

PATRÍCIA ALMEIDA DE REZENDE

**ASPECTOS IMUNOGENÉTICOS
DA
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Genética da Universidade Federal do
Paraná, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, na área de Genética.

CURITIBA

1995

Deixai queimar porque o fogo purifica e renova. Queima e arde. Destrói e depois recompõe. Os que não o experimentam permanecem na passividade e repetem antigos conceitos. Os que não o suportam, perecem. Mas os que persistem até o fim, alcançam seus objetivos e ampliam os seus horizontes.

Dedico este trabalho aos profissionais e aos estudantes da área de saúde, aos pacientes que possibilitaram a realização dos estudos sobre a EM e à toda a humanidade que, afinal, espera por um retorno das pesquisas nas quais, mesmo sem o saber, investe seus impostos, e dos pesquisadores nos quais deposita a sua credibilidade.



Ministério da Educação e do Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

A T E S T A D O

ATESTO, para os devidos fins e a quem interessar possa que o Sra. PATRÍCIA ALMEIDA DE REZENDE obteve o grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de GENÉTICA, no dia 02 de fevereiro de 1996, com a defesa da tese intitulada "Aspectos Imunogenéticos da Esclerose Múltipla", na qual obteve o conceito médio final "B" (bom) atribuído pela banca examinadora a seguir relacionada:

1. Dra. Rui Fernando Pilotto (orientador) UFPR
conceito "B" (bom)
2. Dr. Lineu Cezar Werneck - UFPR
conceito "B" (bom)
3. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres - UFPR
conceito "B" (bom)

E, por ser verdade, firmo o presente.

Curitiba, 05 de fevereiro de 1995.

Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto

COORDENADOR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
MATRÍCULA 45799-UFPR



Prof. Rui Fernando Pilotto
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Genética

Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto
COORDENADOR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
MATRÍCULA 45799-UFPR

Orientador :

Dr. Rui Fernando Pilotto

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Em especial ao meu orientador, o Prof. Rui Fernando Pilotto, pelo apoio, incentivo e pela confiança que depositou na minha pessoa,

ao Dr. Walter Oleschko Arruda, pelas inúmeras sugestões e empréstimo de material utilizado na elaboração deste trabalho.

Agradeço, ainda, aos Profs. Anselmo Chaves Neto, José Sebastião Cunha Fernandes e Juarez Gabardo pelo apoio na parte de estatística,

à Prof^ª Maria da Graça Bicalho de Lacerda e ao Prof. Ricardo Alberto Moliterno pela revisão da versão preliminar deste trabalho,

aos colegas da pós-graduação, aos professores e funcionários do Depto de Genética que, por sua receptividade, ajudaram-me na realização profissional e no amadurecimento enquanto pessoa humana,

ao Colegiado do Depto de Genética da UFPr pela oportunidade de fazer o Mestrado,

às bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas e do Hospital de Clínicas da UFPr, da Faculdade de Medicina de São Paulo e da BIREME, pelo apoio no levantamento bibliográfico,

aos meus familiares, amigos e alunos, pelo apoio moral recebido,

à Clínica de Diagnóstico por Imagem do Paraná (CEDIP), pelas radiografias concedidas,

à CAPES pelo apoio financeiro

e finalmente ao meu marido, Armando Guedes Vicentini, pelo incentivo permanente e apoio na parte de digitação e desenho.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	ix
<i>LISTA DE UNIDADES</i>	x
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	xi
<i>LISTA DE TABELAS</i>	xii
<i>RESUMO</i>	xiii
<i>I - INTRODUÇÃO</i>	1
<i>1.1 - Objetivos</i>	2
<i>1.2 - Justificativa</i>	2
<i>1.3 - Metodologia</i>	3
<i>1.3.1 - Coleta de Dados</i>	3
<i>1.3.2 - Análise dos Dados</i>	3
<i>II - NOÇÕES PRELIMINARES</i>	4
<i>2.1 - Conhecimentos Elementares sobre o SNC</i>	4
<i>2.2 - Sistema Imune</i>	5
<i>2.2.1 - Conceitos Gerais</i>	5
<i>2.2.2 - Células do Sistema Imune</i>	7
<i>2.2.3 - Noções Gerais sobre Autoimunidade</i>	10
<i>2.3 - Sobre o HLA</i>	12
<i>2.4 - Sobre o TCR</i>	19
<i>III - CARACTERIZAÇÃO DA EM</i>	21
<i>3.1 - Epidemiologia</i>	21
<i>3.2 - Manifestações Clínicas</i>	23
<i>3.3 - Diagnóstico</i>	25

3.4 - Tratamento	26
<i>IV - ASPECTOS IMUNOGENÉTICOS DA EM</i>	29
4.1 - <i>Imunopatologia</i>	29
4.1.1 - <i>Rompimento da Barreira Hematoencefálica</i>	29
4.1.2 - <i>Células Apresentadoras de Antígeno</i>	29
4.1.3 - <i>Autoantígenos e Populações de Linfócitos T</i>	30
4.1.4 - <i>Indução da Resposta Autoimune</i>	33
4.1.5 - <i>Citocinas e Marcadores de Membrana</i>	34
4.1.6 - <i>Atividade Imunossupressora</i>	37
4.1.7 - <i>Autoanticorpos e Populações de Linfócitos B</i>	39
4.2 - <i>Evidências da Suscetibilidade Genética</i>	41
4.2.1 - <i>Estudos em Gêmeos</i>	41
4.2.2 - <i>Associação MHC x EM</i>	42
4.2.3 - <i>Envolvimento dos Genes TCR na EM</i>	47
<i>V - RESULTADOS</i>	49
5.1 - <i>Análise Estatística dos Dados de Gêmeos</i>	49
5.2 - <i>Cálculo do Risco Relativo</i>	51
<i>VI - DISCUSSÃO</i>	55
6.1 - <i>Sobre a Etiologia</i>	55
6.2 - <i>Imunopatologia</i>	56
6.3 - <i>Sobre os Estudos em Gêmeos</i>	59
6.4 - <i>Sobre a Associação MHC x EM</i>	59
6.5 - <i>Sobre o Envolvimento dos Genes TCR</i>	63
6.6 - <i>Seqüência Hipotética dos Eventos</i>	64
6.7 - <i>Perspectivas para o Tratamento da EM</i>	66

<i>VII - CONCLUSÕES</i>	68
<i>VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	Barreira Hematoencefálica
CAA	Célula Apresentadora de Antígeno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Desoxiribonucleic Acid)
EAE	Encefalomielite Alérgica Experimental
EM	Esclerose Múltipla
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (Human Leukocyte Antigen)
hsp	proteína de choque térmico (heat shock protein)
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular (Intercellular Adhesion Molecule)
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
LCR	Líquido Cefalorraquidiano (líquor)
LFA	Antígeno Associado à Função do Linfócito (Lymphocyte Function-Associated Antigen)
LMP	Protease Multifuncional (Large Multifunctional Protein)
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina (Myelin-Associated glycoprotein)
MBP	Proteína Básica da Mielina (Myelin Basic Protein)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)
MOG	Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito (Myelin Oligodendrocyte Glicoprotein)
mRNA	Ácido Ribonucleico - mensageiro (messenger-Ribonucleic Acid)
PCP	Progressiva Crônica Primária (Primarily Chronic Progressive)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PLP	Proteína Proteolípídica (Proteolipidic Protein)
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
SR	Surto/Remissão
SSO	Oligonucleotídeo Sequência-Específico (Sequence-Specific Oligonucleotide)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TAP	Transportador associado ao Procesamento de Antígeno (Transporter associated with Antigen Processing)
TCC	Tomografia Computadorizada de Crânio
TCR	Receptor da Célula T (T-Cell Receptor)
TGF	Fator de Transformação do Crescimento (Transforming Growth Factor)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor)
VCAM	Molécula de Adesão da Célula Vascular (Vascular Cell Adhesion Molecule)
VLA	Antígeno de Ativação Tardia (Very Late Activation Antigen)

LISTA DE UNIDADES

cM	centimorgan
kb	kilobase
kD	kilodalton
ml	mililitro
mm³	milímetro cúbico
ng	nanograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Produção da bainha de mielina	5
Figura 2.2	Barreira hematoencefálica	6
Figura 2.3	Células do sistema imune	8
Figura 2.4	Interações entre as células do sistema imune	10
Figura 2.5	Localização cromossômica da região HLA	13
Figura 2.6	Mapa simplificado da região HLA	13
Figura 2.7	Representação esquemática da molécula HLA de classe I	14
Figura 2.8	Representação esquemática da molécula HLA de classe II	15
Figura 2.9	Complexo MHC-antígeno-TCR e moléculas acessórias	16
Figura 2.10	Superfamília das imunoglobulinas	19
Figura 2.11	Formação do mRNA do TCR	20
Figura 2.12	Correspondência entre os segmentos gênicos e a região variável das cadeias de TCR	20
Figura 3.1	Mapa de distribuição geográfica da esclerose múltipla	22
Figura 3.2	Corte sagital de ressonância nuclear magnética de crânio comparado entre pessoa normal e afetado com esclerose múltipla	23
Figura 3.3	Desmielinização e remielinização	24
Figura 4.1	Adesão do linfócito à parede do vaso sanguíneo e travessia da barreira hematoencefálica.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Exemplos de doenças autoimunes e autoantígenos relacionados . . .	12
Tabela 2.2	Grupos de reatividade cruzada	18
Tabela 2.3	Exemplos de doenças autoimunes associadas ao HLA	18
Tabela 3.1	Critérios de diagnóstico da esclerose múltipla segundo SCHUMACHER	26
Tabela 3.2	Critérios de diagnóstico da esclerose múltipla segundo POSER . . .	26
Tabela 4.1	Citocinas presentes no sistema nervoso central	35
Tabela 4.2	Estudos populacionais de associação MHC x Esclerose Múltipla . .	46
Tabela 5.1	Estimativa do grau de concordância para a esclerose múltipla em gêmeos	53
Tabela 5.2	Associações MHC x Esclerose Múltipla em populações caucasóides .	54
Quadro 6.1	Estratégias experimentais para tratamento de esclerose múltipla . .	67

RESUMO

A etiologia da esclerose múltipla (EM) ainda é desconhecida, porém, há evidências da participação de fatores genéticos e ambientais na determinação da suscetibilidade a esta doença.

No presente trabalho foi feita uma análise dos principais aspectos imunogenéticos implicados na EM que vêm sendo estudados. Encontrou-se que a taxa de concordância em gêmeos monozigóticos é significativamente maior do que em gêmeos dizigóticos, sugerindo a participação de um componente genético na etiologia da EM. A média da herdabilidade da EM foi estimada como sendo aproximadamente 28%; porém ainda não foram identificados os genes que constituem um fator de risco para o desenvolvimento da EM.

Há evidências de que os genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), principalmente os de classe II, das subregiões DR e DQ possam estar envolvidos. Em particular o haplótipo DRB1*1501.DQA1*0102.DQB1*0602, referente ao fenótipo DR2.Dw2.DQ6 foi encontrado em associação positiva em vários estudos em populações caucasóides. O desequilíbrio de ligação entre os genes DR e DQ dificulta o reconhecimento da contribuição individual de cada alelo. Nos estudos de associação MHC x EM, nota-se heterogeneidade quanto aos critérios de diagnóstico empregados pelos diversos autores e a ausência, na maioria das vezes, de análises em separado dos grupos de pacientes com manifestações clínicas distintas.

A despeito da variabilidade dos receptores de célula T (TCRs) encontrados nas células dos pacientes com EM, as moléculas de TCR $\alpha\beta$, que são expressas na membrana dessas células, aparentemente apresentam seqüências em comum entre si na região de ligação com o complexo antígeno-MHC. Entretanto, os estudos a respeito do envolvimento dos genes TCR na suscetibilidade à

EM partem do pressuposto de que o autoantígeno envolvido seja a proteína básica da mielina (MBP). Além disso, alguns estudos sugerem que outras moléculas, como por exemplo a glicoproteína associada à mielina (MAG) e a glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG), possam servir de alvo da autoimunidade na EM. As citocinas produzidas nos sítios de inflamação no sistema nervoso central também parecem desempenhar papel relevante na imunopatologia da EM.

I - INTRODUÇÃO

Especula-se que a esclerose múltipla (EM) tenha surgido entre os povos escandinavos que dominaram o Norte da Europa. Tais povos, procedentes dos países atuais da Noruega, Suécia e Dinamarca, eram conhecidos como *Vikings*. Eram bons navegadores e conquistadores de novas terras. Em cada área diferente que ocupavam, recebiam designações distintas, como *Normandos* na Alemanha, França e Espanha, *Danes* na Inglaterra e *Varângios* na Rússia. Era costume entre eles capturar mulheres e crianças após as batalhas para vendê-las como escravos ou para mantê-las como serviçais. Os *Vikings* também participaram ativamente nas Cruzadas, freqüentemente estabelecendo-se em diversas terras estrangeiras, onde casavam-se e se misturavam à população local. Eis aí, segundo a visão de POSER (1994) o principal motivo da disseminação dos genes de suscetibilidade à EM, estendendo-se às populações descendentes dos *Vikings* que povoaram as demais regiões onde hoje há alta prevalência da EM.

A esclerose múltipla é uma doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) de natureza aparentemente autoimune, cuja etiologia ainda é desconhecida. Existem evidências de que fatores ambientais e genéticos estejam envolvidos na determinação de sua ocorrência.

O diagnóstico da EM é extremamente dificultado, dada a heterogeneidade do ponto de vista clínico e a inexistência de testes laboratoriais específicos. O tratamento da EM é na maioria das vezes inespecífico, ou é restrito a um grupo de pacientes com determinadas manifestações clínicas.

Há ainda muitas questões em aberto no que concerne à caracterização da EM. Entre estas, a determinação dos fatores genéticos de risco. Além disto, os mecanismos implicados na imunopatologia têm sido enfocados em diversas pesquisas.

No presente trabalho são abordados alguns aspectos possivelmente implicados na suscetibilidade à EM. Antes de apresentar os resultados dos estudos específicos, é dada uma explanação prévia de alguns assuntos das áreas de imunologia e genética necessários ao entendimento dos tópicos abordados, seguida de um breve comentário sobre a doença propriamente dita. Por fim, são comentados os principais aspectos imunogenéticos que vêm sendo investigados atualmente.

1.1 - Objetivos

1. Apresentar, discutir e analisar alguns aspectos gerais e focar os mecanismos imunogenéticos implicados na EM;
2. Efetuar a análise estatística dos dados de diversos estudos populacionais em gêmeos, a fim de se estimar a contribuição do componente genético na etiologia da EM;
3. Analisar os resultados de diversos estudos populacionais de associação entre MHC e EM;
4. Comparar os resultados dos diversos autores, evidenciando as causas das divergências;
5. Apresentar sugestões que visem ao aprimoramento dos trabalhos futuros e algumas perspectivas com vista ao diagnóstico e tratamento da EM.

1.2 - Justificativa

A EM é a doença desmielinizante mais comum do SNC entre as populações caucasóides. Dada a sua natureza multifatorial, o estudo da EM é dificultado pela grande complexidade das interações entre os fatores genéticos e ambientais que influenciam na determinação desta doença. Por se tratar provavelmente de uma doença autoimune, as causas implicadas na indução e os mecanismos imunogenéticos responsáveis pela manutenção da EM vêm despertando o interesse de geneticistas e neuroimunologistas.

A inexistência de testes laboratoriais específicos e de sinais e sintomas exclusivos da EM dificultam o diagnóstico desta doença, constituindo-se num desafio que os médicos neurologistas têm enfrentado no dia-a-dia. A caracterização dos aspectos imunológicos e dos fatores genéticos implicados na suscetibilidade à EM será útil para o conhecimento da sua etiologia, com implicações óbvias no diagnóstico e tratamento.

Embora as pesquisas referentes à EM sejam abundantes, os resultados dos diversos autores são muitas vezes contraditórios ou inconclusivos. Uma abordagem comparativa dos dados desses trabalhos é útil para que se possa inferir de forma generalizada sobre a EM e possibilita uma análise das possíveis causas de divergência entre os diferentes autores.

1.3 - Metodologia

1.3.1 - Coleta de Dados

Os dados utilizados neste trabalho foram obtidos de diversas fontes bibliográficas buscadas através do sistema MEDLINE de intercâmbio computacional entre várias bibliotecas, incluindo-se dentre estas as principais das redes nacional e internacional. A maioria dos artigos citados nesta dissertação provêm da BIREME, uma biblioteca situada na capital São Paulo que concentra grande parte da bibliografia na área de saúde, da Faculdade Paulista de Medicina, e da Biblioteca do Hospital de Clínicas da UFPr. Outras referências foram enviadas de diversas localidades através do serviço de comutação bibliográfica (COMUT), e outras ainda foram gentilmente cedidas por profissionais ligados à área de neuroimunologia.

1.3.2 - Análise dos Dados Obtidos

Na apresentação dos resultados de estudos referentes à EM, procedeu-se a análise estatística dos dados de concordância em gêmeos, a fim de verificar se as diferenças entre os pares de gêmeos monozigóticos e dizigóticos são significativas. Em seguida, utilizando-se os mesmos dados, fêz-se uma estimativa do grau de herdabilidade da EM. A partir destas análises, pôde-se inferir a participação de um componente genético na etiologia da EM.

Os dados de estudos populacionais de associação entre antígenos HLA e a EM foram agrupados em tabelas, e os referentes às populações caucasóides foram submetidos ao cálculo do risco relativo, que representa a chance de um indivíduo com um determinado alelo HLA desenvolver a doença, comparado aos que não possuem o alelo em questão, num contexto populacional definido.

Ao final deste trabalho, foram discutidos diversos aspectos da imunopatologia da EM, bem como os resultados das análises dos dados de estudos genéticos. Foram feitos comentários a respeito das possíveis causas de divergência entre os diversos autores e dadas algumas sugestões para aplicação em trabalhos futuros. Ao mesmo tempo, foram lançadas hipóteses para tentar explicar as interações imunogenéticas implicadas na EM.

II - NOÇÕES PRELIMINARES

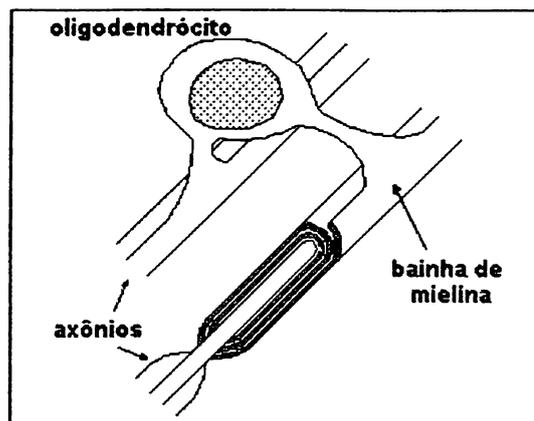
2.1 - Conhecimentos Elementares sobre o SNC

O SNC é constituído pelo encéfalo (cérebro e cerebelo) e pela medula espinhal. São estruturas delicadas que requerem proteção contra choques mecânicos e substâncias estranhas ou células imunocompetentes que possam causar-lhes danos. O encéfalo é envolto por membranas (meninges) e está confinado ao crânio. A massa encefálica é constituída de substância branca e cinzenta. Cérebro e cerebelo contêm substância branca em seu interior e substância cinzenta no córtex, enquanto que na medula a distribuição dessas substâncias é invertida. As principais células do tecido nervoso são os **neurônios**, que apresentam prolongamentos denominados axônios. Os neurônios são caracterizados por sua capacidade de produção e condução de uma descarga elétrica (impulso nervoso) em resposta a estímulos. Os axônios dos neurônios levam o impulso nervoso a grandes distâncias, cuja maior parte é percorrida dentro da substância branca. Cada axônio é isolado por uma **bainha de mielina**, composta de várias camadas de uma substância proteolipídica constituída predominantemente de mielina (HAM, 1972).

O isolamento elétrico dos axônios permite a condução saltatória do impulso nervoso e a redução da perda de corrente do axônio para o fluido tissular circundante durante a condução do impulso nervoso. Isto permite uma condução muito mais veloz nos axônios mielinizados do que nos não mielinizados. A destruição da bainha de mielina reduz drasticamente a velocidade de condução do impulso nervoso. Em consequência, ocorrem alterações motoras e sensoriais, podendo levar à inabilitação permanente devida a degeneração dos axônios desmielinizados (BRODAL, 1992).

Diversos outros tipos de células são encontrados no SNC. Tais tipos celulares, referidos como células da glia, são de crucial importância para o funcionamento dos neurônios e são agrupados em três categorias: 1) os **astrócitos** mantêm íntimo contato com os neurônios, com os quais realizam troca de substâncias, e formam uma camada contínua ao redor dos vasos sanguíneos e no lado interno das meninges; 2) os **oligodendrócitos** são responsáveis pela produção da mielina que envolve os axônios (figura 2.1); 3) as **células da micróglia** apresentam capacidade fagocítica e sua função parece estar relacionada com a remoção de "debris" do SNC após a destruição por trauma, isquemia ou inflamação (BRODAL, 1992).

Figura 2.1 - Produção da bainha de mielina. O oligodendrócito produz simultaneamente bainhas que revestem os axônios de vários neurônios. A bainha de mielina é composta de uma série de camadas sobrepostas e sua distribuição é descontínua ao longo dos axônios, permitindo a condução saltatória do impulso nervoso. (Adaptado de HAM, 1972.)



O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um líquido incolor que confere proteção ao SNC contra possíveis traumas mecânicos. Em situação normal, contém pequeno número de células ($1-5/\text{mm}^3$) e, comparado ao plasma, altas concentrações de íons Na^+ , Cl^- e Mg^{+2} e baixo teor de K^+ , Ca^{+2} e glicose (CARPENTER, 1991).

A vascularização do SNC é abundante, porém, altamente seletiva. A sobrevivência dos neurônios depende da manutenção estrita da composição físico-química adequada ao seu funcionamento. O sistema que regula a troca de materiais entre o cérebro, o LCR e o sangue é designado barreira hematoencefálica (BHE). Em condições normais, o trânsito das células imunocompetentes no SNC é contido pela BHE, que impede o acesso dos clones de células com potencial autorreativo aos antígenos tecido-específicos do SNC, para os quais não há tolerância imunológica. A BHE é constituída pela camada de células endoteliais dos vasos cerebrais, pela membrana basal e pelas células da glia perivasculares (figura 2.2). A parede dos capilares sanguíneos do SNC é constituída de uma camada contínua de células endoteliais estreitamente conectadas umas às outras, dificultando a difusão de solutos (CARPENTER, 1991).

2.2 - Sistema Imune

2.2.1 - Conceitos Gerais

Aos microorganismos e às moléculas que induzem uma resposta imune no hospedeiro dá-se o nome genérico de **antígeno**. A expressão **epítipo**, ou **determinante antigênico**, é usada para designar os segmentos específicos dessas moléculas que interagem com os receptores de membrana das células imunocompetentes ou para designar os pontos específicos do antígeno aos quais se

ligam os anticorpos. Os **anticorpos**, ou **imunoglobulinas**, são glicoproteínas produzidas pelos plasmócitos em resposta a um estímulo antigênico, que apresentam alta afinidade para o antígeno que induziu a sua formação.

