Degos* do Instituts de Rechèreche sur les maladies du sang (Lab. Prof. J. Dausset), Paris, France, pela ajuda e doação dos antissoros HLA imprescindíveis na execução deste trabalho.
- Ao Dr. *Celso Granato* do Serviço de Virologia do Instituto Adolf Lutz (São Paulo), pela gentil doação dos soros dos pacientes positivos para o vírus Coxsackie B.
- Ao Professor Dr. *Luiz Alberto Magna* do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelas entusiásticas sugestões na assessoria estatística desta pesquisa.
- À Professora Dra. *Zulma Fernandes Peixinho* da Disciplina de Imunologia da Escola Paulista de Medicina (SP), pelas sugestões científicas na complementação do trabalho.
- Ao Professor Dr. *Carlos Frazato Junior* da Disciplina de Cirurgia Torácica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo valioso auxílio.
- À Professora Dra. *Sofia Rosa Lieber*, pela indispensável ajuda.
- Ao Professor Dr. *Paulo Cesar Rodrigues Palma*, pela irrestrita solidariedade.
- Ao Professor Dr. *Alberto José da Silva Duarte* da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo (USP) pela colaboração na análise prévia deste trabalho.
- Ao Professor Dr. *Euripedes Ferreira* do Hospital das Clíni

cas da Universidade Federal de Curitiba (Paraná), pelas valiosas apreciações e sugestões na análise final deste trabalho.

- À Senhorita *Vilma Proide*, pela elaboração dos desenhos.
- Ao Professor Dr. *Joel Salles Giglio*, pelo estímulo e ajuda.
- À Senhorita *Maria Aparecida Fernandes*, pelo trabalho de datilografia.
- Aos Professores Drs. *João Luiz Pinto e Silva*, *Mario Mantovani* e *Antonio Frederico Novaes Magalhães* da Faculdade de Ciências Médicas e Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela ajuda financeira na aquisição das baterias de soros HLA.
- Ao Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.
- Aos meus *pais* e minhas *filhas*, pela compreensão ao longo do tempo, até a conclusão desta tese.

"The animal and human bodies great forces lying latent could be called into action by appropriate stimuli".

Von Behring's (1905)

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Constituição e Doença Tireoidiana	2
1.2. Doença de Basedow-Graves	4
1.2.1. Doença de Basedow-Graves e Auto-imu- nidade	5
1.3. Os Mecanismos Efetores na Doença de Gra- ves	7
1.3.1. O Papel do Linfócito T	7
1.3.2. A Expressão Aberrante das Moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal	9
1.3.3. O Papel do Anticorpo Antiidiotipo	11
1.4. Auto-imunidade	13
1.4.1. Auto-imunidade e Autotolerância ...	15
1.4.2. Auto-imunidade e Fatores Genéticos.	18
1.5. O Complexo de Histocompatibilidade Princi- pal (CHP)	21
1.5.1. O Polimorfismo das Moléculas e Ge- nes HLA	23
1.5.2. O Significado Biológico do Complexo CHP	28
1.5.3. Desequilíbrio de Ligação	33
1.5.4. Avanços em HLA e Doenças	35

2. Objetivos	41
3. Metodologia	43
3.1. Casuística	43
3.2. Material de Laboratório	45
3.3. Métodos Laboratoriais	49
3.4. Métodos Estatísticos	58
4. Resultados	63
4.1. Freqüência dos Antígenos HLA e Freqüência Gênica HLA em População Caucasoide Miscige nada Brasileira da Cidade de Campinas-SP .	63
4.2. Comparação das Freqüências dos Antígenos HLA-A em Indivíduos com Doença de Graves e do Grupo Controle	64
4.3. Comparação das Freqüências dos Antígenos HLA-B em Indivíduos com Doença de Graves e do Grupo Controle	64
4.4. Comparação das Freqüências dos Antígenos HLA-C em Indivíduos com Doença de Graves e do Grupo Controle	65
4.5. Comparação das Freqüências dos Antígenos HLA-DR em Indivíduos com Doença de Graves e do Grupo Controle	66
4.6. Associação de Haplótipos entre os Alelos HLA-A-B e DR Encontrados nos Indivíduos Controles Normais e Com a Doença de Gra- ves	66

4.7. Detecção da Atividade Citotóxica para Células DR3 Positivas em Amostras de Soro de Pacientes com Doença de Graves	67
4.8. Detecção da Atividade Citotóxica para Células DR3 Positivas em Amostras de Soro de Pacientes com Doença de Graves antes e após Absorção com Anticoxsackie B Utilizando-se o Teste Linfocitotóxico Modificado .	68
5. Discussão	83
6. Conclusões	95
7. Resumo	98
8. Bibliografia	100

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Constituição e Doença Tireoidiana

As características morfológicas, fisiológicas e psicológicas próprias de cada indivíduo definem, no conjunto, a sua constituição individual. Tipos constitucionais são definidos pela reunião, em grupos, de indivíduos que apresentam características homogêneas, principalmente anatômicas, que os diferenciam das de outros grupos. O fundamental do que chamamos constituição é o genótipo de cada indivíduo. No momento da fecundação fica determinado se o novo ser será do tipo astênico ou atlético. Em gêmeos univitelinos nunca se observou dissociação de tipos constitucionais. Muitos equiparam a constituição ao genótipo e, para J. BAUER, principalmente a Patologia Constitucional equivalia à Genética Aplicada. Muitos outros, como RÖSSLE, já admitiam que os fatores ambientais influem também sobre a constituição, dando como resultado o fenótipo. KRETSCHMER, grande estudioso dos problemas constitucionais e defensor do conceito hereditário da constituição, afirmou: "Por constituição entendemos o conjunto de todas as qualidades individuais baseadas na herança, isto é, de raiz genotípica. Como é natural, o investigador nunca poderá separar, rigorosamente, do conceito de constituição as modificações da predisposição hereditária ocasionadas por estímulos externos, para não cair em definições artificiais e ilógicas, pois que tudo vive se fez como

produto da reação entre a herança e o meio-"ambiente".

O termo predisposição indica que um organismo, ou parte do mesmo, está de alguma forma mais exposto ao risco de adquirir uma doença. Não há nenhuma doença que afete exclusivamente a um único tipo constitucional; somente se pode indicar maior ou menor predisposição a contrair algumas doenças nos diferentes tipos.

Com relação às doenças tireoidianas, está perfeitamente demonstrada, por investigações familiares e em gêmeos, a importância da herança como fator preponderante na doença de Basedow Graves e nas outras formas de hipertireoidismo. Já clínicos antigos como CHVOSTEK ressaltaram a importância dos fatores constitucionais para a eclosão da doença de Basedow-Graves e H. ZONDEK expressou, de forma enfática, que "não se faz hipertireoideo o que quer, mas sim o que pode".

Entre gêmeos idênticos, a doença ocorre em ambos os membros do par em proporção maior que seria a esperada para a população geral (MARTIN, 1945). A concordância para expressão da doença foi observada em 40 de 170 pares de gêmeos idênticos (incidência de 23%) (WILROY & ETTELDORF, 1971). A porcentagem de concordância para gêmeos não idênticos é semelhante à encontrada para os demais graus de parentesco em famílias de indivíduos com a doença (ROITT & DONIACH, 1967); entretanto, a ocorrência de discordância em 77% torna evidente que fatores não genéticos mas ambientais estão também envolvidos. Estudos epidemiológicos recentes, tem apontado o papel das infecções na patogênese da doença

de Graves, onde nos pacientes, tem sido constatado uma alta incidência de anticorpos especificamente para a bactéria *Yersinia Enterocolítica* e à determinados agentes virais (SAFRAN et al., 1987).

1.2. Doença de Basedow-Graves

Os termos hipertireoidismo e tireotoxicose são usualmente utilizados para identificar conjunto de alterações fisiológicas e bioquímicas conseqüentes à exposição dos tecidos a quantidades excessivas de hormônios tireoidianos. Esse conjunto de alterações é acompanhado em geral de hiperplasia difusa da glândula tireoideiana muitas vezes associada a alterações oftálmicas específicas (MARGOLICK et al., 1988). A doença foi descrita pela primeira vez por PARRY em 1786 e depois por GRAVES e BASEDOW entre 1835 e 1843. MÖRIUS em 1887 identificou o hipertireoidismo como sendo a característica fundamental da doença.

A doença de Graves é relativamente comum ocorrendo especialmente nas 3ª e 4ª décadas da vida, mais frequentemente no sexo feminino (8:1) (HOLLINGSWORTH et al., 1972).

Classicamente se atribui a doença o desajuste nos mecanismos homeostáticos que normalmente regulam a secreção de hormônio tireoideiano de forma a adequá-lo às necessidades fisiológicas dos tecidos periféricos (GRAVES, 1940).

São manifestações clínicas comuns o exoftalmo,

bócio por aumento difuso bilateral da tireóide, tremor fino das extremidades, instabilidade emocional, sudorese excessiva, intolerância ao calor, palpitações, hipercinesia, emagrecimento desproporcionado à ingestão de alimentos e outros sinais e sintomas (FARID, 1981).

1.2.1. Doença de Basedow-Graves e Auto-Imunidade

O achado de anticorpos para tireoglobulina no soro de pacientes com doença tireoidiana auto-imune por ROITT et al., em 1956, marcou o início das investigações sobre a natureza dessa doença. ROSE & WITERBSKY foram capazes, também em 1956, de demonstrar que lesões similares podem ser produzidas em animais por imunização com antígenos tireoidial nos homólogos, misturados com adjuvante de Freund. Subseqüentemente um grande número de anticorpos a componentes do tecido tireoidiano normal foi descoberto nos soros dos pacientes (ROITT et al., 1956; ROSE & WITEBSKY, 1956).

Muitos fenômenos de natureza auto-imune foram descritos na doença de Graves: hiperplasia tímica, linfo-adenopatia, esplenomegalia, infiltração linfocitária da tireóide e tecidos retro-orbitais, benefício terapêutico com uso de agentes imuno-supressores e esteróides, associação com outras doenças auto-imunes: miastenia gravis, anemia perniciosa, artrite reumatóide e tireoidite de Hashimoto (VOLPE et al., 1972). Há também registro de gêmeos idênticos, um com a doença de Graves e outro com tireoidite de Hashimoto (VOLPE et al., 1974).

A primeira evidência para estimulador circulante no sangue para função tireoidiana na doença de Graves foi publicada por ADAMS & PURVES em 1958, quando descreveram um "long-acting thyroid stimulator". O bio-ensaio inicial usado para esse fim utilizou a cobaia, mas foi depois padronizado por McKenzie em camundongo (McKENZIE, 1958). O ensaio depende da capacidade do soro do paciente em produzir liberação de iodo radioativo a partir de glândulas tireoidianas de camundongo. Como o TSH produzia pico em duas horas, enquanto que o soro de Graves o fazia a 9-12 horas com padrão mais sustentado de estimulação, a atividade foi denominada "long-acting thyroid Stimulator" (LATS). Essa atividade estava associada com a classe IgG do soro (KRISS et al., 1964; MEEK et al., 1964) e inicialmente foi demonstrada em 50 a 60% dos pacientes com doença ativa. ADAMS & KENNEDY, em 1971, demonstraram que a maioria dos soros LATS-negativos continha também imunoglobulinas que, embora não se ligassem e estimulassem a tireóide de camundongo, podiam entretanto fixar-se em tireóide humana e inibir competitivamente a ligação de outras imunoglobulinas estimuladoras da tireóide.

Progresso importante foi o desenvolvimento de ensaio de radiorreceptor para a detecção de imunoglobulinas estimuladoras da tireóide (SMITH & HALL, 1974). O ensaio tinha por base a capacidade do soro ou de imunoglobulinas séricas competirem com ^{125}I -TSH na ligação ao seu receptor ou a membranas de tireóide humana. Com este ensaio, 60 a 100% dos soros apresentavam anticorpos circulantes anti-receptor para TSH. Outros ensaios foram posteriormente propostos baseados na capacidade de estimular a tireóide.

Com técnicas de maior sensibilidade é possível detectar o anticorpo TRab, (CNATA, 1987) em praticamente todos os soros de pacientes com a doença de Graves (KRAIFM et al., 1987). Há correlação entre os níveis de TRab e os vários graus de hiperfunção tireoidiana (ZAKÁRIJA & MCKENZIE, 1987).

1.3. Os Mecanismos Efetores na Doença de Graves

Certamente vários são os fatores a serem considerados na fisiopatologia da doença, a qual, depende para sua expressão de associações de natureza imunológica ainda não claramente determinadas; neste contexto tem sido enfocado basicamente: o papel do linfócito T, a expressão aberrante das moléculas CHP, o papel do anticorpo antiidiotipo.

1.3.1. O Papel do Linfócito T

Os estudos sobre a imunidade mediada por células na fisiopatologia da doença de Graves têm-se revelado de máxima importância devido à infiltração linfocítica na glândula da tireóide, comprovada histologicamente em pacientes com essa doença. Os linfócitos B na glândula da tireóide produzem uma quantidade significativa de auto-anticorpos, enquanto que os linfócitos T desempenham um papel vi-

tal nesta produção, através da ação dos linfócitos T auxiliares (TH), que, por sua vez, são regulados pelos linfócitos T supressores (TS) (TOTTERMAN, 1979). A quantificação das subpopulações de células - T foi realizada utilizando-se diferentes técnicas com a finalidade de documentar e caracterizar o papel do linfócito T sob aspecto quantitativo e funcional (FAURE et al., 1983; BENE et al., 1983). Inicialmente, observaram-se anormalidades nas células - T e a existência de um desequilíbrio quantitativo com uma diminuição na célula - T supressora e específico para a tireóide (AOKI et al., 1979; LAMKI et al., 1973).

A utilização de técnicas mais sofisticadas com emprego de anticorpos monoclonais (WILSON et al., 1984) tornou possível estabelecer uma correlação entre os marcadores celulares fenotípicos e a função celular dos linfócitos do sangue periférico e intratireoidiano (WALL et al., 1983). Porém os resultados de imunofluorescência e imunoperoxidase na análise dessas subpopulações não são uniformes e não permitem consenso sobre a quantificação fenotípica das células T, resultando em controvérsia na interpretação das variações observadas (LUDGAT et al., 1984). A análise dos linfócitos intratireoidianos, embora com alguma limitação metodológica, revelou diferenças fundamentais tais como, falha dos linfócitos T supressores e diminuição da percentagem total de linfócitos T com relação aos linfócitos do sangue periférico dos diferentes pacientes, tanto na multiplicidade fenotípica, como na diversificação funcional (MISALKI et al., 1985).

Na glândula tireóide dos pacientes com doença

de Graves foi bem estabelecida predominância quantitativa de linfócitos T sobre os B (TOPLISS et al., 1983). A característica funcional tem mostrado que estes linfócitos T expressam antígenos de histocompatibilidade de classe II--HLA-DR indicativo da ativação da célula T, sendo que para a grande maioria dos pacientes com a doença de Graves foi possível observar esse marcador (AICHINGER et al., 1985). A constatação do aumento das células T-DR positivas na doença de Graves indica um processo imune ativo na glândula tireóide (PETERSEN et al., 1986). Até o momento, fenômeno de ativação de células T dessa ordem não foi observado em indivíduos normais; estima-se, pois, que essa alteração tenha significado fisiopatológico na doença de Graves (MARIOTTI et al., 1989).

1.3.2. A Expressão Aberrante de Moléculas de Classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP)

Os conhecimentos sobre a estrutura e a função dos produtos do CHP permitiram sua compreensão e levaram à especulação sobre seu possível papel na predisposição a doenças em geral.

A suscetibilidade por fator genético foi muito bem estudada, nas doenças auto-imunes sugerindo uma clara associação das moléculas HLA (antígenos leucocitários humanos) com a resposta imune à tireóide (SVEJGAARD & RYDER, 1976).

A documentação básica da expressão aberrante de produtos dos genes do complexo CHP de classe II nas células humanas de tireóide foi obtida em culturas de células tireoidianas estimuladas com lectinas (PUJOLL-BORELL et al., 1983). A importância dessa observação reside no papel que esses produtos, aberrantemente expressos, podem desempenhar na apresentação do antígeno às células que, ativadas, desenvolvem, como efeito funcional, resposta imune efetora (LUCAS-MARTIN et al., 1988). A maioria dos auto-antígenos orgãoespecíficos normalmente aparecem na superfície das células do órgão-alvo no contexto das moléculas CHP de classe I, mas não às de classe II.

A descoberta deste fato foi altamente significativa para melhor entendimento do papel destas moléculas na doença de Graves. Anteriormente, já havia sido constatada expressão aberrante dos produtos HLA nas células foliculares provenientes de locais de infiltração linfocitária intensa na glândula tireóide (HANAFUSA et al., 1983). A importância da positividade aumentada dos antígenos HLA de classe II parece residir no envolvimento destas moléculas na apresentação do antígeno; foi sugerida uma relação entre a expressão aberrante destas moléculas e a patogenia da doença de Graves, (BOTTAZO, 1983; UNAMUE et al., 1984). Os experimentos efetuados em culturas de células tireoidianas documentam a participação destas células na resposta autóloga, em relação à ativação das células T e à amplificação da resposta imune local (DAVIES, 1985).

Nos tireócitos a expressão de antígenos HLA-D significa associação com mecanismos estimuladores que possi

velmente determinam o nível de expressão da classe II no curso da doença (KENNEDY et al., 1985). Nas células da tireóide que apresentam antígeno HLA-D de forma aberrante foi observado que estas próprias células podem participar diretamente na apresentação de autoantígenos específicos para o sistema imune.

Nas células alvo do epitélio da tireóide de pacientes com doenças auto-imunes observou-se um aumento de antígenos classe II, e nos locais das lesões, a produção e liberação de linfocinas, principalmente o interferon (IFN- γ) pelas células T efectoras. Tal fato aparentemente aponta para o significado fisiológico do IFN- γ na indução de antígenos classe II, bem como, para o efeito biológico na apresentação do antígeno. Desta forma, macrófagos tratados com IFN- γ , expressam um aumento de antígenos de classe II significando, possivelmente, uma maior eficiência na apresentação do antígeno para estas células (KAPPES & STROMIGER, 1988; COCKFIELD et al., 1989).

1.3.3. O Papel do Anticorpo Antiidiotipo

O estudo dos anticorpos antiidiotipos que envolvem os produtos gênicos para o CHP, vem suscitando, há anos, grande interesse devido às suas especificidades potencialmente deletérias para os receptores e auto-anticorpos. Se os idiotipos definidos como determinantes antigênicos da região variável e hipervariável de uma imunoglobulina fo-

rem vistos operacionalmente como receptores, tanto nas imunoglobulinas, como nas células T ou B algumas das aparentes hipóteses contraditórias nas auto-imunidade passam a ser resolvidas (ROITT et al., 1989). A restrição do CHP que ocorre ao nível de receptores de célula T para o CHP "auto" podem se expandir durante a ontogenia no ambiente tímico sendo proposta para a falta de tolerância uma falha nas células apresentadoras de antígeno (APC) do timo, dependendo do repertório de células T de um indivíduo estas células reconhecerão o antígeno no contexto do CHP "auto" (BABCOCK et al., 1989).

Segundo a teoria da rede, a necessidade de uma imagem interna para todos os antígenos incluindo os "auto" e a presença de antiidiotipos complementares fortalece a idéia da origem da autoimunidade como um defeito na cascata da regulação imune (JERNE, 1982). O fato de, em indivíduos normais, ocorrerem naturalmente anticorpos antiidiotipos, tanto para os antígenos de classe I quanto de classe II, reforçam essa hipótese (THOMAS & WILLIAMS, 1987). Através da rede de respostas restritas ao HLA-DR foram descritos anticorpos antiidiotipos para os antígenos DR em pacientes com: Artrite reumatóide (SAVAGE et al., 1987); Lupus erimatoso sistêmico (LES) (ABDOU et al., 1981; OKUDAIRA et al., 1986), doenças endócrinas auto-ímmunes (SALVI et al., 1988) e para anticorpos HLA (POSTILLO et al., 1989). De grande interesse, no que se refere aos anticorpos antiidiotipos, está sendo o papel desempenhado pelas viroses, principalmente dos vírus que se utilizam de antígenos do complexo CHP como um dos seus receptores. Em trabalhos experimentais

constatou-se ocorrer uma grande afinidade na seqüência viral e na seqüência do Loci-H2 dos genes de histocompatibilidade do camundongo (DOHERTY et al., 1976). Desta forma os vírus, por exemplo "Epstein-Barr, Coxsackie B, que possuem uma afinidade para receptores de superfície podem, como hipótese, induzir resposta antiidiotipo com atividade biológica para o receptor viral (VENABLES, 1988; CHRISTIANSEN et al., 1983).

1.4. Auto-imunidade

As doenças auto-imunes são hoje reconhecidas como sendo uma das causas mais comuns de morbidade a longo prazo, bem como de considerável mortalidade, visto que com freqüência e terapêutica padronizada não tem base fisiopatológica e, por essa razão, eficácia questionável (FLYNN et al., 1988). A essas doenças tem sido atribuído um comprometimento multifatorial com envolvimento de mecanismos pelos quais a resposta imune pode ser iniciada, incluindo fatores genéticos, infecciosos, hormonais, o estresse, os mecanismos de interação da célula T e idiotipos. A contribuição de cada fator pode variar muito entre os diferentes pacientes (FELDMANN et al., 1988).

A auto-imunidade pode ser definida como uma falha do organismo para reconhecer seus tecidos normais como "próprios", implicando qualquer tipo de resposta imune para o "próprio" humoral (por exemplo, auto-anticorpos circulantes) ou celular (por exemplo, a hipersensibilidade de tipo

tardio). A auto-imunidade desta forma é um conceito que pode explicar a patogênese de uma série de doenças, sendo considerado o principal fenômeno imunológico na medicina clínica (NAKAMURA & BINDER, 1988).

Os conhecimentos relacionados à auto-imunidade sofreram consideráveis modificações no decorrer dos últimos anos. Os avanços para uma melhor compreensão dessa patologia envolvem progressos tanto no campo da imunologia, uma vez que o sistema imune esteve desde muito cedo implicado na etiologia da auto-imunidade (TEOFILOPOULOS & DIXON, 1982), quanto na genética no emprego correto de animais de experimentação que podem reproduzir determinadas características dessas doenças (HALÁ et al., 1988).

Atualmente os conceitos vigentes sobre os mecanismos pelos quais se originam as doenças auto-imunes refletem uma compreensão evolucionária das respostas imunes para os autocomponentes (ADA & ROSE, 1988). A função essencial do Sistema imune tem envolvido a discriminação e o auto-reconhecimento e não auto-reconhecimento, existindo muitos caminhos para o desarranjo dos mecanismos fundamentais de auto-reconhecimento que resultem nas respostas auto-imunes (MILLER & WATSON, 1988).

A resposta imune mostrou ser específica, amplificadora, como também limitada na extensão e na temporariedade para a defesa das necessidades do organismo (KLEIN, 1985). Um distúrbio neste reconhecimento discriminatório trará como consequência as respostas imunes anormais diretamente contra os constituintes do organismo, com uma contribuição relativa dos diferentes fatores ambientais e genéticos (STROMINGER, 1986).