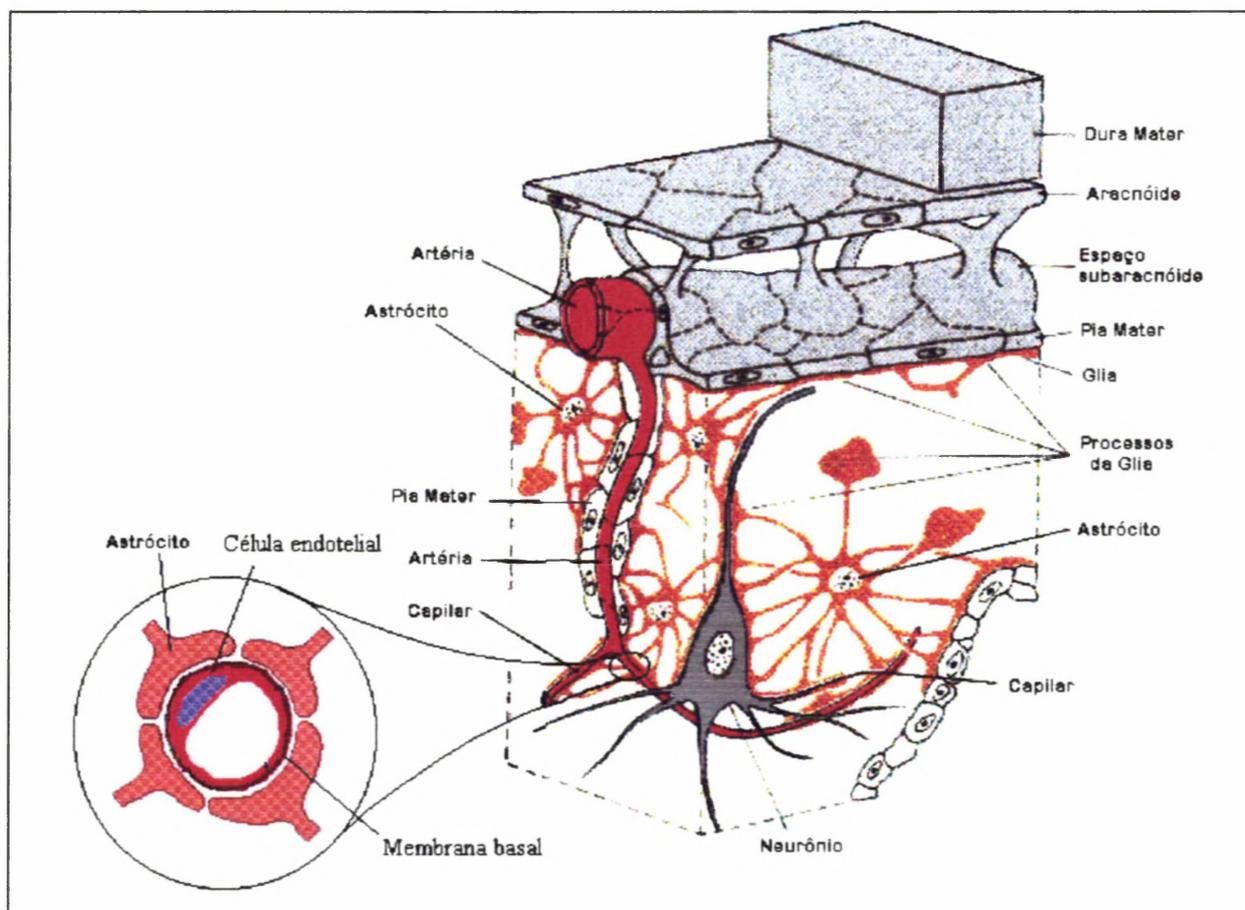


Figura 2.2 - Barreira hematoencefálica. (Adaptado de BRODAL, 1992.)

Para que os anticorpos possam atuar eficientemente na lise de células infectadas, é ativado um conjunto de proteínas séricas que é denominado de **complemento**. O complemento possui uma segunda via de ativação, que é feita através de moléculas presentes na superfície de microorganismos. As proteínas do complemento estão inicialmente em estado inativo e, ao serem clivadas, adquirem atividade enzimática. Alguns fragmentos dessas proteínas atuam como **agentes quimiotáticos**, cuja função é atrair as células imunocompetentes para o local da infecção, ou como **opsoninas**, que encobrem a superfície do microorganismo invasor, facilitando a fagocitose. O produto final de ativação de ambas as vias do complemento é um complexo enzimático de ataque à membrana, responsável pela lise de células heterólogas. As proteínas do complemento estão presentes em todos os processos inflamatórios onde, além das funções já

mencionadas, aumentam a permeabilidade dos vasos sangüíneos, facilitando o fluxo dos elementos celulares e humorais para o local da infecção.

Citocina é um termo genérico para moléculas solúveis, mediadoras de interação celular, secretada por diversos tipos celulares (ROITT *et al.*, 1992). Dentre as principais citocinas, citam-se as interleucinas de diversos tipos e funções, cada qual designada por um número (ex. IL-1, IL-2, IL-3), o fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) e o interferon, cujos subtipos são também designados por letras gregas (ex. INF- β , INF- γ).

Órgãos ou tecidos linfóides são os locais onde se concentram as células do sistema imune. São denominados **órgãos linfóides primários** os locais de produção e amadurecimento dos linfócitos que, nos mamíferos, correspondem ao fígado fetal, à medula óssea e ao timo. Dá-se o nome de **órgãos linfóides secundários**, ou **periféricos**, aos locais para onde migram os linfócitos maduros e onde estas células poderão entrar em contato com os antígenos e interagir entre si. Para tanto, estes órgãos estão situados em locais estratégicos do organismo, como as placas de Peyer no intestino e as amígdalas na cavidade oral, que são as principais portas de entrada de microorganismos invasores. Além destes já mencionados, são considerados órgãos linfóides periféricos o baço e os linfonodos.

2.2.2 - Células do Sistema Imune

As células do sistema imune originam-se na medula óssea a partir de uma célula-tronco pluripotente (figura 2.3). Esta célula primordial gera duas linhagens distintas de células: a linhagem linfóide diferencia-se nos linfócitos T e B, enquanto que a linhagem mielóide origina as demais células do sistema imune: monócitos, macrófagos, mastócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas, além dos eritrócitos.

Os linfócitos T são uma população heterogênea de células com funções distintas e marcadores de membrana próprios. As células T recém-produzidas migram da medula óssea para o timo, onde completam seu amadurecimento e se diferenciam nas subpopulações de linfócitos T auxiliar, citotóxico e supressor (ROITT *et al.*, 1992). Os linfócitos T auxiliares, que expressam a proteína CD4 na sua membrana, desempenham um papel central na regulação das respostas imunes; sua função é denunciar a presença de um antígeno e atrair as células implicadas na eliminação deste antígeno para o local da infecção.

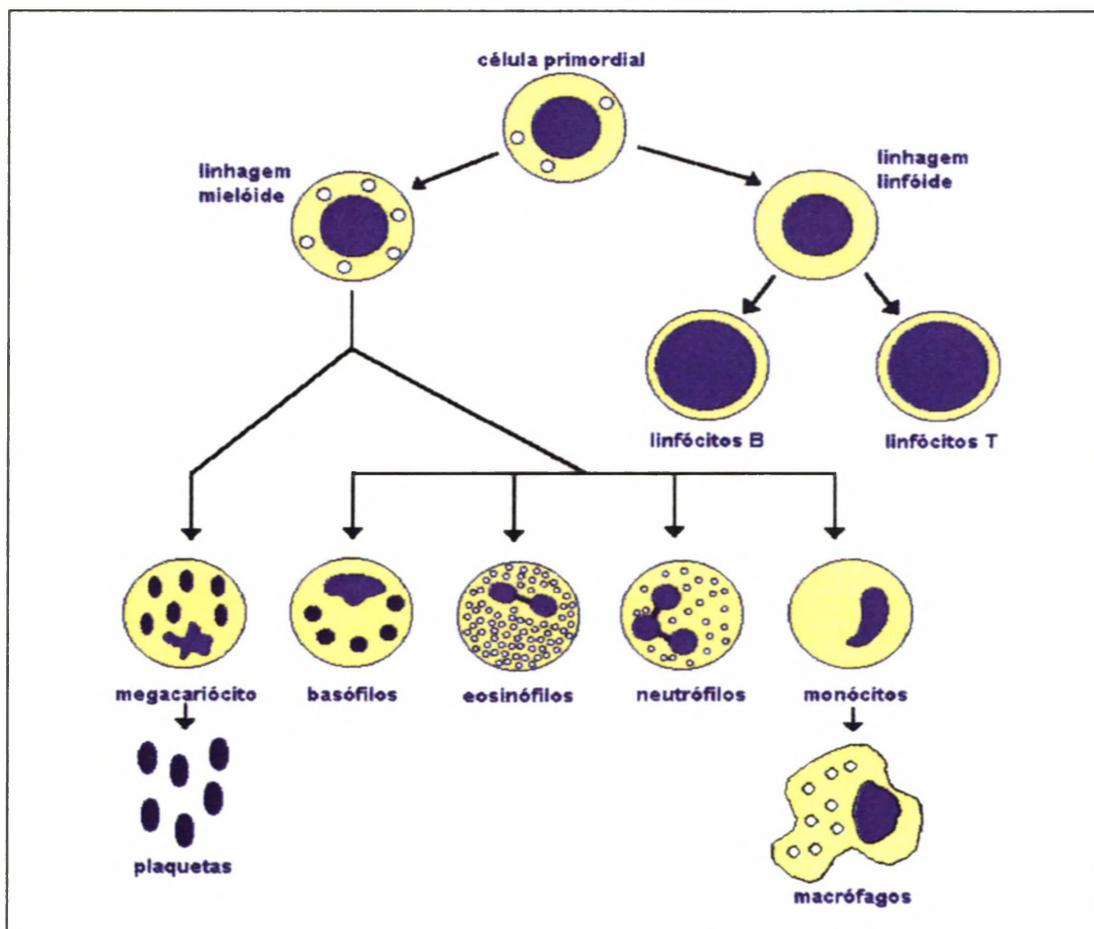


Figura 2.3 - Células do sistema imune. Todas as células do sistema imune são derivadas de uma célula primordial pluripotente na medula óssea, a qual se divide originando duas linhagens distintas de células. A linhagem linfóide origina os linfócitos T e B, enquanto que a linhagem mielóide origina as demais células do sistema imune, além dos eritrócitos. Estes últimos não estão mostrados no esquema. (Adaptado de ABBAS *et al.* 1994.)

O reconhecimento do antígeno ocorre por intermédio de receptores de membrana específicos designados receptores de células T (TCR). Os TCRs dos linfócitos T auxiliares interagem com os complexos antígeno-MHC de classe II na superfície das células apresentadoras de antígeno (CAA). A molécula CD4 contribui para aumentar a adesão entre as células e envia sinais intracitoplasmáticos para a ativação dos linfócitos após o reconhecimento do antígeno (ABBAS *et al.*, 1994).

Há duas subpopulações de linfócitos T auxiliares, designadas Th1 e Th2, as quais podem ser acionadas em situações distintas, uma vez que estas subpopulações de células T CD4 diferem ligeiramente entre si quanto à função. As células Th1 produzem IL-2, IL-3, TNF- β , INF- γ e participam das respostas inflamatórias, enquanto as células Th2 produzem IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e TNF- β . Ao contrário das células Th1, as células Th2 não dependem de IL-2 para a sua proliferação autócrina (OKSENBERG, 1994).

Os linfócitos T citotóxicos $CD8^+$, por sua vez, têm a importante incumbência de lisar as células infectadas. Podem interagir diretamente com as células-alvo através do reconhecimento de complexos antígeno-MHC de classe I na superfície dessas células, ou indiretamente em resposta aos estímulos provenientes dos linfócitos T auxiliares. Células T supressoras $CD8^+$, por fim, inibem a função efetora dos linfócitos T citotóxicos após cessado o estímulo antigênico, além de garantir a supressão das células com potencial autorreativo que eventualmente estejam presentes na circulação. A molécula CD8 tem função acessória semelhante à molécula CD4. Ambas passam a ser expressas durante a passagem dos linfócitos pelo timo, juntamente com os TCRs e outras moléculas acessórias da membrana celular dos linfócitos T.

Os linfócitos B saem já maduros da medula óssea, indo para a circulação ou concentrando-se nos linfonodos e em outros órgãos e tecidos linfóides periféricos, para onde convergem também os linfócitos T maduros. Após receberem um estímulo antigênico, diferenciam-se em plasmócitos e secretam os anticorpos específicos para o antígeno em questão. Podem ser estimulados diretamente pelo antígeno ou indiretamente através das citocinas secretadas pelos linfócitos T auxiliares.

A descrição detalhada de cada tipo celular da linhagem mielóide foge ao escopo deste trabalho. Destacam-se dentre estas, as que apresentam capacidade de realizar a fagocitose, quais sejam, monócitos, macrófagos e neutrófilos.

As CAA expressam simultaneamente moléculas MHC de classe I e de classe II na membrana citoplasmática. Ao ser infectada, uma CAA apresenta os peptídeos antigênicos associados às moléculas MHC de classe II aos linfócitos T auxiliares $CD4^+$, cujos receptores de membrana são específicos para fazer o reconhecimento dos complexos peptídeo-MHC em questão. Em resposta ao estímulo antigênico, os linfócitos T auxiliares proliferam-se e liberam citocinas que ativam as células fagocíticas, induzem a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e a proliferação de clones de linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ específicos, os quais são atraídos por quimiotaxia para o local da infecção. Os linfócitos B, após a diferenciação em plasmócitos, secretam os anticorpos que ativam as proteínas do sistema complemento. Juntos, anticorpos e complemento fazem a opsonização e a lise das células infectadas. Da mesma forma, os linfócitos T citotóxicos lisam as células infectadas por ação enzimática. A interação das CAA com os linfócitos T citotóxicos pode ser feita diretamente sem o auxílio das células $CD4^+$. Neste caso, a CAA apresenta os peptídeos antigênicos associados a moléculas MHC de classe I na sua superfície, os quais interagem com os receptores de membrana específicos dos linfócitos T citotóxicos (figura 2.4).

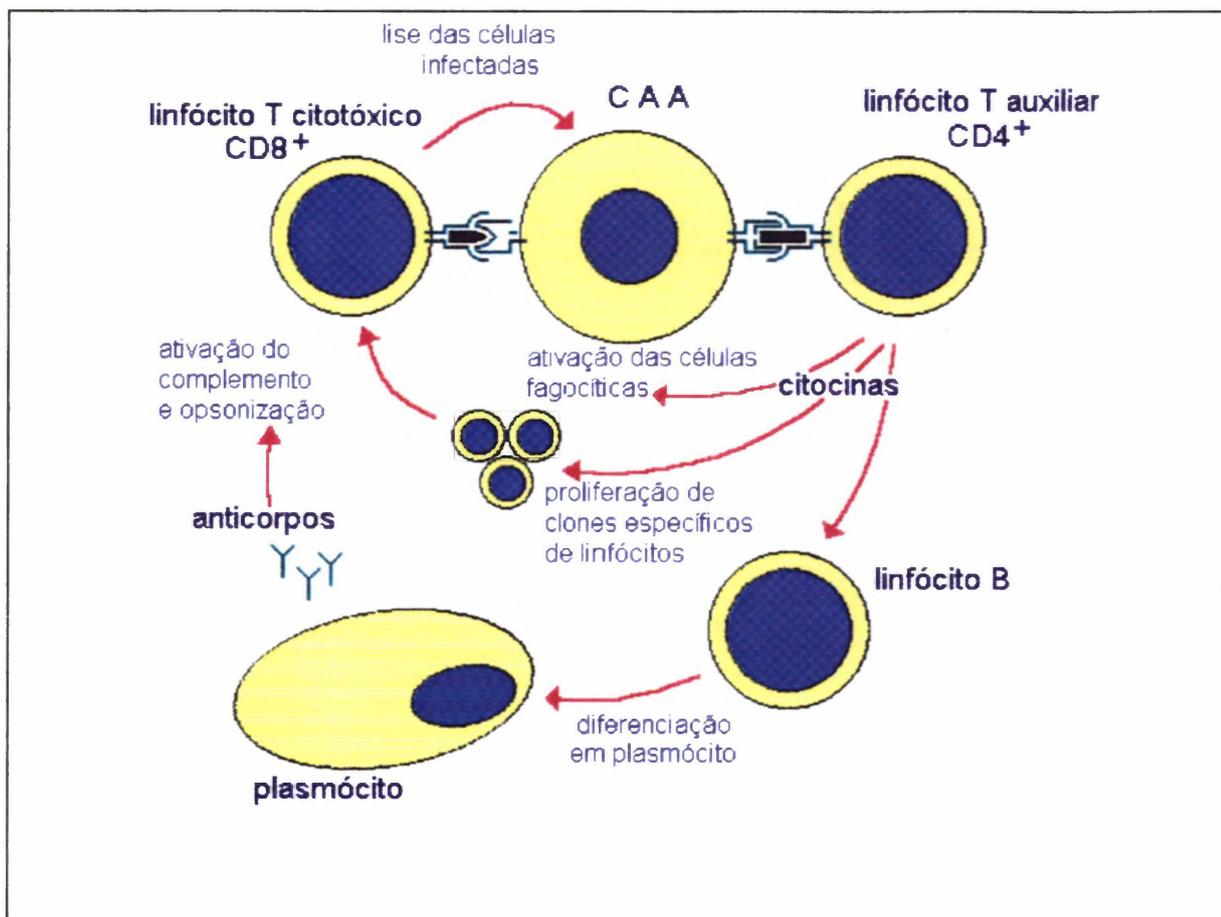


Figura 2.4 - Interações entre as células do sistema imune envolvendo a apresentação de antígenos associados às moléculas HLA de classe I e de classe II.

2.2.3 - Noções Gerais sobre Autoimunidade

Uma das propriedades mais importantes do sistema imune é a sua capacidade de distinguir as moléculas próprias das não-próprias do organismo. Contra estas últimas, reconhecidas como estranhas e potencialmente prejudiciais, o sistema imune reage ativamente, através da produção de anticorpos e da ativação de células contendo receptores de membrana específicos para essas moléculas. Em relação à maioria das moléculas próprias, o sistema imune mantém-se num estado de ausência de reatividade, denominado **tolerância imunológica** ou autotolerância. Ao nascer, cada indivíduo herda um conjunto de genes que codificam os receptores de membrana para vários antígenos. Esses genes recombina-se, e seus produtos são expressos na membrana celular dos linfócitos, independente de sua especificidade para antígenos próprios ou estranhos. Em consequência, alguns linfócitos imaturos poderão expressar receptores capazes de interagir também com moléculas próprias.

A fim de impedir a ocorrência de uma possível ação autodestruidora, o organismo deve, então, encontrar meios de manutenção da autotolerância. Os mecanismos de manutenção da tolerância imunológica incluem: 1) a deleção de linfócitos T com potencial autorreativo no timo, local onde essas células são apresentadas à maioria das moléculas próprias; 2) a deleção dos linfócitos B com potencial autorreativo na medula óssea; 3) a supressão da autorreatividade das células T e B periféricas, que eventualmente escapam à deleção, através da liberação de mediadores químicos por outros tipos celulares (ABBAS *et al.*, 1994).

A autoimunidade é decorrente de uma resposta imunológica contra o próprio organismo, levando à injúria dos tecidos e das células que contêm as moléculas que são os alvos da autoagressão. A estas moléculas dá-se o nome de **autoantígenos**, por serem capazes de induzir uma resposta imune em que há participação de células autorreativas e produção de **autoanticorpos**. Os mecanismos de indução da autoimunidade vêm sendo objeto de muitos estudos. Em condições normais, o organismo consegue manter um equilíbrio entre as forças opostas. Se por um lado muitas células autorreativas são eliminadas no timo, por outro lado alguns tipos celulares com capacidade de autorreatividade sempre estão presentes na circulação. Tais células, contudo, normalmente não causam danos ao organismo por estarem sob efeito imunossupressor. A presença de alguns tipos celulares com potencial autorreativo é esperada, uma vez que não são apresentadas no timo todas as moléculas próprias do organismo, como aquelas cuja expressão é tecido-específica.

A autorreatividade implica no reconhecimento de moléculas próprias como antígenos estranhos pelos linfócitos T citotóxicos, os quais são induzidos a se proliferar e lisam as células que expressam tais moléculas, e na produção de autoanticorpos pelos linfócitos B ativados. Também as células fagocíticas podem tomar parte no processo autorreativo, englobando e destruindo as células que apresentam tais antígenos em sua superfície. Estas respostas podem ser dependentes ou não do reconhecimento prévio pelos linfócitos T auxiliares, que liberam mediadores químicos (citocinas) que ativam diversos outros tipos celulares.

Os principais fatores que podem contribuir para o desencadeamento da resposta autoimune são: 1) injúria aos tecidos e inflamação que levam à liberação de autoantígenos ou à alteração estrutural do autoantígeno; 2) deleção deficiente dos clones de linfócitos autorreativos; 3) ativação policlonal de linfócitos autorreativos; 4) reação cruzada do antígeno com moléculas próprias; 5) herança de genes implicados nas doenças autoimunes.

Há atualmente uma lista extensa de doenças de natureza autoimune, cujos fatores de indução da autoimunidade e os mecanismos imunológicos envolvidos vêm sendo intensivamente investigados em cada caso. Na tabela 2.1 são mostrados alguns exemplos de doenças autoimunes, com os respectivos autoantígenos e mecanismos efetores responsáveis pela patogênese.

Tabela 2.1 - Exemplos de doenças autoimunes com os respectivos autoantígenos e principais mecanismos efetores. (ROITT *et al.*, 1992; ABBAS *et al.*, 1994.)

Doença	Autoantígeno	Mecanismo efetor
lupus eritematoso sistêmico	DNA e nucleoproteínas	anticorpo
miastenia grave	receptor da acetilcolina	anticorpo e células T
glomerulonefrite (síndrome de Goodpasture)	colágeno tipo IV	anticorpo, complemento e neutrófilos
diabete melitus insulina-dependente	receptor da insulina	anticorpo
encefalomielite alérgica experimental	MBP, PLP	células T
tireoidite de Hashimoto	tireoglobulina	anticorpo

2.3 - Sobre o HLA

O MHC da espécie humana é designado HLA (do inglês Humam Leukocyte Antigen). A região HLA está localizada no braço curto do cromossomo 6 humano, banda 6p21.3 (LAMM e OLAISEN, 1985) ocupando um segmento de cerca de 4 cM, equivalente a aproximadamente 3500 kb do DNA. As moléculas HLA estão subdivididas em três classes de acordo com a sua estrutura e função, e os genes que as codificam estão distribuídos numa ordem determinada ao longo do cromossomo. A região de classe I é mais telomérica, a de classe II está localizada mais próxima ao centrômero, e a de classe III é intermediária a essas duas (figuras 2.5 e 2.6). Os produtos dos genes HLA de classe I e de classe II são glicoproteínas de membrana, cuja função primordial é a apresentação de antígenos na superfície das células e, em última análise, a regulação das respostas imunes. O complexo HLA é um sistema altamente polimórfico, que compreende vários genes codominantes e apresenta grande diversidade de alelos para cada loco. Ao conjunto dos genes HLA herdados no mesmo cromossomo, dá-se o nome de **haplótipo**. Há pouca recombinação entre esses genes. Frequentemente alguns genes HLA, localizados muito próximos, são her-

dados em conjunto numa frequência maior da que seria esperada considerando-se as frequências individuais de cada um desses genes numa determinada população, um fenômeno designado **desequilíbrio de ligação** (ABBAS *et al.*, 1994).