Até há pouco tempo foi um dogma em imunologia que os correspondentes imuno-celulares nos indivíduos nor-

mais não possuíssem receptores de superfície celulares diretamente contra os autoconstituintes (ERLICH, 1900). A teoria da seleção clonal sobre a formação do anticorpo visualizou, sob um novo prisma, a falta de resposta para determinantes autólogos, de tal forma que clones de células reativas para os autocomponentes fossem eliminados (BURNET, 1953). Posteriormente, foi intensamente estudado o papel central da célula T, bem como a sua função ativadora, reguladora ou supressora com relação à autotolerância e regulação imune nas auto-imunidades (MICHIE & GUNN, 1966; ROSE et al., 1981). Gradualmente, foi-se formando uma visão mais dinâmica da regulação imune antiauto e o sistema imune passou a ser entendido como um sistema de referência dentro do Universo de antígenos, funcionando na base do auto-reconhecimento (JERNE, 1984).

1.4.1. Auto-imunidade e Autotolerância

Os mecanismos da autotolerância estão sendo considerados um dos problemas centrais na auto-imunidade e, embora os modelos experimentais de indução de tolerância para auto-antígenos tenham contribuído com consideráveis informações, muito está faltando para elucidar a base celular da tolerância (STROMINGER & HAUSMANN, 1988).

A multiplicidade de interações, nas quais o sistema imune se encontra funcionalmente estruturado, compreende elementos regulatórios em íntima conexão; aí clones

reativos passam a ser representados no ambiente interno, por determinantes antigênicos, denominados idiotipos (OUDIN, 1974). O reconhecimento mútuo do idiótipo com seu antiidiotipo complementar faz com que eles sejam considerados elementos reguladores do equilíbrio interno, tanto na forma de moléculas livres, quanto de receptores celulares (CAZENAVE, 1977). O idiótipo e seu receptor molecular complementar mostram estar envolvidos na manutenção do delicado equilíbrio entre os diferentes componentes do ambiente interno, resultando na regulação, bem como na autotolerância (FARID, 1985).

O processo de autotolerância foi considerado muito mais de aprendizagem do que herdado geneticamente, através de uma série de experimentos realizados em animais de laboratório. Nos modelos animais estudados foram encontrados linfócitos que possuíam a habilidade de suprimir a resposta imune para antígenos estranhos e principalmente para auto-antígenos; esta falta de resposta natural para auto-antígenos foi atribuída à célula T, dentro de uma função supressora ou reguladora (ZINKERNAGEL & DOHERTY, 1974a). Evidências subseqüentes permitiram comprovar que a autotolerância, para os auto-antígenos se acha presente muito cedo na ontogenia, persistindo ao longo de toda a vida adulta por meio de processos de supressão imunológica. Para a sua indução, bem como para a sua persistência, conceitos mais recentes mostram ser necessários a presença do antígeno e um limiar mínimo de afinidade entre o tolerógeno e seus receptores celulares (JENKINS & SCHWARTZ, 1987).

Por outro lado, observou-se que a imunização com antígenos do ambiente interno, por exemplo, insulina, pode

levar a uma resposta auto-imune, ativando o aparecimento de anticorpos seguidos de anti-anticorpos antiidiotipos. Dependendo das circunstâncias, estes anticorpos podem mimetizar a função do auto-antígeno original e, conseqüentemente, induzir a formação de auto-anticorpos para este mesmo auto-antígeno (LIDER et al., 1988).

Os estudos da idiotipia da região variável do anticorpo mostravam-se de extrema importância na correlação entre imunoglobulinas específicas para o mesmo auto-antígeno (CLEVELAND et al., 1983). Os idiotipos da molécula de anticorpo parecem não ser tão importantes na regulação das respostas imunes para antígenos estranhos, mas possivelmente essenciais para a manutenção da tolerância, bem como na origem das condições essenciais para o desencadear de uma doença auto-imune (ZANETTI, 1986). Esses clones de células auto-reativas, por sua vez, parecem ser controlados por manipulações idiotípicas, envolvendo processos complexos de interações celulares e humorais ainda não bem elucidadas.

Muitas evidências experimentais mostram o comprometimento das células T reativas e o surgimento da auto-imunidade (BANDEIRA et al., 1987). Entre elas temos o efeito benéfico da timectomia neonatal em muitos modelos animais de doenças auto-imunes, o efeito terapêutico dos anticorpos antilinfocitários, o efeito terapêutico de um anticorpo para o receptor da interleucina - 2 (IL-2) e o desenvolvimento de doenças auto-imunes como conseqüência de doença enxerto x hospedeiro (GVH) em pacientes que receberam transplante de medula óssea (TALAI, 1986).

Em modelos animais, foi constatada a ocorrência natural de anticorpos para o idiótipo do anticorpo que reage ao "auto", o qual parece funcionar como um regulador do equilíbrio interno (ISLAM et al., 1983; BAKER et al., 1984). Esse anticorpo auto-antiidiótipo também parece ocorrer de uma maneira específica para o receptor celular (KABAT, 1988), modulando a complementariedade idiótipica através de uma influência reguladora.

1.4.2. Auto-imunidade e Fatores Genéticos

A base genética para a regulação imunológica é uma área de importantes pesquisas atualmente, uma vez que a auto-imunidade é geneticamente programada (SHREFFLER, 1988). Um grupo de genes localizados dentro dos "loci" do Complexo de Histocompatibilidade Principal desempenha um importante papel nas regulações imunológicas. Neste contexto têm sido enfocados os "loci" D/DR do Complexo CHP Humano e a região Ir do camundongo, também denominados genes de resposta imune (genes Ir). Associados à região Ir foram reconhecidas as moléculas Ia e a magnitude destes antígenos nas respostas imunes, tanto para diferenças de suscetibilidade às viroses envolvendo o reconhecimento do antígeno, como nas interações e cooperações celulares (BENACERRAF, 1981). Os genes de resposta imune, genes Ir, foram originalmente descobertos através de estudos realizados em diferentes linhagens de "murinos". O controle genético para esses genes foi obtido inicialmente pela resposta a polímeros relativamente simples de

poli-L-lisina (BENACERRAF & McDEVITT, 1972). Concomitantemente foram feitas observações para antígenos mais complexos, como as proteínas naturais, por exemplo as encontradas no sangue, durante a resposta a uma infecção (LOZNER et al., 1974).

Os genes HLA de Classe II no homem foram detectados nos macrófagos, células B e células T ativadas. Pela sua função na apresentação do antígeno e concomitantemente interações das células T auxiliadora e célula B, esses genes parecem determinar a magnitude da resposta imune-humoral, para antígenos timo-dependentes (BEISEL et al., 1982). Os genes HLA de Classe II-HLA-D parecem desempenhar um papel central através de seu mecanismo fisiopatológico e regulador. São concordantes nesse sentido as observações de que a rede HLA-D pode envolver auto-anticorpos com a função de "baixa-regulação" para as células T-DR positivas que se encontram grandemente aumentadas nas doenças auto-imunes (OKUDAIRA et al., 1982).

A ativação e a supressão dos antígenos HLA-D da superfície das células imunes podem ter uma função complementar e, semelhante à supressão mediada para o idiótipo, esses antígenos foram pesquisados para a auto-imunidade em função da variação quantitativa e qualitativa de seus produtos gênicos, principalmente HLA-D. A variação quantitativa dependente de antígenos de superfície HLA-D foi explicada como representando uma parte da expressão bioquímica de variação da imunogenicidade alogênica, ou seja, como a suscetibilidade genética para as doenças auto-imunes (DE BERNARDO & DAVIES, 1986). A expressão aberrante das moléculas CHP da classe II

HLA-DR pode levar à ativação das células T auxiliadoras reativas contra os auto-antígenos, originando as células T citotóxicas e auto-anticorpos com conseqüências deletérias para os tecidos alvos (BRETSCHER, 1986).

A tipagem para as especificidades do CHP foi de grande valor para melhor definir subgrupos de pacientes, embora os progressos mais atuais dentro desta área de imunogenética não tenham encontrado uma correlação absoluta entre os haplótipos do CHP e auto-imunidade. Devido à função do CHP e seu papel na suscetibilidade às doenças, foi fundamental estabelecer uma associação de ligação como uma das muitas variantes expressas na superfície dos linfócitos (BARNSTABLE et al., 1978).

Um outro fator de extrema importância foi a constatação da expressão dos antígenos HLA-DR em órgãos dos quais eles normalmente estão ausentes (AGUAYO et al., 1988).

Um dos mais recentes modelos propostos para o desencadear das reações de auto-imunidade destaca os eventos de ativação e proliferação das células T e células B - auto-reativas. Essas células, pela ação de uma série de estímulos e do encontro de vírus e bactérias com os auto-antígenos, podem tornar-se rapidamente ativadas. As células T, uma vez estimuladas, passam a sintetizar a interleucina-2 (IL-2) que, por sua vez, interage com os receptores celulares da IL-2, induzindo a proliferação clonal das células T. Um dos mediadores químicos neste processo é o interferon gama (γ -IFN) comprometendo a expressão normal das moléculas do CHP principalmente de Classe II e as células naturalmente mata-

doras ou NK, resultando no comprometimento da manutenção e exacerbação das doenças (THOMSEN & MARKER, 1989).

1.5. O Complexo de Histocompatibilidade Principal Humano

PETER GORER, patologista inglês, foi quem, pela primeira vez, postulou a existência de aloantígenos nos eritrócitos de camundongos, os quais se encontravam geneticamente associados às rejeições de tumores nesses animais (GORER, 1937). Entre 1940 e 1950, foram feitas numerosas publicações citando a presença no sangue, principalmente de pacientes leucopênicos, de determinadas substâncias, que aglutinavam os leucócitos. Somente, porém, com a descoberta da leucoaglutinação de origem imunológica devida a aloanticorpos que se desenvolviam após as transfusões, é que se iniciou um estudo mais sistemático deste complexo (DAUSSET & NENA, 1952; MOESCHLIN, 1952).

A primeira especificidade do sistema CHP foi detectada em soros de pacientes politransfundidos, nos quais seis soros reagiram de uma maneira muito similar pela técnica de leucoaglutinação. Foi assim definido o primeiro antígeno leucocitário humano (MAC, hoje conhecido como HLA-A2) (DAUSSET, 1958). Concomitantemente, outros pesquisadores observaram a extrema freqüência dos anticorpos antileucocitários no soro de mulheres gestantes múltiplas (VAN ROOD, 1958); a estas moléculas deu-se o nome de antígenos de Histocompatibilidade HLA que são codificadas por genes do Com-

plexo de Histocompatibilidade Principal (CHP) no homem e H-2 no camundongo (GORER, 1959).

Este sistema foi denominado e reconhecido como o Sistema de Histocompatibilidade Principal, responsável pela indução rápida de transplantes incompatíveis, bem como de anticorpos humorais. O conhecimento progressivo sobre as associações levaram à interpretação de que se tratava de um sistema imunogenético complexo e análogo ao sistema de histocompatibilidade H-2 do camundongo (IVANNY & DAUSSET, 1966).

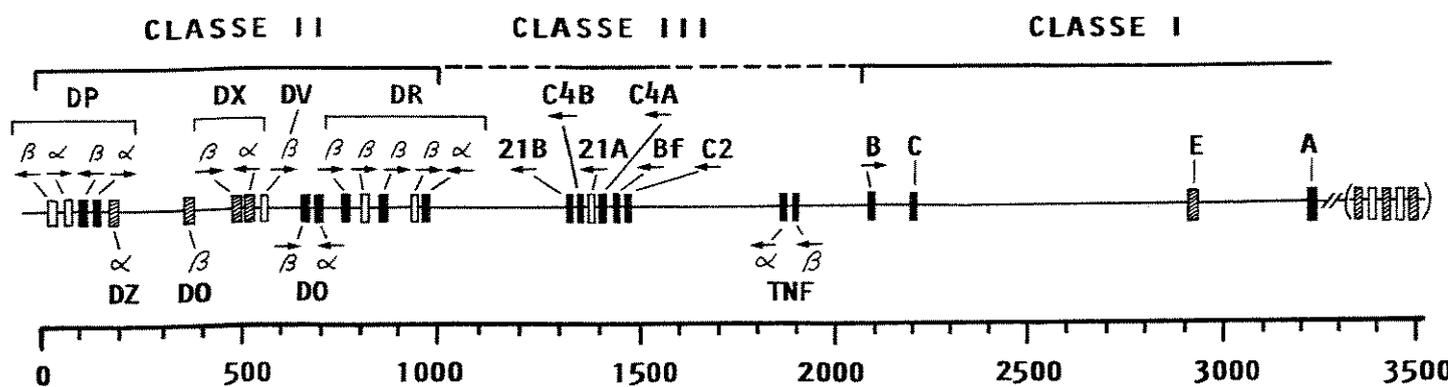
O desenvolvimento de pesquisa sobre o sistema principal de histocompatibilidade, tanto no camundongo (H-2) quanto no homem HLA, muito contribuiu para a compreensão da organização de sua região gênica e do seu polimorfismo no curso de um longo período evolucionário (KLEIN & SHREFFLER, 1971; KISSMEIR-NIELSEN & THORSBY, 1970).

A partir da descoberta dos primeiros anticorpos anti-HLA, progressivamente novos "loci" e antígenos foram descobertos. Comunicações e trabalhos colaborativos internacionais ("Workshops" de Histocompatibilidade, iniciado por BERNARD AMOS em 1964 e continuando até os dias atuais), efetivamente contribuíram para rápidos progressos e desenvolvimento do sistema HLA através de intercâmbio de materiais, técnicas e idéias, acelerando os avanços nessa área (ALBERT et al., 1984).

1.5.1. Polimorfismo das Moléculas e Gênes HLA

Um polimorfismo genético é definido conceitualmente pela existência, em uma população, de dois ou mais alelos num determinado "locus" cada um dos quais numa frequência de mais de um por cento. A grandeza deste polimorfismo é calculada pela frequência total dos heterozigotos com relação à frequência total dos homozigotos. Neste contexto, o Sistema Principal de Histocompatibilidade possui um polimorfismo de grande variabilidade, se comparado com outros polimorfismos conhecidos (BODMER, 1972).

Nos mamíferos, o complexo gênico que codifica os antígenos principais de transplantação compreende uma região gênica muito conhecida e estudada. No homem, esta região está situada no braço curto do cromossomo seis e comporta genes que controlam numerosos processos imunológicos (representação diagramática 1) (DAUSSET, 1979a; BODMER et al., 1986b).



Representação Diagramática 1: Mapa Genético da região HLA (adaptado, segundo TROWSDALE, 1987).

As barras em preto representam os genes; as barras em branco representam os pseudogenes; as barras cortadas em diagonais representam os genes não definidos.

Este complexo compreende três classes de genes ou produtos; cada classe mostra forte homologia, tanto dentro como entre as diferentes espécies de vertebrados que foram estudados para o CHP porém esta homologia é extremamente menor entre as classes I e II do que entre os diferentes antígenos de cada uma dessas classes (KAUFMAN et al., 1984).

Os genes dos "loci" HLA-A, B, C e os antígenos que eles controlam estão presentes em virtualmente todas as células nucleadas do organismo, contudo o nível de expressão dos antígenos pode variar consideravelmente de uma célula a outra, aumentando muito após a exposição a determinadas linfocinas (WALLACH et al., 1982). Análises moleculares de seqüência de DNA sugerem a existência de pelo menos dois "loci", denominados HLA-QA e HLA-TL pela analogia com o sistema H-2 do camundongo com estrutura similar porém evolucionariamente distintas, com uma distribuição tecidual mais restrita e localização próximas ao locus HLA-A (BODMER, 1987). A região HLA-D ou produtos de classe II (HLA-DP, DQ, DR) expressam-se em linfócitos B e células ativadas e foram encontrados originariamente em células linforeticulares derivadas da medula óssea. Algumas células epiteliais podem expressar antígenos classe II durante os processos inflamatórios (DAAR et al., 1984). São de Classe III os componentes do complemento C2, C4A, C4B, BF. Os produtos das regiões Classe I e Classe II podem ser identificados: sorologicamente, por resposta imune-celular "in vitro"; a nível molecular, por seqüência gênica e, por estudos de fragmentos de DNA obtidos com restrição do DNA genômico; por identificação bioquímica (ponto isoelétrico); e por amplificação enzimática do DNA (PCR) ⇒ "Po

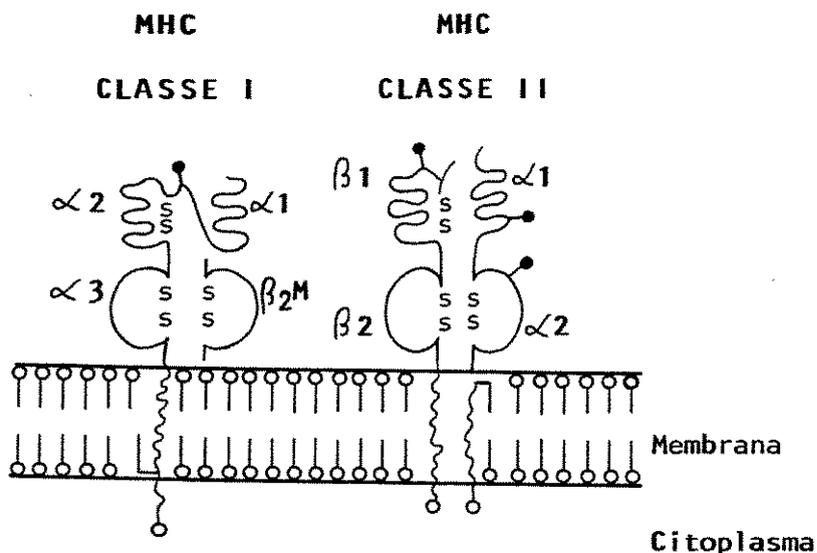
lymerase Chain Reaction" (MOLLER, 1985).

Os antígenos Classe II que compreendem as moléculas H-2, D, L, TLA, Q-2 no camundongo e HLA-A, B, C, no homem são glicoproteínas de membrana celular constituídas por uma cadeia pesada extremamente polimórfica de peso molecular de 43,000 quilodaltons com cinco regiões distintas: três domínios extracelulares, um domínio da transmembrana e a porção terminal citoplasmática (GUILD & STROMINGER, 1984). O segundo e o terceiro domínio estão intimamente associados com a β 2-microglobulina que constitui a cadeia leve não polimórfica. A β 2-microglobulina não transpassa a membrana celular, não apresenta polimorfismo e é codificada por um só gene no cromossomo quinze do homem. A síntese da β 2-microglobulina é necessária para ocorrer a expressão dos antígenos Classe I na superfície da célula (PETERSON et al., 1972).

Os antígenos Classe II que compreendem as moléculas I-a e I-E (de resposta imune) nos murinos e HLA-DP, DQ, DR no homem são constituídos por uma cadeia pesada Alfa (α) com peso molecular de 39.000 quilodaltons (kd) e uma cadeia pesada Beta (β) de peso molecular de 28.000 quilodaltons, sendo as duas cadeias pesadas não covalentemente associadas (representação diagramática 2) (HUMPHREYS et al., 1976; KORMAN et al., 1985).

As moléculas CHP possuem uma extrema homologia com os receptores imunoglobulínicos das células B, com os receptores das células T e com a molécula Thy que se expressa na superfície da célula T do camundongo. A razão desta homologia não está esclarecida, podendo estas estruturas repre-

sentar especialização funcional da membrana para reconhecer e transmitir informações para o interior da membrana celular (LAFFERTY, 1988).



Representação Diagramática 2: Similaridade Estrutural dos Antígenos CHP de Classe I e de Classe II (adaptado, segundo TROWSDALE, 1987). (S-S) indicam ligações de dissulfeto entre resíduos de cisteína; (C) indica a porção carboxil terminal; (i) indica as cadeias laterais de carboidrato.

Cada um dos genes Classe I e Classe II é por si mesmo extremamente polimórfico, sendo este polimorfismo uma das mais intrigantes propriedades dos antígenos CHP. Este polimorfismo é certamente muito mais extenso do que pode ser definido simplesmente pela análise sorológica. Compreende numerosas variantes ou alelos que são seus produtos de membrana e se constituem de glicoproteínas fortemente antigênicas com um número muito amplo de combinações (BODMER, 1986a).

O polimorfismo dos antígenos Classe I e Classe II foi definido inicialmente quanto às proteínas através de testes sorológicos. Foram reconhecidos, até o presente, vin-

te especificidades para o "locus" A, cinquenta especificidades para o "locus" B, oito especificidades para o "locus" C e quatorze especificidades para o "locus" DR (STRACHAM, 1987; TROWSDALE, 1987). Posteriormente o polimorfismo e a organização dos genes e antígenos de Classe II foram estudados com relação às moléculas, através da análise com endonucleases de restrição do DNA celular humano, correlacionando-se o polimorfismo definido sorologicamente com o polimorfismo dos sítios analisados com as enzimas de restrição e técnicas de Imuno "Blot" (SOUTHERN BLOT) associados aos genes HLA (MATSUMO et al., 1989; COHEN, 1982). Constatou-se que a região HLA-D é particularmente complexa, compreendendo dois genes α -DP e dois genes β -DP, dois α -DQ e dois genes β -DQ um gene α -DR e pelo menos três genes β -DR, sendo os genes α -DQ, β -DQ e β -DR os mais polimórficos (OWERBACH et al., 1983; CHARRON et al., 1985).

O polimorfismo dos produtos do MHC vem sendo estudado há vários anos com o objetivo de explicar o mecanismo que originou o seu aparecimento e sua continuidade. Com relação às moléculas MHC Classe I, possivelmente diferenças entre os genes sejam o resultado de duplicação gênica entre os "loci" relacionados e não relacionados. Estes eventos de conversão gênica e mutação possivelmente originaram a variabilidade e, simultaneamente, a conservação de seqüências (SERJEANTSON, 1989). A evolução dos genes de Classe II pode ter ocorrido por mecanismos de conversão gênica, bem como por eventos de duplicação, nos quais, a partir de uma unidade central - as cadeias Alfa (α) ou Beta (β) -, originaram-se as diferentes regiões D (KOURILSKY, 1986). O polimorfis-

mo que controla principalmente a expressão das moléculas MHC de Classe II tem sido recurso extremamente importante na análise da heterogeneidade dentro das populações e nas interações funcionais da resposta imune. A região Classe II mostra uma forte associação de determinados alelos com um grande número de doenças, principalmente as de natureza auto-imune (TODD et al., 1988). O polimorfismo da seqüência de nucleotídeos dos genes codificando para os produtos de MHC de Classe II parecem determinar a especificidade da resposta imune.

Possivelmente o desenvolvimento do conhecimento das associações muito poderá contribuir para o entendimento da base genética entre a expressão polimórfica do CHP e a suscetibilidade a essas doenças, sendo observado em alguns casos, que a substituição de um só aminoácido na molécula CHP pode alterar profundamente a reatividade no reconhecimento celular para os produtos gênicos de Classe II (IRLÉ et al., 1988).