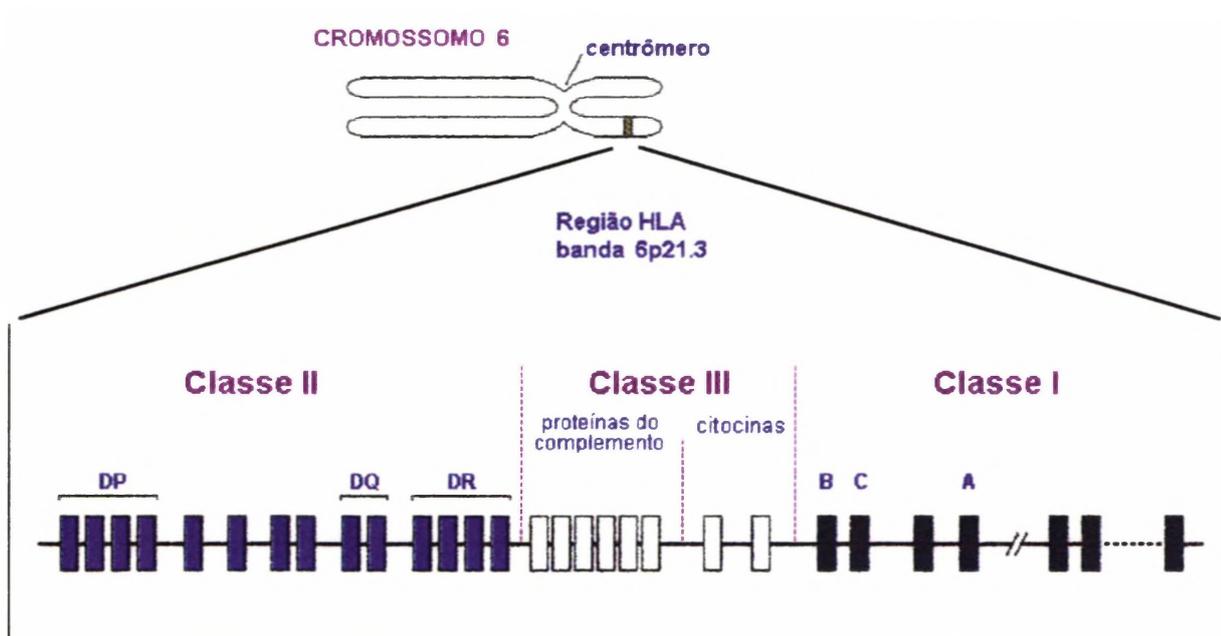


Figura 2.5 - Localização cromossômica da região HLA.

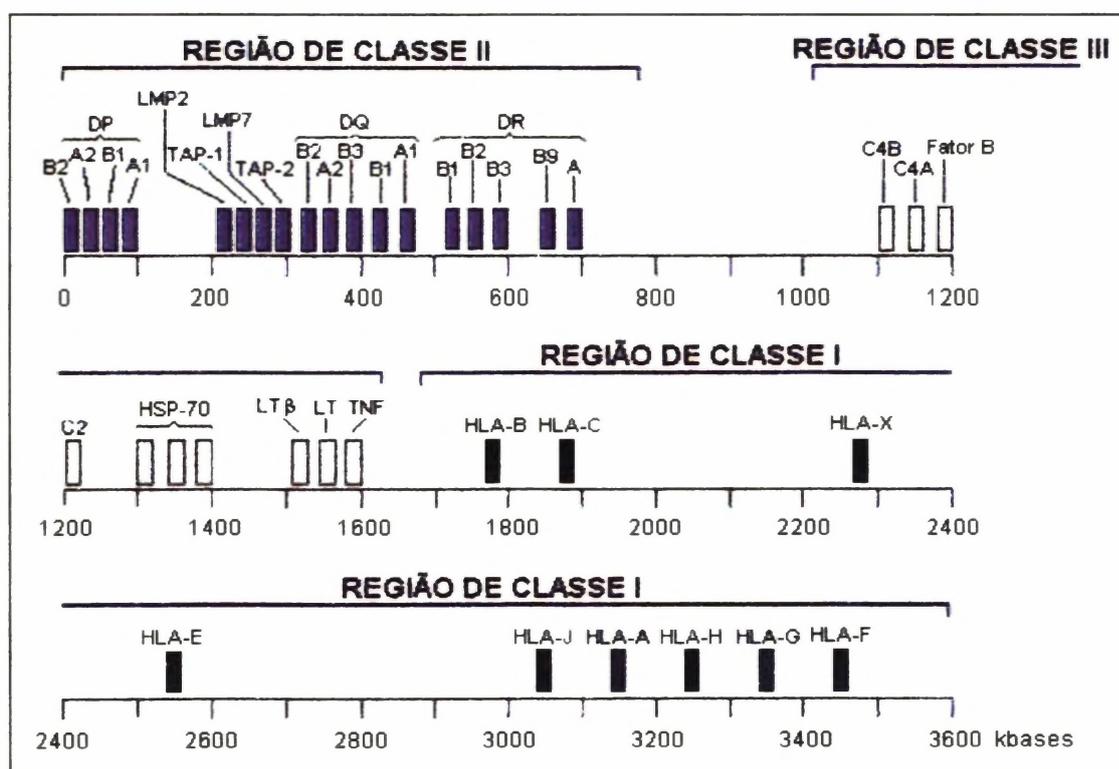


Figura 2.6 - Mapa simplificado da região HLA. (Adaptado de ABBAS *et al.*, 1994.)

As principais moléculas HLA de classe I são designadas HLA-A, -B e -C, sendo heterodímeros constituídos de duas cadeias polipeptídicas: a cadeia α , de aproximadamente 44 kD e a β_2 -microglobulina de peso molecular em torno de 12 kD (STITES e TERR, 1992). Esta última é praticamente invariável em toda a sua extensão, e é codificada por um gene localizado no cromossomo 15 humano. A cadeia α , por sua vez, apresenta três porções distintas: extracelular, transmembrana e citoplasmática. A extremidade aminoterminal da molécula fica na porção extracelular, enquanto que a extremidade carboxilterminal é intracitoplasmática. A região de ligação com o antígeno é altamente variável, envolvendo os módulos α_1 e α_2 na extremidade aminoterminal (figura 2.7). Ambas as cadeias estão associadas de forma não-covalente, sendo que a β_2 -microglobulina é totalmente extracelular e não participa da ligação com o antígeno, porém a sua presença parece conferir maior estabilidade à molécula. Vários outros genes estão incluídos na região de classe I (figura 2.6), porém ainda estão pouco estudados.

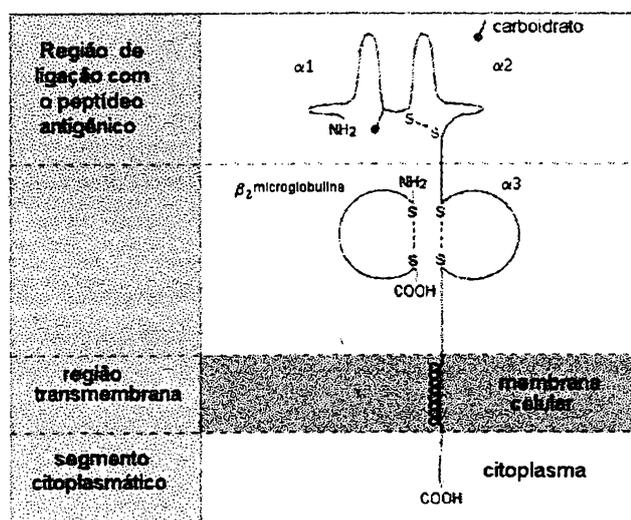


Figura 2.7 - Representação esquemática da molécula HLA de classe I. (Adaptado de ABBAS *et al.*, 1994.)

As moléculas HLA de classe II também são constituídas de duas cadeias polipeptídicas, designadas α (PM ~ 34 kD) e β (PM ~ 29 kD) (figura 2.8), ambas codificadas por genes do cromossomo 6 humano. Da mesma forma que as moléculas de classe I, as moléculas HLA de classe II apresentam três porções distintas: extracelular, transmembrana e citoplasmática. Contudo, nas moléculas de classe II a região de ligação com o antígeno envolve os módulos α_1 e β_1 , que correspondem à extremidade aminoterminal de seqüência altamente variável das cadeias α e β , respectivamente. A expressão das moléculas de classe II é limitada a determinados tipos celulares, como linfócitos B, monócitos, macrófagos, células de Langerhans e células dendríticas, enquanto que as de classe I são expressas em quase todas as células nucleadas. As células que normal-

mente expressam moléculas HLA de classe II recebem o nome genérico de **células apresentadoras de antígeno (CAA)** e, naturalmente, expressam também as moléculas de classe I (ABBAS *et al.*, 1994).

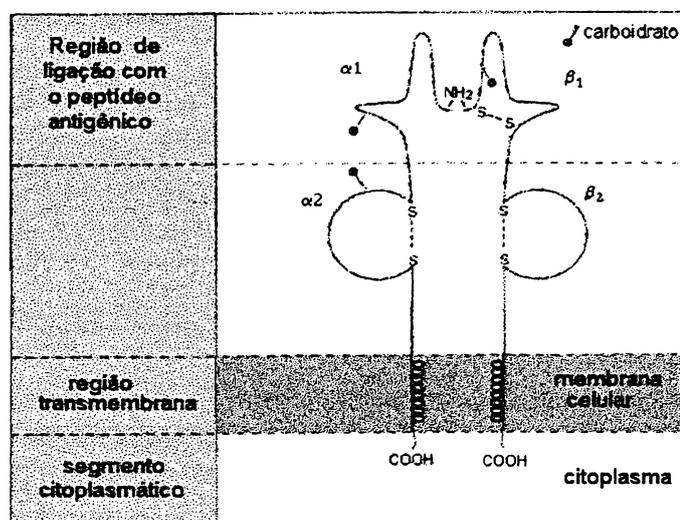


Figura 2.8 - Representação esquemática da molécula HLA de classe II. (Adaptado de ABBAS *et al.*, 1994.)

Em relação às células do SNC, WEBER *et al.* (1994) encontraram que os astrócitos expressam constitutivamente em sua membrana moléculas MHC de classe I e normalmente não expressam as de classe II. Porém, após indução com citocinas como IL-1, INF- γ e TNF- α , tais células podem passar a produzir também moléculas MHC de classe II, tornando-se capazes de apresentar antígenos, cuja expressão é limitada ao SNC. Neurônios e oligodendrócitos não expressam moléculas MHC e aparentemente são resistentes à indução por citocinas (WUCHERPFENNIG, 1994). GRAEBER *et al.* (1992) mencionam a existência de células fagocíticas expressando MHC de classe II ao redor dos vasos sanguíneos no cérebro de pessoas normais, correspondendo provavelmente às células da micróglia. Tais células são muito semelhantes aos macrófagos, possuem receptores para imunoglobulinas e para o fragmento C3b do complemento, e são também encontradas no parênquima do SNC (SMITH e SOMMER, 1992).

A região de classe II inclui as subregiões HLA-DP, -DQ e -DR, cada qual contendo genes A e genes B, que codificam as cadeias α e β da molécula HLA de classe II, respectivamente (figura 2.6). Diversos outros genes foram identificados dentro da região de classe II, cuja função é desconhecida ou estão implicados indiretamente na apresentação de antígenos, como os genes da proteína transportadora (TAP) e da protease multifuncional (LMP). Os genes TAP e LMP codificam produtos envolvidos no **processamento** de antígenos. Este termo refere-se ao processo de clivagem das proteínas antigênicas reduzindo-as a peptídeos de 8-15 aminoácidos, os quais se associam intracelular-

mente às moléculas HLA e são expressos na superfície das células. As proteínas LMP são subunidades de um complexo enzimático localizado no citosol, envolvido na degradação de proteínas sintetizadas endogenamente, como as proteínas próprias e as virais. As proteínas TAP são responsáveis pelo transporte de peptídeos através do retículo endoplasmático, possibilitando a associação destes com as moléculas HLA de classe I. Os complexos peptídeo-HLA expressos na superfície das células infectadas são reconhecidos por células T com receptores específicos que finalmente desencadeiam uma resposta imune. Linfócitos T auxiliares $CD4^+$ reconhecem complexos peptídeo-HLA de classe II da superfície das CAA, enquanto os linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ reconhecem complexos peptídeo-HLA de classe I na membrana das células-alvo (figura 2.9).

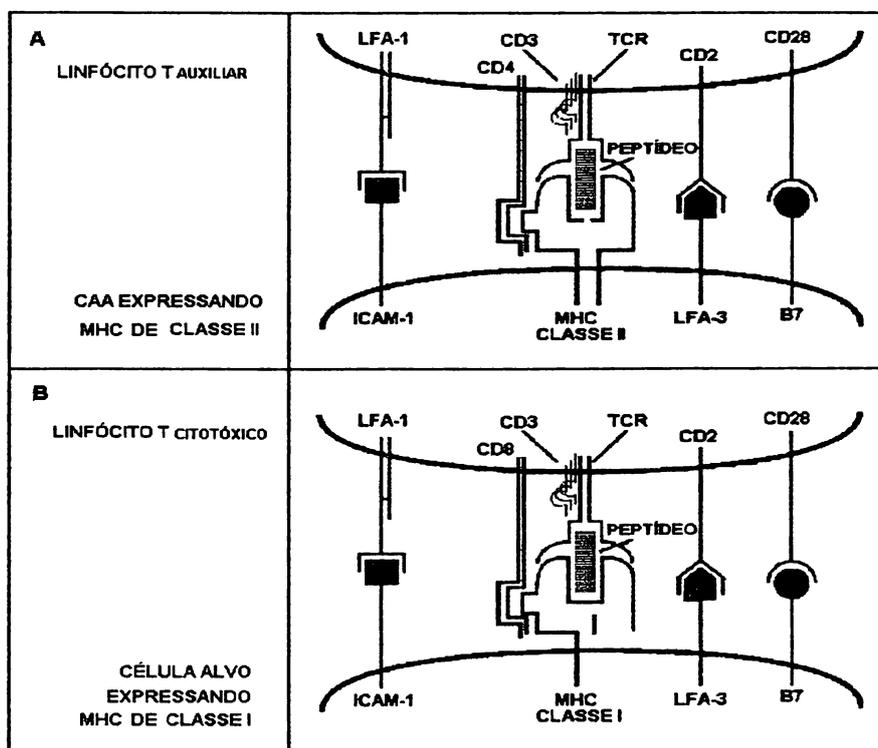


Figura 2.9 - Apresentação de antígeno aos linfócitos T auxiliares (A) e aos linfócitos T citotóxicos (B), evidenciando o complexo trimolecular MHC-antígeno-TCR e moléculas acessórias. (Adaptado de ABBAS *et al.*, 1994.)

A região de classe III compreende genes que codificam moléculas com função diversa das de classe I e II, como as proteínas C2 e C4 e o fator B do complemento, além da 21-hidroxilase, do fator de necrose tumoral (TNF) e da proteína de choque térmico hsp70, dentre outras (figura 2.6).

A tipagem HLA pode ser feita por diferentes métodos: **celular**, através da reação mista de linfócitos (RML), **sorológico**, através do teste de microlinfocitotoxicidade que utiliza antissoros contendo anticorpos contra diversas especificidades HLA contra um painel de células do paciente em estudo e **molecular**, através da utilização das técnicas de RFLP, PCR-SSO, SOUTHERN, dot blot e seqüenciamento. De acordo com a técnica adotada e a época em que foi empregada, pode-se fazer referência a nomenclaturas distintas. Por exemplo, em relação às especificidades da região HLA de classe II, a tipagem feita pela RML deu origem à série Dw (Dw1-Dw26). A partir da década de 70, a tipagem sorológica subdividiu as especificidades Dw em DR, DQ e DP. E mais recentemente, através da tipagem molecular ao nível do DNA, tem-se a especificação dos alelos concernentes a cada uma dessas especificidades sorológicas. Sabe-se atualmente que há, por exemplo, pelo menos 71 diferentes alelos DRB, 10 DQA e 21 DQB. Os alelos HLA são nomeados segundo regras internacionais divulgadas em *workshops*, colocando-se um asterisco seguido de um número após o nome da região genômica à que se refere (HILLERT, 1994).

Algumas especificidades sorológicas correspondem, na verdade, a um grupo de moléculas HLA com segmentos em comum e estrutura muito semelhante que, não raro, reagem aos mesmos antissoros. Assim, por exemplo, a especificidade HLA-DR2 é subdividida em DR15 e DR16, e a especificidade HLA-DQ1 é também subdividida em DQ5 e DQ6. Tais subdivisões se baseiam na reatividade sorológica cruzada entre as diversas especificidades (STITES e TERR, 1992). O conhecimento dos grupos de reatividade cruzada é de crucial importância na interpretação dos resultados das tipagens HLA para os estudos de associação. Na tabela 2.2 são apresentados alguns principais grupos de reatividade cruzada, fazendo-se menção às especificidades originais e às derivadas destas.

Existem vários relatos de associação do MHC com doenças. O MHC, contudo, não é o fator único decisivo na manifestação dessas doenças, constituindo apenas um fator de risco. Diversas doenças autoimunes apresentam associação positiva com especificidades HLA. Como se pode notar a partir dos dados da tabela 2.3, a mesma especificidade HLA pode estar associada a diversas doenças. Da mesma forma, uma doença pode estar associada à diversas especificidades HLA, cada qual conferindo um risco relativo diferente.

Tabela 2.2 - Grupos de reatividade cruzada dos antígenos HLA (STITES e TERR, 1992).

Especificidades amplas	Subdivisões
A9	A23, A24
A10	A25, A26, A34, A66
A19	A29, A30, A31, A32, A33, A74
A28	A68, A69
B5	B51, B52
B12	B44, B45
B14	B64, B65
B15	B62, B63, B75, B76, B77
B16	B38, B39
B17	B57, B58
B21	B49, B50
B22	B54, B55, B56
B40	B60, B61
B70	B71, B72
C3	C9, C10
DR2	DR15, DR16
DR3	DR17, DR18
DR5	DR11, DR12
DR6	DR13, DR14
DQ1	DQ5, DQ6
DQ3	DQ7, DQ8, DQ9

Tabela 2.3 - Exemplos de doenças autoimunes associadas ao HLA em populações caucasóides. RR~ = risco relativo aproximado.(STITES e TERR, 1992.)

Doença	Fenótipo HLA	RR ~
Artrite reumatóide	DR4	6
Diabete melitus insulina - dependente	DR2	0,25
	DR3	5
	DR4	6,3
	DR3 / DR4	20
	DQ8	31,8
Doença celíaca	DR3	12
Doença de Graves	DR3	3,8
Espondilite anquilosante	B27	81,8
Hepatite crônica	DR3	14
Lupus eritematoso sistêmico	DR3	2,7
	C4Adel	5,5
Pênfigo vulgar	DR4	24
Síndrome de Sjögren	DR3	10

2.4 - Sobre o TCR

A molécula de TCR apresenta certa homologia de seqüência e estrutura semelhante às moléculas MHC. Este tipo de estrutura foi originalmente identificada nas imunoglobulinas e, ao conjunto das proteínas de membrana que apresentam grande homologia com as imunoglobulinas, dá-se o nome de **superfamília das imunoglobulinas** (figura 2.10). Acredita-se que tais proteínas evoluíram a partir de um único gene ancestral. São membros da superfamília das imunoglobulinas as moléculas de imunoglobulinas propriamente ditas, TCR, MHC, CD4, CD8 e ICAM, dentre outras (ABBAS *et al.*, 1994).

Os linfócitos T fazem o reconhecimento dos complexos antígeno-MHC através de receptores de membrana específicos, denominados TCRs (do inglês T-cell receptors). Cada molécula de TCR é constituída de duas cadeias polipeptídicas designadas α e β ou γ e δ . Cerca de 95% das células T circulantes expressam TCR $\alpha\beta$ e apenas 5% expressam TCR $\gamma\delta$ (HOHLFELD *et al.*, 1995). O TCR é uma glicoproteína de membrana que apresenta uma região variável (V) aminoterminal, que se liga ao complexo antígeno-MHC, e uma região constante (C), que apresenta uma porção transmembrana e um curto segmento citoplasmático carboxilterminal.

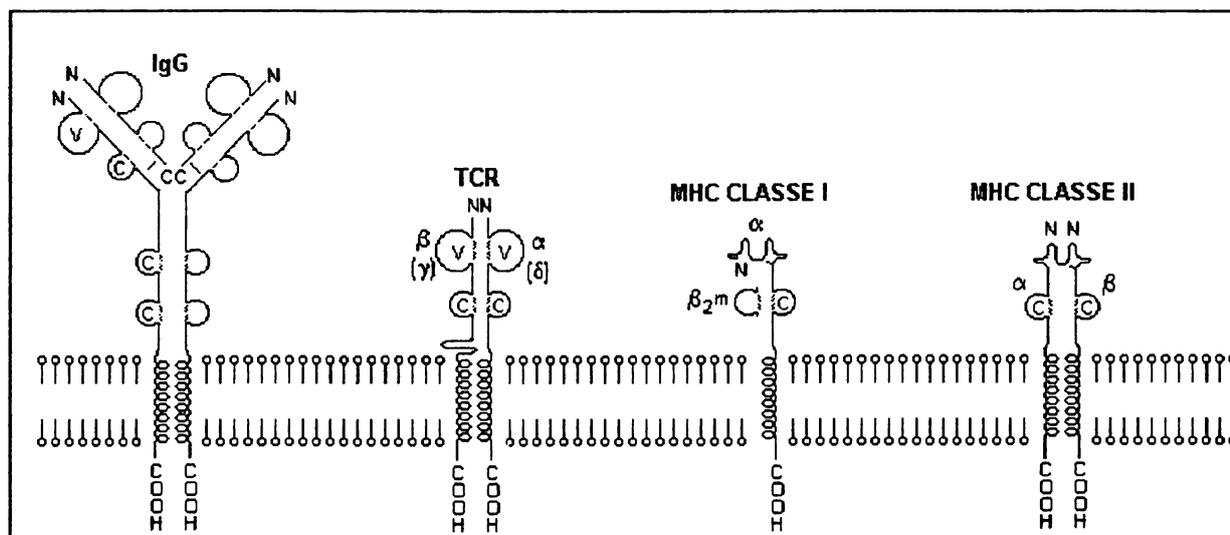


Figura 2.10 - Membros da superfamília das imunoglobulinas. V = região variável; C = constante; N = grupamento amino. COOH = grupamento carboxila; β_{2m} = β_2 microglobulina. (Adaptado de ABBAS *et al.*, 1994.)

A região de ligação com o antígeno apresenta grande variabilidade quanto à seqüência de aminoácidos e é codificada por um conjunto de genes que se recombina, possibilitando a formação de TCRs de diversas especificidades (figura 2.11). Além dos rearranjos somáticos que ocorrem entre os genes que

codificam a região variável dos TCRs durante a maturação das células T no timo, há outros mecanismos que contribuem para a grande variabilidade dos TCRs, como: a) a herança de múltiplos genes numa seqüência definida ao longo do cromossomo; b) a adição de nucleotídeos por ação enzimática a determinados segmentos gênicos; c) o pareamento das cadeias ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$).

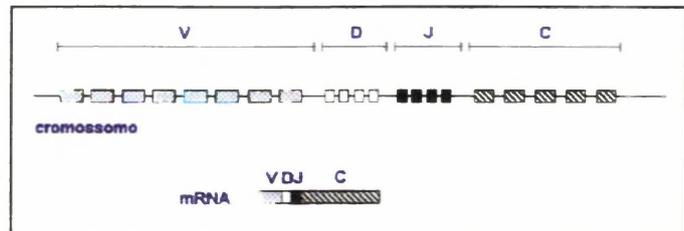


Figura 2.11 - Formação do mRNA do TCR. (Adaptado de TIENARI, 1994.)

Em humanos, os genes que codificam as cadeias α e δ estão localizados no cromossomo 14, enquanto as cadeias β e γ são codificadas por genes do cromossomo 7 (ABBAS *et al.*, 1994). Os genes TCR estão subdivididos em segmentos V (*variable*), D (*diversity*), J (*joining*) e C (*constant*), que codificam módulos distintos das cadeias de TCR. A região V das cadeias de TCR α e γ é codificada pelos segmentos gênicos V e J, enquanto a região V das cadeias TCR β e δ é codificada pelos segmentos gênicos V, D e J. A região C de todas as cadeias de TCR é subdividida em porções designadas C (*constant*), H (*hinge*), TM (*transmembrane*) e CY (*cytoplasmic*) (figura 2.12).

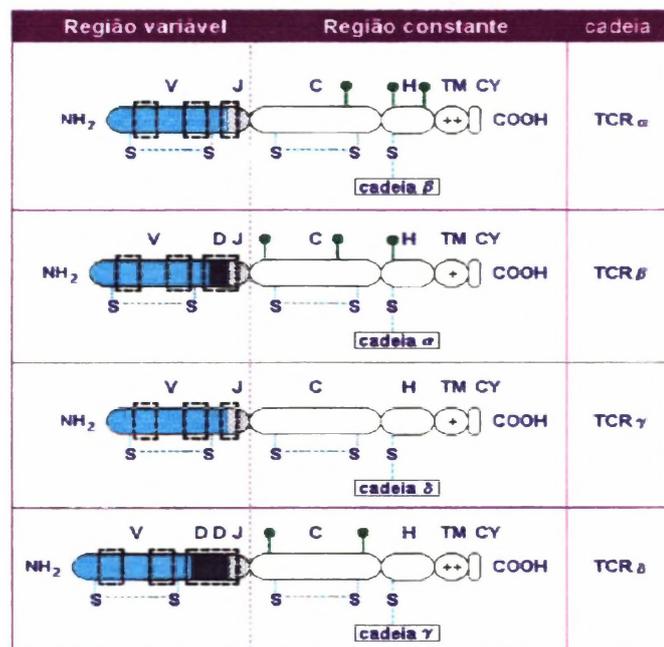


Figura 2.12 - Correspondência entre os segmentos gênicos e a região variável das cadeias de TCR. A região variável das cadeias α e γ são codificadas pelo segmento V e J. As cadeias β e δ são codificadas por um segmento gênico adicional (D) além dos segmentos V e J. (Adaptado de ABBAS *et al.*, 1994.)

III - CARACTERIZAÇÃO DA EM

3.1 - Epidemiologia

Os primeiros relatos epidemiológicos da EM datam de 1922 e concluem que a doença é mais comum entre os descendentes da Escandinávia (BAILEY, 1922; DAVENPORT, 1922).

Nos estudos epidemiológicos sobre a EM, são caracterizadas como região de alta prevalência da doença aquelas cujo número de afetados é igual ou maior do que 30/100.000 habitantes; de baixa prevalência quando o número de afetados pela EM é igual ou abaixo de 5/100.000 habitantes; e de média prevalência quando apresenta valores intermediários a estes. Dentre as regiões de alta prevalência, incluem-se o Norte da Europa e dos EUA, o Sul do Canadá, a Austrália e a Nova Zelândia. Na região Sul da Europa destacam-se a Itália com uma prevalência de até 58/100.000 e a Ilha da Sardenha (Itália) com uma taxa de prevalência particularmente alta, variando de 59 a 103 /100.000 (ROSATI, 1994). São consideradas regiões de baixa prevalência a América Latina, a África e a Ásia (LOWIS, 1988). Na figura 3.1 é mostrado o mapa da distribuição geográfica mundial da EM.

A EM é mais freqüente nas populações caucasóides, principalmente entre as mulheres (KELLY *et al.*, 1995). Dados epidemiológicos relativos à EM foram obtidos no período de 1979 a 1987 em 24 capitais brasileiras (GOMES e ALMEIDA, 1991). Constatou-se que a freqüência da EM é maior nas regiões Sul e Sudeste, atingindo preferencialmente mulheres da raça branca, com pico máximo de óbito na faixa dos 50-60 anos. Estima-se que a prevalência da EM no Brasil seja de aproximadamente 4/100.000 habitantes, para um coeficiente de mortalidade de 0,08/100.000 habitantes.

Com o objetivo de pesquisar a influência da etnia e do sexo na exteriorização clínica da EM, PAPAIS-ALVARENGA *et al.* (1995c) analisaram 88 pacientes da população do Rio de Janeiro, incluindo em sua amostra 28 negróides. Seus resultados sugerem que a influência do fator étnico é mais marcante na determinação da ocorrência de determinados sinais e sintomas da EM. Dados de estudos realizados em pacientes brasileiros, confirmam a predominância da EM no sexo feminino (3:1) e idade média de início de manifestação da doença de 27,9 anos e em pessoas de cor branca (PAPAIS-ALVARENGA e ALVARENGA, 1995).

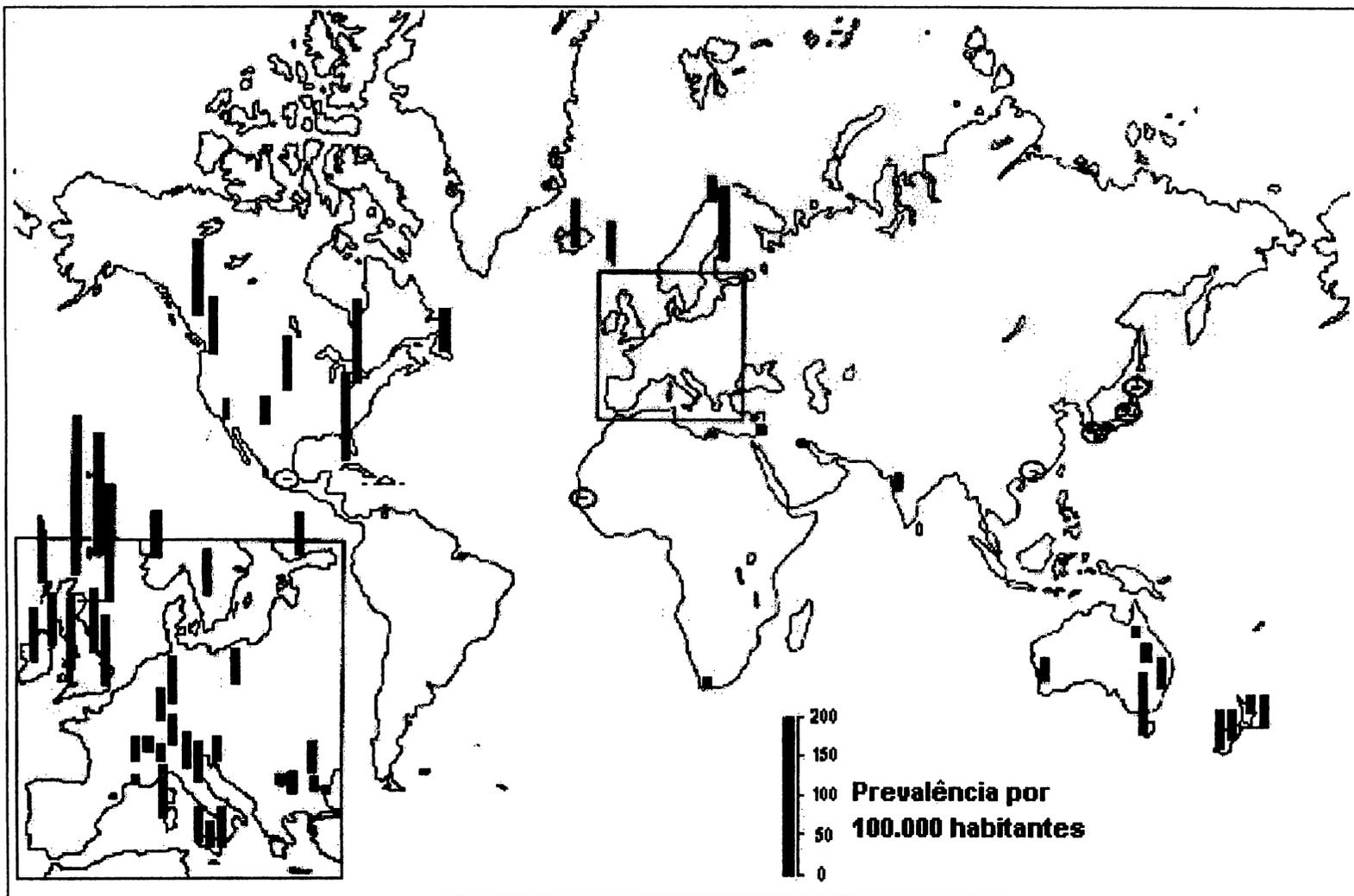


Figura 4.4 - Distribuição geográfica da esclerose múltipla. (Tirado de MATTHEWS *et al.*, 1991).

3.2 - Manifestações Clínicas

A EM é uma doença inflamatória crônica do SNC, que apresenta grande diversidade de manifestações clínicas. Os locais de inflamação são visualizados como placas na substância branca, conforme evidenciado na figura 3.2, onde há destruição da bainha de mielina (desmielinização) pela ação fagocítica dos macrófagos e relativa preservação dos axônios (figura 3.3). A evolução da EM pode perdurar por vários anos em surtos e remissões ou assumir um caráter progressivo. Durante a evolução da doença, pode ocorrer progressivo acometimento de deambulação, função urinária, motilidade dos membros superiores e da função bulbar (PAPAIIS-ALVARENGA e ALVARENGA, 1995).

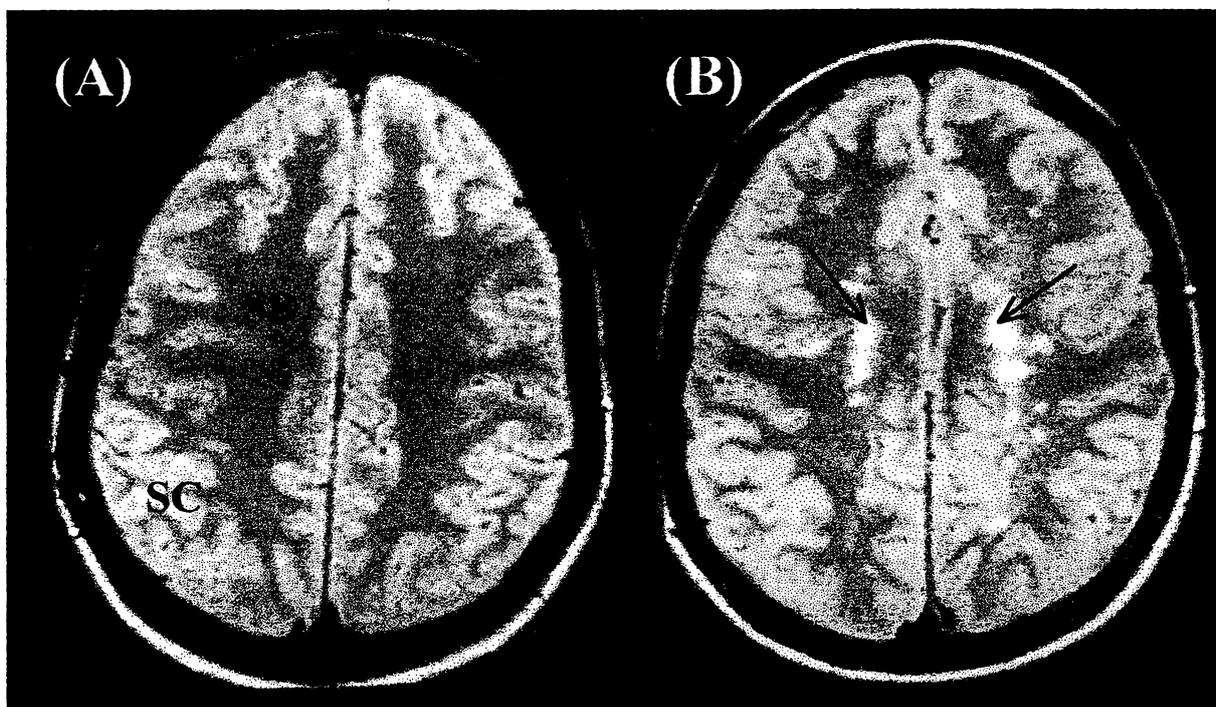


Figura 3.2 - (A) Corte sagital de ressonância nuclear magnética de crânio, seqüência T2, de uma pessoa normal. SB = substância branca; SC = substância cinzenta. (B) Corte sagital de ressonância nuclear magnética de crânio de um paciente com esclerose múltipla. Observam-se áreas de desmielinização em ambos os hemisférios cerebrais (setas).

Três formas clínicas da EM são reconhecidas: 1) progressiva; 2) em surto/remissão (SR) e; 3) benigna. A forma SR é caracterizada pela ocorrência de pelo menos três surtos durante os dois últimos anos. É a forma mais comum da EM. Define-se um surto, ou ataque, como sendo um período de exacerbação da doença em que se verifica a ocorrência de um ou mais sintomas, com ou sem confirmação objetiva, de duração de mais de 24 horas (POSER *et al.*, 1983). A

forma progressiva é caracterizada como uma particularidade da forma SR que entra na fase progressiva, sem que haja novo surto durante o último ano. A forma benigna é também uma particularidade da forma SR, cuja durabilidade ultrapassa os dez anos e recebe escore menor do que três na escala de Kurtzke (ZOUKOS *et al.*, 1992; KURTZKE, 1983; POSER *et al.*, 1983). A escala de Kurtzke é uma forma de avaliação clínica quantitativa do grau de acometimento e incapacidade do paciente. Acredita-se que fatores imunogenéticos distintos estejam implicados na ocorrência destas três formas clínicas da doença (OLERUP e HILLERT, 1991).

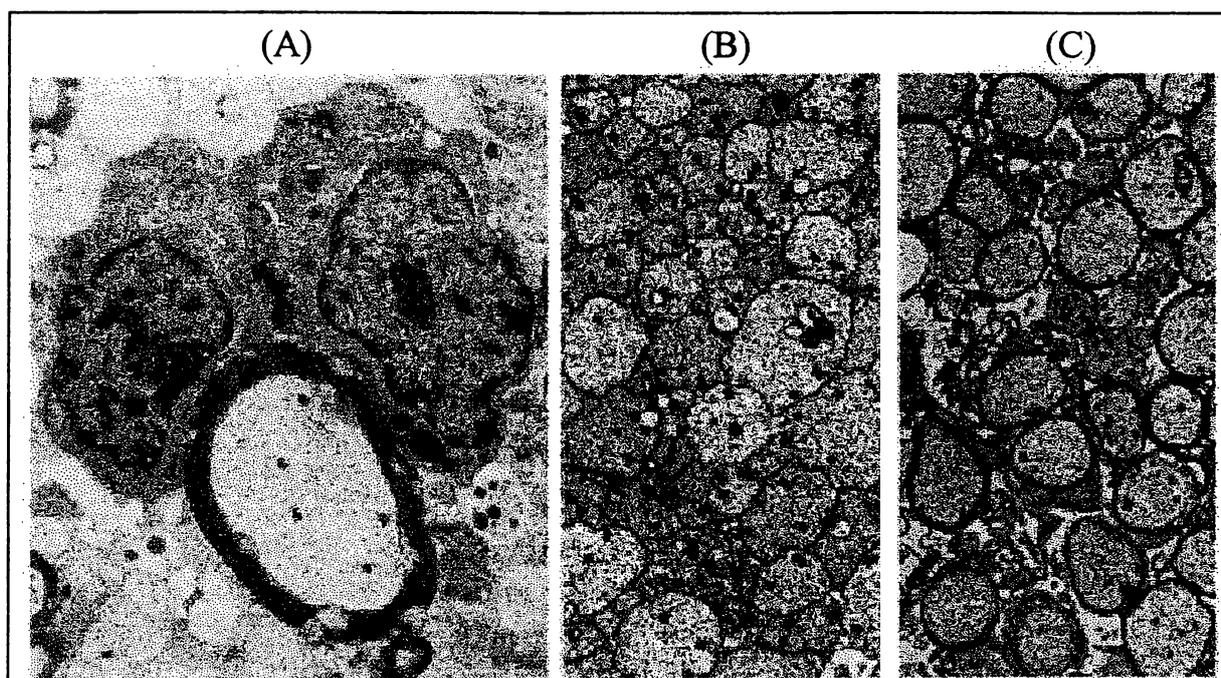


Figura 3.3 - (A) Infiltração de macrófagos no sistema nervoso central e degradação da bainha de mielina; (B) Axônios desmielinizados; (C) Reconstituição da bainha de mielina (remielinização) verificada após o transplante de novos oligodendrócitos. (Tirado de STEINMAN, 1993.)

Alguns autores referem-se à forma progressiva ora como progressiva crônica primária (PCP), ora como secundária. A PCP refere-se a uma forma da doença que apresenta uma evolução progressiva contínua desde o início de sua manifestação (OLERUP *et al.*, 1989).

A doença ocorre com ligeira predominância no sexo feminino. A forma SR manifesta-se em média a partir dos 30 anos e a forma progressiva por volta dos 40 anos (HILLERT *et al.*, 1992).

A doença atinge preferencialmente o SNC. Não é comum serem afetados os nervos periféricos. O comprometimento do trato piramidal resulta na ocorrência de fraqueza, espasticidade, hiperflexia, sinal de Babinski e sinal de Hoff-

man unilateral. Os sintomas visuais incluem perda ou diminuição da acuidade visual, escotoma, diplopia e ptose palpebral. A parestesia pode ser relatada pelos pacientes como sensação de formigamento ou dormência. Os sintomas cerebelares incluem perda do equilíbrio, perda de coordenação, dismetria e tremor intencional. As disfunções urinárias aplicam-se à frequência urinária, incontinência ou retenção urinária. O senso de posição pode ser testado pela mensuração da extensão do movimento dos dedos: enquanto uma pessoa normal pode detectar um deslocamento de até dois graus, um indivíduo afetado detectará um ângulo consideravelmente maior (POSER, 1994).

3.3 - Diagnóstico

O diagnóstico da EM é baseado na anamnese e é fundamentalmente um diagnóstico de exclusão, uma vez que não há dados clínicos ou laboratoriais específicos da doença. Devido ao comprometimento de várias partes diferentes do SNC, a lista de sinais e sintomas da EM é praticamente infindável.

Existe uma tendência à uniformidade dos critérios de diagnóstico. Os critérios propostos por SCHUMACHER *et al.* (1965) e os de POSER *et al.* (1983) são os mais empregados (tabelas 3.1 e 3.2). Segundo POSER *et al.* (1983), pode-se classificar o diagnóstico em duas categorias: definido ou provável.

A EM pode apresentar semelhanças clínicas com várias outras doenças do SNC, tais como sarcoidose, colagenose, doença cérebro-vascular oclusiva do tronco ou da medula e angiomas medulares, que apresentam curso evolutivo em remissão e exacerbação, e outras de caráter progressivo, tais como as degenerações espinocerebelares e as mielopatias virais. Também nenhum exame laboratorial é específico da EM. São consideradas evidências paraclínicas alterações nos exames de tomografia computadorizada do crânio (TCC), ressonância nuclear magnética (RNM), potenciais evocados (visual, auditivo e somatosensitivo), testes urodinâmicos (PAPAI-ALVARENGA e ALVARENGA, 1995).

A constatação da produção aumentada de IgG no LCR por eletroforese de proteínas é um dado inespecífico, que pode ocorrer em outras doenças neurológicas inflamatórias, tais como panencefalite, esclerose subaguda, meningite por criptococos e outras meningoencefalites, mas que vem sendo utilizado como apoio laboratorial no diagnóstico da EM.

Tabela 3.1 - Critérios de diagnóstico para esclerose múltipla segundo SHUMACHER *et al.* (1965).

1	—	há necessidade da existência de anormalidades objetivas atribuíveis à disfunção do sistema nervoso central
2	—	envolvimento de duas ou mais partes separadas do sistema nervoso central
3	—	acometimento predominante da substância branca
4	—	envolvimento do neuroeixo: <ul style="list-style-type: none"> a) com dois ou mais episódios de agravamento, separados por período de pelo menos um meses, cada episódio durando mais de 24 horas b) progressão lenta dos sinais e sintomas, em período mínimo de seis meses
5	—	acometimento inicial entre os 10 e 50 anos, inclusive
6	—	os sinais e sintomas não podem ser melhor atribuídos a outra doença por médico experiente em neurologia clínica

Tabela 3.2 - Critérios de diagnóstico para esclerose múltipla segundo POSER *et al.* (1983).

Categoria	Ataque	Evidência clínica	Evidência pa- raclínica	IgG	
[A]-definido clinicamente					
A1	2	2			
A2	2	1	e	1	
[B]-definido com apoio laboratorial					
B1	2	1	o u	1	+
B2	1	2			+
B3	1	1	e	1	+
[C]-provável clinicamente					
C1	2	1			
C2	1	2			
C3	1	1	e	1	
[D]-provável com apoio laboratorial					
D1	2				+

3.4 - Tratamento

O tratamento da EM vem sendo feito principalmente à base de drogas imunossupressoras que, não raro, resultam em efeitos colaterais indesejáveis.

Dentre as mais usadas destacam-se a metilprednisolona, a corticotropina, a azatioprina e a ciclofosfamida (HUGUES, 1994). A **metilprednisolona** é tolerável mesmo em altas doses se administrada por curto espaço de tempo via parenteral. Seu efeito como anti-inflamatório é semelhante ao da **corticotropina**, cuja aplicação é intravenosa. Sabe-se que estas drogas alteram a produção de citocinas como o INF- γ e a IL-2 pelos leucócitos de um modo geral, e a apresentação de antígenos pelos monócitos, dentre outras alterações imunológicas (BANSIL *et al.*, 1995). Surtos de menor intensidade podem ser tratados com **prednisona** via oral. A **azatioprina** é usada para desacelerar a progressão da doença pelo efeito supressor sobre as células T e B. Esta droga somente deve ser usada nos pacientes com a forma SR da doença, sendo inadequada ao tratamento da fase crônica progressiva, pois há a possibilidade de maior incidência de linfoma nos tratamentos a longo prazo. Outra droga que traz efeitos colaterais indesejáveis é a **ciclofosfamida**, que pode levar à séria neutropenia e conseqüente suscetibilidade aumentada a infecções, porém o seu uso estabiliza o curso da doença.