1.5.2. O Significado Biológico do Complexo HLA

A função biológica dos genes ou antígenos do complexo principal de histocompatibilidade - HLA tem sido um enigma desde a descoberta da reatividade alogênica. A grande pergunta a ser respondida é como se pode explicar o papel do CHP no sistema imune de maneira a predizer satisfatoriamente a alorreatividade.

As primeiras observações focalizaram a atenção

no papel biológico dos antígenos de histocompatibilidade e nos fatores que controlam sua evolução. Os genes deste sistema controlam diferenças nas respostas imunes, gerando suscetibilidade diferenciada para as doenças infecciosas (BURNET, 1972).

As doenças infecciosas podem ser consideradas a principal força evolucionária para o desenvolvimento dos mecanismos imunes dos vertebrados superiores a este fato pode explicar a extraordinária reatividade imunológica dos vertebrados contra determinados agentes microbianos intra e extra-celulares (TYSON & JENKIN, 1974).

Um primeiro papel atribuído aos genes do MHC foi relacionado ao controle do reconhecimento de célula a célula durante os processos de diferenciação celular (BENACERRAF & McDEVITT, 1972).

A descoberta de que a suscetibilidade para a indução de tumores estava ligada ao CHP veio mostrar que havia um controle genético dos genes deste sistema na resposta a infecções por vírus oncogênicos (SJÖGREN & RINGERTZ, 1962; LILLY & PINEUS, 1973).

O papel do CHP na imunidade mediada pelas células T foi amplamente pesquisado no sistema H-2 do camundongo, mostrando que a atividade citotóxica das células T específicas para o vírus estava restrita ao H-2 (DOHERTY & ZINKERNAGEL, 1975a).

As pesquisas realizadas com o hapteno trinitrofenil (TNP) mostraram que as células T citotóxicas para as células-alvo modificadas por este agente eram similarmente

restritas (SHEREARER et al., 1974; SHEREARER, 1976). Esta constatação levou tais pesquisadores a redefinirem as células T singenicamente restritas e as células T citotóxicas (THOMAS et al., 1977).

Os estudos da ontogenia das células T citotóxicas e células T específicas para o vírus contribuíram com algumas informações sobre a origem molecular dos receptores de célula T, numa tentativa de compreender se a restrição se dá quanto à apresentação do antígeno ou independentemente dele (JANEWAY et al., 1978). Paralelamente, foi estudado o papel do timo na diferenciação e concomitante maturação das células T, bem como a sua relação na seleção de especificidade da restrição desta célula (BENVAN & FINK, 1978).

O fenômeno de restrição do CHP reflete o fato de que a função efetora das células T mostrou ser determinada pelo reconhecimento do H-2-"auto" juntamente com o antígeno estranho na superfície dessa célula. No camundongo, as regiões K e D são receptoras para sinais líticos e os determinantes da região Ia atuam como receptores para sinais de diferenciação celular (SCHWARTZ, 1978). Dessa forma, foram atribuídas ao sistema imune dos vertebrados propriedades cognitivas como aprender, recordar, discriminar dentro da organização geral e global, sendo a discriminação imune "auto", e "não-auto" o traço característico deste sistema (BODMER, 1981).

Os modelos experimentais mostraram que o repertório clonal das células que emigram do timo são selecionadas na base da reatividade do complexo principal de histocom

patibilidade (HASKINS et al., 1983). Uma vez que a identificação para o "auto" ocorre no timo, foi suposto que todos os membros das populações de células pré-T possuíam pelo menos um receptor complementar para um outro dos alelos do CHP da espécie (FINK & BEVAN, 1978). Com relação ao receptor de reconhecimento do antígeno em associação ao CHP (Ag-CHP) das células T, foi atribuído um só receptor que foi isolado destas células há alguns anos (ALLISON et al., 1982; HASKINS et al., 1983; YAGUIE et al., 1985). Constatou-se que as células T CD4 reconhecem fragmentos antigênicos de proteínas estranhas associadas com moléculas CHP "auto" Classe II, enquanto as células T CD8 reconhecem fragmentos antigênicos de proteínas estranhas associadas com moléculas CHP "auto" Classe I (SCHENDEL & VENUTA, 1987). Os modelos de seleção para a especificidade do receptor de célula T no timo mostraram que aquelas que preferencialmente se ligam ao antígeno junto com o CHP são selecionadas (seleção positiva), e as células T que se ligam só ao "auto", auto-reativas, são eliminadas (seleção negativa), resultando no final um repertório periférico que é restrito pelo CHP e tolerante ao "auto". Isto possivelmente ocorre quando as células entram em contato com macrófagos e células dendríticas (BLACKMANN, 1988). As células B e os anticorpos reativos foram produzidos da mesma maneira, sendo necessários para operar na seleção positiva de clones de células T auxiliaadoras, formando setores de complementariedade, incluindo-se aí os receptores de imunoglobulinas e demais estruturas "auto" que são envolvidas nas interações funcionais, resultando na ativação, crescimento e diferenciação de linfócitos. Estas interações de células "au

to" reativas e conectadas idiotipicamente mantêm o repertório total durante o tempo de vida do indivíduo (MILLER, 1989). Neste contexto, as imunoglobulinas têm-se mostrado particularmente importantes, uma vez que os anticorpos podem inibir, induzir e selecionar as células T de uma maneira não restrita ao MHC (KABAT, 1988).

Modelos animais foram utilizados para melhor definir os detalhes moleculares do reconhecimento do antígeno pelas células T, partindo do princípio de que a função comum das glicoproteínas é a de apresentar fragmentos antigênicos para as células T (MARYANSKI et al., 1988). Para as moléculas de Classe I foi demonstrado que peptídeos antigênicos têm a capacidade de interagir direta e especificamente com moléculas CHP. Tais complexos podem estimular a produção de interleucina - 2 (IL-2) por clones de células T apropriadas (BUUS et al., 1987). Em ensaios de estimulação "in vitro" foi observada correlação direta entre a habilidade de peptídeo para competir com o antígeno tanto na ligação direta com as moléculas CHP da Classe II), quanto na habilidade de inibir a apresentação do antígeno. Em geral, os peptídeos restritos para o mesmo haplótipo foram capazes de competir entre si e mostraram que cada molécula CHP de Classe II) contém um só sítio de ligação para o peptídeo (GUILLET et al., 1987). Em contraste com a reação clássica que mostrava que a discriminação imune "auto" e "não auto" se encontrava sedimentada na eliminação de clones reativos, surgiram mecanismos que, para diminuir "auto" e "não-auto", consideravam a reatividade direta do "auto". Tais mecanismos celulares, tanto de célula T como célula B parecem estar envolvidos na manutenção da indu

ção da supressão da resposta imune e níveis de expressão idiotípica (CHANG et al., 1989).

1.5.3. Desequilíbrio de Ligação

No cromossomo seis humano, na região MHC, os "loci" se encontram estruturalmente unidos e a herança dos genes ocorre, usualmente, através de eventos de recombinação, como na meiose, quando os alelos de cada um dos progenitores se separam comportando-se como entidades individuais (AMOS et al., 1972).

Uma característica particular do sistema HLA é o aparecimento de associações gaméticas preferenciais entre os diferentes genes dos "loci" A, B, C, DR, codificando um desequilíbrio genético para determinados alelos, e muitas vezes para o haplótipo inteiro. Assim, alelos de dois ou mais "loci" se transmitem juntos no mesmo haplótipo numa frequência maior que a esperada para uma associação ao acaso (BODMER, 1980). Especificamente, com relação a essa frequência alterada, observou-se, para o alelo HLA-A30, a existência dela predominantemente em pessoas negras (28%) se comparado com pessoas brancas (5%) e inexistente nos japoneses (BAUR & DANILOVS, 1980).

Os eventos que levam ao desequilíbrio de ligações e ao concomitante aparecimento de tais haplótipos incluem processos mutacionais e endocruzamentos. As vantagens, seletivas normalmente, são evocadas para justificar a conti-

nuidade de tais associações preferenciais, sendo difícil imaginar, neste contexto, a associação gamética mais comum, A1, B8 e DR3 fortemente associadas às doenças auto-imunes (COLOMBANI, 1985). Esta associação, portanto, deve ter um grande significado biológico, uma vez que as associações com os haplótipos em desequilíbrio de ligação mostram induzir uma resposta imune particular, a qual pode significar vantagem ou desvantagem seletiva (BODMER, 1987).

Trabalhos experimentais mostraram que os alelos individuais de haplótipo A1, B8 e DR3 exercem efeitos diferentes no nível de IgE (MELLINS et al., 1988), podendo ocorrer a seleção, quando os efeitos benéficos de uma parte do haplótipo compensam os efeitos deletérios da outra parte. Neste caso específico, a seleção pode envolver desvantagem seletiva quanto aos genes de resposta imune (KALLENBERG et al., 1988).

Uma das hipóteses prováveis envolve as infecções associadas ao HLA. Neste contexto, foi postulado que um determinado agente exterior, no caso uma bactéria ou vírus, penetrando no organismo e favorecido pela vantagem da combinação dos alelos particulares fortemente associados, terá condições de proliferar em órgãos-alvo. A sua presença contínua poderá favorecer uma auto-imunização e conseqüentemente o surgimento da doença em indivíduos suscetíveis. Evidências mais convicentes são citadas na literatura, com relação aos possíveis efeitos da resposta imune do hospedeiro, simultaneamente à infecções virais (SATO & SHIROMA, 1989) e ou bactérias (COVER & ABER, 1989).

1.5.4. Avanços em HLA e Doenças

Em decorrência da descoberta do polimorfismo eritrocitário, numerosas pesquisas foram realizadas no sentido de correlacionar os antígenos deste sistema com doenças. Embora os resultados tenham sido muito limitados, essas pesquisas serviram como base para estudos posteriores num campo de investigações muito similar, o do sistema HLA (BODMER, 1986b).

As primeiras observações foram obtidas através de experiências efetuadas no camundongo e mostraram que havia uma relação direta entre o alelo H-2K e a suscetibilidade de algumas linhagens para determinados vírus oncogênicos. Este fato demonstrou que a suscetibilidade e/ou resistência para as leucemias era particularmente determinada por um gene situado no complexo H-2 do camundongo (LILLY et al., 1964).

Posteriormente, observou-se que determinadas linhagens de camundongos desenvolviam resistência ao crescimento de enxertos tumorais. Como estas linhagens diferiam apenas pelo H-2, verificou-se que havia um locus genético dominante que controlava a histocompatibilidade para os enxertos tumorais, o qual foi denominado de Complexo Principal de Histocompatibilidade (SNELL, 1968).

Paralelamente, na área da investigação clínica, surgiu uma série de perguntas tentando correlacionar o sistema HLA com doenças. No ano de 1958, foi descoberto por

Jean Dausset o primeiro antígeno HLA-(MAC), hoje HLA-A2. Desde então, o polimorfismo dos antígenos do complexo MHC tem sido consideravelmente aumentado, tanto para as moléculas HLA-A, B, C (PARHAM et al., 1988), como para a região HLA-D (BETTET et al., 1987). Através do aperfeiçoamento de métodos, tanto os clássicos de sorologia, quanto os de imunologia celular, foi possível detectar os genes e suas variantes ou alelos, definir os haplótipos individuais e, posteriormente, estabelecer-se um dado HLA estava influenciando a suscetibilidade (Associação positiva) ou a resistência (associação negativa) nas diferentes patologias (BODMER, 1987).

Os estudos iniciais foram realizados entre doentes não aparentados, porém pertencentes a uma mesma população étnica e geográfica. Os resultados desses estudos definiram as primeiras associações com os antígenos de histocompatibilidade (SINGAL & BLACKMAN, 1973; HANSEN et al., 1977).

Essas associações apontavam uma forte associação entre os genes HLA e uma vasta gama de patologias (MAYR et al., 1977; JACKSON et al., 1977). A análise genética das associações HLA em trabalhos com famílias foram de grande importância. Nessas famílias, verificou-se existirem membros doentes por mais de três gerações, podendo ser estabelecida a segregação conjunta de um certo gene ou haplótipo com a doença (THOMSON & BODMER, 1977).

Nas pesquisas entre HLA e doenças foi fundamental estabelecerem-se critérios com relação à validade da população controle, que deveria englobar indivíduos de uma mesma esfera geográfica. Os pacientes deveriam ser diagnosticados, levando-se em consideração parâmetros como: sexo, idade

do surgimento da doença e presença de determinados anticorpos específicos da patologia. Devido ao grande polimorfismo do sistema HLA, deveria haver uma fidedignidade e reprodutibilidade dos soros, a fim de que os antígenos HLA fossem definidos tão precisamente quanto possível, tendo em vista a tecnologia disponível (DAUSSET, 1979c).

As informações iniciais obtidas, seja em pesquisas de associações entre HLA e doenças, seja em estudos familiares, mostraram que a transmissão hereditária dos gens de suscetibilidade não seguia um mecanismo mendeliano simples, mas uma segregação multifatorial ou poligênica com penetrância incompleta, havendo a necessidade - para a doença se expressar - da interação da bagagem hereditária do indivíduo com os demais fatores ambientais (HORS, 1985).

Foi proposta uma série de mecanismos na tentativa de uma melhor compreensão das associações entre HLA e doenças. As primeiras descobertas apontaram para a possibilidade de que as próprias moléculas HLA atuariam como receptores para os agentes virais; uma segunda hipótese apontou para a provável similaridade estrutural entre essas moléculas e os agentes infecciosos (HELENIUS et al., 1978). A hipótese mais aceita estava apoiada em trabalhos que abordavam a restrição dos antígenos HLA para determinados vírus ambientais (ZINKERNAGEL & DOHERTY, 1974; ZINKERNAGEL et al., 1978).

O papel das moléculas HLA passou a ser estudado com relação à resposta imune para os produtos de histocompatibilidade Classe I e Classe II. O fenômeno de restrição de

terminado a especificidade de restrição CHP para a célula T veio comprovar as profundas implicações das moléculas HLA na resposta imune (ZINKERNAGEL & DOHERTY, 1979), servindo como marcadoras do "auto" e mostrando por que determinados indivíduos são suscetíveis, ao passo que outros são resistentes a certas doenças ou agressões externas (DAUSSET, 1981a).

Mais recentemente, com o desenvolvimento de técnicas em Biologia Molecular, foi demonstrado que os fragmentos de restrição polimórficos podem estar mais fortemente associados às doenças que os epitopos sorologicamente definidos. Novas técnicas em biologia molecular aplicados ao DNA dos genes HLA e com a ajuda das enzimas de restrição, da clonagem gênica das porções não traduzidas (introns e regiões 5' e 3') não transcritas do DNA destes genes ampliarão consideravelmente o reconhecimento do polimorfismo, responsável pelo repertório individual (BATCHELOR et al., 1987).

As associações permitiram agrupar e classificar uma série de doenças em que o componente comum foi a base genética. Do ponto de vista teórico e também prático, a determinação dos genes de suscetibilidade conduziu a uma abordagem do papel natural do sistema HLA cujos estudos estão apenas se iniciando. Os mecanismos são muito complexos, a base genética é fundamental, porém existem outros fatores atuantes como o meio ambiente e outros genes não relacionados com o MHC.

As perspectivas para o futuro estão sedimentadas na compreensão do CHP e sua função biológica, visando a entender quais os genes que produziram a suscetibilidade, iso-

lando estes genes e localizando nos haplótipos a sua função com relação à regulação imune (DAUSSET, 1981b, KLEIN, 1987). Determinados fatores como a penetrância incompleta e a heterogeneidade genética das doenças dificultam uma melhor compreensão nestes estudos. Seguramente, os avanços técnicos relacionados à análise sorológica, aos anticorpos monoclonais e à biologia molecular muito contribuirão para um melhor entendimento na associação HLA e doenças (THOMSON, 1988).

2. Objetivos

2. Objetivos

As investigações no presente estudo foram realizadas com o objetivo de obter informações mais precisas sobre a relação e a expressão dos genes HLA associados na suscetibilidade genética da doença de Graves.

A presente pesquisa foi dirigida para os seguintes tópicos:

1. Estudar a frequência gênica e antigênica dos antígenos de histocompatibilidade das séries alélicas HLA-A, B, C e DR em linfócitos de indivíduos normais e linfócitos de indivíduos portadores da doença de Graves, a fim de verificar a existência ou não da associação de um ou mais antígenos ou haplótipos do sistema HLA com a doença;
2. Analisar e avaliar o possível significado da reatividade linfocitotóxica específica para antígenos HLA de classe II - HLA-DR, presente em pacientes com doença de Graves e ausente no soro de indivíduos normais;
3. Pesquisar possíveis fatores ambientais desencadeantes da doença de Graves.

3. Metodologia

3. Metodologia

3.1. Casuística

3.1.1. Seleção dos Pacientes com Doença de Graves

1. O grupo de pacientes foi constituído de 40 indivíduos com doença de Graves, dos quais 33 do sexo feminino e sete do sexo masculino. Foram coletadas e analisadas amostras de sangue e de soro de 40 pacientes não tratados entre março de 1985 e dezembro de 1986. O sangue foi colhido da veia periférica, de forma a permitir coleta de soro e plasma. Em relação à faixa etária, os pacientes eram adultos, sendo 30 com idade entre 18 e 45 anos e 10 com a idade de 45 a 60 anos.

2. Esses pacientes foram acompanhados no ambulatório de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Selecionaram-se pacientes com hipertireoidismo na fase ativa, confirmado clínica e laboratorialmente, pela presença de bócio difuso tóxico e hipercaptante à cintilografia.

Os indivíduos selecionados não haviam recebido nenhum tipo de medicação específica para a doença de Graves, até o momento da coleta das amostras.

3.1.2. Seleção de Indivíduos Caucasóides Miscigenados como Grupo Controle

O grupo controle foi constituído de 157 indivíduos clinicamente sadios, não aparentados, da cidade de Campinas, os quais foram pareados por critérios de sexo, idade e raça. A grande maioria (92%) dos entrevistados narrou a presença de elementos da raça branca, ou negra ou índia na composição familiar. Pela predominância de caracteres fenotípicos entre o branco e o mulato claro os indivíduos foram denominados de Caucasóide Miscigenado ou Sul Americana.

No momento da colheita do material foram explicados a cada indivíduo os objetivos do trabalho, ou seja, a determinação dos antígenos HLA-A,B,C e DR para a constituição de um painel HLA de referência com a finalidade de aplicação em testes e pesquisas em histocompatibilidade. Uma vez obtida a permissão, foi colocada a necessidade de futuras doações de sangue para a continuidade a viabilização do painel de células e banco de soros local.

As tipagens para os antígenos HLA-A, B, C e DR foram determinadas em indivíduos do 28º Batalhão de Infantaria Blindada (28º BIB) Campinas-SP; mulheres gestantes múltiplas registradas no Departamento de Tocoginecologia da FCM-UNICAMP, dos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica - FCM-UNICAMP e demais funcionários de diferentes setores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

3.1.3. Seleção de Soro de Pacientes Absorvidos com Anticoxsackie B

Dos 40 soros de pacientes com doença de Graves, foram selecionadas amostras de soro para serem absorvidos com anticoxsackie B humano. As vinte amostras foram escolhidas a partir do maior número de positividade nas reações (TABELA 9) frente ao painel de células B e positivas para o antígeno HLA-DR3.

3.1.4. Seleção de Soro de Pacientes Absorvidos com Yersinia Enterocolítica (0:3)

Dentre as 40 amostras de soro de pacientes com doença de Graves, foram selecionadas os mesmos soros acima descritos para absorção com a bactéria yersinia enterocolítica.

As vinte amostras restantes e com menor número de reatividade para o total das reações (TABELA 9) foram excluídas dos testes de absorção.

3.2. Material de Laboratório

AET (Hidrobrometo - 2 - amino - etil - isotil

- urânio cristalino - Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Meio grama de AET foi diluída em 12,5 ml de água destilada. Para uso imediato, o pH foi acertado para 9,0 adicionando-se NAOH 5M (Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro - Brasil). A solução foi imediatamente utilizada).

Azul Tripan - Cem mg de azul tripan (Matheson, Coleman & Bell, Norwood, Ohio, USA) foram diluídos em 10 ml de água destilada e conservados a 4°C. Antes do uso a solução foi diluída a 1:4 em HBSS.

DMSO - dimetilsufóxido (Sigma Chemical Company, St. Louis - USA).

Eritrócitos de Carneiro (E) - Obtidos de animais do Departamento de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia - UNICAMP, e conservados a 4°C em solução de Alsever estéril, até o momento do uso.

Filtro Millipore 4-7 mm GSW (0,22 μ); Millipore Co. Bedford, Massachussets, USA.

Heparina (liquemine = 5000 UI/ml, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S.A. - Rio de Janeiro, Brasil).

Meio TC-199 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), diluído em água bidestilada e desionizada, acrescentaram-se 0,35 g/l de bicarbonato de sódio a 7g% (U.T. Baker, Richardson, Merrel - Moura Brasil - São Paulo) e o pH foi acertado para 7,0. O meio foi filtrado em filtro de Millipore e conservado a -20°C.

Microplacas de Microcitotoxicidade (Falcon Plastics - Division of B.D. Laboratories Inc. Los Angeles USA); microplacas subdivididas em 60 escavações, às quais foram adicionados previamente anti-soros HLA.

"Pailletes" - capilares de plástico com 13 cm de comprimento por 0,3 cm de diâmetro (volume 0,5 ml) (Instruments de Médecine Vétérinaire, L'Aingle, França).

Pó Polimerizável - Colocado em contato com a água resulta álcool polivilínico - (Instruments de Médecine Vétérinaire, L'Aingle, França).

Solução de ACD - Preparada de acordo com a fórmula abaixo e esterilizada por filtração em membrana de Millipore (47 mm GSWP - 9,22 - Millipore - Co. Bedford, USA).

Solução: 8g de ácido cítrico
22g de citrato trissódico
24,5g de destrose
água destilada 1000 ml

Os reagentes foram diluídos para um volume final de 1000 ml de água destilada. A solução foi conservada a temperatura ambiente.

Solução de Alsever - Preparada de acordo com a fórmula abaixo e esterilizada por membrana de Millipore (47 mm GSWP 0,22 - Millipore Co. Bedford, USA).

Solução: 24,6g de glicose
9,6g de citrato de sódio
50,4g de cloreto de sódio
água destilada 1200 ml

Os reagentes foram diluídos para um volume fi-

nal de 1200 ml de água destilada e o pH acertado para 6,1 com ácido acético. A solução final foi filtrada em Millipote e armazenada esterilmente a 4°C.

Solução Gradiente de Ficoll-Hypaque - a 354 ml de solução a 9% de Ficoll (Ficoll 400 - Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Suécia) foram misturados 100 ml de Hypaque a 50% (Hypaque - Winthrop Products Inc. New York, USA) e 47,5 ml de água destilada. A densidade específica foi ajustada para 1.076 e a solução foi armazenada de forma estéril e conservada a 4°C protegida da luz.

Solução Fisiológica (Solução Salina) - Cloreto de sódio a 0,85g% com água destilada (Laboratório Merck S/A, Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil).

Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS - Difco Laboratories, Detroit, USA). O pH foi ajustado com bicarbonato de sódio a 7g% para 7.2. A solução foi armazenada de modo estéril a -20°C.

Soro de Coelho como Fonte de Complemento (C) - Sangue de 500 coelhos Nova Zelândia, adultos e aparentemente sãos, foi colhido e incubado por 30 minutos a 37°C e por 2 horas a 4°C. O soro foi separado em centrífuga refrigerada e guardado em alíquotas a -70°C.

Solução de Sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ - Merck S/A - Indústrias Químicas - Rio de Janeiro - Brasil). Cinquenta g de sulfato de amônio foram adicionados em 100 ml de água destilada, com agitação constante a 25°C, em concentração final de 50% de solução. O pH foi acertado para 7.8 com hidróxido de sódio (J.T. Baker, Richardson Merrel - Mou

ra Brasil S/A - São Paulo). A solução foi conservada a 25°C sendo adicionado antes do uso, na proporção de 1:2 soro humano.

3.3. Métodos Laboratoriais

3.3.1. Obtenção do Soro Humano AB Absorvido com Hemácias de Carneiro (SAB-E)

Uma mistura ("pool") de soro humano de vários indivíduos do sexo masculino e do grupo sanguíneo AB, que nunca receberam transfusões foi previamente inativado a 56°C por uma hora, misturado volume a volume com papa de eritrócitos de carneiro e incubado a temperatura ambiente por duas horas. O material foi centrifugado e incubado novamente com eritrócitos de carneiro, volume a volume, por 48 horas a 4°C. Após nova centrifugação, o soro absorvido foi alíquotado e guardado a -20°C.

3.3.2. Obtenção das Amostras de Soro dos Pacientes e dos Controles Normais

O sangue periférico foi coletado em seringa descartável sem anticoagulante e transferido imediatamente ao

tubo de ensaio estéril. Após retração do coágulo, o soro foi centrifugado e 400 x g por 10 minutos, aliqotado e armazenado a -20°C.

Para os indivíduos adultos normais foi preparado uma mistura de soro ("pool").

3.3.3. Obtenção da Gama-globulina (IgG)

Foram tomadas amostras de soro de indivíduos acima descritos (3.3.2.), em um volume não inferior a 20 ml, colocado gota a gota sobre solução de sulfato de amônio saturado (pH 7.8). A mistura foi submetida a agitação constante e a temperatura de 22°C por três horas. A suspensão foi então centrifugada a 3.000 rpm por 30 minutos a 25°C. O precipitado formado foi ressuspenso em solução salina em volume de 21 ml. O método descrito acima foi repetido duas vezes. O precipitado final foi acertado para um volume de 7 ml (três vezes concentrado da amostra original do soro) em solução salina.

Para a remoção do sulfato de amônio e purificação da gama-globulina, o precipitado foi colocado em diálise contra tampão salina a 4°C em pH alcalino por quatro dias. A solução final foi centrifugada a 3.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Ao final a pureza da proteína foi verificada por imunoeletroforese. Após as amostras foram aliqotadas e armazenadas a -20°C (GARVEY et al., 1977).

3.3.4. Obtenção dos Anti-soros HLA

Na preparação das placas de microlinfocitotoxicidade (Falcon Plastics Division of B.D. Laboratories Inc. Los Angeles, USA) para a identificação dos antígenos de Classe I (HLA-A,B,C) e de Classe II (HLA-DR), foram utilizados anti-soros:

1. Obtidos comercialmente, na quantidade de duas baterias com cada um dos anti-soros representados em duplicata para cada especificidade (Behring, Behring-Werke AG, Marburg, W. Germany).

2. Fornecidos gentilmente a) (Dr. J. Dausset, Dra. V. Lepage; Dr. L. Degos - Institut de Recherches Sur les maladies du Sang, Hospital Saint Louis, Paris - France) b) (Dr. dos Santos, L.M. e Dr. Scheinberg, M.A. (Santa Casa de Misericórdia); c) Dr. Perseli, L.B. (Departamento de Imunologia e Microbiologia da Escola Paulista de Medicina - S.P.).

Nas placas foram adicionados, para cada especificidade, no mínimo três amostras de soros. As especificidades A1, B8 e DR3 foram representadas por seis anti-soros de procedências diferentes. Os anti-soros foram capazes de identificar onze especificidades do locus HLA-A (A1, A2, A3, A9, A10, A11, A23, A26, A28, A29, AW33), dezesseis especificidades do locus HLA-B (B5, B7, B8, B12, B13, B14, B15, B17, B21, B27, B35, B40, BW41, BW44, BW56, BW64), quatro especificidades para o locus HLA-C (CW2, CW3, CW4, CW7), seis especificidades para o locus HLA-DR (DR1, DR2, DR3, DR4,

DR5, DR7). A reatividade no grupo de anti-soros HLA foi avaliada nos anti-soros controle-positivo e controle-negativo, específicos para antígenos de Classe I e de Classe II, provenientes das fontes acima descritas.

3.3.5. Obtenção da Suspensão Celular

O sangue periférico foi coletado em seringa descartável com heparina (para cada 10 ml de sangue foi acrescentado 0,1 ml de heparina). Após, foi misturado volume a volume em solução fisiológica, centrifugado em gradiente de Ficoll-Hypaque a 200 x g por 30 minutos. A fração contendo os linfócitos foi retirada com pipeta Pasteur e em seguida lavada com HBSS duas vezes. O botão celular foi ressuspensão em HBSS, usado imediatamente ou congelado em nitrogênio líquido para uso posterior.

3.3.6. Obtenção dos Eritrócitos de Carneiro (E) Tratados Com AET (E-AET)

O sangue de carneiro foi colhido esterilmente com ACD (para cada 10 ml de sangue foram acrescentados 2,5 ml de ACD), os eritrócitos foram separados e lavados em solução fisiológica e tratados com AET (2-AET). Uma papa de 2 ml foi ressuspensa em 12,5 ml de solução de AET incubada

por quinze minutos a 37°C, com agitação de cinco em cinco minutos. Após a suspensão foi lavada três vezes em solução fisiológica e a papa resultante foi suspensa em meio TC-199, enriquecida com 20% de soro AB absorvido com E. A suspensão foi usada imediatamente ou guardada por não mais de oito dias a 4°C (PELLEGRINO et al., 1976).

3.3.7. Tipagem HLA por Reação de Microlinfocitotoxicidade

O teste para a pesquisa dos antígenos HLA foi realizado nas placas de microlinfocitotoxicidade, previamente preenchidas em cada escavação com 1 µl de cada um dos anti-soros HLA. Inicialmente, foi colocado em cada orifício 1 µl da suspensão celular. O teste foi efetuado para dois tipos de suspensão celular, específico para células T (tipagem HLA-ABC) e para células B (tipagem HLA-DR). Os linfócitos em uma concentração de 4×10^6 cél./ml foram colocados na quantidade de 1 µl em cada escavação das placas. As placas contendo os linfócitos T foram incubados por 30 minutos e aquelas com linfócitos B foram incubados por 60 minutos, ambas a temperatura ambiente (22°C). Após esta primeira incubação, foram adicionados 5 µl de soro de coelho, como fonte de complemento, a cada orifício. As placas foram incubadas por 60 minutos para os linfócitos T e por 90 minutos para os linfócitos B. Em seguida, foi retirado o excesso de complemento por inversão das placas e imediatamente adicionado a cada escavação 1 µl de azul tripan. Após 10 ou 15 minutos, realizou-se a leitura das reações em mi-

croscópio invertido com condensador de campo claro expressando-se em porcentagem de células mortas.

3.3.7.1. Obtenção da População Celular Enriquecida de Linfócitos B

A suspensão de linfócitos obtida inicialmente foi ajustada para uma concentração de 3×10^6 cél/1 ml em HBSS e enriquecida com 20% de soro humano normal absorvido com E (SAB-E). A esta suspensão celular foram acrescentados os eritrócitos de carneiro tratados com AET, (para cada 1 ml de suspensão celular foi adicionado 0,1 ml de (E-AET). A mistura obtida foi colocada sob Ficoll-Hypaque, delicadamente com pipeta Pasteur, deixando-se incubar por vinte minutos a 37°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 30 minutos e a 4°C. A nuvem formada foi retirada e lavada três vezes em HBSS e o botão celular foi reservado. Os linfócitos resultantes eram os não formadores de rosáceas com E comparado à população purificada de leucócitos B (PELLEGRINO et al., 1976).

3.3.7.2. Obtenção da População Celular Enriquecida de Linfócitos T

O botão celular obtido pelo procedimento descri

to acima (3.5.7.1.), estava formado por uma população de linfócitos que ficaram ligados ao E, contendo uma população purificada de linfócitos T. Em seguida, foram colocadas algumas gotas de água destilada para lisar os eritrócitos contaminantes, seguindo-se duas lavagens com HBSS (PELLEGRINO et al., 1976).

3.3.7.3. Verificação da Viabilidade Celular

Para cada dez microlitros de suspensão celular foram adicionados 10 microlitros de azul tripan (1:400). A viabilidade celular foi observada sob microscópio comum em câmara hemacitométrica, após dez minutos de sedimentação com o corante.

3.3.7.4. Preparação do Congelamento das Células

Em plasma autólogo diluído meio a meio com solução fisiológica foi acertada a concentração celular para 20×10^6 células/ml a 4°C. A esta suspensão foi misturado igual volume de solução de DMSO a 20% em HBSS e colocadas em capilares de plástico "pailletes" em um volume de 0,5 ml. Os capilares foram vedados com pó polimerizável diluído em água (álcool polivinílico). Os "pailletes" foram congelados através da queda gradual de temperatura e colocados

em caixas de isopor com orifícios em congelador a 70°C, por no mínimo 18 horas, após congelados em nitrogênio líquido e guardados para uso posterior (ROWE & COHEN, 1965).

3.3.7.5. Preparação do Descongelamento das Células

Os capilares foram retirados do nitrogênio líquido e colocados imediatamente em banho-maria, a 37°C por 30 segundos. Após, a suspensão celular foi depositada em pequenos tubos juntamente com 2 ml de soro AB ou de plasma autólogo. A suspensão foi centrifugada, as células foram lavadas uma vez com meio TC 199 e verificada a viabilidade celular; o material foi usado imediatamente.

3.3.8. Ensaio Linfocitotóxico por Reação de Microlinfocitotoxicidade

Cada escavação da placa foi preenchida com 1 µl das amostras de IgG dos pacientes: controle-positivo (soro humano anti-DR positivo) em um orifício, controle-negativo (soro humano anti-DR negativo) em outro orifício de cada placa; soro específico anti-HLA-DR3 em um orifício de cada placa. Um µl de suspensão de linfócitos B HLA-DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 e DR7 na concentração de 4×10^6 cel/ml foi adicionado a cada escavação das placas. Após período de in-

cubação de 60 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 5 μ l de soro de coelho como fonte de complemento. Seguiu-se um período de incubação de 90 minutos a temperatura ambiente (22°C). O excesso de complemento foi retirado por inversão da placa e imediatamente adicionado a cada escavação 1 μ l de azul tripan. Após 10 a 15 minutos, a leitura das reações foi realizada em microscópio invertido com condensador de campo claro e expresso em porcentagem de células mortas.

3.3.9. Ensaio Linfocitotóxico Modificado para Analisar o Efeito de Anticorpos Anticoxsackie B ou da Absorção com Yersínia Enterocolítica

Em placas de microcitotoxicidade, uma para antixsackie e outra para o sobrenadante após absorção com Yersínia enterocolítica foi inicialmente adicionado 1 μ l das amostras de IgG dos pacientes, em cada uma das escavações das placas. Posteriormente, adicionados 1 μ l de IgG obtida de "pool" de soro humano normal em uma escavação de cada placa como controle-negativo; 1 μ l de HBSS em outra escavação como controle negativo de 1 μ l de soro humano anti-DR - controle-positivo em uma escavação de cada placa. Foram imediatamente adicionados a cada uma das escavações já previamente preenchidas, 1 μ l de soro positivo para Cox-sackie B a uma placa ou 1 μ l de sobrenadante após absorção com Yersínia enterocolítica a outra placa. As placas foram

incubadas a temperatura ambiente por duas horas e procedeu-se o teste de microlinfocitotoxicidade. Às placas foi adicionado 1 μ l de suspensão de linfócitos B (DR3 positivo). Após período de incubação de 60 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 5 μ l de soro de coelho como fonte de complemento. Seguiu-se um período de incubação de 90 minutos a temperatura ambiente (22°C). O excesso de complemento foi retirado por inversão da placa e imediatamente adicionado a cada escavação 1 μ l de azul tripan. Após 10 ou 15 minutos, a leitura das reações foi realizada em microscópio invertido com condensador de campo claro e expresso em porcentagem de células mortas.

3.4. Métodos Estatísticos

Para a análise estatística dos dados foram empregados os seguintes métodos:

- Teste do χ^2 , quando pertinente com correção de Yates.
- Teste exato de Fischer.

Em ambos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

3.4.1. Análise Genética da População

Para a efetuação dos cálculos das freqüências antigênicas e gênicas, a população estudada foi considerada em equilíbrio de acordo com a lei de Hardy-Weinberg (REID, 1978).

Do número total de indivíduos usados como amostras da população, inicialmente foi estabelecida uma estimativa da freqüência antigênica para cada antígeno individualmente, e, posteriormente, da freqüência gênica. Essas freqüências foram calculadas a partir de fórmulas matemáticas, nas quais se levaram em consideração os indivíduos em que o antígeno estava presente ou ausente.

3.4.2. Cálculo da Freqüência Antigênica (LAM & DEGOS, 1979; SIEGEL, 1979)

No presente trabalho, estabelecida como exemplo a freqüência de antígeno A1, obtivemos:

$$F_{A1} = \frac{na}{n}$$

onde

F_{A1} = freqüência de antígeno A1

na = número de indivíduos com o antígeno presente

n = número total de indivíduos estudados

Então:

$$F_{A1} = \frac{56}{157} = 0,357 \text{ ou } 35,7\%$$

3.4.3. Cálculo da Frequência Gênica

Estabelecida a frequência antigênica, foi calculada a frequência gênica para o mesmo antígeno, onde:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - \frac{na}{n}}$$

$$FG_{A1} = 1 - \sqrt{1 - 0,357}$$

$$FG = 0,198 \text{ ou } 19,8\%$$

3.4.4. Desequilíbrio de Ligação (SVEJGAARD et al., 1974)

O desequilíbrio de ligação de um determinado gene foi calculado usando-se a fórmula

$$D = \frac{nd}{N} - \left(\frac{nc}{N} + \frac{nd}{N} \right) \left(\frac{nb}{N} + \frac{nd}{N} \right)$$

onde

D = Desequilíbrio de ligação

nd = número de indivíduos com o antígeno de um locus mais o antígeno de outro locus. Ex: A1 e B8.

nc = número de indivíduos com o antígeno de um locus B (ex B8) sem o antígeno de outro locus (ex A1).

nb = número de indivíduos com o antígeno do locus A (ex A1) sem o antígeno do locus B (ex B8).

O significado estatístico foi calculado pelo teste do χ^2 para os diferentes indivíduos testados.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Frequência dos Antígenos HLA e Frequência Gênica HLA em População Caucásioide Miscigenada Brasileira da Cidade de Campinas-SP

Na TABELA 1 está representado o resultado da análise da população estudada para os marcadores HLA-A, B, C e DR.

A descrição geral na primeira coluna representa as diferentes especificidades antigênicas para os genes HLA dos quatro "locus". As outras duas colunas mostram as estimativas das frequências antigênicas (valores expressos em percentagem) e das frequências gênicas (valores expressos em percentagem) para as especificidades HLA-A, B, C e DR.

Para identificar cada antígeno HLA, foram selecionados anti-soros de boa qualidade e comprovada eficácia, de maneira tal que o padrão de reatividade para as tipagens celulares identificasse, de uma maneira clara, o antígeno assinalado.

Os cálculos foram realizados para todos os antígenos, o que permitiu um exame acurado da distribuição dos antígenos e genes para cada alelo HLA. Foi, igualmente, analisada a população em termos de percentagem dos genes e antígenos "brancos", os quais incluem genes que não conseguiram ser definidos.

4.2. Comparação das Frequências dos Antígenos HLA-A em Indivíduos com Doença de Graves e Grupo Controle

Dentre o grupo total de indivíduos com doença de Graves, provenientes de população Caucasoíde Miscigenada brasileira e de mesma área geográfica dos indivíduos do grupo controle, também Caucasoíde Miscigenadas foram estabelecidas as estimativas das frequências antigênicas HLA-A, B, C e DR. Quando comparadas para as frequências dos antígenos HLA do grupo controle, revelaram, para determinadas especificidades, diferenças estatisticamente significantes. Os valores das percentagens antigênicas para o "locus" HLA-A mostram não existirem diferenças significativas nos dois grupos (TABELA 2). O alelo HLA-A28 apresentou um valor ligeiramente aumentado, quando analisadas as frequências antigênicas observadas no grupo de pacientes ($FA_{A28} = 17,5\%$) em relação ao grupo controle ($FA_{A28} = 10,8\%$), sugerindo uma associação positiva do antígeno com a doença. Entretanto, pelo cálculo estatístico ($\chi^2 = 0,041$ e $P = 0,80 < p < 0,90$) esta possibilidade foi eliminada. O aumento numérico na frequência, provavelmente representa diferenças na composição étnica do grupo de pacientes em relação ao grupo controle.

4.3. Comparação das Frequências dos Antígenos HLA-B em Indivíduos com Doença de Graves e Grupo Controle

Entre o grupo de antígenos de "locus" HLA-B (TA

BELA 3) duas especificidades mostram um aumento nos valores relativos às suas freqüências antigênicas calculada pelo número de antígenos testados. O alelo HLA-B15 apresentou uma freqüência antigênica de $FA_{B15} = 15\%$ nos pacientes e $FA_{B15} = 0,6\%$ no grupo controle, com um $\chi^2 = 15,221$ e valor de $p < 0,001$. O alelo HLA-B21 apresentou um $FA_{B21} = 15\%$ nos pacientes e $FA_{B21} = 13\%$ no grupo controle, com um $\chi^2 = 12,094$ e valor de $p < 0,001$. As diferenças nas freqüências da população de pacientes e grupo controle mostraram pelos cálculos estatísticos valores significativos, definindo uma associação positiva dos antígenos HLA-B15 e HLA-B21 com a doença.

4.4. Comparação das Freqüências dos Antígenos HLA-C em Indivíduos com Doença de Graves e Grupo Controle

A flutuação dos antígenos HLA-C (TABELA 4) mostrou limites normais nas freqüências antigênicas estudadas. Os valores percentuais para cada especificidade nas duas populações, tanto de pacientes como de controles, mostraram valores altos. Entretanto, a freqüência dos antígenos nos pacientes não diferiu daquela observada nos controles. Igualmente, a freqüência dos "brancos" apresentou valores percentuais bastante elevados, refletindo provavelmente especificidade não definidas.

4.5. Comparação das Frequências dos Antígenos HLA-DR em Indivíduos com Doença de Graves e Grupo Controle

Os antígenos de células B da série alélica HLA-DR (TABELA 5) apresentaram os dados estatísticos mais significativos, com relação às frequências antigênicas observadas nos dois grupos. Um notável aumento foi constatado na especificidade HLA-DR3 cuja frequência nos pacientes foi de FA = 55% e no grupo controle foi FA = 14%, com um $\chi^2 = 21,555$ e $p > 0,001$. Em relação à especificidade HLA-DR1, foi constatada elevada diminuição na frequência dos pacientes (FA = 10%) e no grupo controle (FA = 35,7%), contribuindo com um $\chi^2 = 8,742$ e $p < 0,001$. A especificidade HLA-DR5, igualmente apresentou diminuição na frequência antigênica dos pacientes (FA = 0,0%) com relação ao grupo controle (FA = 28,7%) ($\chi^2 = 13,227$ e $p < 0,001$).

4.6. Associação de Haplótipos entre os Alelos HLA-A-B e DR Encontrados em Indivíduos Controles Normais e com Doença de Graves

Na TABELA 6 está relacionado o desequilíbrio de ligação positiva observado para HLA-A-B e DR, estabelecido a partir da estimativa das frequências antigênicas e frequências gênicas definidas a partir das tipagens para os 157 indivíduos do grupo controle e 40 pacientes (TABELA 10). Os resultados obtidos permitiram esta-

belecer um desequilíbrio de ligação e associação haplotípica positiva, com valores estatisticamente significativos de 0,64% de associação nos controles e 12,58% de associação nos pacientes com χ^2 de 11,441 e $p < 0,01$, apenas para o haplótipo A1 B8 DR3. As demais associações investigadas A1 B8 e B8 DR3 não revelaram valores considerados estatisticamente significantes. Igualmente as associações entre os alelos B15 DR3 e B21 DR3 nos doentes (TABELA 8) não mostravam significância estatística.

4.7. Detecção da Atividade Citotóxica para Células DR3 Positivas em Amostras de Soro de Pacientes com Doença de Graves

Em 40 amostras de IgG obtidas de soro de pacientes com doença de Graves coletadas entre março de 1985 e dezembro de 1986, analisadas pelo método de microlinfocitotoxicidade frente a painel de células positivas e negativas para o antígeno HLA-DR3 (TABELA), 12 amostras apresentaram-se reativas com todas as células (9/9). Duas amostras foram positivas em oito reações (8/9); 6 amostras revelaram positividade em sete testes (7/9); duas amostras mostraram-se positivas em 6 reações (6/9); 5 amostras foram positivas em 4 testes (4/9); 5 amostras revelaram positividade em 3 reações (3/9); e uma amostra foi positiva em 2 reações (2/9). Quando analisadas para o painel de células DR3 negativas as amostras de IgG não apresentaram reatividade significativa.

A prevalência de anticorpos citotóxicos no grupo total de pacientes analisados foi de 100% (FIGURA 1). O soro anti-DR (controle positivo) mostrou marcada percentagem de reatividade (100% de lise celular) quando comparado com os controles negativos: soro humano negativo para DR soro humano normal e HBSS (11% de lise celular).

4.8. Detecção da Atividade Citotóxica para Células DR3 Positivas em Amostras de Soro de Pacientes Com Doença de Graves Antes e Após Absorção com Anticoxsackie B ou Yersínia Enterocolítica, Utilizando o Teste Linfocitotóxico Modificado

Dentre as 20 amostras de IgG obtidas de pacientes com doença de Graves e selecionadas para a absorção tanto para anticorpo anticoxsackie B como para a bactéria Yersínia enterocolítica, somente a absorção com o anticoxsackie B apresentou uma capacidade de inibição de reatividade citotóxica dos soros frente a linfócitos B-DR3 positivas.

Para a investigação nos soros, as placas de microlinfocitotoxicidade foram inicialmente revestidas com as amostras de soros de pacientes com doença de Graves e posteriormente incubadas com: soros anticoxsackie B; com o sobrenadante dos soros de pacientes de Graves absorvidos com Yersínia enterocolítica; com um soro controle positivo para célula B; soro negativo para célula B; "pool" de soro de indivíduos normais.