Alternativamente, o interferon- β (INF- β) vem sendo atualmente empregado com relativo êxito na redução da freqüência dos surtos e do número de lesões detectadas por RNM. Trata-se na verdade de uma forma modificada do INF- β , não glicosilada, e que possui um resíduo de serina na posição 17, em lugar da cisteína. Tem a vantagem de não apresentar efeitos colaterais podendo, no máximo, provocar inflamação no local de injeção da droga, dado que o tratamento requer várias aplicações subcutâneas em dias alternados (HUGUES, 1994). Segundo POSER (1992), a única forma de tratamento das exacerbações com aceitação geral é ainda à base de adrenocorticosteróides, pois o INF- β , apesar de ser uma droga promissora, não leva à cura, nem mesmo elimina completamente as exacerbações.

Uma alternativa de tratamento recentemente introduzida é a aplicação subcutânea de um polipeptídeo sintético denominado **copolímero-1** (COP-1), constituído dos aminoácidos L-alanina, L-ácido glutâmico, L-lisina e L-tirosina nas proporções de 6 : 1,9 : 4,7 : 1, respectivamente, cujo peso molecular varia de 25 a 28 kD (WEILBACH *et al.*, 1995). O COP-1 foi testado inicialmente em animais com encefalomielite alérgica experimental (EAE), tendo surtido na melhora considerável da doença nas diversas espécies estudadas, dentre as quais citam-se roedores e outros mamíferos, inclusive primatas. Em estudos subseqüentes, o COP-1 foi inoculado em pacientes humanos com EM, obtendo-se melhora significativa do quadro clínico na maioria dos indivíduos testados (SELA e ARNON, 1992). O modo de ação desta droga baseia-se possivelmente na interação competitiva pelo sítio de ligação da proteína básica da mielina

(MBP) à molécula MHC, ou ainda, na indução de clones de células T supressoras. A MBP é uma das principais moléculas que se supõe ser o autoantígeno implicado na EM. Apesar da ação do COP-1 ser restrita à inibição da resposta anti-MBP mediada por células T, seu efeito imunomodulador não oferece risco para o paciente e apresenta resultados muito promissores, principalmente quando a terapia é combinada ao uso do INF- β (WEILBACH *et al.*, 1995).

Outras abordagens imunoterápicas vêm sendo pesquisadas, incluindo-se vacinas anti-células T e anticorpos monoclonais contra clones específicos de células T. Fala-se na elaboração de uma vacina preparada com células T autoimunes, a qual, administrada em dose adequada, induziria uma reação supressora contra os clones endógenos de linfócitos T autoimunes. Experiências deste tipo foram realizadas em ratos com EAE induzida por MBP bovina, obtendo-se resultados animadores, mesmo quando outros tipos de células se misturavam aos linfócitos T na vacina (SELA e ARNON, 1992). A viabilidade da vacinação com células T em humanos foi testada por JINGWU *et al.* (1993), através da inoculação de células T reativas à MBP em pacientes com a forma crônica ou SR da EM. Foram empregadas na vacina células T autólogas com reatividade a diferentes epítomos da molécula MBP. Seus resultados mostraram que, após a segunda inoculação, havia um declínio progressivo do número de linfócitos T específicos para a MBP na circulação. A vacina não apresentou efeitos colaterais, contudo, não se chegou ainda a nenhuma conclusão quanto à eficácia do tratamento.

A utilização de **anticorpos monoclonais** contra TCRs específicos como uma intervenção terapêutica na EM tem sido proposta por alguns pesquisadores, como BEN-NUN *et al.* (1991), que partem do pressuposto de que os linfócitos T CD4⁺ autorreativos dos pacientes com EM expressam TCRs com determinadas seqüências em comum e especificidade para o mesmo autoantígeno. Os experimentos com anticorpos monoclonais ainda estão em fase de teste e seus efeitos clínicos não foram divulgados até o momento.

IV - ASPECTOS IMUNOGENÉTICOS DA EM

4.1 - Immunopatologia

4.1.1 - Rompimento da Barreira Hematoencefálica

Na EM, acredita-se que a destruição da bainha de mielina dos neurônios do SNC e a reação inflamatória local sejam decorrentes de resposta autoimune. Um pré-requisito para o desencadeamento da autoimunidade é o rompimento desta barreira. De fato, na EM células imunocompetentes, principalmente linfócitos T e plasmócitos, atravessam a BHE e reagem aos produtos de degradação da bainha de mielina (TILBERY, 1995).

Dentre as desordens neurológicas em que há desmielinização primária, incluem-se a EM, a encefalomielite aguda disseminada e a leucoencefalopatia aguda. No laboratório pode-se induzir a manifestação de uma doença desmielinizante de natureza autoimune, a EAE, em animais que servem de modelo para o estudo das doenças humanas. Essa doença tem muitos aspectos em comum com a EM, como por exemplo: a) a invasão de linfócitos e macrófagos no parênquima do SNC; b) a destruição da bainha de mielina por células fagocíticas e c) a presença de anticorpos IgG no LCR (SMITH e SOMMER, 1992).

4.1.2 - Células Apresentadoras de Antígeno

A presença de CAA nas meninges e nos espaços perivasculares parece importante no desencadeamento da resposta imunológica. Nas placas de EM predominam macrófagos ativados que liberam proteinases e fagocitam a mielina (STITES e TERR, 1991). Durante a resposta inflamatória, notou-se a presença de células da micróglia expressando moléculas MHC de classe I e de classe II e receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, sendo provavelmente as principais responsáveis pelos danos à bainha de mielina, por sua atividade fagocítica e pelo seu papel como CAA (WUCHERPFENNIG, 1994). A expressão de MHC de classe II foi observada também nas células endoteliais do cérebro nas lesões de EM, sugerindo que, em estado ativado, tais células facilitarão a adesão de leucócitos à parede dos vasos sanguíneos e a atração destes para o parênquima do SNC (TRAUGOTT *et al.*, 1985). Na substância branca normal, uma subpopulação de células da micróglia expressa MHC de classe II, porém a

quantidade expressa dessas moléculas e o número de células que as expressam encontra-se muito aumentada nos afetados pela EM (HAYES *et al.*, 1987).

4.1.3 - Autoantígenos e Populações de Linfócitos T

O autoantígeno envolvido na patogênese da EM ainda não é conhecido. Um dos principais candidatos a autoantígeno que vem sendo intensivamente estudado é a proteína básica da mielina (MBP). Trata-se de uma proteína solúvel em água, muito suscetível ao ataque de proteases. Sua função parece estar relacionada com a estabilidade da bainha de mielina, constituindo cerca de 40% do total das proteínas da mielina do SNC. A expressão da MBP, contudo, não é restrita ao SNC, sendo encontrada também no SNP (COLMAN *et al.*, 1987).

A MBP que predomina no SNC do adulto é uma das formas possíveis desta proteína, constituída de 171 resíduos de aminoácidos e com peso molecular de 18,5 kD. Outras formas da MBP são geradas por processamento alternativo do mRNA que codifica estas moléculas. Durante o desenvolvimento fetal, são abundantes as formas de 20,2 kD e de 21,5 kD, ambas contendo um segmento codificado pelo exon 2, que está ausente na MBP de 18,5 kD. Tais moléculas são produzidas em quantidades desprezíveis no adulto, porém, aumentam em decorrência de remielinização após infecções virais que levam a danos na bainha de mielina (ROTH *et al.*, 1987).

Com a finalidade de investigar qual seria o segmento da molécula MBP que atua como determinante antigênico, TANIGAKI *et al.* (1994) testaram diversos nonapeptídeos derivados da clivagem da proteína MBP completa quanto à capacidade de se associarem a diversas moléculas HLA de classe I e de induzirem a proliferação *in vitro* de clones de células T CD8⁺. Seus resultados, contudo, não foram conclusivos, constando-se que tanto podem se associar peptídeos diferentes à mesma molécula HLA, como também um único peptídeo pode se associar a diferentes moléculas HLA, inclusive considerando-se os produtos de alelos de diferentes locos. Não foi mencionado neste trabalho, entretanto, se todas as combinações antígeno-molécula HLA induziram igualmente uma resposta de células T CD8⁺. *Talvez fosse interessante quantificar a intensidade das respostas aos diferentes complexos peptídeo-molécula HLA.*

OTA *et al.* (1990) relataram a existência de um segmento da MBP (84-102) com alta afinidade pelas células T dos pacientes com EM, associado ao fenótipo DR2/DQ1. De modo semelhante, JINGWU *et al.* (1992a) testaram a reatividade das células T de pacientes com EM a diversos fragmentos da MBP humana. Constataram a existência de dois segmentos específicos da molécula MBP,

os peptídeos 84-102 e 149-171, que seriam os principais epítomos reconhecidos pelas células T autorreativas. E ainda, que a reatividade à região 84-102 da MBP correlaciona com o fenótipo DR15(2) nos pacientes. Entretanto, reconhecendo que o número amostral utilizado (8 pacientes e 3 controles) é muito pequeno, os autores não se comprometeram quanto a afirmar que isto estivesse terminantemente associado à predisposição à doença. Todos os clones de células T anti-MBP observados expressavam o fenótipo $CD3^+CD4^+CD8^-$ e, portanto, nenhuma atividade citotóxica foi detectada. A frequência inicial de células T reativas à MBP no sangue periférico foi determinada em pacientes e controles, não alcançando diferença significativa.

MARTIN *et al.* (1991) utilizaram linhagens de células T monoespecíficas de pacientes com a forma crônica da EM contra o fragmento 87-106 da MBP, a fim de verificar quais seriam os aminoácidos desta seqüência, que servem de epítomo para a formação do complexo trimolecular MHC-antígeno-TCR. Verificaram que os aminoácidos do segmento 89-99 da MBP são imprescindíveis para o reconhecimento das células T autorreativas. Em relação aos receptores destas células, constataram que havia heterogeneidade quanto ao uso das cadeias $TCR\beta$ entre os pacientes. E no que diz respeito à restrição pelo MHC, o reconhecimento do epítomo ocorria no contexto de diferentes moléculas HLA-DR. Em estudos subseqüentes, WUCHERPFENNIG *et al.* (1994) constataram que os aminoácidos Val89 e Phe92 do peptídeo 88-95 da MBP são críticos para a ligação com a molécula HLA $DR\beta 1^*1501$, com a qual apresentam alta afinidade.

Devido à constatação de que nas placas da EM ocorrem áreas de remielinização, VOSKUHL *et al.* (1994) investigaram a reatividade das células T de pacientes com EM às isoformas de 20,2 kD e de 21,5 kD da MBP. Verificaram que muitas das células T desses pacientes eram capazes de reconhecer o segmento da MBP codificado pelo exon 2 (X2 MBP). Tais células eram inclusive mais abundantes do que as que apresentavam especificidade contra epítomos da forma comum de 18,5 kD da MBP. Os clones anti-X2 MBP dos pacientes eram $CD4^+$ e apresentavam restrição para DR2/DQ1. Seus estudos foram feitos tanto a nível de família, como entre indivíduos não aparentados descendentes de europeus. Em ambos os grupos de pacientes, os resultados foram consistentes. No que diz respeito ao uso do TCR, observaram heterogeneidade entre os pacientes, com tendência à uniformidade individualizada, isto é, ao uso dos mesmos TCRs no mesmo indivíduo.

MATSIOTA-BERNARD *et al.* (1993) testaram a reatividade de leucócitos do sangue periférico de pacientes com EM e de pacientes com outras doenças neurológicas contra um painel de substâncias referidas anteriormente por ou-

tros autores como autoantígenos para diversas anomalias. Incluíram em seu estudo, além da MBP, também a miosina, a actina e a tireoglobulina. Constataram que as células dos pacientes com EM podem ser ativadas por diferentes autoantígenos, não apenas pela MBP. Aliás, não encontraram nenhuma tendência quanto ao reconhecimento da MBP pelos linfócitos dos pacientes. Contudo, observaram que a resposta dos linfócitos a esses antígenos diferia entre pacientes e controles em relação aos receptores de membrana dessas células. As células T dos indivíduos com EM passavam a expressar o receptor de IL-2 (IL-2R) após sensibilização com a MBP, enquanto que nas pessoas normais e nos afetados por outras doenças neurológicas utilizadas como controle, tais células expressavam um marcador de membrana diferente, designado antígeno de ativação tardia 19,2.

Outras moléculas, tais como o gangliosídeo GM1, a proteína proteolipídica da mielina (PLP), a glicoproteína associada à mielina (MAG) e a glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) também podem ser mediadoras da autoimunidade na EM (LINK, 1994; WUCHERPFENNIG, 1994; TILBERY, 1995). A PLP é uma proteína hidrofóbica transmembrana, constituída de 276 aminoácidos, cuja seqüência é altamente conservada entre diferentes espécies. É a proteína mais abundante da bainha de mielina, expressa unicamente no SNC, perfazendo cerca de 50% do total das proteínas da mielina. Sua função parece estar relacionada com a maior compactação da mielina (LAURSEN *et al.*, 1984). A PLP é, juntamente com a MBP, uma forte candidata a autoantígeno na EM. Entretanto, os números de células T CD4⁺ anti-MBP e anti-PLP circulantes são equivalentes entre indivíduos normais e afetados com EM, e o que varia entre estas é o estado de ativação dessas células. Nas células dos pacientes com EM observou-se a expressão abundante do IL-2R. Como as células T contendo IL-2R proliferam-se em resposta à IL-2, deduz-se que os linfócitos dos pacientes com EM encontram-se em estado ativado (JINGWU *et al.*, 1994).

Há evidências de que a MBP e a PLP não sejam as únicas proteínas envolvidas na autoimunidade, uma vez que outros componentes da mielina, ainda que presentes em menor proporção, podem induzir tanto a imunidade humoral como uma resposta mediada por células T. A MOG, por exemplo, é o principal alvo de autoanticorpos na EAE, capaz de induzir uma forte resposta inflamatória no SNC (LININGTON e LASSMANN, 1987; LININGTON *et al.*, 1993).

Recentemente tem-se discutido a importância das proteínas de choque térmico (hsp) na imunopatologia da EM. As hsp são agrupadas em famílias de acordo com o peso molecular e com a semelhança da seqüência de aminoácidos. Em cada família há proteínas que são expressas constitutivamente em situ-

ação normal e outras que somente são produzidas sob condições de *stress*. O nome delas advém do fato de que elas são sintetizadas em abundância em culturas de células de mamíferos submetidas a um aumento de temperatura (choque térmico). A função das hsp *in vitro* parece estar relacionada com a solubilização, renaturação e reconstituição da estrutura tridimensional de diversas proteínas (ALBERTS *et al.*, 1989). Desta forma, as hsp auxiliam as células a sobreviverem às injúrias em situações em que haja danos teciduais como, por exemplo, nas reações inflamatórias.

O papel das hsp como autoantígenos na EM foi evidenciado pela presença de linfócitos com TCR $\gamma\delta$ específicos para a hsp60 (BATTISTINI *et al.*, 1995), hsp65 (SELMAJ *et al.*, 1992), hsp60 e hsp90 (WUCHERPFENNIG *et al.*, 1992) nas lesões encefálicas de pacientes com EM. A expressão da hsp65 foi detectada nos oligodendrócitos (SELMAJ *et al.*, 1992), a hsp60 em macrófagos e a hsp90 em astrócitos (WUCHERPFENNIG *et al.*, 1992) de afetados pela EM. A presença de linfócitos T $\gamma\delta$ predomina nas lesões crônicas, o que sugere que a expressão anormal das hsp possa contribuir para a manutenção da EM em estado crônico, provavelmente porque as células T $\gamma\delta$ anti-hsp contribuem para a destruição dos oligodendrócitos, impedindo a remielinização dos axônios (UTZ e McFARLAND, 1994). A presença de células T $\gamma\delta$ foi relatada também em lesões ativas na fase aguda da EM por WUCHERPFENNIG *et al.*, (1992), nas quais, entretanto, predominam células T $\alpha\beta$.

4.1.4 - Indução da Resposta Autoimune

O mecanismo de ativação de linfócitos T autorreativos na EM ainda é ignorado, porém há hipóteses que mencionam a indução por agentes infecciosos que apresentam homologia com proteínas mielínicas ou por patógenos que produzem superantígenos (WUCHERPFENNIG, 1994). A indução da expressão de moléculas MHC nas células fagocíticas da micróglia em resposta a uma infecção no SNC poderia ser o principal mecanismo de iniciação da resposta imune (WEINSTEIN *et al.*, 1990). Experiências realizadas em camundongos transgênicos altamente suscetíveis à EAE por imunização prévia com MBP, mostraram que as células T específicas para MBP não eram deletadas no timo e induziam uma resposta inflamatória no SNC nos camundongos mantidos em condições ambientais não estéreis. A indução da doença, entretanto, não ocorria nos camundongos mantidos em ambiente livre de patógenos (GOVERMAN *et al.*, 1993). A semelhança da seqüência de aminoácidos e da estrutura molecular da MBP com certos antígenos virais reforça a hipótese do mimetismo molecular

para explicar a ocorrência de surtos de EM após infecções virais (ATKINS *et al.*, 1990). JINGWU *et al.* (1992a), porém, não encontraram reatividade cruzada entre os clones de células T anti-MBP e as células T de pacientes com EM que reagem contra os antígenos do vírus do sarampo.

Acredita-se que a EM possa ser induzida por uma exposição prévia a agentes infecciosos baseando-se também nos seguintes fatos: 1) infecções virais podem preceder as exacerbações agudas da EM; 2) certas doenças desmielinizantes que se manifestam em surtos e remissões e apresentam longo período de incubação, como na encefalopatia progressiva multifocal, na encefalomielite pós-infecciosa e na AIDS, são de etiologia viral conhecida; 3) altos níveis de anticorpos anti-virais foram encontrados no soro e no LCR de pacientes com EM, dentre os quais citam-se os anticorpos com especificidade para o vírus do sarampo, da varicela, da rubéola, da influenza, do herpes simples e do Epstein-Barr (JOHNSON, 1994).

4.1.5 - Citocinas e Marcadores de Membrana

A presença de citocinas no estágio pré-inflamatório e nas lesões do SNC na EM foi evidenciada através de estudos imunohistoquímicos (BROSNAN *et al.*, 1995). É possível que algumas dessas citocinas contribuam para a imunopatologia da EM, enquanto outras levam à amenização dos sintomas. Ambos os tipos de citocinas são produzidos simultaneamente no SNC, realizando o controle das atividades das células. A diferença entre os indivíduos normais e os afetados pela EM neste contexto, reside principalmente na expressão anormal de citocinas e de seus receptores, bem como nos níveis de citocinas produzidos. Na tabela 4.1 estão listadas as principais citocinas encontradas no SNC, fazendo-se menção às principais células que as produzem, seus possíveis efeitos e interferência no estado clínico dos pacientes com EM.

LINK (1994) incluiu em seu trabalho de tese uma análise da expressão de mRNA do interferon gama (INF- γ), da interleucina-4 (IL-4) e do fator beta de transformação do crescimento (TGF- β) nas células do sangue e do LCR de pacientes com EM. Comparados aos indivíduos normais, os pacientes com EM possuem maior número de células expressando INF- γ e IL-4 e que são reativas contra MBP e PLP. Em particular, estas células são mais abundantes no LCR dos afetados, mas na corrente sanguínea estão presentes também em quantidades expressivas, incluindo várias subpopulações de linfócitos. A expressão de mRNA de TGF- β foi observada *in vitro* após estímulo com MBP ou PLP. Constatou-se a expressão deste mRNA em maior quantidade nas células mono-

nucleadas obtidas do sangue e do LCR dos afetados com EM do que nos indivíduos normais.

Tabela 4.1 - Citocinas presentes no sistema nervoso central. (PORRINI e REDER, 1994; BROSANAN *et al.*, 1995.)

citocina	produção	efeito	estado clínico
IL-1	micróglia e macrófago	edema, ativação de linfócitos, células endoteliais e astrócitos	piora
IL-2	leucócitos e micróglia	ativação de linfócitos e oligodendrócitos	piora
IL-4	célula Th2	supressão da produção de INF- γ , diferenciação das células B, ativação de macrófagos, micróglia e astrócitos	melhora
IL-6	micróglia	indução da proliferação policlonal de células B e da produção de anticorpos	piora
IL-10	astrócito e célula Th2	inibição da produção de citocinas pelas células Th1 e da ativação de macrófagos	melhora
TGF- β	linfócito T supressor	inibição da ativação de macrófagos	melhora
INF- β	fagócitos	inibição da multiplicação viral e da proliferação de células tumorais e inibição da expressão de MHC de classe II	melhora
INF- γ	leucócitos, micróglia e astrócito	inibição da produção de IL-1 e TNF- α e da expressão de MHC, inibição da multiplicação viral, ativação de macrófagos, micróglia e astrócitos	piora
TNF- α	macrófago, micróglia e astrócito	citotóxico para oligodendrócitos, células endoteliais e astrócitos	piora
TNF- β	leucócitos e micróglia	inflamação	piora

As moléculas de adesão celular também parecem desempenhar papel importante na imunologia da EM. Sua importância advém da facilitação da aderência dos linfócitos T à parede dos capilares e conseqüente rompimento da BHE (HARTUNG *et al.*, 1995). Para atravessar a BHE, os linfócitos T circulantes inicialmente aderem-se à parede dos vasos sangüíneos através de interações entre as moléculas de membrana das células endoteliais como, por exemplo, a molécula de adesão intercelular - 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1), e seus ligantes correspondentes da membrana dos linfócitos, quais sejam, o antígeno associado à função do linfócito-1 (LFA-1) e o antígeno de ativação tardia-4 (VLA-4). Em seguida, atraídos por agentes quimio-

táticos, liberados no sítio de inflamação do SNC, os linfócitos migram através do endotélio até atingir o parênquima do tecido nervoso (figura 4.1).

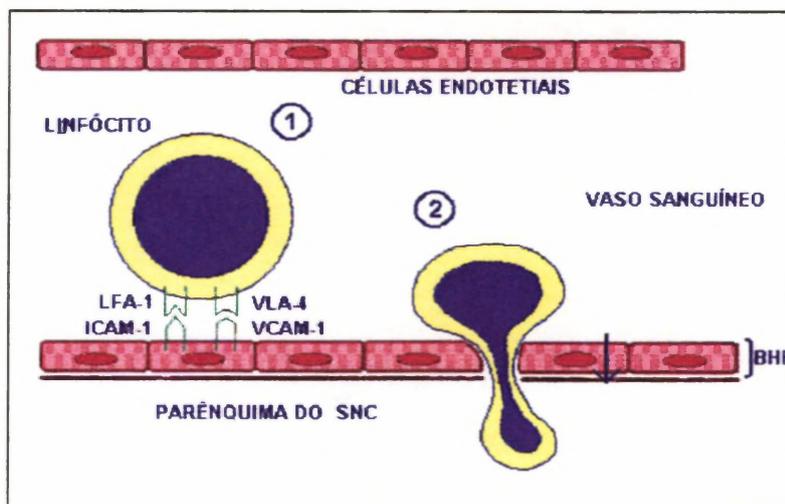


Figura 4.1 - Adesão do linfócito à parede do vaso sanguíneo e travessia da barreira hematoencefálica.

As moléculas de adesão intercelular desempenham ainda a função de coestimuladoras nos processos de reconhecimento do antígeno e de ativação das células T, e conferem maior estabilidade às interações entre os TCRs e os complexos antígeno-MHC (HARTUNG *et al.*, 1995). Conforme pode ser observado na figura 4.1, as moléculas de adesão celular são expressas reciprocamente nos linfócitos T e nas células endoteliais.

A análise fenotípica das células do sangue e do LCR dos pacientes com EM revelou uma alta proporção de linfócitos T $CD8^+Leu8^+$. A molécula Leu8 está envolvida na facilitação da aderência dos linfócitos T às regiões mielinizadas do encéfalo e, por conseguinte, está implicada na imunopatologia da EM (DUFOUR *et al.*, 1993).

TSUKADA *et al.* (1993) investigaram a presença de ICAM-1 e do receptor do fator de necrose tumoral (TNF-R) em estado solúvel no LCR de pacientes com EM. O nível dessas moléculas era particularmente alto nos pacientes com EM, comparado aos controles com outras anomalias neurológicas.

A expressão de ICAM-1 pode ser induzida pelo $TNF-\alpha$, pela IL-1 ou pelo $INF-\gamma$. O $TNF-\alpha$, por sua vez, está presente em várias doenças inflamatórias do SNC e apresenta atividade citotóxica. O TNF-R está presente em diversas células, inclusive nas células endoteliais, possibilitando a interação destas com o $TNF-\alpha$. Nas lesões cerebrais da EM é possível que o $TNF-\alpha$ seja liberado por macrófagos, linfócitos T, neurônios e células da micróglia após estímulo com citocinas, principalmente nas fases de exacerbação da doença. Desta forma, TSUKADA *et al.* (1993) inferem que a presença de níveis aumentados de

ICAM-1 e TNF-R no LCR dos pacientes com EM pode ser indicativo do estado de atividade da doença.

Os mecanismos imunorreguladores implicados na EM envolvem interações entre os sistemas imune, nervoso e endócrino (PAPAI-ALVARENGA *et al.*, 1995b). KARASZEWSKI *et al.* (1990) relataram a ocorrência de aumento da densidade de receptores β -adrenérgicos nos linfócitos circulantes de pacientes com a forma progressiva da EM. Inspirados nos trabalhos destes autores, ZOUKOS *et al.* (1992) reexaminaram a densidade dos receptores β -adrenérgicos de linfócitos circulantes de pacientes com diferentes categorias clínicas da EM. Comparada a pessoas normais, a densidade destes receptores encontra-se significativamente aumentada nos pacientes com EM (em ambas as formas, progressiva ou SR), porém nos pacientes expressando a forma benigna da doença, a densidade dos receptores está dentro da faixa normal.

Realizando estudos *in vitro*, ZOUKOS *et al.* (1992) testaram a influência da hidrocortisona e da IL- α 1 sobre os linfócitos circulantes, tendo constatado que nos pacientes com EM não havia alteração da densidade dos receptores β -adrenérgicos em resposta a tais estímulos, enquanto que nas células dos controles normais a densidade destes receptores aumentou consideravelmente. Este achado, e mais a constatação de que os níveis de cortisol, adrenalina e noradrenalina no plasma de pacientes expressando a forma SR da EM é maior do que em pessoas normais, sugere que nos afetados pela EM os linfócitos já estão sob o efeito regulador de hormônios e citocinas que induzem a superexpressão dos receptores de membrana e conseqüente ativação destas células. Resultados semelhantes foram obtidos por KARASZEWSKI *et al.* (1991) em relação à IL-2.

4.1.6 - Atividade Imunossupressora

A quantidade de substâncias supressoras da resposta imune produzidas na EM é aparentemente maior do que nas pessoas normais, como que para compensar a presença dos clones de células T autorreativos. Entretanto, o mecanismo de supressão da resposta imune é deficiente nos indivíduos com EM, seja decorrente do decréscimo do número de células supressoras propriamente ditas (TILBERY, 1995) ou do número de células indutoras da função supressora (STITES e TERR, 1991). DUFOUR *et al.* (1993) relataram uma diminuição considerável do número de linfócitos T CD8⁺ no LCR e no sangue dos pacientes com EM, comparado a outras desordens neurológicas. Num estudo feito por JINGWU *et al.* (1992b), cujo objetivo era identificar o fenótipo das células

supressoras dos clones de células T auxiliares específicos para a MBP de pacientes com EM, encontrou-se que a maioria é de linfócitos T CD4⁺. Constatou-se ainda que a atividade supressora não é decorrente da ação de fatores solúveis, nem de efeitos citotóxicos, mas possivelmente é induzida pela interação dos receptores de membrana das células supressoras com epítopos específicos da MBP, expressos na superfície das células T suprimidas em associação com moléculas HLA. Tais epítopos aparentemente diferem dos que induzem a resposta de células T auxiliares e citotóxicas anti-MBP.

O TGF- β é uma citocina imunossupressora capaz de inibir a atividade de macrófagos e células da micróglia (MEINL *et al.*, 1994). Sendo assim, os pacientes que a expressam em maior quantidade tendem a apresentar uma forma mais branda da doença (LINK, 1994). O INF- γ possivelmente exerce efeito antagônico ao TGF- β . A aplicação sistêmica de INF- γ induz a expressão de moléculas MHC de classe I e de classe II nas células da micróglia (WUCHERPFENNIG, 1994).

ANTEL *et al.* (1978) investigaram a resposta ao mitógeno concanavalina A e a função supressora de linfócitos isolados do sangue de pacientes com EM, em função da idade e da atividade da doença. Tanto no grupo controle como nos pacientes, a capacidade de resposta ao mitógeno decresce com o aumento da idade, enquanto que a atividade de células supressoras aumenta. Contudo, entre os pacientes jovens (média de 29 anos), a atividade supressora encontra-se aumentada durante os períodos de exacerbação da doença. Na fase clinicamente inativa, a atividade dessas células nos pacientes é semelhante aos controles normais.

As propriedades inibidoras dos astrócitos humanos podem contribuir para o confinamento das lesões inflamatórias na EM. MEINL *et al.* (1994) constataram que astrócitos obtidos do cérebro de embriões humanos podiam suprimir a proliferação e a produção de INF- γ pelas células T CD4⁺ de pacientes com EM estimuladas pela MBP ou pela toxina do tétano (TT) em cultura. Este achado os levou a investigar a contribuição de outros mediadores que poderiam suprimir os processos inflamatórios. Verificaram que os astrócitos cultivados sintetizavam TGF- β 2, porém não produziam IL-4 nem IL-10.

A IL-10 é uma citocina com potente efeito inibidor sobre macrófagos e células T, normalmente produzidas pelas células B, pelos próprios macrófagos e por diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares. A IL-4, por sua vez, inibe a atividade de determinadas subpopulações de linfócitos T auxiliares, conhecidas como Th1, e de monócitos e células da micróglia. Desta forma, MEINL *et al.* (1994) concluem que a secreção local de fatores inibidores pelos astrócitos durante a fase inflamatória das lesões da EM podem explicar a alter-

nância de períodos de melhora dos sintomas após os surtos, que é típica da EM.

4.1.7 - Autoanticorpos e Populações de Linfócitos B

É notória a presença de anticorpos IgG no LCR dos pacientes com EM. Tais anticorpos podem ser detectados como bandas oligoclonais em eletroforese e constituem uma das formas de diagnóstico laboratorial da EM (POSER, 1994). WILLIAMS *et al.* (1978) relataram a presença de níveis aumentados de IgM no LCR de pacientes com EM, através da utilização da técnica de radioimunoensaio. Não encontraram relação com a gravidade ou a duração da doença, nem correlação entre os níveis de IgM e IgG. Dentre os pacientes, 40% apresentavam um alto nível de IgM no LCR e, no entanto, possuíam níveis normais de IgG. Considerando que o nível médio de IgM no LCR de pessoas normais é de 51,3 ng/ml, o nível médio de 456 ng/ml encontrado nos pacientes com EM diferia significativamente do grupo controle e de pacientes com outras doenças neurológicas.

NERENBERG *et al.* (1978) quantificaram os níveis das cinco classes de imunoglobulinas no LCR de pacientes com diversas desordens do SNC. Nos pacientes com EM, encontraram valores aumentados de IgM (13x), IgA (4x) e IgG (2x), e um decréscimo de IgD e IgE, em relação aos valores normais. Chama atenção o fato de que o nível de IgA estava aumentado em 92% dos pacientes e o de IgG em 64% dos afetados com EM.

A especificidade dos anticorpos encontrados no LCR de pacientes com EM ainda não foi determinada. WILLIAMS *et al.* (1978) testaram a reatividade da IgM do LCR e do sangue de pacientes com EM contra o vírus do sarampo, não tendo detectado nenhuma reação. STEVENS *et al.* (1992) relataram a ocorrência de anticorpos IgG e IgM com especificidade para diversos gangliosídeos (GM1, GM2, GM3, AGM1, GD1a, GD1b e GT1b) no LCR e no soro de pacientes com a forma SR e PC da EM. Os gangliosídeos constituem o principal componente da membrana dos oligodendrócitos. Em ambas as formas da doença foram detectados altos títulos de IgG e IgM no LCR dos pacientes com EM comparado aos controles normais ou com outras doenças neurológicas. Comparando-se os padrões dessas imunoglobulinas nas formas SR e PC, encontrou-se níveis de IgG anti-GM1, -GM2 e -GT1b e de IgM anti-GT1b significativamente maiores na forma SR, enquanto que na forma PC predominaram anticorpos IgM anti-GM3. BANSAL *et al.* (1994) também detectaram altos títulos de anticorpos IgM anti-GM1 no soro de pacientes com EM. Porém níveis significativa-

mente altos desses anticorpos foram também encontrados em outras doenças autoimunes, tais como artrite reumatóide, síndrome de Sjögren e LES.

SÖDERSTRÖM *et al.* (1993) examinaram a resposta das células B de pacientes com EM, dentre várias desordens neurológicas estudadas, contra a MBP completa ou contra peptídeos específicos da MBP. Em 62% dos pacientes com EM havia células anti-MBP secretoras de anticorpos da classe IgG no sangue periférico, e em 89% dos pacientes foram detectadas destas mesmas células no LCR. Anticorpos das classes IgA e IgM foram detectados também no sangue desses pacientes, ainda que em menor quantidade do que no LCR. Somente em relação ao número de células secretoras de IgG foi encontrada diferença significativa em relação às demais desordens neurológicas. Testaram a reatividade dessas células contra 4 peptídeos diferentes da molécula MBP, e constataram que não havia preferência das células B por nenhum dos peptídeos testados entre os pacientes com EM. Resultados semelhantes foram obtidos por CASH *et al.* (1992).

A fim de caracterizar o papel dos linfócitos B na patogênese da EM, CASH *et al.* (1992) isolaram as células do LCR de pacientes com EM ou com outras doenças neurológicas e as estimularam *in vitro* com um mitógeno policlonal e com a MBP humana. Todas as células que produziram anticorpos específicos contra a MBP eram provenientes dos pacientes com EM, ainda que tal reatividade tenha ocorrido em apenas alguns desses pacientes. A presença dos anticorpos foi detectada por Western blot, sendo que a intensidade do sinal positivo variava de paciente para paciente. Com o objetivo de verificar a especificidade desses anticorpos a epítomos específicos na molécula da MBP, foram realizados experimentos subseqüentes utilizando peptídeos de 15 a 20 aminoácidos da MBP. Os resultados deste trabalho sugerem que tais anticorpos não apresentam afinidade maior para nenhum dos peptídeos testados, porém indicam haver possivelmente um envolvimento das células B nos mecanismos patofisiológicos da EM. SMITH e SOMMER (1992) observaram que as lesões desmielinizantes nos camundongos com EAE permanecem ativas mesmo após a recuperação dos camundongos, provavelmente porque algumas células B permanecem no SNC e continuam secretando anticorpos antimielina.

4.2 - Evidências da Suscetibilidade Genética

4.2.1 - Estudos em Gêmeos

Um método tradicional de investigação da influência relativa do genótipo na etiologia de um determinado caráter é o estudo de pares de gêmeos. Os gêmeos são classificados como monozigóticos (MZ) quando originam-se de um único zigoto, resultando em indivíduos geneticamente idênticos e que geralmente são do mesmo sexo (*). Por sua vez, os gêmeos dizigóticos (DZ) são resultantes da fertilização simultânea de dois ovócitos que formam zigotos distintos, podendo ambos terem o mesmo sexo ou apresentar sexos diferentes (BEIGUELMAN, 1994). Levando-se em consideração que os pares de gêmeos MZ possuem genótipos idênticos, podemos inferir que a variância fenotípica nesta classe de gêmeos é quase inteiramente devida a fatores ambientais, enquanto que a variância fenotípica nos pares de gêmeos DZ é influenciada pelo genótipo e por fatores ambientais. Os caracteres cuja expressão fenotípica depende da ocorrência de mutações e/ou recombinações somáticas dos genes herdados podem resultar em ligeiras diferenças genotípicas entre os pares de gêmeos MZ, como é o caso dos genes que codificam os TCRs e as imunoglobulinas.

A determinação da zigosidade pode ser feita por diferentes métodos como, por exemplo, pela tipagem de grupos sanguíneos eritrocitários ou pela análise de DNA. A investigação da zigosidade é necessária principalmente entre os gêmeos do mesmo sexo, já que os de sexos diferentes são, via de regra, dizigóticos (BEIGUELMAN, 1994). Diz-se que um par de gêmeos é concordante em relação a um caráter quando este caráter ou está presente, ou está ausente em ambos. E, ao contrário, são discordantes os pares em que um membro possui o caráter e o outro não (CAVALLI-SFORZA e BODMER, 1971).

Estudos populacionais em gêmeos denotam existirem alelos que conferem susceptibilidade à EM, mas que por si só não são suficientes para desencadear a doença. Isto implica que a manifestação da doença envolve a ação conjunta de fatores genéticos e ambientais ainda desconhecidos.

(*) Gêmeos MZ de sexos diferentes são casos muito raros que podem ocorrer em decorrência da não disjunção do cromossomo Y durante a clivagem do zigoto, formando gêmeos heterocarióticos em que um membro possui o cariótipo 47,XYX e o outro com 45,X ou ainda, podem ser constituídos por um gêmeo de cariótipo 46,XY e o outro com 45,X, em consequência da perda de um cromossomo Y (BEIGUELMAN, 1994).

4.2.2 - Associação MHC x EM

A associação entre especificidades HLA e a EM foi determinada pela primeira vez em 1972, tendo sido encontrada associação positiva com os genes HLA-A3 e -B7 (BERTRAMS e KUWERT, 1972; NAITO *et al.*, 1972). Estudos posteriores indicaram a existência de associações mais fortes com a região de classe II, envolvendo principalmente as subregiões DR e DQ.

Os estudos iniciais baseados na análise segregacional de haplótipos HLA em famílias com dois ou mais membros afetados pela EM, como em EBERS *et al.* (1982) e MARROSU *et al.* (1988) não indicaram associação com o HLA. Mesmo nos estudos mais recentes, as associações com o HLA em famílias somente são evidenciadas sob condições especiais como em TIENARI *et al.* (1993), que encontraram associação com o haplótipo DQA1*0102.DQB1*0602, apenas após a exclusão de sua amostra das famílias em que um dos parentais é homocigoto quanto a DQA1*0102. As principais evidências da participação dos genes HLA na suscetibilidade à EM advêm de estudos populacionais. Os resultados são algumas vezes contraditórios e não foi possível definir até o momento qual (ou quais) o alelo que realmente estaria relacionado à maior ou menor predisposição à EM.

A maioria dos estudos foi feita em caucasóides descendentes de europeus. Em particular o haplótipo DRB1*1501.DQA1*0102.DQB1*0602 foi encontrado em associação positiva com a EM em diversas populações. Os alelos DRB1*1501 e DQB1*0602 correspondem respectivamente às especificidades sorológicas DR15(2) e DQ6(1), enquanto que o alelo DQA1*0102 é muitas vezes referido como Dw2, porém não apresenta especificidade sorológica correspondente (BODMER *et al.*, 1994). Desta forma, a conotação fenotípica deste haplótipo é usualmente escrita como DR15.Dw2.DQ6. O desequilíbrio de ligação entre as regiões DR e DQ dificulta o reconhecimento da contribuição individual de cada gene. Outro fator que dificulta a análise dos dados de associação é o fato de que mais de um alelo da região HLA ou outro intimamente ligado ao MHC pode estar associado à EM.

Numa amostra de árabes, KURDI *et al.* (1977) encontraram associação significativa com um antígeno expresso nos linfócitos B, referido como BT102, o qual corresponde ao HLA-DR4 na nomenclatura atual. Da mesma forma, num estudo feito em japoneses, NAITO *et al.* (1978) não encontraram associação com nenhuma das especificidades sorológicas usualmente encontradas nas populações caucasóides. Apesar de não ter alcançado significância estatística, os autores observaram uma ligeira predominância de HLA-DR6 entre os pacientes com EM. Em contraste, em outro estudo realizado em japoneses procedentes

da Ilha de Hokkaido, ao Norte do Japão, FUKAZAWA *et al.* (1992) encontraram associação positiva com as especificidades DR4 e DR8 num dos subgrupos de pacientes, e com DQ7 no outro subgrupo. A divisão em subgrupos foi feita de acordo com as características clínicas dos pacientes. Em ambos os subgrupos foram encontradas em menor frequência as especificidades DR9 e DR53 que diferiram significativamente do grupo controle.

Com a utilização das técnicas moleculares, tornou-se possível realizar análises mais detalhadas das associações com o HLA. É importante salientar, contudo, que a maioria dos estudos moleculares se baseia em resultados de tipagens sorológicas prévias. E ainda que forneçam informações mais limitadas, as técnicas sorológicas ainda estão em pleno uso.

HAEGERT e FRANCIS (1993) estudaram duas amostras de caucasóides do Canadá quanto ao polimorfismo HLA-DQ relacionado à EM. Uma de suas amostras era constituída de descendentes de imigrantes franceses que se estabeleceram no Canadá desde 1763 e quase não se misturaram com populações de outras etnias; a outra amostra era composta de indivíduos de diversas etnias. Seus resultados sugerem que, na população dos descendentes de franceses, há um fator adicional de predisposição à EM, além do haplótipo DRB1*1501.DQA1*0102.DQB1*0602 reconhecido por vários autores. Referem-se à presença comum entre os pacientes do aminoácido 26 da molécula HLA-DQ β 1 (DQ β Leu26), situado na região de ligação com o antígeno.

VARTDAL *et al.* (1989) também investigaram o polimorfismo quanto ao loco DQ em noruegueses. Selecionaram pacientes com EM que diferiam quanto às especificidades HLA-DR e seqüenciaram os genes DQB1 de cada. Notaram que a maioria desses indivíduos possuem seqüências em comum, correspondendo aos aminoácidos 10-29, 31-52, 58-69 e 71-83 da região de ligação com o antígeno na molécula de DQ β . Concluíram a partir destes dados que a associação primária entre HLA e EM deve estar relacionada aos genes DQ e que as associações com DR refletiriam o desequilíbrio de ligação entre esses dois locos. ALLEN *et al.* (1994), ao contrário, sugerem que as associações com alelos DQ sejam secundárias à associação com DRB1*1501 e que o aminoácido da posição 86 da cadeia DR β é crítico na determinação da suscetibilidade ou proteção à EM. Todos os alelos DRB associados positivamente com a EM codificavam uma valina na posição 86, enquanto os que apresentavam associação negativa codificavam uma glicina nesta mesma posição.

A glutamina na posição 34 da molécula DQ α 1 também parece exercer alguma influência na maior predisposição à EM, sugerindo que o desencadeamento da doença pode ser influenciado por uma combinação de cadeias DQ α e DQ β (SPURKLAND *et al.*, 1991a). No entanto, HAEGERT e FRANCIS (1993)

consideram que a associação com os alelos DQA1 que codificam a glutamina na posição 34, quando presente, é apenas secundária à associação com DRB1*1501. HILLERT *et al.* (1992) não encontraram nenhuma relação com seqüências definidas das moléculas DQ α e DQ β da amostra de caucasóides estudada.

Em amostras populacionais do Japão e da Suécia foram encontradas associações com DP4 (ODUM *et al.*, 1988; ODUM *et al.*, 1989). Na população da Suécia, a associação somente com DR2 apresentou um RR = 6,1, enquanto que a associação positiva com DP4 apresentou um RR = 5,4. A combinação de ambos oferece um risco ainda maior de predisposição à EM (RR = 8,1), conforme os dados de ODUM *et al.* (1988). Uma vez que não há desequilíbrio de ligação entre DR e DP, a associação com essas duas especificidades é independente, ainda que possa haver algum efeito sinérgico entre os produtos desses genes em conferir maior suscetibilidade à doença. Através da hibridização com um painel de sondas alelo-específicas, FUGGER *et al.* (1990) estudaram a associação com diversas variantes de DPB1*02 e DPB1*04 numa amostra de dinamarqueses com a forma SR da EM, não tendo encontrado diferença significativa em relação aos genes DPB entre os controles normais e os indivíduos afetados.

MUNTONI *et al.* (1991) investigaram a associação da EM com diversos haplótipos DR2 em duas amostras de diferentes procedências: uma do Norte da Itália e a outra da Sardenha. O haplótipo DR15(2).Dw2.DQ6 foi encontrado em todos os pacientes do norte da Itália e estava praticamente ausente entre os sardenhos. Diferenças na composição genética dessas duas subpopulações e o pequeno número de pacientes incluídos em sua amostra (9 italianos do Norte e 14 sardenhos) devem ter influenciado nos resultados deste trabalho, posto que a Ilha da Sardenha é considerada uma região de alta prevalência da EM (ROSATI, 1994).

MARROSU *et al.* (1988) já haviam investigado anteriormente a associação da EM com HLA de classe II na população da Sardenha, tendo feito dois estudos em paralelo: um estudo populacional, no qual incluiu 19 casos de pacientes com a forma SR da EM e 26 casos com a forma progressiva; e um estudo em 6 famílias com dois ou mais indivíduos afetados, totalizando 14 afetados e 39 consangüíneos. No estudo populacional, encontraram associação positiva com DR4 (RR = 2,5) e DQ3 (RR = 2,2) no grupo de pacientes, não relacionada a nenhuma forma específica de manifestação da doença. No estudo em famílias, não encontraram nenhum haplótipo em comum entre os afetados com diferença significativa do que seria esperado ao acaso. Em outros estudos, encontrou-se associação positiva com DQB1*0302 e DQB1*0102 e associação negativa com DQA1*0102 na população da Sardenha (MARROSU *et al.*, 1992).