Como pode ser observado na FIGURA 2, quando a especificidade das reações foi investigada, a amostra representativa de soro humano anti-DR3 positivo apresentou uma percentagem de 100% de reatividade frente às células testadas. A outra amostra reativa, representada pelos soros dos pacientes com doença de Graves, mostrou igualmente uma percentagem de reatividade de 100%. A pré-incubação em placas de citotoxicidade de soro de pacientes com soro positivo para o Coxsackie B com sobrenadante de absorção com *Yersinia enterocolítica* reduziu a percentagem de reatividade para 11% similar aquela apresentada pelos controles. Entretanto, a absorção de tais soros com *Yersinia enterocolítica* não mostrou nenhum efeito sobre a reatividade citotóxica frente a células B HLA-DR3 positivas.

TABELA 1: FREQUÊNCIA DOS ANTÍGENOS HLA E FREQUÊNCIA GÊNICA HLA EM POPULAÇÃO CAUCASÓIDE MISCIGENADA BRASILEIRA DA CIDADE DE CAMPINAS (SP)
HLA-A (N=157), -B(N=157), -C(N=157), -DR (N=157)

Antígeno	Frequência do Antígeno (%)	Frequência do Gene (%)
A1	33,1	18,2
A2	52,2	30,8
A3	13,9	8,3
A9	30,5	16,6
A10	7,6	3,9
A11	8,9	4,6
A23	1,3	0,6
A26	2,5	1,3
A28	10,8	5,5
A29	6,3	3,9
AW33	2,5	1,3
Branços	24,2	12,9
B5	25,5	13,6
B7	17,8	9,3
B8	14,6	7,6
B12	19,7	10,4
B13	7,7	3,9
B14	11,5	5,9
B15	0,6	0,3
B17	4,5	2,3
B21	1,2	0,6
B27	9,5	4,8
B35	8,0	4,1
B40	8,3	4,2
B41	1,2	0,6
B44	1,9	0,9
BW56	0,6	0,3
BW64	0,6	0,3
Branços	42,0	23,8
CW2	7,1	3,6
CW3	12,8	6,6
CW4	33,2	18,3
CW7	1,3	0,7
Branços	36,9	20,6
DR1	35,7	19,8
DR2	39,5	22,2
DR3	14,0	7,3
DR4	31,3	17,1
DR5	28,7	15,6
DR7	18,5	9,8
Branços	27,6	14,9

**TABELA 2: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ANTÍGENOS HLA-A EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE GRAVES
E GRUPO CONTROLE**

Antígeno	Pacientes*		Controles***		χ ² **	P
	N	%	N	%		
A1	14	35,0*	52	33,1	0,001	0,90 < p < 0,99
A2	16	40,0	83	52,2	1,628	0,10 < p < 0,20
A3	7	17,5	25	15,9	0,000	p > 0,99
A9	10	25,0	48	30,5	0,246	0,50 < p < 0,60
A10	2	5,0	12	7,6	0,056	0,80 < p < 0,90
A11	2	5,0	14	8,7	0,236	0,60 < p < 0,70
A23	0,0	0,0	2	1,3	0,028	0,80 < p < 0,90
A26	1	2,5	4	2,5	0,298	0,50 < p < 0,60
A28	7	17,5*	23	10,8	0,041	0,80 < p < 0,90
A29	2	5,0	10	6,3	0,002	0,90 < p < 0,99
AW33	0,0	0,0	4	2,5	0,154	0,60 < p < 0,70

* Gl = 1

** Total de pacientes = 40

*** Total de indivíduos controles = 157

TABELA 3: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ANTÍGENOS HLA-B EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE GRAVES E GRUPO CONTROLE

Antígeno	Pacientes**		Controles***		X ² *	P
	N	%	N	%		
B5	7	17,5	40	25,5	0,721	0,3 < p < 0,40
B7	5	12,5	28	17,8	0,324	0,50 < p < 0,60
B8	8	20,0	23	14,6	0,344	0,50 < p < 0,50
B12	5	12,5	31	19,7	0,688	0,40 < p < 0,50
B13	3	7,5	12	7,7	0,056	0,80 < p < 0,90
B14	1	2,5	18	11,5	2,001	0,10 < p < 0,20
B15*	6	15,0	1	0,6	15,227	p < 0,001
B17	2	5,0	7	4,5	0,071	0,70 < p < 0,85
B21*	6	15,0	2	1,3	12,094	p < 0,001
B27	3	7,5	15	9,5	0,009	0,9 < p < 0,92
B35	8	20,0	44	28,0	0,684	0,40 < p < 0,50
B40	3	7,5	13	8,3	0,027	0,80 < p < 0,90
B41	1	2,5	3	1,9	0,154	0,60 < p < 0,70
B44	2	5,0	3	1,9	0,298	0,50 < p < 0,60
B56	1	2,5	1	0,6	0,028	0,80 < p < 0,40
BW64	0,0	0,0	1	0,6	0,548	0,40 < p < 0,50

* GL = 1

** Total de pacientes = 40

*** Total de indivíduos controle = 157

**TABELA 4: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ANTÍGENOS HLA-C EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE GRAVES
E GRUPO CONTROLE**

Antígeno	Pacientes**		Controles***		χ^2 *	p
	N	%	N	%		
CW2	3	7,5	11	7,1	0,056	0,8 < p < 0,9
CW3	5	12,5	20	12,7	0,051	0,8 < p < 0,9
CW4	14	35,0	52	33,1	0,001	0,9 < p < 0,99

* GL = 1

** Total dos pacientes = 40

*** Total dos controles = 157

TABELA 5: COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ANTÍGENOS HLA-DR EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE GRAVES
E GRUPO CONTROLE

Antígeno	Pacientes**		Controles***		X ² *	P
	N	%	N	%		
DR1	4	10,0	56	35,7	8,742	p < 0,01
DR2	19	47,5	62	39,4	0,546	04 < p < 0
DR3	22	55,0	22	14,0	21,555	p < 0,001
DR4	11	27,5	49	31,2	0,069	07 < p < 0,8
DR5	0,0	0,0	45	28,7	13,277	p < 0,001
DR7	9	22,5	29	18,4	0,124	07 < p < 0,1

* GL = 1

** Total dos pacientes = 40

*** Total dos indivíduos controles = 157

TABELA 6: ASSOCIAÇÃO DE HAPLÓTIPOS ENTRE OS ALELOS DOS "LOCI" HLA-A, -B e -DR EM INDIVÍDUOS CONTROLES NORMAIS E COM DOENÇA DE GRAVES

HLA	Controles	Doentes	χ^2	P
A1 B8	7,01%	7,5%*	0,056	0,8 < p < 0,9
B8 DR3	4,46%	12,9%**	2,335	0,1 < p < 0,2
A1 B8 DR3	0,64%	12,5%***	11,441	p < 0,001

Fischer * p = 0,88

** p = 0,09

*** p = $1,5 \times 10^{-3}$

TABELA 7: TESTE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE B15 e DR3

HLA	HLA	DR3+	DR3-	Total
	B15+	3	3	6
	B15-	19	15	34
		22	18	40

$\chi^2 = 0,032$ $0,8 < p < 0,9$

Fischer $p = 0,8274$

TABELA 8: TESTE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE B21 e DR3

HLA	HLA	DR3+	DR3-	Total
	B21+	5	1	6
	B21-	17	17	34
		22	18	40

$\chi^2 = 1,41$ $0,2 < p < 0,3$

Fischer $p = 0,1629$

TABELA 9: ATIVIDADE CITOTÓXICA REVELADA COM SOROS DE PACIENTES COM DOENÇA DE GRAVES, FRENTE A UM PAINEL DE CÉLULAS B HLA-DR3 POSITIVAS

Soro de Pacientes	Células Alvo									
	DR3+					DR3-				
Soro 1	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Soro 2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Soro 3	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Soro 4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Soro 5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Soro 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 7	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Soro 8	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Soro 9	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Soro 10	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Soro 11	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Soro 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 13	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Soro 14	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Soro 15	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Soro 16	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Soro 17	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Soro 18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 19	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Soro 20	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
SH - Anti-DR(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SH - Anti-DR(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SHN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HBSS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	9	9	11	8	9	15	15	9	11	

SH - anti DR(-) - controle negativo para antígeno HLA-DR

SH - anti DR(+) - controle positivo para antígeno HLA-DR

SHN - soro humano normal

HBSS - solução salina balanceada de Hanks

DR3+ - células positivas para o antígeno DR3

DR- - células positivas para HLA-DR1 ou HLA-DR2 ou HLA-DR4, ou HLA-DR5 ou HLA-DR7.

Tabela 9: continuação

Soro de Pacientes	Células Alvo									
	DR3+					DR3-				
Soro 21	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Soro 22	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
Soro 23	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 24	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Soro 25	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Soro 26	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Soro 27	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Soro 28	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Soro 29	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 31	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 32	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Soro 33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Soro 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

SH - anti-DR (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SH - anti-DR (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SHN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HBSS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Total	13	14	16	15	19	18	19	18	19	

SH - anti-DR (-) - controle negativo para antígeno HLA-DR

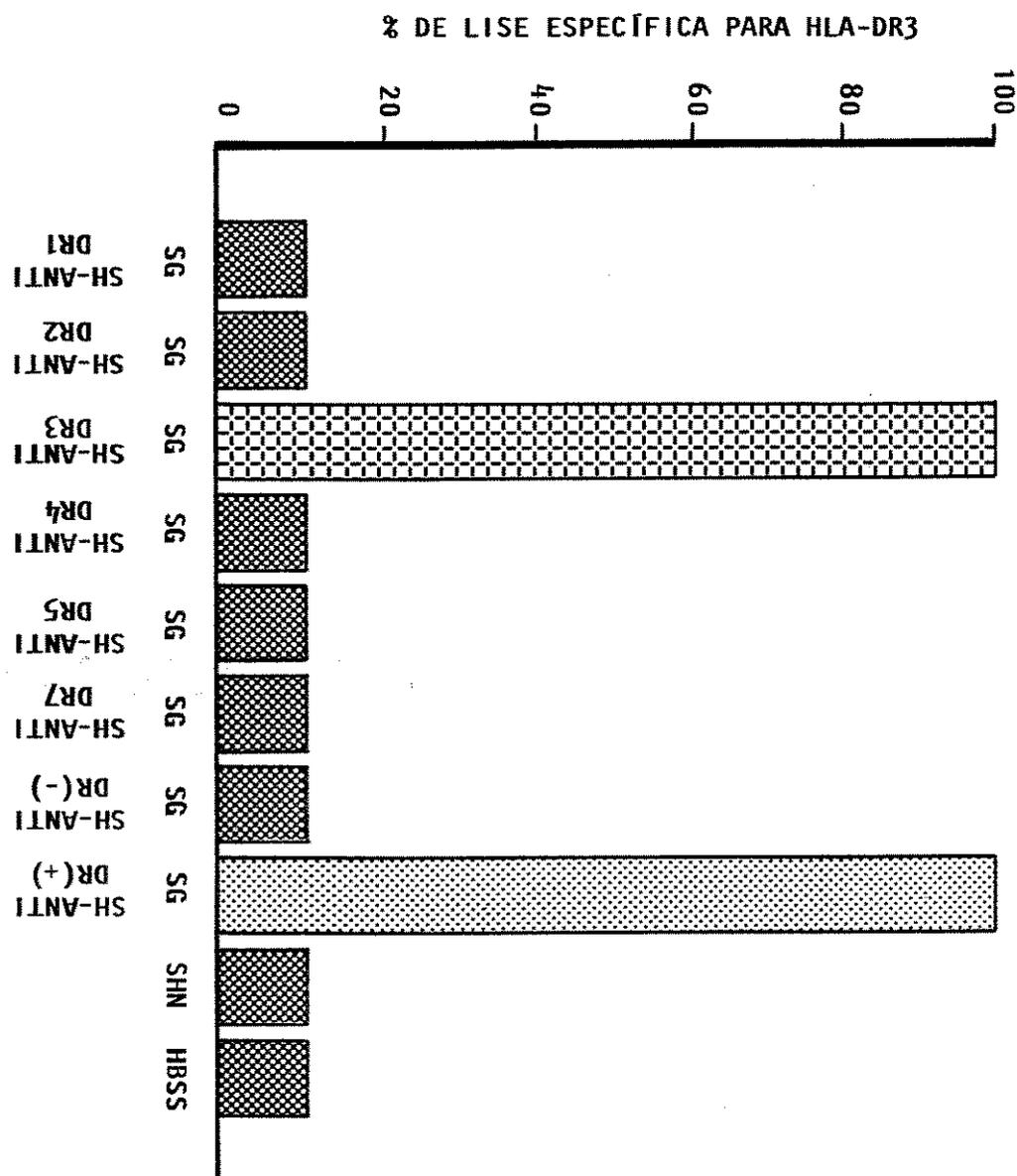
SH - anti-DR (+) - controle positivo para antígeno HLA-DR

SHN - soro humano normal

HBSS - solução salina balanceada de Hanks.

Pacientes nº	Fenótipo HLA			
1	A9,A-;	B12,B13;	C-C-;	DR4,DR2;
2	A1,A-;	B8,B35;	CW4,C-;	DR1,DR4;
3	A1,A26	B8,B-;	C-C-;	DR4,DR-;
4	A28,A-;	B35,B15;	CW3,CW4;	DR1,DR-;
5	A3,A-;	B5,B-;	CW3,C-;	DR2,DR3;
6	A2,A-;	B-B7;	CW3,C-;	DR2,DR3;
7	A9,A-;	B35,B12;	CW4,C-;	DR3,DR7;
8	A1,A11;	B35,B8;	CW4,C-;	DR3,DR7;
9	A1,A2;	B5,B8;	C-C-;	DR3,DR4;
10	A2,A-;	B5,B40;	C-C-;	DR2,DR3;
11	A28,A-;	B35,B-;	CW2,CW4;	DR3,DR4;
12	A9,A-;	B15,B21;	CW4,C-;	DR3,DR7;
13	A9,A28;	B40,B-;	C-C-;	DR2,DR7;
14	A9,A-;	B35,B-;	CW3,CW4;	DR7,DR-;
15	A2,A3;	B5,B21;	C-C-;	DR3,DR4;
16	A2,A10;	B-,B-7;	C-C-;	DR2,DR-;
17	A1,A3;	B27,B35;	CW4,C-;	DR7,DR2;
18	A3,A9;	B18,B-;	CW2,C-;	DR3,DR-;
19	A1,A9;	B5,B18;	CW3,C-;	DR3,DR-;
20	A1,A3;	B7,B-;	C-C-;	DR2,DR7;
21	A2,A-;	B21,B35;	CW4,C-;	DR-,DR-;
22	A2,A-;	B13,B15;	CW4,C-;	DR1,DR-;
23	A2,A-;	B5,B7;	CW2,C-;	DR2,DR-;
24	A1,A-;	B8,B15;	C-C-;	DR3,DR4;
25	A1,A2;	B8,B17;	C-C-;	DR3,DR2;
26	A11,A-;	B5,B12;	CW7,C-;	DR2,DR7;
27	A9,A28;	B41,B-;	CW4,C-;	DR2,DR-;
28	A9,A28;	B8,B-;	CW3,C-;	DR2,DR4;
29	A2,A-;	B21,B56;	CW4,C-;	DR2,DR4;
30	A1,A28;	B12,B27;	C-C-;	DR2,DR-;
31	A1,A3;	B12,B40;	CW4,C-;	DR7,DR4;
32	A1,A10;	B27,B-;	CW3,CW4;	DR1,DR3;
33	A1,A28;	B21,B-;	C-C-;	DR2,DR3;
34	A2,A29;	B-,B18;	C-C-;	DR2,DR3;
35	A2,A-;	B8,B21;	C-C-;	DR2,DR3;
36	A2,A3;	B15,B27;	C-C-;	DR3,DR4;
37	A2,A29;	B17,B-;	C-C-;	DR3,DR-;
38	A2,A-;	B15,B44;	C-C-;	DR2,DR3;
39	A1,A9;	B7,B13;	C-C-;	DR3,DR-;
40	A2,A-;	B44,B14;	C-C-;	DR-,DR3.

FIGURA 1: DETECÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA PARA CÉLULAS B DR3 POSITIVAS EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE GRAVES, UTILIZANDO-SE O TESTE DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE



SG - amostra de IgG concentrada de pacientes com doença de Graves

SG-SH anti DR3(+) - soro controle positivo para HLA-DR3

SG-SH anti DR3(-) - soro controle negativo para HLA-DR3

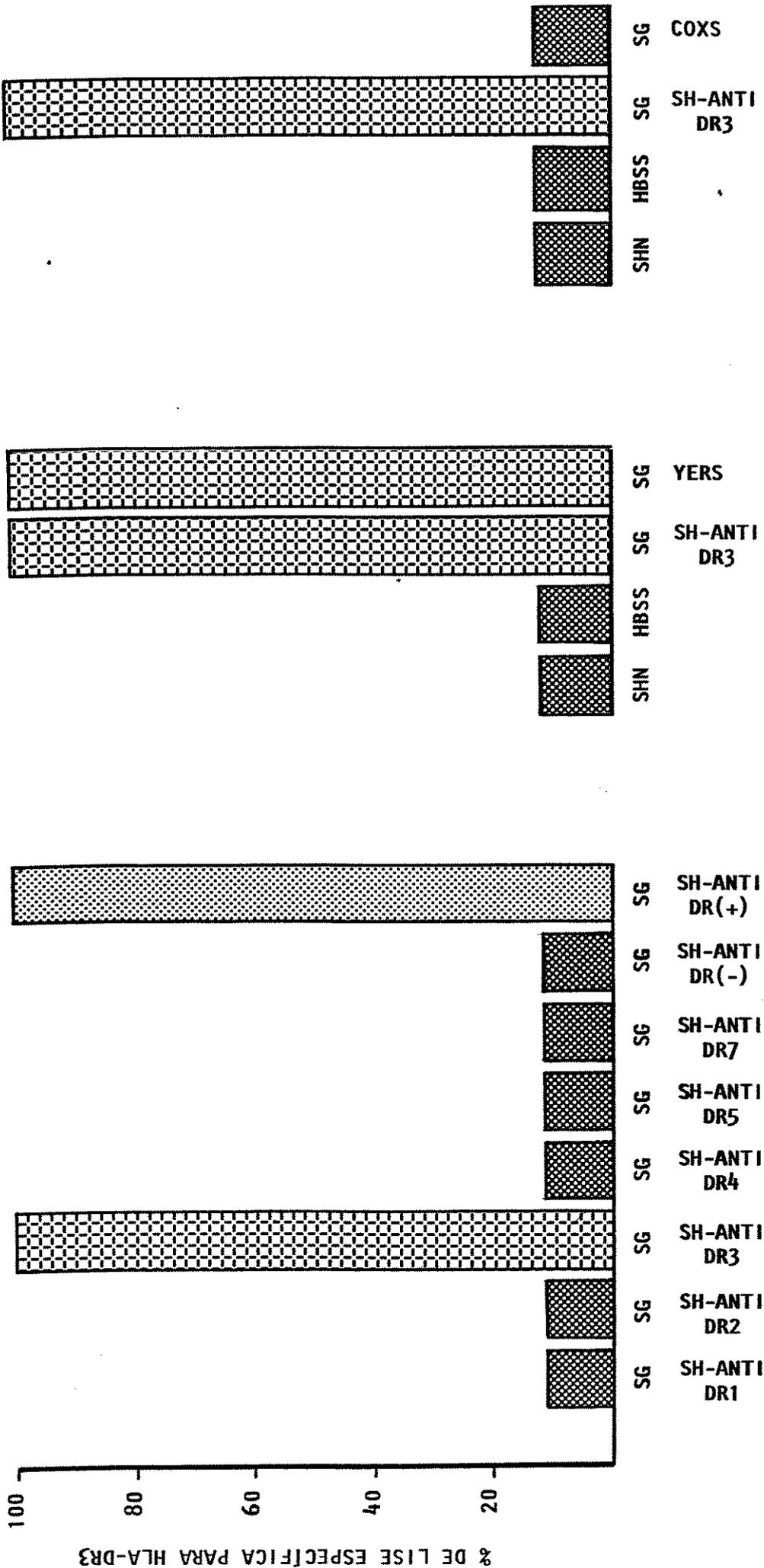
SHN - IgG obtida de "pool" de soro humano normal.

HBSS - solução salina balanceada de Hanks.

Barras em preto - representam o soro sem atividade citotóxica.

Barras horizontais - representam o soro com atividade citotóxica.

FIGURA 2: DETECÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA PARA CÉLULAS DR3 POSITIVAS EM AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE GRAVES, ANTES E APÓS ABSORÇÃO COM ANTICOXSACKIE B OU YERSÍNIA ENTEROCOLÍTICA, UTILIZANDO-SE O TESTE DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE



SG - amostra de IgG concentrada de pacientes com doença de Graves.
 SGCOXS - amostra de IgG concentrada de pacientes com doença de Graves, absorvida com antioxsackie B.
 SG-YERS - amostra de IgG concentrada de pacientes com doença de Graves absorvida com Yersinia-enterocolitica.

SG-SH anti-DR3(+) - soro controle positivo para HLA-DR3.
 SG-SH anti-DR3(-) - soro controle negativo para HLA-DR3.
 SHN - IgG obtida de "pool" de soro humano normal.
 HBSS - solução salina balanceada de Hanks.

Barras em preto - soro sem atividade citotóxica
 Barras na horizontal - soro antes da absorção

5. Discussão

5. Discussão

O presente trabalho procurou analisar as associações entre determinadas especificidades HLA dentro do polimorfismo do Sistema Principal de Histocompatibilidade e as manifestações de auto-imunidade próprias da doença de Graves.

Nos 157 indivíduos, que constituíram o grupo controle representativo de nossa população, foi possível evidenciar as freqüências antigênicas e gênicas. As tipagens celulares para os antígenos da Classe I e da Classe II bem como a análise das freqüências gênicas e antigênicas para cada alelo HLA obedeceram a critérios estabelecidos principalmente no 8º "Workshop" Internacional de Histocompatibilidade (TERASAKI et al., 1980; PARK et al., 1981) utilizando-se a técnica de microlinfocitotoxicidade para as tipagens HLA adequadamente definida em termos de sensibilidade e especificidade (LAMM & DEGOS, 1979).

Estudos em nível populacional tem demonstrado que as diferenças observadas nas freqüências dos alelos entre as diferentes raças ocorre por mecanismos de seleção (BODMER et al., 1973), por desvio genético (BODMER, 1973), ou mais provavelmente pela simples miscigenação (DEGOS, 1979; FIGUEROA et al., 1988). Os dados sobre a distribuição das porcentagens antigênicas e gênicas dos alelos HLA entre as raças devido a migrações de populações concordam com o que se pode deduzir dos nossos resultados. Esses dados levam em consideração as 92 especificidades para os "loci" HLA-A,

B, C e DR bem conhecidas no presente (BODMER et al., 1984). Dados semelhantes aos nossos foram relatados nos EUA em amplo estudo em população miscigenada descendente de caucasóides e negros (PICKBOURNE et al., 1977).