OLERUP e HILLERT (1991) acreditam que a EM apresenta formas imunogeneticamente distintas, estando a forma SR associada positivamente ao haplótipo DR15.DQ2 entre os suecos. Resultados semelhantes haviam sido obtidos anteriormente por VARTDAL *et al.* (1989) em noruegueses e por OLERUP *et al.* (1989) numa outra amostra de suecos. Posteriormente HILLERT *et al.* (1992) investigaram em noruegueses a associação diferencial quanto à região de classe II em duas formas clínicas da EM e encontraram o haplótipo DR17(3).DQ2 mais freqüente entre os pacientes com a SR.

Atualmente vários pesquisadores vêm estudando outras regiões do MHC, ora centroméricas, ora teloméricas à sub-região DR-DQ. LIBLAU *et al.* (1993) investigaram a associação da EM com os genes LMP2, LMP7, TAP1 e TAP2 em pacientes HLA-DR2 com EM progressiva, não tendo encontrado nenhum padrão de RFLP preferencial entre os afetados. KELLAR-WOOD *et al.* (1994) investigaram a possibilidade dos genes TAP1 e TAP2 influenciarem na suscetibilidade à EM, mas também não encontraram nenhuma associação com os alelos TAP da população caucasóide estudada. Da mesma forma, SPURKLAND *et al.* (1994) não encontraram associação com alelos TAP2 na amostra de pacientes noruegueses analisada, utilizando a técnica de hibridização com sondas de oligonucleotídeo para seqüências específicas de três alelos TAP2. HILLERT e OLERUP (1993) relatam a distribuição de fragmentos de restrição dos genes C4 do complemento e do citocromo P-21 (CYP21) numa amostra de suecos previamente tipados quanto aos locos DR e DQ. Encontraram uma predominância de C4/CYP21 B em pacientes DR15.DQ6.DW2 e de C4/CYP21 C em pacientes DR17.DQ2. Desta forma, levantou-se a questão sobre o envolvimento de outros genes próximos à região de classe II na suscetibilidade à EM.

Na tabela 4.2 estão resumidos os resultados de vários estudos populacionais de associação MHC x EM, incluindo-se dados referentes à população analisada, ao tamanho amostral, objetivos e metodologia de cada trabalho. Além disto, foram acrescentados dados relativos ao grupo de pacientes estudado e ao critério de diagnóstico empregado pelos diversos autores.

Tabela 4.2 - Estudos populacionais de associação MHC x Esclerose Múltipla N = nº amostral (pacientes / total)

AUTOR(ES)	ANO	POPULAÇÃO	N	CASOS CLÍNICOS	CRITÉRIO DE DIAGNÓSTICO	OBJETIVO E METODOLOGIA	RESULTADOS
1) BERTRAMS <i>et al</i>	1972	ALEMANHA - caucasóides	393 / 648	PCP	não especificado	Investigar associação com especificidades de classe I (sorologia)	Associação positiva com A3 e B7
2) KURDI <i>et al</i>	1977	árabes procedentes da JORDÂNIA, SÍRIA E LÍBANO	32 / 75	definido ou provável	não especificado	Investigar associação com HLA classe I e II (sorologia)	Associação positiva com DR4
3) NAITO <i>et al</i>	1978	JAPÃO - orientais	43 / 89	não especificado	SCHUMACHER, McALPINE	Investigar associação com HLA classe I e II (sorologia)	Associação positiva com A9, B7, C4 e DR6
4) MARROSU <i>et al</i>	1988	SARDENHA - caucasóides	45 / 182	definido, PCP e SR	ROSE	Investigar associação com DR e DQ (RFLP)	Associação positiva com DR4 e DQ3
5) ODUM <i>et al</i>	1988	SUÉCIA - caucasóides	45 / 211	não especificado	não especificado	Investigar associação com DR e DP (RFLP)	Associação positiva com DR2 e DP4 ou ambos
6) OLERUP <i>et al</i>	1989	SUÉCIA - caucasóides	100 / 200	definido, PCP/SR	não especificado	Investigar associação com DR e DQ (RFLP)	i) Associação positiva amostra total com DR15 e com DQ6, ii) PCP a) positiva com DR15 e DR4 DQ8 ou ambos, b) negativa com DQ7, iii) SR associação positiva com DR15 e DR17 DQ2 ou ambos
7) VARTDAL <i>et al</i>	1989	NORUEGA - caucasóides	61 / 361	definido ou provável	POSER	Investigar associação com HLA-A, -B, -DR (sorologia) e polimorfismo-DQ (SSO)	Associação positiva com B7, DR2 e DQ6, segmentos 10-29, 31-52, 58-69 e 71-83 de diferentes moléculas DQβ comuns a 97% dos pacientes
8) FUGGER <i>et al</i>	1990	DINAMARCA - caucasóides	37 / 133	SR	não especificado	Investigar associação com alelos DPB (PCR-SSO, dot blot)	Não encontraram associação
9) HOWELL <i>et al</i>	1991	CANADA - descendentes de franceses	52 / 99	não especificado	não especificado	Investigar associação com HLA-DP (PCR-SSO)	Não encontraram associação
10) MUNTONI <i>et al</i>	1991	Norte da ITÁLIA - caucasóides SARDENHA - caucasóides	a) 9 / 25 b) 14 / 39	não especificado	não especificado	Investigar associação com diferentes haplótipos HLA-DR2 (RFLP)	a) Associação positiva com DR15 Dw2 DQ6 na pop Norte da Itália, presente em 100% dos pacientes e 50% dos controles b) nenhuma associação na pop Sardenha
11) OLERUP e HILLERT	1991	SUÉCIA - caucasóides	179 / 429	definido, PCP e SR	não especificado	Investigar associação com HLA de classe II (RFLP, SOUTHERN, PCR-SSO)	i) amostra total associação positiva com DR15 Dw2 DQ6 ou DR15 ou DQ6, ii) SR associação positiva com DR17 DQ2, iii) Não encontraram associação com DP
12) SPURKLAND <i>et al</i>	1991b	NORUEGA - imigrantes japoneses	24 / 47	definido ou provável	POSER	Investigar associação com DRB1, DQA1, DQB1, DPA1 e DPB1 (PCR-SSO)	Não encontraram associação
13) FUKAZAWA <i>et al</i>	1992	JAPÃO - orientais	67 / 255	definido, SR, PCP	POSFR	Investigar associação com especificidades de classe I (-A, -B, -C) e de classe II (-DR, -DQ) (sorologia)	i) Associação positiva com DR4, DR8 e DQ7 ii) Associação negativa com DR53 e DR9
14) HILLERT <i>et al</i>	1992	NORUEGA - caucasóides	62 / 160	definido, PCP e SR	não especificado	Investigar associação com HLA de classe II (SOUTHERN BLOT, RFLP, PCR-SSO)	Frequência de DR17 DQ2 cinco vezes mais comum na SR do que na PCP
15) HAEGERT e FRANCIS	1993	CANADA - caucasóides a) descendentes de imigrantes franceses b) etnia mista	a) 79 / 151 b) 62 / 131	definido	POSER	Investigar associação com HLA de classe II (PCR-SSO e RFLP)	a) Associação positiva com DRB1*1501 DQA1*0102 DQB1*0602 e DQβLeu26 b) Associação positiva com DRB1*1501
16) HILLERT e OLERUP	1993	SUÉCIA - caucasóides	148 / 306	definido, PCP e SR	SCHUMACHER	Investigar associação com C4, CYP21 e HLA-B (SOUTHERN BLOT, RFLP)	Associação positiva com C4/CYP21B em pacientes DR15 Dw2 DQ6 e com C4/CYP21C em pacientes DR17 DQ2
17) LIBLAU <i>et al</i>	1993	SUÉCIA - caucasóides	60 / 120	definido, SR	POSER	Investigar associação com LMP e TAP (RFLP, PCR-SSO)	Não encontraram associação
18) TIENARI <i>et al</i>	1993	FINLÂNDIA - caucasóides	72 / 157	não especificado	POSER	Investigar associação com alelos DQA1 e DQB1 (PCR-SSO)	Associação positiva com DQA1*0102 e DQB1*0602
19) ALLEN <i>et al</i>	1994	SUÉCIA - caucasóides	94 / 269	definido, SR	McDONALD e HALLIDAY	Investigar associação com alelos de classe II (PCR-SSO)	i) Associação positiva com DRB1*1501 DQA1*0102 DQB1*0602 e DRβ Va186, ii) Associação negativa com DRB1*0401 DQA1*0301 DQB1*0301 e DRβ G186
20) KELLAR-WOOD <i>et al</i>	1994	REINO UNIDO - caucasóides	173 / 301	definido	POSER	Investigar associação com TAP1 e TAP2 em indivíduos previamente tipados quanto a DR e DQ (RFLP, SOUTHERN, PCR-SSO)	Não encontraram associação
21) SPURKLAND <i>et al</i>	1994	NORUEGA - caucasóides (?)	69 / 242	não especificado	não especificado	Investigar associação com alelos TAP2 (PCR-SSO)	Não encontraram associação
22) KELLY <i>et al</i>	1995	REINO UNIDO - descendentes de imigrantes do Caribe (negros) e da Índia (asiáticos)	negros 30 / 126 asiáticos 40 / 133	definido ou provável	POSER	Investigar associação com DRB1, DQA1 e DQB1 (RFLP, PCR-SSO)	i) negros associação positiva DRB1*1501 DQA1*0102 DQB1*0602, ii) asiáticos associação positiva com DRB1*1501 DQA1*0102 DQB1*0602

4.2.3 - Envolvimento dos Genes TCR na EM

Nos animais com EAE induzida por MBP, a resposta de células T com especificidade para este antígeno consiste na utilização de um repertório limitado de TCR, particularmente em relação ao segmento $V\beta$ (ZAMVIL e STEINMAN, 1990). Evidências quanto à possível participação dos genes TCR na EM vêm sendo obtidas principalmente através das análises de polimorfismo dos TCRs dos linfócitos de pacientes humanos com EM.

A herança de genes que codificam a cadeia β do TCR foi analisada por SEBOUN *et al.* (1989) em famílias americanas contendo um ou mais afetados com EM. Foram incluídos 40 pares de irmãos concordantes quanto à forma SR da EM, nos quais realizou-se a análise segregacional de marcadores polimórficos de segmentos das regiões C e V do complexo TCR β através da técnica de RFLP. O método de análise empregado consistia em identificar os haplótipos idênticos por descendência, herdados pelos pares de irmãos afetados, comparando-se a proporção esperada e a observada. A proporção média dos haplótipos TCR β idênticos por descendência encontrada entre os pares de irmãos afetados foi significativamente maior da que seria esperada pela segregação ao acaso. Isto é sugestivo de que os genes TCR β , ou outro intimamente ligado a estes influencia na suscetibilidade à EM. A associação da EM com genes TCR verificada nos estudos em famílias, contudo, não é absoluta, dada a existência de pares de irmãos afetados que não possuem haplótipos idênticos por descendência.

MARTIN *et al.* (1993) realizaram estudos em gêmeos, tendo selecionado pares monozigóticos em que apenas um dos irmãos apresentava EM, a fim de verificar a especificidade e a frequência das células T do sangue desses indivíduos. Desta forma, pretendia-se uniformizar o componente genético, visando principalmente aos genes MHC e TCR, eliminando-se uma variável que, segundo os autores, poderia atrapalhar nas conclusões sobre o envolvimento das células T na EM. Seus dados mostram não haver diferença significativa quanto à frequência das células T específicas para a MBP entre indivíduos afetados e normais geneticamente idênticos. Concluem com isso que, se é que existe alguma relação entre a herança de determinados genes MHC e TCR e a ocorrência de clones específicos de células T anti-MBP nos pacientes com EM, a frequência dessas células varia meramente em função da constituição genética de cada indivíduo e não é um fator distintivo entre pessoas afetadas e normais. HAGHEB *et al.* (1993) fazem críticas a este trabalho, lembrando que os genes TCR sofrem rearranjos somáticos e mesmo entre os pares de gêmeos monozigóticos pode haver diferença quanto à expressão dos TCRs.

Apesar de existirem relatos da participação de seqüências específicas da molécula de TCR na maior suscetibilidade à EM em humanos (BEALL, 1989; OKSENBERG, 1989; BEN-NUN *et al.*, 1991), FUGGER (1994) não encontrou nenhum segmento na molécula de TCR que fosse particularmente repetitivo entre os clones de células T derivados de pacientes com a forma SR da EM. BEN-NUN *et al.* (1991) observaram que os clones de células T específicos para a MBP isolados de pacientes belgas com EM apresentavam, ao contrário dos roedores com EAE, grande variabilidade quanto ao tipo de TCR usado. Porém, num mesmo indivíduo, os clones de células T CD4⁺ MBP-específicos possuíam em sua maioria um determinado segmento V β em comum. A maioria dos clones com V β 15 ou V β 12 reconhecia o epítipo 149-170 da molécula de MBP e apresentavam restrição para DR2 ou DR7, considerando-se o mesmo indivíduo. Não encontraram, contudo, nenhuma correlação entre os TCRs de diferentes pacientes e a especificidade ao epítipo da MBP ou ao tipo HLA.

RICHERT *et al.* (1991) observaram uma grande heterogeneidade quanto aos rearranjos gênicos dos TCRs expressos nos linfócitos de um paciente com EM. Apesar de não terem investigado a ocorrência de segmentos comuns nas moléculas de TCR desses pacientes, seus resultados indicam que no mesmo indivíduo os clones de linfócitos T CD4⁺ não são tão homogêneos, como foi sugerido por BEN-NUN *et al.* (1991).

A presença de células T com TCR $\gamma\delta$ foi investigada nas lesões encefálicas de pacientes com a forma crônica da EM por BATTISTINI *et al.* (1995). Seus resultados sugerem que nestes pacientes são utilizadas preferencialmente subpopulações de linfócitos T com TCRs codificados pelo segmento V δ 2-D δ 3-J δ 3, respondedoras ao mesmo tipo de antígeno, neste caso uma proteína de choque térmico (hsp-60). As hsp são produzidas nos locais de inflamação e possivelmente contribuem para a manutenção da doença em estado crônico.

V - RESULTADOS

5.1 - Análise Estatística dos Dados de Gêmeos

A análise estatística dos dados de concordância em gêmeos foi realizada no presente trabalho em cada caso através do cálculo 1) da herdabilidade, 2) da probabilidade de aceitação ou rejeição da hipótese de igualdade entre as proporções e 3) da estimativa do intervalo de confiança a nível de 95% para as proporções de concordância individuais e 4) para a diferença de concordância entre pares de gêmeos MZ e DZ.

A fórmula comumente utilizada para o cálculo da herdabilidade (h^2) é, segundo CAVALLI-SFORZA e BODMER (1971):

$$h^2 = \frac{s_G^2}{s_G^2 + s_A^2} \quad (5.1)$$

onde s_G^2 = variância genética e s_A^2 = variância ambiental.

A herdabilidade é uma estimativa da contribuição do componente genético na expressão de um certo caráter, numa determinada amostra, num dado momento. Sua finalidade é dar a proporção da variação fenotípica que é devida a fatores genéticos. As características que são pouco influenciadas pelo ambiente apresentam alto grau de herdabilidade, o que implica na participação efetiva de fatores genéticos na sua determinação. Por outro lado, quanto menor o grau de herdabilidade, maior a influência de fatores ambientais e menor a participação do componente genético sobre o caráter.

A estimativa da herdabilidade é normalmente utilizada para caracteres quantitativos. O índice de herdabilidade de Holzinger (H) é uma medida arbitrária para o cálculo da herdabilidade de caracteres qualitativos em gêmeos (BEIGUELMAN, 1994), que utiliza as taxas de concordância para o caráter em estudo, qual seja,

$$H = \frac{C_{MZ} - C_{DZ}}{1 - C_{DZ}} \quad (5.2)$$

onde C_{MZ} = taxa de concordância em pares de gêmeos MZ e C_{DZ} = taxa de concordância em pares de gêmeos DZ. Ainda que o emprego desta fórmula seja pouco usual, obtém-se através desta uma estimativa razoável do grau de her-

dabilidade da EM. E a média dos valores obtidos dos diversos trabalhos pode nos dar uma idéia de quanto o componente genético pode influenciar na manifestação da doença.

A despeito da herdabilidade referir-se a um momento estático e ser aplicável apenas à amostra em que foi estimada, é comum fazer-se generalizações partindo dos resultados de alguns estudos. Este procedimento é utilizado com frequência pelos melhoristas de animais e de plantas para melhor definir sua estratégia de seleção.

A comparação entre proporções é freqüentemente empregada nas análises dos dados de pesquisas na área de saúde. A fim de verificar se as diferenças encontradas entre as taxas de concordância em MZ e DZ diferem significativamente, foi calculado o valor de z pela fórmula 5.3 (SHOTT, 1990), obtendo-se uma probabilidade (P) correspondente através da utilização da tabela da curva normal.

$$z = \frac{C_{MZ} - C_{DZ}}{\sqrt{\frac{C_{MZ}(1-C_{MZ})}{n_{MZ}} + \frac{C_{DZ}(1-C_{DZ})}{n_{DZ}}}} \quad (5.3)$$

onde n_{MZ} = número total de pares de gêmeos MZ e n_{DZ} = número total de pares de gêmeos DZ.

As hipóteses testadas neste caso foram: 1) hipótese nula [H_0]: $C_{MZ} = C_{DZ}$, significando que a taxa de concordância em gêmeos MZ não difere significativamente da taxa de concordância em gêmeos DZ e os desvios podem ser atribuídos ao acaso; 2) hipótese alternativa [H_A]: $C_{MZ} \neq C_{DZ}$, significando que a taxa de concordância em gêmeos MZ difere significativamente da taxa de concordância em gêmeos DZ. Um valor de z grande favorece H_A e, ao contrário, um valor pequeno de z favorece H_0 . No presente trabalho rejeitou-se H_0 sempre que ao valor de z calculado correspondeu a um valor de $P > 0,05$.

Em seguida foram calculados os intervalos de confiança de 95% separadamente para os pares de MZ (fórmula 5.4) e DZ (fórmula 5.5) e para a diferença de concordância entre MZ e DZ (fórmula 5.6), conforme SHOTT (1990).

$$C_{MZ} \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{C_{MZ}(1-C_{MZ})}{n_{MZ}}} \quad (5.4)$$

$$C_{DZ} \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{C_{DZ}(1-C_{DZ})}{n_{DZ}}} \quad (5.5)$$

$$C_{MZ} - C_{DZ} \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{C_{MZ}(1-C_{MZ})}{n_{MZ}} + \frac{C_{DZ}(1-C_{DZ})}{n_{DZ}}} \quad (5.6)$$

Encontrou-se que a taxa de concordância em gêmeos monozigóticos é quase sempre significativamente superior à de dizigóticos, como mostrado na tabela 5.1. Isto sugere que, de fato, existe um componente genético na determinação da doença.

Pelos dados da tabela 5.1 podemos dizer que somente nos trabalhos de MacKAY e MYRIANTHOPOULOS e do GRUPO FRANCÊS as taxas de concordância entre gêmeos MZ e DZ não diferem significativamente entre si. Nos demais casos, a concordância em MZ é significativamente maior do que em DZ, o que reforça a hipótese da participação de um componente genético na determinação da suscetibilidade à EM. Tomando como exemplo o trabalho de CENDROWSKI de maior número amostral ($N = 107$), tem-se que o intervalo de confiança de 95% da diferença entre as proporções ($C_{MZ} - C_{DZ}$) é de $0,20 \pm 0,1457$, isto é, um valor qualquer da diferença entre as taxas de concordância quanto à EM entre os pares de gêmeos MZ e DZ, tem 95% de probabilidade de estar entre 0,0543 e 0,3457.

Considerando-se os trabalhos individuais, a herdabilidade da EM varia desde 18,1% até 40,0%, média de 28%, excluídos os dois trabalhos referidos anteriormente, nos quais o valor de H diferiu consideravelmente dos demais, coincidindo de serem os únicos autores a obterem resultados não significativos quanto à diferença de concordância entre MZ e DZ. Nota-se uma grande coincidência entre os dados de H e dos intervalos de confiança para a diferença, apesar de se tratar de duas abordagens distintas. Tal coincidência provavelmente acontece porque o valor de $1 - CDZ$ é praticamente igual a 1, e sendo assim, $H \approx C_{MZ} - C_{DZ}$.

5.2 - Cálculo do Risco Relativo

O risco relativo (RR) é uma estimativa da probabilidade de um indivíduo com determinado alelo HLA desenvolver a doença, em comparação com os indivíduos que não têm esse alelo, num contexto populacional definido. O RR é empregado nos estudos populacionais de associação entre alelos HLA e doenças, podendo-se fazer menção ao fenótipo HLA, quando somente é conhecida a especificidade sorológica dos indivíduos. Desta forma, os dados são agrupados em tabelas 2x2, conforme mostrado no exemplo a seguir.

fenótipo HLA	pacientes	controles
presente	p^+	c^+
ausente	p^-	c^-

O RR é, então, calculado pela fórmula 5.7 (STITES e TERR, 1992):

$$RR = \frac{p^+ \times c^-}{p^- \times c^+} \quad (5.7)$$

onde p^+ e p^- são os números de pacientes com e sem o fenótipo em estudo, e c^+ e c^- correspondem aos números de controles normais com e sem o fenótipo em questão, respectivamente.

Nos estudos de associação entre HLA e doença é imprescindível que a amostra de controles seja obtida da mesma população dos pacientes. Isto porque a frequência dos alelos HLA varia entre diferentes grupos étnicos e, dentro do mesmo grupo étnico, há frequentemente variações entre as populações de diferentes procedências.

Quando $RR > 1$ diz-se que a associação é positiva, isto é, há evidências de que o alelo em questão, ou outro ligado a ele, possa conferir maior suscetibilidade à doença. Assim, por exemplo, um $RR = 7$ para determinado alelo indica que os indivíduos com o alelo em questão têm uma probabilidade 7 vezes maior de desenvolver a doença em estudo do que os que não têm o referido alelo. Quanto maior o RR, mais freqüente é o alelo no grupo de pacientes. Quando $RR < 1$ diz-se que a associação é negativa, significando que o alelo em questão, ou outro intimamente ligado a ele, confere proteção contra a doença em estudo. Um valor de $RR = 1$ indica ausência de associação (STITES e TERR, 1992).

Nos estudos de associação entre HLA e doenças, comumente são encontradas associações positivas com diversos alelos. Diz-se que a associação é primária com determinado alelo quando, dentre todos os alelos testados, o RR relativo daquele é maior que os demais. Isto pressupõe que, no que concerne à participação do HLA na suscetibilidade à doença, tal alelo seja o principal responsável pela doença, e os outros são secundários ou mesmo não relacionados. Neste último caso, as associações com os demais alelos podem ocorrer devido ao fato destes alelos estarem intimamente ligados entre si, localizados muito próximo ao primeiro. Contudo, é ainda possível que mais de um alelo HLA esteja envolvido na expressão da doença.

Tabela 5.1 - Estimativas do grau de concordância para a esclerose múltipla em gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ). H = herdabilidade; P = probabilidade; NS = não significativo.