Segundo os autores, a miscigenação gênica e a mistura alélica parecem ter ocorrido por variabilidade resultante da seleção natural para o polimorfismo HLA.

As amostras populacionais observadas na grande maioria das comunidades européias apresentam variabilidade menor e os grupos humanos constituintes demonstram polimorfismo de menor dispersão do que o encontrado em nosso grupo étnico (BAUR & DANILOVS, 1980).

A grande maioria dos indivíduos por nós tipados, embora fenotipicamente caucasóides, apresentou na história familiar progenitores com caracteres de misturas raciais (branca, negra, índia). Tal miscigenação provavelmente explica a elevada proporção de especificidades gênicas não identificadas (24,2% para o "locus" A; 42% para o "locus" B; 36,9% para o "locus" C e 27,6% para o "locus" DR). A probabilidade desses genes "brancos" se encontrarem em homozigose parece ser pequena (DAUSSET, 1979b). Provavelmente são subtipos ("splits") ainda não identificados dentro da população que compõe a amostra analisada (BODMER et al., 1986).

Na análise da relação entre as frequências gênicas e antigênicas, do grupo controle de indivíduos não relacionados e do grupo de pacientes também não relacionados, os nossos resultados expressaram aumento significativo para

as frequências dos antígenos HLA-B15 (0,6% nos controles para 15% nos pacientes: $p < 0,001$), HLA-B21 (1,2% nos controles e 15% nos pacientes: $p < 0,001$), HLA-DR3 (14% nos controles e 55% nos pacientes: $p < 0,001$).

Na verdade existem poucos estudos realizados entre grupos de indivíduos sadios e grupos de doentes que tenham levado em consideração todas as variáveis que podem influenciar a distribuição das especificidades HLA (ROSENBAUM & McDEVITT, 1981; THOMSON, 1983; NEPOM, 1987; PAYAMI et al., 1987). Tais informações são, entretanto, de importância fundamental, tendo em vista as discordâncias encontradas na literatura (SVEJGAARD et al., 1974; TIWARI & TERASAKI, 1985). Na presente investigação, os resultados discordam parcialmente desses dados com relação às frequências principalmente da Classe I.

As associações de haplótipos entre os nossos dados e os que consideramos mais interessantes na literatura estão registradas na TABELA 7 e 8. Essa avaliação permitiu incluir o desequilíbrio de ligação entre o haplótipo A1, B8 e DR3; não foram encontrados valores significativos para outras associações.

A ligação do alelo HLA-DR3 com a patologia da doença de Graves está muito bem documentada em indivíduos caucasóides e em populações indianas e chinesas (ALLANIC et al., 1980). Em negros americanos a associação foi observada com o alelo DRW6 (SRIDAMA et al., 1987). BOSCH e colaboradores (1985) e ROLLINI e colaboradores (1985) estudando o polimorfismo da região HLA-D constataram, através de técni-

cas da biologia molecular, reações cruzadas entre o DRW6 e determinadas sub-regiões do DR3. Da mesma forma, GORSKI e MASCH (1986), utilizando sondas de oligonucleotídeos sintéticos, constataram ter sido o DR3 originado por mecanismo de conversão gênica a partir de um gene ancestral comum. As similaridades estruturais observadas nesses dois antígenos sugerem comprometimento direto do DR3 na suscetibilidade à doença (DAVIS, 1987).

É possível que as associações dos genes HLA de Classe I HLA-B15 e HLA-B21 sejam próprias da população estudada. Frequência aumentada do alelo HLA-B15 foi amplamente descrita em pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente (SVEJGAARD et al., 1980).

As flutuações circunstanciais das frequências dos marcadores HLA encontradas em pacientes de diferentes populações e em diferentes grupos étnicos, principalmente para os antígenos de Classe I, tem sido apontadas em vários trabalhos como sendo inteiramente secundárias, quando comparadas aos desequilíbrios observados para qualquer um dos "loci" da região HLA-D (THOMSON & BODMER, 1977; FARID et al., 1987). Contudo, os nossos achados em relação à região HLA-B não excluem a possibilidade de uma associação direta dos genes correspondentes aos antígenos HLA de Classe I com a doença de Graves. O papel biológico e antigenicidade destas moléculas tem mostrado envolvimento principalmente com os domínios da porção N-terminal da cadeia pesada (ORR, 1983; DUCEMAN et al., 1986; ULRICH & ATHASSI, 1989).

Estudos futuros de casos múltiplos em famílias serão necessários para comprovar a existência de desequilí-

brío real de ligação dos alelos entre as diferentes regiões do complexo MHC e a doença de Graves. Principalmente em relação à molécula HLA-DR3, a metodologia sorológica tem-se mostrado extremamente limitante com relação à definição dos subtipos que possivelmente estarão mais diretamente associados a essa doença. Tendo em vista o grande polimorfismo dos antígenos de Classe I, torna-se fundamental o mapeamento dos epítomos antigênicos funcionais por técnicas de maior poder de resolução que permitam definir sua correlação com as alterações imunológicas próprias da doença de Graves (TIWARI & TERASAKI, 1985; WEETMAN et al., 1988).

Em adição a "locus" de suscetibilidade ligado ao HLA, antígenos de Classe II tipo DR3 podem desempenhar papel direto na suscetibilidade a fatores ambientais, dando início à doença auto-imune (THOMSEN & MARKER, 1989). O vírus de Epstein-Bar tem sido indicado como possível agente patogênico na artrite reumatóide. Nesses doentes foram descritos defeitos celulares específicos do linfócito T restritos à ausência de supressão da proliferação linfocitária caracteristicamente induzida pelo vírus de Epstein-Bar (LEGRAND et al., 1984).

Em relação ao "diabetes mellitus" insulina-dependente, tanto fatores genéticos, como ambientais estão bem documentados. Certamente infecções virais podem contribuir para a sua patogênese (em especial Coxsackie B4 e B5), mas a evidência para predisposição de natureza genética é igualmente forte (GAMBLE, 1980). Vários genes parecem estar envolvidos, talvez com diferentes modos de herança e mesmo com efeitos aditivos como foi observado pela freqüência

mais alta dessa doença em heterozigotos DR3/DR4 (ROTTER et al., 1983; GROOP et al., 1988).

A dificuldade para a análise dessa natureza consiste em se obterem testes virológicos e imunológicos logo no início da lesão pancreática, quando o diabetes ainda não pode ser detectado.

A literatura tem descrito exemplos de doenças de origem auto-imune com características extremamente semelhantes às por nós encontradas, por exemplo o "diabetes mellitus" insulino-dependente associado a infecção confirmada por vírus Coxsackie B, a genes de alto risco, a fenômenos auto-ímmunes humorais e celulares (anticorpos anti-ilhota) e a efeito diabetogênico do vírus demonstrado em algumas raças de camundongos, também suscetíveis. Esse estudo documentou a importância da constituição genética para a suscetibilidade individual, pois a paciente tinha o antígeno HLA-DR3 que indica alto risco para esse tipo de diabetes. Não havia nesse caso desequilíbrio nas populações de linfócitos T, mas sim provavelmente anormalidade limitada a um clone linfocitário particular. Anticorpos anti-ilhota foram detectados em alto título precocemente no curso da doença, antes do seu início clínico. Há evidências na literatura de que esses anticorpos são produzidos secundariamente à alteração viral das membranas das células que constituem as ilhotas pancreáticas (YOON et al., 1979).

NAKAMURA et al. (1988), analisando em condições ótimas a ativação de células B humanas e usando vírus de Epstein-Bar em ensaios de diluição limitante, de forma a gerar linhagens secretoras de anticorpos monoclonais, concluí

ram que a alta freqüência de células circulantes produtoras de auto-anticorpos, principalmente da classe isotípico IgG, é característica em pacientes com doença auto-imune. Estudos de competição antigênica e dissociação demonstraram que esses auto-anticorpos diferem nitidamente dos detectados em indivíduos normais pelo fato de serem monoreagentes de alta afinidade, o que no conjunto indica resposta secundária dirigida a antígeno específico envolvendo anticorpos derivados de mutação somática. Nesse sentido, auto-anticorpos resultantes de ativação policlonal de linfócitos B muito mais provavelmente deveriam ter afinidade relativamente baixa, serem polivalentes e possuírem configuração das regiões V não derivadas de mutação, semelhante ao que ocorre em indivíduos normais por seleção com auto-antígeno.

Essas considerações se aplicam de forma pertinente às doenças auto-imunes restritas a um determinado órgão, como na doença de Graves por nós estudada ou no "diabetes mellitus" insulino-dependente. Nesses casos o auto-anticorpo, IgG com alta afinidade, desempenha papel importante na fisiopatologia e patogenia da doença (SALVI et al., 1988).

A auto-imunidade também pode ser devida à produção de anticorpos antiidiotipos que, por possuírem especificidade para os idiotipos de anticorpos a vírus, podem ligar-se aos mesmos constituintes celulares que o vírus (STROMINGER, 1986). Ainda pode resultar da chamada "molecular mimicry" na qual um anticorpo pode reconhecer tanto antígenos virais como antígenos do hospedeiro (HANSEN, 1986; MARK et al., 1987).

Certos anticorpos antiidiotipos, além de demonstrarem ligação específica às moléculas do anticorpo contendo idiotipo, podem também expressar algumas propriedades funcionais do antígeno inicial (FARID & LO, 1985; MOURITSEN, 1986). Para analisar a possível ação de anticorpos antiidiotipo, SEGE & PETERSON (1978) induziram anticorpos antiinsulina e, em seguida, prepararam anticorpos antiidiotipos (contra anticorpos purificados antiinsulina). Foi possível, usando tais anticorpos específicos anti-antiinsulina: 1. bloquear a ligação da insulina marcada com iodo isotópico dos receptores para insulina em adipócitos; 2. demonstrar ligação direta aos receptores para insulina dos anticorpos anti-antiinsulina marcados; 3. reduzir com seu uso os níveis glicêmicos de camundongos diabéticos.

Tais anticorpos anti-receptor podem ser demonstrados na doença de Basedow-Graves (SWITH & HALL, 1974). Um ponto importante passa a ser distinguir se os anticorpos anti-receptor são inicialmente induzidos diretamente contra o próprio receptor ou se via indução de anticorpos auto-antiidiotipo.

Nossos resultados sugerem a presença de uma reatividade linfocitotóxica possivelmente um anticorpo com especificidade para linfócito B em 100% dos doentes analisados. Essa observação é original e parece indicar a presença de anticorpos capazes de reconhecer possivelmente sítios particulares da cadeia β do antígeno DR, visto que a reatividade não é uniforme para todos os antígenos DR3 (TABELA e no caso não reconheceriam zona constante de sua estru-

tura, mas sim polimórfica. É reconhecidamente grande o polimorfismo das moléculas de Classe II (BONTROP et al., 1986; WESCOTT et al., 1987; BONTROP et al., 1988; KAPES & STROMINGER, 1988); CHAO et al., 1989). Alternativamente outros sítios antigênicos em linfócitos B, mas não em linfócito T, poderiam ser alvo à ação citotóxica. Essa atividade citotóxica não é removida por absorção com Yersinia enterocolitica que possui sítios de ligação saturável para TSH, comportando-se como os verdadeiros receptores para TSH na membrana plasmática de células tireoidianas (WEISS et al., 1983; HEYMA et al., 1986). Este fato sugere que a atividade citotóxica descrita neste trabalho não tem relação com as globulinas estimuladoras da tireóide, que no soro dos doentes reconhecidamente tem afinidade para os receptores para TSH (SUMAQ et al., 1989).

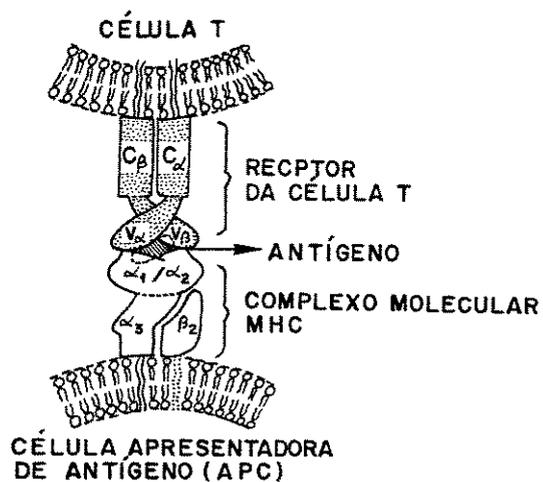
Entretanto, o efeito linfocitotóxico é significativamente reduzido por incubação com soros de pacientes com infecção viral contendo anticorpos antioxsackie B. Esta observação levanta a possibilidade desses anticorpos linfocitotóxicos serem na verdade anticorpos antiidiotipo com especificidade para o idiótipo de anticorpos antioxsackie B. Neste caso o receptor para o vírus poderia ser o próprio antígeno DR3.

Esta possibilidade é coerente com idéias e fatos registrados na literatura e que foram em parte apenas lembrados nesta discussão. O efeito mencionado por último, de redução da atividade linfocitotóxica, pode não estar restrito ao anticorpo anti-vírus Cocksackie B e envolver da mesma forma outros vírus. O assunto certamente merece análise

mais aprofundada nesse ponto e a atual observação pode ser tida como sugestiva. É possível que a metodologia utilizada para a demonstração dessa atividade linfocitotóxica, documentada de forma original neste trabalho, possa servir para explorar o papel funcional de moléculas HLA da Classe II, interagindo com agentes virais sempre presumidos nas interpretações patogênicas das doenças auto-imunes.

Evidentemente para que haja resposta imune frente a um antígeno, este deve gerar peptídeos capazes de ligar-se a moléculas CHP da Classe II, mas também o indivíduo deve possuir linfócitos T portando receptores capazes de reconhecer a combinação particular do peptídeo e o MHC (YAGUE et al., 1985; LEE et al., 1987). Isso implicará em que um antígeno causador de doença em um indivíduo pode não induzi-la em outro com CHP diferente (polimorfismo do CHP) (MEL LINS et al., 1988) ou com repertório de receptor de célula T diferente (polimorfismo do receptor de célula) (BERZOFKY et al., 1988). A expressão aberrante do CHP na superfície celular pode ser importante na apresentação de auto-antígenos em tecidos alvo (LAHAT et al., 1989).

No complexo trimolecular (molécula do receptor em célula T + antígeno + molécula do CHP) vários são portanto os pontos de variação no contexto do polimorfismo e que podem ter efeito na determinação da doença auto-imune (KUMAR et al., 1989).



COMPLEXO TRIMOLECULAR

Representação Diagramática 3: Complexo Trimolecular de Ativação da Célula T. Compreendendo o receptor molecular da célula T; o antígeno e a molécula MHC. As indicações V α , V β , C α e C β representam as regiões variáveis e constantes da cadeia α e β do receptor da célula T; α_1 , α_2 , α_3 e β_2 representa as três regiões da cadeia α e a β_2 microglobulina do complexo MHC Classe I e domínio β para MHC de Classe II.

6. Conclusões

6. Conclusões

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. As frequências gênicas e antigênicas para os alelos HLA de Classe I e de Classe II nos indivíduos saudáveis, que foram a nossa amostra da população de Campinas, mostraram pequena variabilidade numérica para todos os alelos dos loci ABC e DR em relação a outras populações semelhantes analisadas por outros autores, e que serviram de modelo comparativo, permitindo classificar a nossa população estudada para o Sistema de Histocompatibilidade Principal como Caucasoide Miscigenada.

2. A correlação entre as frequências dos alelos da população controle e da população de pacientes com doença de Graves mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p > 0,001$) para os antígenos de Classe I (HLA-B15 e HLA-B21) e de Classe II (HLA-DR3), para os pacientes, sugerindo uma associação entre os genes com frequência aumentada e a doença.

3. O soro dos pacientes apresentou, uma reatividade citotóxica para o linfócito B em 100% das amostras, sugerindo uma ação frente a epítomos da Classe II, talvez DR3. Tanto quanto sabemos, esta observação apresenta o primeiro registro na literatura de anticorpos linfocitotóxicos na doença de Graves.

4. Houve remoção desta reatividade dos soros

dos pacientes, quando os mesmos foram absorvidos com anticorpo antioxsackie humano tipo B. Este fato permite levantar a hipótese de o anticorpo linfocitotóxico ser antiidiotipo de anticorpo antioxsackie B.

5. A absorção dos soros com suspensão de *Yersinia enterocolitica* não foi capaz de eliminar a atividade citotóxica descrita, sugerindo que esta não tem especificidade para o sítio que se comporta nessas bactérias como receptor para TSH.

7. Resumo

7. Resumo

As associações entre determinantes polimórficos do CHP e doenças auto-imunes observadas em estudos de população podem ter explicação em nível de modificações anormais na resposta imune. Nessas doenças tornou-se de interesse fundamental entender os mecanismos pelas quais as moléculas HLA conferem a suscetibilidade individual. Com esse interesse no presente trabalho foram avaliados:

- Nos linfócitos T e B as tipagens para os antígenos HLA de Classe I e de Classe II de indivíduos controles normais e pacientes com doença de Graves a fim de estabelecer as frequências gênicas e antigênicas para os alelos ABC e DR. Pelo método de microlinfocitotoxicidade foram tipados 157 indivíduos sadios e que constituiriam a população controle e 40 indivíduos formadores da população de pacientes com doença de Graves.

- As amostras de soro de 40 pacientes com doença de Graves foram pesquisadas para reatividade linfocitotóxica para os linfócitos B. A reatividade foi avaliada por reação de microlinfocitotoxicidade.

- Dentre as 20 amostras de soro de pacientes com doença de Graves absorvidas com *Yersinia enterocolitica* ou antioxsackie humano tipo B, foi possível evidenciar uma inibição do efeito linfocitotóxico para o antioxsackie humano tipo B.

8. Bibliografia

8. Bibliografia

- 'ABDOU, N.J.; WALL, H.; LINDSLEY, H.B.; HALSEY, J.F.; SUSUKI, T. - Network theory in autoimmunity: in vitro suppression of serum anti-DNA antibody binding to DNA by anti-idiotypic antibody in systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 67: 1297-1304, 1981.
- ADA, G.L. & ROSE, N.L. - The Initiation and early development of autoimmune diseases. Clin. Immunol. Immunopathol. 41: 3-9, 1988.
- ADAMS, D.D. & KENNEDY, T.H. - Evidence to suggest that LATS protector stimulates the human thyroid gland. J. Clin. Endocrinol. Metab., 33: 47-51, 1971.
- ADAMS, D.D.; PURVES, H.D. - Abnormal responses in the assay of thyrotrophin. Proc. Univ. Otago Med. Sch., 34: 11-12, 1958.
- AGUAYO, J.; IITAKA, M.; ROW, V.V.; VOLPÉ, R. - Studies of HLA-DR expression on cultured human thyrocytes: effect of antithyroid drugs and other agents on interferon- γ -induced HLA-DR Expression. J. Clin. Endocrinol. Metab., 66: 903-908, 1988.
- AICHINGER, G.; FILL, H.; WICK, G. - In situ immune complexes lymphocyte sub populations and HLA-DR positive epithelial cells in Graves disease and Hashimoto thyroiditis. Lab. Invest., 52: 132-135, 1985.

- ALBERT, E.D.; BAUR, M.P. MAYR, W.R. - Histocompatibility Testing. 1984. Springer Verlag, 1984, 764p.
- ALLANIC, H.; FAUCHET, R.; LORCY, Y.; HEIM, J.; GUEGUEN, M.; LEGUERRIER, A.M.; GENETET, B. - HLA and Graves disease: an association with HLA-DRW3. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51: 863-867, 1980.
- ALLISON, J.; MEINTYRE, B.; BLOCH, D. - Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. J. Immunol., 129: 2293, 1982.
- AOKI, N.; PINNA-MANENI, K.M.; DE GROOT, L. - Studies of suppressor-cell function in thyroid diseases. J. Clin. Endocrinol. Metab., 48: 803-818, 1979.
- AMOS, D.B.; BODMER, W.F.; CEPPELLINI, R.; CONDLIFFE, P.G.; DAUSSET, J.; FACHEY, J.L.; GOODMAN, H.C.; KLEIN, J.; LILLY, F.; MANN, D.L.; McDEVITT, H.; NATHENSON, S.; PALM, J.; REISFELD, R.A.; ROGENTINE, G.N.; SANDENSON, A.R.; SHREFFLER, D.C.; SIMONSEN, M. and VAN ROOD, J.J. Biological significance of histocompatibility antigens. Fed. Proc., 31: 1087-1104, 1972.
- BABCOCK, S.K.; GEORGIN, H.; KOTZIN, B.; BELLGAU, D. - Cyclosporin-induced Autoimmunity: A Role for Marron-derived cells Presenting Self-Antigens in the Thymus. Transplant. Proc., 21: 220-221, 1989.
- BAKER, J.R.; LUKES, Y.G.; BURMAN, K.D. - Production, isolation and characterization of rabbit anti-idiotypic antibodies directed against human antithyrotrophin receptor antibodies. J. Clin. Invest., 488-495, 1984.

- BANDEIRA, A.; LARSSON, E.L.; FORNI, L.; PEREIRA, P.; COUTI
NHO, A. - In vivo activated splenic T cells, refractory
to interleukin - 2 growth in vitro. Eur. J. Immunol.,
17: 901-908, 1987.
- BARNSTABLE, C.J.; BODMER, W.F.; BROWN, G. - Production of
monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and
other human cell surface antigens - new tools for gene-
tic analysis. Cell., 14: 9-20, 1978.
- BATCHELOR, R.J. & McMICHAEL, J.A. - Progress in understand-
ing HLA and disease associations. Br. Med. Bull., 43:
157-183, 1987.
- BAUER, J. - Allgemeine Atiologie. In: VON ASCHOFF, L. (ed.)
Pathologische Anatomie. Von Gustav Fischer, publischer,
Jen, 1928, 59, 301p.
- BAUR, M.P. & DANILOVS, J.A. - Population analysis of HLA-
-A, B, C, DR and other genetic markers. In: TERASAKI,
P.I. (ed.), Histocompatibility testing 1980, Ucla Tis-
sue Typing Laboratories, Los Angeles, 1980, pp. 955-
-2110.
- BEISEL, K.W.; DAVID, C.S.; GIRALDO, A.A.; KONG, Y.C.M.;
ROSE, N.R. - Regulation of experimental autoimmune thy-
roiditis: mapping of susceptibility to the I-A sub-
-region of the mouse H-2: Immunogenetics, 15: 427-
-430, 1982.

- BELL, J.I.; DENNEY, D. Jr.; FOSTER, L.; BELT, T.; TODD, J. A.; McDEVITT, H.O. - Allelic variation in the DR sub-region of the human major histocompatibility complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 3934-3938, 1987.
- BENACERRAF, B. - Role of MHC gene products in immune regulation. Science. 212: 1229, 1981.
- BENACERRAF, B.; McDEVITT, H.O. - Histocompatibility-linked immune response genes. Science. 175: 272-279, 1972.
- BENE, M.C.; DERENNES, V.; FAURE, G.; THOMAS, J.L.; DUHEILLE, J.; LECLERE, J. - Graves' disease: in situ localization of lymphoid T cell sub populations. Clin. Exp. Immunol., 52: 311-316, 1983.
- BERZOFSKY, J.A.; BRETT, S.J.; STREICHER, H.Z.; TAKAHASHI, H. - Antigen processing for presentation to T lymphocytes: function, mechanisms, and implications for the T-cell repertoire. Immunol. Rev., 106: 5-30, 1988.
- BEVAN, M.J. & FINK, P.J. - The influence of thymus H-2 antigens on the specificity of maturing killer and helper cells. Immunol. Rev., 42: 4-19, 1978.
- BLACKMAN, M.A.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P. - T-cell specificity and repertoire. Immunol. Rev., 101: 5-19, 1988.
- BODMER, W.F. - Evolutionary Significance of the HLA system. Nature, 237: 139-145, 1972.

- BODMER, W.F. - Population genetics of the HLA system. Retrospect and prospect. In: DAUSSET, J. (ed.), Histocompatibility testing, 1972. Munksgaard, Copenhagen, 1973. pp. 611-617.
- BODMER, W.F. - Models and Mechanisms for HLA and disease association, J. Exp. Med., 152: 3535-3575, 1980.
- BODMER, W.F. - HLA structure and function: a contemporary view. Tissue Antigens., 17: 9-20, 1981.
- BODMER, W.F. - HLA today. Human Immunology. 17: 490-503, 1986.
- BODMER, W.F.; ALBET, E.; BODMER, J.G.; DAUSSET, J.; KISSMEYER-NIELSEN, F.; MAYR, W.; PAYNE, R.; VAN ROOD, J.J.; WALFORD, R.L. - Nomenclature of factors of the HLA System. Hum. Immunol., 11: 117-125, 1984.
- BODMER, W.F.; CANN, H.; PIAZZA, A. - Differential genetic variability among polymorphisms as an indication of natural selection. In: DAUSSET, J. (ed.), Histocompatibility testing, 1972, Munksgaard, Copenhagen, 1973, pp. 753-767.
- BODMER, W.F.; TROWSDALE, J.; YOUNG, J.; BODMER, J. - Gene clusters and the evolution of the Major Histocompatibility system. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 312: 303-315, 1986b.
- BODMER, W.F.; TROWSDALE, T.; YOUNG, J.; BODMER, J. - Gene clusters and the evolution of the Major Histocompatibility system. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 312: 303-315, 1986a.

- BODMER, J.G.; KENNEDY, L.J.; LINDSAY, J.; WASIK, A.M. -Applications of serology and the ethnic distribution of three locus haplotypes. Br. Med. Bull., 43: 94-121, 1987.
- BONTROP, R.E.; TILANUS, M.G.J.; MIKULSKI, M.M.A.; VAN EGERMOND, M.; TERMIJTELEN, A.; GIPHART, M. - Polymorphisms within the HLA-DR3 haplotypes. Immunogenet., 23: 401-405, 1986.
- BONTROP, R.E.; TILANUS, M.G.J. MIKULSKI, M.M.A.; ELFERINK, D.G.; TERMIJTELEN, A.; DEVRIES, R.R.P.; VAN ROOD, J.J.; GIPHART, M.J. - Polymorphism and complexity of HLA-DR: evidence for intra-HLA-DR regional crossing-over events. Immunogenet., 27: 40-45, 1988.
- BOSCH, M.L.; TERMIJTELEN, A.; GERRETS, R.; SCHREUDER, G.M. T.; BONTROP, R.E.; GIPHART, M.J. - Polymorphisms within the HLA DRW6 Haplotypes. II. Protein charge heterogeneity reflects MLC subtyping of HLA-DRW6 homozygous cells. Immunogenetics, 22: 23-33, 1985.
- BOTTAZO, G.F.; PUJOL-BORREL, R.; HANAGUSA, T.; FELDMAN, N. The role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. Lancet., 2: 1115-1119, 1983.
- BRETSCHER, P.A. - How Significant are "autoreactive" T cells? Thyroid Today. 7: 301-302, 1986.
- BURNET, F.M. - In: The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge Univ. Press London, 1959.

- BURNET, F.M. - Multiple polymorphism in relationship to histocompatibility antigens. Nature. 245: 359-361, 1972.
- BUUS, S.; SETTE, A.; COLON, S.M.; MILES, C.; GREY, H.M.-The relation between major histocompatibility Complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. Science. 235: 1353-1358, 1987.
- CAZENAVE, P.A. - Idiotypic anti-idiotypic regulation of antibody synthesis in rabbits. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74: 5122-5125, 1977.
- CHANG, H.C.; MULLER, S.; KÖHLER, H. - Perturbation of the idiotypic network. II, transfer of suppression to neonatal mice. Cel. Immunol., 119: 373-381, 1989.
- CHAO, N.J.; TIMMERMAN, L.; McDEVITT, H.O.; JACOB, C.O. - Molecular characterization of MHC class II antigens (β 1 domain) in the BB diabetes - prone and resistant rat. Immunogenet., 29: 231-234, 1989.
- CHARRON, D.J.; LOTTEAU, V.; TURMEL, V. - Hybrid HLA-DQ antigens molecular expression. Histocompatibility testing, 1984, Berlin, Springer Verlag, 1985, 539p.
- CHRISTIANSEN, M.L.; PACHMAN, L.M.; MARYJOWSKI, M.C.; FRIEDMAN, J.M. - Antibody to Coxsackie B virus. Increased incidence in children with recently diagnosed dermatomyositis. Arthritis Rheum. 26 (suppl.): 524, 1983.
- CLEVELAND, W.L.; WASSERMANN, N.H.; SARANGARAN, P.; PENN, A.S.; ERLANGER, B.F. - Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor (ACHR) by a normally functioning auto anti-idiotypic mechanism. Nature; 305: 56-57, 1983.

COCKFIELD, S.M.; URMSON, J.; PLEASANTS, J.; HALLORAN, P.F.

Is Normal MHC class I and II expression constitutive or induced? Transplant. Proc., 21: 630-631, 1989.

COHEN, D.; COHEN, O.; MARCADET, A.; MASSART, C.; LATHROP, M.;

DESCHAMPS, I.; HORS, J.; SCHULLER, E.; DAUSSET, J. Class II HLA-DR β -chain DNA restriction fragments differentiate among HLA-DR2 individuals in insulin-dependent diabetes and multiple sclerosis. C. R. Acad. Sc. Paris. 295: 432-436, 1982.

COLOMBANI, J. - Le Complexe majeur d'histocompatibilité et réponse immunitaire. In: DAUSSET, J. & PLA, M. (eds.) HLA Complex Majeur d'histocompatibilité de l'homme, 1985. Flammarion Médecine - Sciences, Paris, 1985, pp. 173-191.

COVER, T.L. ; ABER, R.C. - Yersinia Enterocolitica. N.

Engl. J. Med. 321: 16-24, 1989.

CNATA - Committe on Nomenclature of the American Thyroid Association: Revised Nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid - Related proteins in serum (letter to the editor). J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 1089-1098, 1987.

DAAR, A.S.; FUGGLE, S.V.; FABRE, J.W.; TING, A.; MORRIS, P.J.

The detailed distribution of MHC class II antigens in human organs. Transplantation, 38: 293-298, 1984.

DAUSSET, J. & NENNA, A. - Présence d'une leuco-agglutinine

dans le sérum, d'un cas d'agranulocytose chronique. C. R. Soc. Biol., 146: 1539-1541, 1952.

- DAUSSET, J. - Iso-leuco-anticorps. Acta Haemat., 20: 156-166, 1958.
- DAUSSET, J. - HLA et Maladie. In: DAUSSET, J. (eds.) -Cours Supérieur d'histocompatibilité, L' Imprimerie du Signe à Cergy, France, 1979. p. 72-352.
- DAUSSET, J. - La définition et la reconnaissance du soi. Rev. Med. Int. 3: 247-249, 1981a.
- DAUSSET, J. - The major histocompatibility complex in man. Past, present and future concepts. Science. 213: 1469-1474, 1981b.
- DAVIES, T.F. - Co-cultures of human thyroid monolayer cells and autologous T cells - impact of HLA class II antigen expression. J. Clin. Endocrinol. Metab., 61: 418-422, 1985.
- DAVIES, T.F. - HLA immunogenetic heterogeneity within patients with Graves' disease. Arch. Intern. Med., 147: 1845-1846, 1987.
- DE BERNARDO, E.; DAVIES, T.F. - Antigen Presentation in human autoimmune thyroid disease. Exp. Cell. Biol., 54: 155-162, 1986.
- DEGOS, L. - La Repartition Anthropologique des Genes HLA et Dynamique des populations. In: DAUSSET, J. (ed.), Cours Supérieur d'Histocompatibilité, L'imprimerie du signe à Cergy, France, 1979. pp. 138-157.

- DOHERTY, P.C. & ZINKERNAGEL, R.M. - H-2 Compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. J. Exp. Med., 141: 502-507, 1975a.
- DOHERTY, P.C.; GÖTZE, D.; TRINCHIERI, G.; ZINKERNAGEL, R.M. Models for recognition of viral modified cells by immune thymus - derived lymphocytes. Immunogenetics., 3: 517, 1976.
- DUCEMAN, B.W.; NESS, D.; RENDE, R.; CHORNEY, M.J.; SRIVASTAVA, R. GREENSPAN, D.S.; PAN, J.; WEISMAN, S.M.; GRUMMET, F.C. - HLA-J.Y. 328: mapping studies and expression of a polymorphic HLA class I gene. Immunogenetics., 23: 90-99, 1986.
- ERLICH, P. - On autoimmunity with special references to cell life. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 66B: 424-48, 1900.
- FARID, N.R. - Graves' disease and thyroiditis. In "HLA in endocrine and metabolic disorders". Academic. Press, 1981. pp. 85-176.
- FARID, N.R. - Immunogenetics of autoimmune thyroid disease. Endocrinol Metab. Clin. N. Am., 16: 229-245, 1987.
- FARID, N.R. & LO, T.C.Y. - Antiidiotypic antibodies as probes for receptor structure and function. Endocr. Rev., 6: 1-23, 1985.

- FAURE, G.; BENE, M.C.; THOMAS, J.L.; LECLERE, J.; DUHEILLE, J. - Sous populations lymphocytaires T dans la maladie de Basedow - La Presse Méd., 12: 1776-1776, 1983.
- FELDMANN, M.; LONDEI, M.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; DE BERNARDINIS, P.; LEECH, Z.; TURNER, M.; BARRET, K.; BUCHAN, G.; MAINI, R.N. - Understanding what infiltrating cells do in autoimmunity: Combination of cellular and molecular approaches. Transpl. Proc. XX: 311:314, 1988.
- FINK, P.J. & BEVAN, M.J. - H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. J. Exp. Med., 149: 766-775, 1978.
- FLYNN, S.D.; NISHIYAMA, R.H.; BIGOS, S.T. - Autoimmune thyroid disease: immunological, Pathological, and clinical Aspects. CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 26: 43-85, 1988.
- GAMBLE, D.R. - The epidemiology of insulin dependent diabetes with particular reference to the relationship of virus infection to its etiology. Epidemiol. Rev., 2: 49-70, 1980.
- GARVEY, J.; CREMER, N.E.; SUSSDORJ, D.H. - Methods in Immunology. W.A. Benjamin, I N.C. Canada, 1977, 218p.
- GUILLET, J.; LAY, M.Z.; BRINER, T.J.; BUUS, S.; SETTE, A.; GREY, H.M.; SMITH, J.A.; GEFTER, M.L. - Immunological self, not self discrimination. Science, 235: 865, 1987.
- GORER, P.A. - Genetic and Antigenic basis of tumor transplantation. J. Pathol. Bacteriol., 44: 691-697, 1937.

- GORER, P.A. & MIKULSKA, Z.B. - Some further data on the H-2 system of antigens. Proc. Roy. Soc., 69: 151-157, 1959.
- GORSKI, J. & MACH, B. - Polymorphism of human Ia antigens: gene conversion between two DR3 loci results in a new HLA-D/DR specificity. Nature, 322: 67-70, 1986.
- GRAVES, R.J. - Clinical lectures, Med. Classics, 5: 22-43, 1940.
- GROOP, L.; MIETTINEM, A.; GROOP, P.H.; MERI, S.; KOSKIMIES, S.; BOTAZZO, G.F. - Organ-specific autoimmunity and HLA-DR antigens as markers for B-cell destruction in patients with type II diabetes. Diabetes, 37: 99-103, 1988.
- GUILD, B.C.; STROMINGER, J.L. - Human and murine class I MHC antigens share conserved serine 335, the site of HLA, phosphorylation in vivo. J. Biol. Chem., 259: 9235-9240, 1984.
- HÁLA, K. - Hypothesis: Immunogenetic analysis of spontaneous autoimmune thyroiditis in obese strain (OS) chickens: a two-gene family model. Immunobiol., 177: 354-373, 1988.
- HANAFUSA, T.; PUJOL-BORELL, R.; CHIOVATO, L.; RUSSEL, R.C. G.; DONIACH, D.; BOTAZZO, G.F. - Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. Lancet. 11: 1111-1115, 1983.

- HANSEN, J.A.; GOOD, R.A.; DUPONT, B. - HLA-D compatibility between parent and child. Increased occurrence in severe combined immuno-deficiency and other hematopoietic diseases. Transplantation, 23: 366-374, 1977.
- HANSEN, B.L. - Why do some individuals produce autoreactive antibodies against receptor and/or their ligands? A possible answer to the question. Scand. J. Immunol., 24: 363-370, 1986.
- HASKINS, K.; KUBO, R.; WHITE, J.; PIGEON, M.; KAPPLER, J.; MARRAK, P. - The Major Histocompatibility Complex-restricted antigen receptor in T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. J. Exp. Med., 157: 1149-1169, 1983.
- HAVEL, R.A.; ALLEN, H.; WAKE, C.; WIDERA, G. - Organization and Expression of the MHC of the C57 Blck to mouse. Imun. Rev., 84: 29-50, 1985.
- HELENIUS, A.; MOREIN, B.; FRIES, E.; SIMONS, K.; ROBINSON, P.; SCHIRMACHER, V.; TERHORST, C.; STROMINGER, J.L. - Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 3846-3850, 1978.
- HEYMA, P.; HARROSON, L.C.; ROBINS-BROWNE - Thyrotrophin (TSH) binding sites on yersinia enterocolitica recognized by immunoglobulins from humans with Graves' disease. Clin. Exp. Immunol., 64: 249-254, 1986.

- HOLLINGSWORTH, D.R.; MABRY, C.C.; ECKERD, J.M. - Hereditary aspects of Graves' disease in infancy and childhood. J. Pediatr., 81: 446-459, 1972.
- HORS, J. - HLA et maladie. In: DAUSSET, J. & PLA, M. (eds), HLA Complexe, majeur d'histocompatibility de l'homme, Flammarion Medicine-Sciences, Paris, 1985, pp. 227-256.
- HUMPHREYS, R.E.; MCLUNE, J.M.; CHESS, L.; HERRMAN, H.L.; MALENKA, D.J.; MANN, D.L.; PARHAM, P.; SCHLOSSMANN, S. F.; STROMINGER, J.L. - Isolation and immunologic characterization of a human, B-lymphocyte-specific, cell surface antigen. J. Exp. Med., 114: 98-112, 1976.
- IVANNY, P.; DAUSSET, J. - Alloantigens and antigenic factors of human leucocytes. Vox Sang., 11: 326-331, 1966.
- IRLÉ, C.; YAGUES, D.; TIERCY, J.M.; FUGGLE, S.V.; GORSKI, J.; TERMIJTELEN, A.; JEANNET, M.; MACH, B. - Functional polymorphism of each of the two HLA, DR β chain loci demonstrated with antigen specific DR3 and DRW52 restricted T cell clones. J. Exp. Med., 167: 853-872, 1988.
- ISLAM, M.N.; PEPPER, B.M.; BRIONES-URBINA, R.; FARID, N.R. - Biological activity of anty-thyrotropin anti-idiotypic antibody. Eur. J. Immunol., 13: 57-63, 1983.
- JACKSON, J.F.; CURRIER, R.D.; TERASAKI, P.I.; MORTON, N.E. Spinocerebellar ataxia and HLA linkage. Risk prediction by HLA typing. New Engl. J. Med., 296: 1138-1141, 1977.

- JANEWAY, C.A.Jr.; MURPHY, P.D.; KEMP, J.; WIGZELL, H. - T**
cells specific for hapten-modified self are precommit-
ted for self major histocompatibility complex antigens
before encounter with the hapten. J. Exp. Med., 147:
1065-1077, 1978.
- JENKINS, M.K. & SCHWARTZ, R.H. - Antigen presentation by**
chemical modified splenocytes induces antigen-specific
T-cell unresponsiveness in vitro and in vivo. J. Exp.
Med., 165: 302-319, 1987.
- JERNE, M.K.; ROLAND, J.; CAZENAVE, P.A. - Recurrent idioty-**
pes and internal images. Eur. Mol. Biol. Org. J. 1: 243
-247, 1982.
- KABAT, E.A. - Antibody Complementarity and antibody struc-**
ture. J. Immunol., 141: 525-536, 1988.
- KALLEMBERG, C.G.; KLAASSEN, R.J.L.; WESTRA, J.; BEELEN, J.**
M.; OCKHUIZEN, T. - Immunoglobulin genes, HLA-B8/DR3
and immune responsiveness to primary immunogen and mi-
togens in normal subjects. Clin. Immunol. Immunopathol.
47: 333-342, 1988.
- KAPPES, D. & STROMINGER, J.L. - Human class II Major hist-**
ocompatibility complex genes and proteins. Ann. Rev.
Biochem., 57: 991-1028, 1988.
- KAUFMAN, J.F.; AUFRAY, C.; KORMAN, A.J.; SHACKELFORD, D.**
A.; STROMINGER, J.L. - The class II molecules of the
human and murine Major Histocompatibility Complex.
Cell., 36: 1-13, 1984.

- KENNEDY, P.G.E.; NARAYAN, O.; GHOTBI, Z.; HOPKINS, J.; GENDELMAN, H.F.; CLEMENTS, J.E. - Persistent expression of Ia antigen and viral genome in Visna-Maedi virus induced inflammatory cells. Possible role of centi virus induced interferon. J. Exp. Med., 162: 1970-1980, 1985.
- KISSMEYER-NIELSEN & DICK - Introduction to HLA Genetics. In: DICK, H.M. & KISSMEYER-NIELSEN, F. (eds) - Histocompatibility Techniques. Elsevier/North-Holland and Biomedical Press., Amsterdam, 1979, pp. 9-38.
- KISSMEYER-NIELSEN, F. & THORSBY, E. - Human transplantation antigens. Transpl. Rev., 4: 1-176, 1970.
- KLEIN, J. & SHEREFFLER, D.C. - The H-2 model for the Major Histocompatibility systems. Transpl. Rev., 6: 3-29, 1971.
- KLEIN, J. - What causes immunological nonresponsiveness? Immunol. Rev., 81: 177-202, 1985.
- KLEIN, J. - Origin of major histocompatibility complex polymorphisms: the trans-species hypothesis. Human Immunol., 19: 155-162, 1987.
- KORMAN, A.J.; BOSS, J.M.; SPIES, T.; SORRENTINO, B.; OKADA, K.; STROMINGER, J.L. - Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. Immunol. Rev., 85: 45-86, 1985.
- KOURILSKY, P. - Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells. Trends in Genetics, 2: 60-63, 1986.

- KUMAR, V.; KONO, H.K.; URBAN, J.L.; HOOD, L. - T cell receptor repertoire and autoimmune diseases. Ann. Rev. Immunol., 7: 657-682, 1989.
- KRAIEM, Z.; LAHAT, N.; GLASER, B.; BARON, E.; SADEH, O.; SHEINFELD, M. - Thyrotropin receptor blocking antibodies incidence, characterization and in vitro synthesis. Chin. Endocrinol. (Oxf.), 27: 409-421, 1987.
- KRETSHMER, E. - Uber Disposition and Konstitution. In: VON ASCHOFF, L. (ed.), Pathológische Anatomie. Von Gustav Fischer, publisher, Jene, 1928, 10-30.
- KRISS, J.; PLESHAKOV, V.; CHIEN, J.R. - Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. J. Clin. Endocrinol. Metab., 24: 1005-1028, 1964.
- LAFFERTY, K.J. - The immunologic network. Transplant. Proc., 2: 13-26, 1988.
- LAHAT, N.; HIROSE, W.; DAVIES, T.F. - Enhanced induction of thyroid cell MHC class II antigen expression in rats highly responsive to thyroglobulin. Endocrinology., 124: 1754-1759, 1989.
- LAMM, L.U. & DEGOS, L. - Introduction to HLA genetics. In: DICK, H.M. & KISSMEYER-NIELSEN, F. (eds). Histocompatibility techniques, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979. pp. 131-162.

- LAMKI, L.; ROW, V.V.; VOLPÉ, R. - Cell-mediated immunity in Graves' disease and in Hashimoto's thyroiditis as shown by the demonstration of migration inhibition factor (MIF). J. Clin. Endocrinol. Metab., 36: 358-364, 1973.
- LAMM, L.U. & DEGOS, L. - Introduction to HLA genetics. In: DICK, H.M. & KISSMEYER-NIELSEN, F. (eds.), Histocompatibility-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979. pp. 131-162.
- LE, A.X.T.; BERNHARD, E.J.; HOLTERMAN, M.J.; STRUB, S.; PARHAM, P.; LACY, E.; ENGELHARD, V.H. - Cytotoxic T cell responses in HLA-A21 transgenic mice: recognition of HLA alloantigens and utilization of HLA-A21 as a restriction element. J. Immunol., 142: 1366-1371, 1989.
- LEGRAND, L.; LATHROP, G.M.; MARCELLI-BARGE, A.; DRYLL, A.; BARDIN, T.; DEBEYRE, N.; POIRIER, J.C.; SCHIMID, M.; RYCKEWAERT, A.; DAUSSET, J. - HLA-DR Genotype Risks in seropositive Rheumatoid Arthritis. Ann. Human. Genet., 36: 690-699, 1984.
- LILLY, F.; BOYSE, E.A.; OLD, L.J. - Genetic basis of susceptibility to viral leukaemogenesis. Lancet., 11: 1207-1209, 1964.
- LILLY, F.; PINNEUS, T. - Genetic control of murine viral leucomogenesis. Adv. Cancer Reser., 17: 231-277, 1973.
- LIDER, O.; RESHEJ, T.; BERAUD, E.; BEN-NUN, A.; COHEN, R. - Anti-idiotypic network induced by T cell vaccination against experimental auto-immune encephalomyelitis. Science., 239: 181-183, 1988.

- LUCAS-MARTIN, A.; FOZ-SALA, M.; TODD, J.; BOTAZZO, G.F.; PUJOLL-BORRELL, R. - Occurrence of thyrocyte HLA class II Expression in a wide variety of thyroid diseases: relationship with lymphocytic infiltration and thyroid auto antibodies. J. Clin. Endocrinol. Metab., 66: 367-375, 1988.
- LUDGATE, M.E.; MCGREGOR, A.M.; WEETMAN, A.P. - Analysis of T cell subsets in Graves disease. Alterations associated with carbimazole. Br. Med. J., 228: 526-528, 1984.
- MARGOLICK, J.B.; WEETMAN, A.P.; BURMAN, K.D. - Immunohistochemical analysis of intrathyroidal lymphocytes in Graves disease: evidence of activated T cells and production of interferon- γ . Clin. Immunol. Immunopathol., 47: 208-218, 1988.
- MARIOTTI, S.; CHIOVATO, L.; VITTI, P.; MARCOCCI, C.; FENZI, G.F.; DEL PRETE, G.F.; TIRI, A.; ROMAGNINI, S.; RICCI, M.; PINCHERA, A. - Recent advances in the understanding of humoral and cellular mechanisms implicated in thyroid autoimmune disorders. Clin. Immunol. Immunopathol. 50: 73-84, 1989.
- MARK, A.; THOMAS, B.; WILLIAMS, D.G. - Idiotypes and anti-idiotypic antibodies in health and disease. Q. J. Med., 247: 883-888, 1987.
- MARYANSKI, J.; PALA, P.; CEROTTINI, J.C.; CORRADIN, G. - Synthetic peptides as antigens and competitors in recognition by H-2 - restricted cytolytic T cells specific for HLA. J. Exp. Med., 167: 1391-1405, 1988.

- MARTIN, L.** - The hereditary and familial aspects of exophthalmic goitre and nodular goitre. Q. J. Med., 14: 207-219, 1945.
- MATSUNO, N.; SANO, N.; NAKATSUJI, T.; ANDO, A.; INOKO, H.; TSUJI, K.** - Effect of HLA Class II Antigen in Vitro and in Vivo Cellular Responses. Transplant. Proc., 21: 158-159, 1989.
- MAYR, W.R.** - HLA-A, B, C gene and haplotype frequencies in Vienna. An analysis of family data. Human Genet., 37: 41-48, 1977.
- McKENZIE, J.M.** - Delayed Thyroid response to serum from thyrotoxic patients. Endocrinology, 62: 865-868, 1958.
- MEEK, J.C.; JONES, A.E.; LEWIS, U.J.; VANDERLAAN, W.P.** Characterization of the long-acting thyroid stimulator of Graves' disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 52: 342-349, 1964.
- MEIKLE, A.W.; STRINGHAM, J.D.; WOODWARD, M.G.; NELSON, J.C.** Hereditary and environmental influences on the variation of thyroid hormones in normal male twins. J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 588-592, 1988.
- MELLINS, E.; ARP, B.; OCHS, B.; ERLICH, H.; PIOUS, D.** - A single amino acid substitution in the human histocompatibility leucocyte antigen DR3 β chain selectively alters antigen presentation. J. Exp. Med., 168: 1531-1537, 1988.

- MICHIE, W. & GUNN, A. - The thyroid, the Thymus and Autoimmunity. Brith J. Clin. Pract., 20: 9-13, 1966.
- MILLER, J.F. & WATSON, J.D. - Intracelular recognition events eliminate self-reactive T cells. Scand. J. Immunol., 28: 389-395, 1988.
- MILLER, J.F.A.P. - Tolerance and the thymus. Transplant. Proc., 59-60, 1989.
- MISAKI, T.; KONISHI, Y.; NAKASHIMA, T. - Immunohistological phenotyping of thyroid infiltrating lymphocytes in Graves disease and Hashimoto's thyroiditis. Clin. Exp. Immunol., 60: 104-107, 1985.
- MOESCHLIN, S. & WAGNER, R. - Agranulocytosis due to the occurrence of leucocyte agglutinins (pyrramidon and cold agglutinins). Acta Haemat., 8: 29-41, 1952.
- MOLLER, G. - Molecular genetics of classe I and II MHC antigens. Immunological Review. 85: 5-168, 1985.
- MOURITSEN, S. - Rheumatoid factors are anti-idiotypic antibodies against virus-induced anti-FC receptor antibodies. Scand. J. Immunol., 24: 485-490, 1986.
- NAKAMURA, R.; BINDER, L. - Current concepts and diagnostic evaluation of autoimmune disease. Vistas Immunopathol., 112: 869-877, 1988.
- NAKAMURA, M.; BURASTERO, S.E.; VEKI, Y.; LARRICK, J.W.; NOTKINS, A.L.; CASALI, P. - Probing the normal and autoimmune B cell repertoire with Epstein-Barr virus. J. Immunol., 4165-4177, 1988.

- NEPON, G.T. - Immunogenetics of HLA-associated diseases. Concepts Immunopathol., 5: 80-105, 1987.
- OKUDAIRA, K.; SEARLES, R.P.; CEUPPENS, J.; GOODWIN, J.S.; WILLIAMS Jr., R.C. - Anti-Ia reactivity in sera from patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 69: 17-24, 1982.
- OKUDAIRA, K.; DIAZ-JOUANEN, E.; LOCKSHIN, M.D.; SEARLES, R.; WILLIAMS Jr., R.C. - Changes in anti-lymphocyte and anti-Ia antibodies during pregnancy in Systemic Lupus-erythematosus. Clin. Immunol. Immunopathol., 40: 259-264, 1986.
- LOUDIN, J. - L'idiotypie des anticorps. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 125C: 309-337, 1974.
- OWERBACH, D.; LERNMARK, A.; PLATZ, P.; RYDER, L.P.; RASK, L.; PETERSON, P.A.; LUDVINGSON, J. - HLA-D region β chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR and Identical healthy and insulin-dependent diabetic individuals. Nature, 303: 815-817, 1983.
- PARHAN, P.; LOMEN, C.E.; LAWLOR, D.A.; WAYS, J.P.; HOLMES, N.; COPPIN, H.L.; SALTER, R.D.; WAN, A.M.; ENNIS, P.D. The nature of polymorphism in HLA-A, B, C molecules. Proc. Nat. Acad. Sci USA., 85: 4005-4009, 1988.
- PARK, M.S.; NAKATA, S.; ONORI, K. - Reproducibility of DR typing. Histocompatibility Testing 1980. Ucla Tissue Typing Laboratories, Los Angeles, 1980. pp. 161-164.

- PAYAMI, H.; KHAN, M.A.; GRENNAN, D.; SANDERS, H.; DYER, P. A.; THOMSON, G. - Analysis of genetic interrelationship among HLA - associated diseases. Am. J. Human. Genet., 41: 331-349, 1987.
- PELLEGRINO, M.A.; FERRONE, S.; THEOFILOPOULOS, A.N. - Isolation of Human T and B lymphocytes by with 2 aminoethyl-iso-thiourronium bromide (AET) treated sheep red blood cells and with monkey red blood cells. J. Immunol. Methods., 11: 273-279, 1976.
- PETERSEN, J.; FELDT-RASMUSSEN, U.; HOINER-MADSEN, M.; LARSEN, F.; HUSBY, S.; SIERS BAEK-NIELSEN, K. - Autoreactive lymphocytes in Thyroid disorders. Acta Path-Microbiol. Immunol. Scand. Sect.C., 94: 113-117, 1986.
- PETERSON, P.A.; CUNNINGHAM, B.A.; BERGAARD, I.; EDELMAN, G. M. - $\beta 2$ - Microglobulin - A free immunoglobulin domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69: 1697-1701, 1972.
- PICKBOURNE, P.; PIAZZA, A.; BODMER, W.F. - Population Analysis. In: BODMER, W.F. (ed.), Histocompatibility testing. 1977, Munksgaard, Copenhagen, 1978, 259p.
- PISTILLO, M.P.; FERRARA, G.B.; REED, E.; BRENSILVER, J.; MC CABE, R.; BENVENSITY, A.; HARDY, M.; KING, D.W.; SUCIU-FOCA, N. - Detection of Anti-idiotypic antibodies to HLA (anti-anti-HLA antibodies) by use of Human Monoclonal antibodies. Transplant. Proc., 21: 780-781, 1989.

- PUJOL-BORELLI, T.; HANAFUSA, T.; CHIOVATO, L.; BOTTAZZO, G.F. - Lectin-induced, expression of DR antigens on human cultured follicular thyroid cells. Nature, 303: 71-73, 1983.
- REID, R.M. - The Hardy-Weinberg Law. In: REID, R.M. (ed.), Human population genetics. Bugness Publishing Company Minneapolis, USA, 1978. pp. 5-16.
- ROITT, I.M.; DONIACH, D.; CAMPBELL, R.N; HUDSON, R.V. - Autoantibodies in Hashimoto's disease. Lancet., 2: 828-821, 1956.
- ROITT, I.M.; DONIACH, D. - A reassessment of studies on the aggregation of thyroid autoimmunity in families of thyroiditis patients. Clin. Exp. Immunol., 2: 727-735, 1967.
- ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. - Regulation of the Immune Response. In: ROITT, I.M.; BROSTROFF, J.; MALE, D. (eds.) Immunology, Cower Medical Pubshing, London, 1989. pp. 103-106p.
- ROLLINI, P.; MACH, B.; GORSKI, J. - Linkage map of three HLA-DR β -chain genes. Evidence for a recent duplicational event. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82: 7197-7201, 1985.
- ROSE, N.R. - Current Concepts of autoimmune disease. Transplant. Proc., XX: 3-10, 1988.

- ROSE, N.R.; KONG, Y.M.; OKAYASU, I.; GIRALDO, A.A.; BEISEL, K.; SUNDICK, R.S. - T Cell regulation in autoimmune thyroiditis. Immunol. Rev., 55: 299-314, 1981.
- ROSE, N.R. & WITEBSKY, E. - Studies on organ specificity V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts. J. Immunol., 76: 417-427, 1956.
- ROSENBAUM, J.T. & McDEVITT, H.O. - Immune Response genes and their mole in predisposition to disease. In: N.R. FARID (ed.), Endocrine and Metabolic Disorders., New York, Academic, pp. 325-337.
- ROTTER, J.I.; ANDERSON, C.E.; RUBIN, R.; CONGLÉTON, J.E.; TERASAKI, P.I. - HLA genotypic study of insulin-dependent diabetes. The excess of DR3/DR4 heterozigotos allow refecton of the recessive hipothesis. Diabetes, 32: 169-174, 1983.
- ROWE, A.W. & COHEN, E. - Phagocytic activity and antigenic integrity of leucocytes preserved with dimethyl sulfoxide at cryogenic temperature (-196°C). Vox Sang., 10: 382-386, 1965.
- SAFRAN, M.; PAUL, T.L.; ROTI, E.; BRAVERMAN, L.E. - Environmental factors affecting autoimmune thyroid disease. Endocrinol. Metab. Clin. N. Am., 16: 327-342, 1987.

- SALVI, M.; FUKAZAWA, H.; BERNARD, N.; HIROMATSU, Y.; HOW, J.; WALL, J.R. - Role of autoantibodies in the pathogenesis and association of Endocrine autoimmune disorders. Endocrin. Rev., 450-466, 1988.
- SATO, Y. & SHIROMA, Y. - Concurrent infections with Strongyloides and T-cell leukemia virus and their possible effect on immune responses of Host. Clin. Immunol. Immunopathol., 52: 214-224, 1989.
- SAVAGE, M.S.; SEARLES, R.P.; TROUP, M.G.; BROZEK, M.C. Anti-idiotypic antibodies to anti-DR in Patients with Rheumatoid arthritis. Clin. Immunol. Immunopathol., 42: 183-194, 1987.
- SCHENDEL, D.J. & VENUTA, S. - Regulation of MHC expression in normal and tumor cells. J. Immunogenet. 14: 9-11, 1987.
- SCHWARTZ, R.H. - A clonal deletion model for Ir gene control of the immune response. Scand. J. Immunol., 7: 3-10, 1978.
- SEGE, K. & PETERSON, P.A. - Use of anti-idiotypic antibodies as cell-surface receptor probes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 75: 2443-2447, 1978.
- SERJEANTSON, S.W. - The reason for MHC Polymorphism in Man. Transplant. Proc., 21: 598-601, 1989.

- SHEREARER, G.M.; REHN, T.G.; GARBARINO, C.A.** - Cell mediated lympholysis of trinitrophenyl - modified treated sheep red blood cells and with monkey red blood cells. J. Immunol. Methods., 11: 273-279, 1976.
- SHEREARER, G.M.** - Cell mediated cytotoxicity to trinitrophenyl modified syngeneic lymphocytes. Europ. J. Immunol., 4: 527-533, 1974.
- SHREFFLER, D.C.** - Seventy-Five uears of immunology: the view from the MHC. J. Immunol., 141: 1791-1798, 1988.
- SIEGEL, S.** - Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. Editora Mc Graw-Hill do Brasil, Ltda, São Paulo, 1979. pp. 350.
- SINGAL, D.P. & BLAJCHMAN, M.A.** - Histocompatibility (HLA) antigens lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. Diabetes, 22: 429-432, 1973.
- SJÖGREN, H.O. & RINGERTZ, N.** - Histopathology and transplantability of polyona-induced tumors in strain a/SN and three coisogenic resistant (Ir) substrains. J. Natl. Cancer Inst., 28: 859-895, 1962.
- SKILLERN, P.G.** - Genetics of Graves' disease. Mayo Clin. Proc., 47: 848-849, 1972.

- SMITH, B.R. & HALL, R. - Thyroid Stimulating immunoglobulins in Graves' disease. Lancet, 11: 427-431, 1974.
- SNELL, G.D. - The H-2 locus of the mouse: observations and speculations. Concerning its comparative genetics and its polymorphism. Folia biologica., 14: 335-358, 1968.
- SRIDAMA, V.; HARA, Y.; FAUCHET, R. - HLA immunogenetic heterogeneity in black American patients with Graves' disease. Arch. Inter. Med., 147: 229-231, 1987.
- STOCKINGER, B. & HAUSMANN, B. - Induction of an immune response to a self antigen. Eur. J. Immunol., 18: 249-259, 1988.
- STRACHAM, T. - Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. Brit. Med. Bul., 43: A-14, 1987.
- STROMINGER, J.L. - Biology of the human histocompatibility leucocyte antigen (HLA) system and Hypothesis regarding the generation of autoimmune diseases. J. Clin. Invest., 77: 1411-1415, 1986.
- SVEJGAARD, A. & RYDER, L.P. - Interaction of HLA Molecules with non-immunological ligands as an explanation of HLA and disease associations. Lancet., 11: 547-549, 1976.
- SVEJGAARD, A.; JERSILD, C.; NIELSEN, L.S.; BODMER, W.F. - HLA-A antigens and disease statical and genetical considerations. Tissue antigens, 4: 95-105, 1974.

- SVJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYDER, L.P. - Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. In: Terasaki, P.I. (ed.), Histocompatibility testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratories, Los Angeles, 1980. pp. 638-656.
- TALAI, N. - New therapeutic approaches to autoimmune disease. Springer Semin. Immuno Pathol., 9: 105-116, 1986.
- TERASAKI, P.I.; PARK, M.S.; BERNOCO, D.; OPELZ, G.; MICKEY, M.R. - Overview of the 1980 International Histocompatibility Workshop. Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratories, Los Angeles, 1980, pp. 1-17.
- THOMAS, D.W.; VAMASHITA, V.; SHEVACH, E.M. - The role of Ia antigens in T cell activation. Immunol. Rev., 35: 97-120, 1977.
- THOMAS, M.A.B.; WILLIAMS, D.G. - Idiotypes and antiidiotypic Antibodies in Health and Disease. Q. J. Med., 247: 883-888, 1987.
- THOMSEN, A.R. & MARKER, O. - MHC and non MHC regulate Elimination of lymphocytic choriomeningitis virus and antiviral cytotoxic T. lymphocyte and delayed - type hypersensitivity mediating T Lymphocyte activity in parallel. J. Immunol., 142: 1333-1341, 1989.
- THOMSON, G. - Investigation of the mode of inheritance of the HLA Associated disease by the method of antigen genotype frequencies among disease individuals. Tissue Antigens., 21: 81-108, 1983.

- THOMSON, G. - HLA disease associations: models for insulin dependent diabetes mellitus and the study of complex human genetic disorders. Ann. Rev. Genet., 22: 31-50, 1988.
- THOMSON, G.; BODMER, W.F. - The genetic analysis of HLA and disease associations. In: DAUSSET, J. & SVEJGAARD, A. (eds.), HLA and disease, Munksgaard, Copenhagen and Wilkins, Baltimore, 1977. pp. 84-93.
- THOMSON, G. & BODMER, W. - The genetic analysis of HLA and disease association - in: HLA and disease. Munksgaard, Copenhagen, 1977. pp. 84-93.
- TIWARI, J.L. & TERASAKI, P.I. - Malignancy. In: TIWARI, J. L. & TERASAKI, P.J. (eds.) HLA and disease association, Springer-Verlag, Berlin, 1985. 214-472p.
- TODD, J.A.; ACHA-ORBEA, H.; BELL, J.I.; CHAO, N.; FRONEK, Z.; JACOB, C.O.; McDERMOTT, M.; SINHA, A.A.; TIMMERMANN, L.; STEINMAN, L.; McDEVITT, H.O. - A molecular basis for MHC class II - Associated immunity. Science, 240: 1003-1009.
- TOPLISS, D.; HOW, J.; LEWIS, M.; ROW, V.; VOLPÉ, R. - Evidence for cell-mediated immunity and specific suppressor T lymphocyte dysfunction in Graves' disease and diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab., 57: 700-705, 1983.

- TOTTERMAN, T.H. - Distribution of T, B and Thyroglobulin-binding lymphocytes infiltrating the gland in Graves' disease, Hashimoto thyroiditis and the Quervains thyroiditis. Clin. Immunol. e Immunopathol., 10: 270-277, 1979.
- TROWSDALE, Y. - Genetics and polymorphism: class II antigens. Brit. Med. Bul., 43: 15-36, 1987.
- TUNAI, H.; UNO, H.; HIROTA, Y.; MATSUBYASHI, S.; KUMA, K.; MATSUMOTO, H.; KUMAGAI, L.F.; SASUZUKI, T.; NAGATAKI, S. - Immunogenetics of Hashimoto's and Graves diseases J.Clin. Endocrinol. Metab., 60: 62-66, 1985.
- TYSON, C.J. & JENKIN, C.R. - Phagocytosis of bacteria in vitro by haemocytes from the crayfish *parachanna bicarintus*. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 52: 341-348, 1974.
- ULRICH, R.G.; ATASSI, M.Z. - Alloreactive T cell recognition of the HLA-DR β N-terminal polymorphic region. Immunol. Let., 21: 285-290, 1989.
- UNANUE, E.R.; BELLER, D.J.; LU, C.Y.; ALLEN, P.M. - Antigen presentation comments on its regulation and mechanism. J. Immunol., 132: 1-5, 1984.
- VAN ROOD, J.J.; TEERNISSE, J.G.; VAN LEEUVEN, A. - Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature, 181: 1735-1736, 1958.

- VENABLES, P.** - Epstein-Barr virus infection and autoimmunity in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis., 47: 265-269, 1988.
- VOLPE, R.; EDMONDS, M.; LAMKI, L.; CLARKE, V.P.; ROW, V.V.** - The pathogenesis of Graves' disease. A disorder of delayed hypersensitivity? Mayo Clin. Proc., 47: 824-834, 1972.
- VOLPE, R.; FARID, N.R.; VON WESTRAP, C.** - The pathogenesis of Graves disease and Hashimoto's thyroiditis. Clin. Endocrinol (Oxf.), 3: 239-261, 1974.
- VON ROSSLE, R.** - Innere Krankheits Bedingugen. In: Von Aschoff, L. (ed.). Pathologische Anatomie. Von Gustav Fischer Publisher, Jena, 1928, 1-50p.
- WALL, J.R.; BAUR, R.; SCHLEUSENEUR, H.; BANDY-DAFOE, P.** Peripheral blood and intra thyroidal mononuclear cell populations in patients with autoimmune thyroid disorders enumerated using monoclonal antibodies. J. Clin. Endocrinol. Metab., 56: 164-169, 1983.
- WALLACH, D.; FELLOUS, M.; REVEL, M.** - Preferential effect of interferon on the synthesis of HLA antigens and their RNAs in human cells. Nature. 299: 833-836, 1982.
- WEISS, M.; INGBAR, S.H.; WINBLAD, S.; KASPER, D.L.** - Demonstration of a saturable binding site for thyrotropin in yersinia enterocolitica. Science, 219: 1131-1133, 1983.

- WESCOTT, M.Z.; AWDEH, Z.L.; YUNIS, E.J.; ALPER, C.A. - Molecular Analysis Distinguishes two HLA-DR3-bearing major histocompatibility complex extended haplotypes. Immunogenet. 26: 370-374, 1987.
- WILROY, R.S. Jr & EITZENDORF, J.N. - Familial hyperthyroidism including two siblings with neonatal Graves' disease. J. Pediatr., 78: 625-632, 1971.
- WILSON, B.S.; HERZING, M.A.; LLOYD, R.V. - Immunoperoxidase staining for Ia like antigens in paraffin embedded tissues from human melanoma and lung carcinoma. Am. J. Pathol., 115: 102-116, 1984.
- YAGUE, J.; WHITE, J.; COLEDOUGH, C.; KAPPLER, J.; PALMER, E.; MARRACK, P. - The T cell receptor: the α and β chains define idiootype, and antigen and MHC specificity. Cell., 42: 81-87, 1985.
- YOON, J.M.; AUSTIN, M.; ONODENA, T.; NOTKINS, A.L. - Virus-induced diabetes Mellitus. N. Engl. J. Med., 1173-1179, 1979.
- ZAKARIJA, M.; MCKENZIE, J.M. - The Spectrum and significance of auto antibodies reacting with the thyrotropin receptor. Endocrin. Metab. Clin. N. Am., 16: 343-363, 1987.
- ZANETTI, M. - New Concepts in autoimmunity. Immunol. Invest., 15: 287-310, 1986.

ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. - Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in Lymphocytic choromeningites. Nature (London), 215: 547-548, 1974.

ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. - MHC restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction-specificity function and responsiveness. Adv. Immunol., 27: 51-77, 1979.

ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. - Restriction of in vitro T cell - mediated cytotoxicity in lymphocyte choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature, 248: 701-702, 1974.

ZINKERNAGEL, R.M.; CALLAHAN, G.N.; ALTHAGE, A.; COOPER, S.; STREINLEIN, J.N.; KLEIN, J. - The lymphoreticular system in triggering virus-plus self-specific cytotoxic T cells. Evidence for T help. J. Exp. Med., 147: 897-911, 1978.

ZONDEK, H. - Hyperthyreoidismus-Historische Bemerkungen. In: ZONDEK, H. (ed.). Die Krankheiten Der Endocrinen Drüsen., Benno Schwabe & Co., Publisher, Basel, 1953, 799p.