Autores	Ano	Concordância		Pares de Gêmeos TOTAL	H%	Intervalos de Confiança			z	P
		MZ	DZ			MZ	DZ	MZ - DZ		
MacKAY e MYRIANTHOPOULOS	1966	9/39 (23%)	6/29 (21%)	68	3,0	0.23 ± 0.1322	0.21 ± 0.1474	0.02 ± 0.1980	0,24	0,4052 NS
CENDROWSKI	1968	15/51 (29%)	5/56 (9%)	107	22,5	0.29 ± 0.1251	0.09 ± 0.0747	0.20 ± 0.1457	2,76	0,0028
BOBOWICK <i>et al.</i>	1978	2/5 (40%)	0/4 (0%)	9	40,0	0.40 ± 0.4294	0.00	0.40 ± 0.4294	1,83	0,0336
WILLIAMS <i>et al.</i>	1980	6/12 (50%)	2/12 (17%)	24	40,0	0.50 ± 0.2829	0.17 ± 0.2109	0.33 ± 0.3528	1,85	0,0322
CURRIER e ELDRIDGE	1982	8/22 (36%)	3/29 (10%)	51	29,0	0.36 ± 0.2010	0.10 ± 0.1108	0.26 ± 0.2296	2,22	0,0132
HELTBERG e HOLM	1982	4/19 (21%)	1/28 (4%)	47	18,1	0.21 ± 0.1833	0.04 ± 0.0687	0.17 ± 0.1958	1,75	0,0401
EBERS <i>et al.</i>	1986	7/27 (26%)	1/43 (2%)	70	24,2	0.26 ± 0.1653	0.02 ± 0.0450	0.24 ± 0.1713	2,70	0,0035
KINNUNEN <i>et al.</i>	1988	2/7 (29%)	0/6 (0%)	13	28,6	0.29 ± 0.3347	0.00	0.29 ± 0.3347	1,67	0,0475
FRENCH RESEARCH GROUP	1992	1/17 (6%)	1/37 (3%)	54	3,3	0.06 ± 0.1119	0.03 ± 0.0523	0.03 ± 0.1235	0,50	0,3085 NS
SADOVNICK <i>et al.</i>	1993	8/26 (31%)	2/43 (5%)	69	27,4	0.31 ± 0.1774	0.05 ± 0.0629	0.26 ± 0.1882	2,72	0,0033
MUMFORD <i>et al.</i>	1994	11/44 (25%)	2/61 (3%)	105	22,5	0.25 ± 0.1279	0.03 ± 0.0447	0.22 ± 0.1355	3,14	0,0008

Tabela 5.2 - Associações MHC x Esclerose Múltipla em populações caucasóides de diversas procedências. NC = não calculado. NS = não significativo. Referências numeradas de acordo com a tabela 4.2.

população	MHC	RR~	Ref.	
1) alemães	A3	1,5	(1)	
	B7	2,4	(1)	
2) árabes	DR4	13,1	(2)	
3) canadenses	DR15.Dw2.DQ6	2,6	(15)	
	DQβ Leu26	5,7	(15)	
4) finlandeses	DQA1*0102	3,8	(18)	
	DQB1*0602	4,0	(18)	
5) italianos	Norte Sardenha	DR15.Dw2.DQ6	NC	(10)
		DR4	2,5	(4)
		DQ3	2,2	(4)
6) noruegueses	B7	3,7	(7)	
	DR2	7,6	(7)	
	DQ6	5,3	(7)	
	SR	DR17.DQ2	NS	(14)
7) suecos	amostra total	DR2	6,1	(5)
		DP4	5,4	(5)
		DR2/DP4	8,1	(5)
		DR15	3,3	(11)
		DR15	3,5	(6)
		DR15.Dw2.DQ6	3,9	(11)
		DQ6	2,2	(6) e (11)
		C4/CYP21B/DR15.Dw2.DQ6	2,7	(16)
		C4/CYP21C/DR17.DQ2	13,7	(16)
		DRβ Val86	3,5	(19)
		DRβ Gli86	0,17	(19)
	PCP	DR15	2,7	(6)
		DR4.DQ8	2,3	(6)
		DR15/DR4.DQ8	7,0	(6)
		DQ7	0,06	(6)
	SR	DR15	3,8	(6)
	DR17.DQ2	1,8	(6)	
	DR17.DQ2	2,2	(11)	
	DR15/DR17.DQ2	5,6	(6)	

Na tabela 5.2 estão resumidos os valores de RR das associações entre HLA e EM, calculados segundo a fórmula 5.7, das populações caucasóides estudadas pelos mesmos autores listados na tabela 4.2, os quais frequentemente se limitam a informar se encontraram ou não associação, sem fazer menção ao RR correspondente.

Note que as associações negativas com DRβGli86 e DQ7 são representadas por valores de RR < 1. Dentre todas as populações de caucasóides estudadas, a de suecos parece melhor caracterizada quanto às associações entre HLA e EM, dado o maior número de registros.

VI - DISCUSSÃO

6.1 - Sobre a Etiologia

Apesar de muitas controvérsias a respeito da etiologia da EM, na medida em que novos estudos vêm sendo realizados, os fatores implicados na predisposição à doença vão sendo desvendados aos poucos. A principal indicação da existência de suscetibilidade genética à EM procede da observação de que a doença é mais freqüente entre membros da mesma família. A ocorrência familiar da EM mostra que o risco de desenvolver a doença é tanto maior, quanto maior o grau de parentesco com o probando afetado. O risco de recorrência entre primos de primeiro grau de uma mulher afetada pela EM chega a ser 25 a 50 vezes maior do que na população em geral (TIENARI, 1994). Num estudo populacional, constatou-se que 20% dos casos *index* têm um consanguíneo afetado, sendo o risco de recorrência da EM maior entre os irmãos do afetado (4-5%), seguido de 3% em relação aos pais, de 2,5% em relação aos filhos, de 2% em relação aos tios e primos e de 1,5% entre os sobrinhos (MATTHEWS *et al.*, 1991).

Dentre os fatores genéticos implicados na suscetibilidade à EM, além dos genes MHC e TCR, é possível que ainda outros estejam envolvidos e necessitam ser melhor estudados. EBERS (1994) acredita que os genes HLA não contribuam mais do que 10% para a suscetibilidade à EM. O gene que codifica a MBP ou outro adjacente, localizado no cromossomo 18, foi indicado por TIENARI *et al.* (1992) como um dos possíveis fatores de risco da EM. Seus estudos foram realizados em pacientes finlandeses, procedendo-se uma análise segregacional de diferentes alelos da MBP em famílias com vários membros afetados e uma análise de associação numa amostra populacional de indivíduos não aparentados. No estudo em famílias, foi detectada a predominância de determinados haplótipos da MBP entre os afetados com EM, e no estudo populacional foi encontrado um alelo da MBP significativamente mais freqüente entre os pacientes do que nos controles, com $RR = 3,3$. Outros genes que merecem ser melhor investigados são os que codificam as principais citocinas observadas no SNC de pacientes com EM ou que regulam a produção das citocinas e das moléculas de adesão celular implicadas na imunopatologia da EM, os que estão implicados na produção *in vivo* de mitógenos que induzem a proliferação das células supressoras da resposta imune e possíveis deficiências na regulação da expressão dos genes implicados na proliferação dessas células.

Não menos importante é a **caracterização dos fatores ambientais** que contribuem para a doença. Se por um lado a diferença de concordância entre gêmeos MZ e DZ indica a participação de fatores genéticos na predisposição à doença, por outro lado, uma taxa média de concordância de apenas 32% em gêmeos MZ implica também na existência de um componente ambiental importante. Sendo assim, não basta o indivíduo ter os genes MHC ou TCR, ou outros ainda não discutidos, que predispõem à EM, para que venha a manifestar os sintomas da doença. Há que se levar em consideração tanto os meios interno e externo do organismo humano, que certamente estão implicados na predominância da EM em caucasóides e no sexo feminino, na distribuição geográfica da EM e na faixa etária de manifestação da doença. DIJKSTRA *et al.* (1993) relatam, por exemplo, que os hormônios sexuais interferem no balanço entre a imunidade humoral e a mediada por células, o que pode ser um fator que contribui para a maior prevalência da EM entre as mulheres.

No que concerne aos fatores etiológicos extrínsecos, por enquanto há apenas algumas evidências que favorecem a exposição prévia a agentes infecciosos. Existem relatos da ocorrência da EM ou do agravamento do estado dos pacientes com EM imediatamente após a vacinação contra gripe, sarampo e poliomielite (MATTHEWS *et al.*, 1991) que reforçam a hipótese da indução da EM por antígenos virais. Uma explicação plausível é que a presença de determinados vírus altera o equilíbrio da produção de certas citocinas que visam impedir a multiplicação viral e que, em última instância, desencadeariam a doença. Alternativamente pode ser que existam antígenos virais muito semelhantes a alguma molécula do hospedeiro, a qual torna-se um autoantígeno após a indução da expressão anormal de moléculas HLA no SNC. Vale lembrar que as respostas imunológicas contra as infecções virais podem aumentar a expressão das hsp e, conseqüentemente, levar à exacerbação do processo inflamatório e à injúria dos tecidos.

6.2 - *Imunopatologia*

Dentre os possíveis autoantígenos implicados na patogênese da EM citam-se a MBP e a PLP como os principais, e outros, tais como o gangliosídeo GM1 e as proteínas MAG e MOG da mielina (WUCHERPFENNIG, 1994). Especial enfoque tem sido dado à MBP que, no entanto, é menos abundante que a PLP, não é expressa unicamente no SNC e sua localização no lado citoplasmático da bainha de mielina, entre duas camadas lipídicas, dificulta o acesso das CAA (COLMAN *et al.*, 1987).

Baseado na constatação de que altos níveis de anticorpos anti-MBP estavam presentes no LCR de 96% dos pacientes com EM e apenas 3% dos pacientes apresentava altos níveis de anticorpos anti-PLP, BANSIL *et al.* (1995) propõem que a EM apresenta duas formas distintas: uma mais comum, associada à presença de anticorpos anti-MBP, e outra menos freqüente, em que são encontrados altos níveis de anticorpos anti-PLP.

Fato indubitável é que as células T com potencial de reagir contra a MBP, ou qualquer que seja o autoantígeno envolvido, podem ser encontradas em quantidades equivalentes em pessoas normais e afetadas pela EM (JINGWU *et al.*, 1992a; JINGWU *et al.*, 1994). Isto não é de se admirar, uma vez que durante o amadurecimento no timo, provavelmente não são deletados os linfócitos cujos receptores de membrana interagem com várias moléculas tecido-específicas e, portanto, os linfócitos reativos à MBP são liberados ilesos para a circulação onde, em situação normal, são mantidos em estado de latência, sob efeito imunossupressor.

A questão que levanta a possibilidade dos clones de linfócitos T anti-MBP estarem implicados na autoimunidade é que, nos pacientes com EM, detectou-se a presença de IL-2R na membrana dessas células e ausência do mesmo nas células reativas à MBP de pessoas normais, indicando que nos pacientes com EM estes clones de linfócitos foram ativados (JINGWU *et al.*, 1992a; MATSIOTA-BERNARD *et al.*, 1993). Além disto, tais células estão presentes no LCR dos afetados e expressam quantidade aumentada de mRNA das citocinas IL-4 e INF- γ (LINK, 1994), ambas responsáveis pela ativação de macrófagos (BROSNAN *et al.*, 1995).

Fato curioso é que, uma vez danificada a bainha de mielina, há produção de formas incomuns da MBP no processo de remielinização dos axônios (ROTH *et al.*, 1987) e a constatação de que nos pacientes com EM predominam os clones anti-MBP reativos a essas formas sobre os que são reativos à MBP comum de 18,5 kD (VOSKUHLE *et al.*, 1994). Neste caso, pode-se supor que o envolvimento da MBP na autoimunidade possa estar relacionado a uma disfunção do oligodendrócito que leva à produção de uma bainha mielina de composição alterada. Dada a importância de se determinar se os clones de células T anti-MBP de pacientes e controles são dirigidos para as mesmas isoformas da MBP, é necessária a especificação do tipo de MBP utilizado na indução dessas células *in vitro* e a utilização preferencial da MBP humana nesses experimentos. Em alguns trabalhos, como em MATSIOTA-BERNARD *et al.* (1993), SUN (1993) e LINK (1994), é utilizada a MBP bovina, além da MBP humana.

A análise do papel das citocinas na EM é dificultada por vários fatores, dentre eles, a regulação recíproca da produção dessas moléculas, os efeitos anta-

gônicos dose-dependentes, a regulação autócrina e a vida média extremamente curta das citocinas nos fluidos corporais (OLSSON, 1992). Mesmo assim, através dos resultados de diversos estudos, foi possível identificar as citocinas que podem estar relacionadas com a melhora ou com a piora do estado clínico da EM (tabela 4.1). As que estão implicadas nas exacerbações da EM são, via de regra, indutoras da expressão de moléculas MHC nas células do SNC e de moléculas de adesão celular e de MHC de classe II nas células endoteliais, além de ativar a atividade fagocítica de macrófagos e células da micróglia. Segundo TROJANO *et al.* (1992), as células endoteliais dos capilares cerebrais apresentam características peculiares, que as distinguem das células endoteliais das demais regiões. Isto talvez possa explicar as alterações locais da permeabilidade da BHE decorrente da ação dessas citocinas.

Dois tipos celulares aparentemente têm um papel relevante na patogênese da EM: a subpopulação Th1 de linfócitos T auxiliares $CD4^+$ e os macrófagos. As células Th1 ativam os macrófagos que, por sua vez, liberam uma grande variedade de citocinas que, em última análise, podem causar danos à bainha de mielina (ARNASON, 1995). Esses efeitos são provavelmente antagonizados pelas citocinas liberadas pelos linfócitos T supressores $CD8^+$ e pela subpopulação Th2 de linfócitos T auxiliares $CD4^+$, tais como IL-4 e IL-10, que estão implicadas na melhora da EM. Os períodos de exacerbação da doença devem ser decorrentes de uma falha nos mecanismos de controle da atividade dessas células.

A detecção de altos níveis de imunoglobulinas no LCR dos pacientes sugere a participação de linfócitos B ativados na patofisiologia da EM. Embora haja alguns relatos da presença de clones de linfócitos B autorreativos e de anticorpos anti-MBP (CASH *et al.*, 1992; SÖDERSTRÖM *et al.*, 1993) ou anti-gangliosídeos (STEVENS *et al.*, 1992) na EM, ainda não está claro se a ativação dessas células e subsequente produção de autoanticorpos precedem a desmielinização no SNC e estão implicadas na imunopatogênese da EM, ou se refletem um mecanismo imune de ativação policlonal em resposta a danos teciduais. O fato é que níveis aumentados de IgG e de IgM no LCR podem ocorrer em diversas outras anomalias e, sendo assim, a utilização deste critério no diagnóstico da EM deve ser feita com muita cautela.

Melhores investigações precisam ser feitas a fim de esclarecer o papel das células B no desencadeamento e/ou na manutenção da autoimunidade na EM. Também a especificidade dos anticorpos encontrados em alta concentração no LCR dos pacientes com EM está em aberto para se determinar.

6.3 - Sobre os Estudos em Gêmeos

Como na maioria dos trabalhos de estudos em gêmeos a concordância em pares de gêmeos MZ diferiu significativamente da concordância em DZ (tabela 5.1), com exceção dos trabalhos de MacKAY e MYRIANTHOPOULOS (1966) e do GRUPO FRANCÊS (1992), procurou-se justificar a não-significância dos resultados de concordância entre MZ e DZ destes dois últimos trabalhos através da análise minuciosa da metodologia empregada por estes autores. Em ambos os trabalhos nota-se uma certa dificuldade, senão insegurança, quanto à determinação da zigosidade e quanto ao diagnóstico da EM. Por exemplo, os próprios autores afirmam que, por razões técnicas, não foi possível fazer a análise de DNA para testar a zigosidade em todos os pares de gêmeos da amostra, restringindo-se a informações dadas pelos pacientes e que, após os resultados da RNM entre os membros não afetados clinicamente, constatou-se que vários apresentavam sinais indicativos da EM (GRUPO FRANCÊS). Da mesma forma MacKAY e MYRIANTHOPOULOS afirmaram ter inicialmente determinado a zigosidade baseada em grupos sanguíneos e, depois, reclassificaram os pares de gêmeos MZ e DZ baseado em outros critérios (análise de DNA e características físicas). Além disto os critérios de diagnóstico foram estabelecidos por um dos autores, que subdividiu os pares de gêmeos em quatro categorias: 1) definido, inteiramente concordante; 2) provável, inteiramente concordante; 3) definido, possivelmente concordante; 4) definido, discordante. Ao incluir somente os pares “inteiramente concordantes” na análise, MacKAY e MYRIANTHOPOULOS encontraram uma taxa de concordância de 15,5% em MZ e de 10,3% em DZ, e após a inclusão dos pares “possivelmente concordantes”, obtiveram os dados mostrados na tabela 5.1 (23% em MZ e 21% em DZ).

Em vista do que foi colocado, pode-se inferir que a taxa média de concordância em gêmeos MZ é de aproximadamente 32%, enquanto que em gêmeos DZ este valor é algo próximo de 6%, diferindo significativamente. A EM é, portanto, uma doença que envolve a participação de um componente genético, provavelmente poligênico, posto que contribui em média 28% para a suscetibilidade à doença, e de fatores ambientais relevantes que contribuem em média 72% na determinação da expressão da doença.

6.4 - Sobre as Associações MHC x EM

Existem várias hipóteses para explicar a associação de alelos HLA com doenças. Dentre as mais aceitas, citam-se: a) moléculas HLA como receptores

para agentes etiológicos; b) moléculas HLA seletivas para peptídeos antigênicos; c) TCR determina predisposição à doença; d) agentes causais mimetizam moléculas do hospedeiro; e) expressão anormal de moléculas HLA de classe II (STITES e TERR, 1992). A primeira hipótese supõe que moléculas HLA específicas podem agir como receptores para agentes etiológicos tais como vírus ou toxinas bacterianas. Neste caso, obviamente, o desencadeamento da doença depende de exposição prévia ao agente etiológico. A segunda hipótese, por sua vez, supõe que determinadas moléculas HLA se associam preferencialmente a certos peptídeos antigênicos, os quais desencadeiam uma resposta agressiva contra o próprio hospedeiro. A terceira hipótese responsabiliza o TCR pela predisposição à doença. Neste caso, seria detectada uma associação indireta com o HLA, dado que existe uma correspondência entre essas duas moléculas, através de interações específicas entre diferentes TCRs e diferentes complexos antígeno-molécula HLA.

Segundo a hipótese do mimetismo molecular, o agente etiológico apresenta semelhança estrutural com moléculas próprias do hospedeiro, codificadas por genes de dentro ou não da região HLA. Isto pode resultar em duas formas de reação do hospedeiro: 1) o agente etiológico passa despercebido e nenhuma resposta imune é acionada; 2) o hospedeiro aciona uma resposta imune contra o antígeno e, dada a similaridade deste com certa molécula própria do organismo hospedeiro, a resposta é também autoimune. Por fim, segundo a última hipótese mencionada no parágrafo anterior, a associação de doenças com moléculas HLA de classe II é devida à indução de expressão destas em células que normalmente não as expressam, levando à apresentação de antígenos próprios que, por serem tecido-específicos, escapam ao processo de educação tímica. Desta forma, clones de células T autorreativas migrariam para o tecido em questão, lisando células próprias do hospedeiro.

No caso da EM, mais de uma destas hipóteses podem ser aplicadas. A semelhança da MBP com antígenos virais corrobora a hipótese de mimetismo molecular (ATKINS *et al.*, 1990). A presença de linfócitos T autorreativos na corrente sangüínea e no LCR, e concomitante surgimento de células apresentadoras de antígeno nas meninges e espaços perivasculares no SNC, podem estar relacionados com a expressão anormal de moléculas HLA de classe II. Vale lembrar aqui que as associações mais fortes do HLA com a EM envolvem justamente a sub-região DR-DQ. Entretanto, seria muito precoce qualquer afirmação neste sentido, uma vez que a suscetibilidade à EM provavelmente envolve a participação de vários genes, alguns dos quais ainda estão para serem identificados.

A análise comparativa dos dados sobre a EM é dificultada por alguns problemas inerentes à doença como, por exemplo, a diferença de prevalência entre as regiões, a heterogeneidade clínica, a falta de uniformidade quanto aos critérios de diagnóstico e a inexistência de testes laboratoriais específicos da EM.

Como se pode notar pelos dados apresentados nas tabelas 4.3 e 5.1 há relatos de associações positivas da EM com diversas especificidades e/ou alelos HLA nas populações de diferentes etnias. Em caucasóides, encontrou-se associação principalmente com o haplótipo DRB1*1501.DQA1*0102.DQB1*0602 ou com as especificidades sorológicas correspondentes em amostras de suecos (ODUM *et al.*, 1988; OLERUP e HILLERT, 1991; ALLEN *et al.*, 1994), noruegueses (VARTDAL *et al.*, 1989), italianos (MUNTONI *et al.*, 1991) e canadenses (HAEGERT *et al.*, 1993).

Admitindo-se que o fenótipo HLA-DR2 confere susceptibilidade à EM, há que se considerar que na Europa ocorre um gradiente Norte-Sul de frequência deste alelo. Portanto, é de se esperar que a prevalência da doença difira entre populações de diversas procedências. Além disto, estudos moleculares evidenciam a ocorrência de pelo menos 5 alelos diferentes de DR2. Notou-se que entre húngaros e escandinavos há uma alta frequência do gene DR2, porém a prevalência da doença é maior entre os escandinavos (STITES e TERR, 1991). Isto pode estar relacionado à diferente distribuição das frequências alélicas do gene HLA-DR2 entre estas populações. Sendo assim, é razoável que no Brasil haja predomínio da doença nas regiões Sul e Sudeste, conforme relatado por GOMES e ALMEIDA (1991), uma vez que nestas regiões houve maior confluência de imigrantes europeus, oriundos das regiões de alta prevalência da EM. Contudo, ainda há poucos estudos que incluem negróides e ameríndios em suas amostras, estando a prevalência da EM entre estes grupos étnicos ainda pouco caracterizada.

É provável que em outros grupos étnicos diferentes dos caucasóides, outras associações sejam mais frequentes. Em orientais, encontrou-se associação com DR4, DR8 e DQ7 (FUKAZAWA *et al.*, 1992) ou predominância de DR6 (NAITO *et al.*, 1978). Em árabes, encontrou-se associação com DR4 (KURDI *et al.*, 1977). Numa amostra de negróides da Inglaterra, descendentes de imigrantes do Caribe, encontrou-se associação com o haplótipo DRB1*1501.DQA1*0102.DQB1*0102 (KELLY *et al.*, 1995), que bem pode ser em decorrência da miscigenação com caucasóides. Em outros trabalhos há relatos de associação negativa com DRB1*0401.DQA1*0301.DQB1*0301 em caucasóides (ALLEN *et al.*, 1994) e com DR53 e DR9 em orientais (FUKAZAWA *et al.*, 1992). No entanto, muitas dessas associações não foram confirmadas em vários

outros estudos, seja porque foi encontrada associação com outros alelos, seja porque não foi encontrada associação nenhuma.

Com exceção do trabalho de ODUM *et al.* (1988), os demais autores não confirmaram a participação da sub-região DP na suscetibilidade à EM (FUGGER *et al.*, 1990; HOWELL *et al.*, 1991; OLERUP e HILLERT, 1991; SPURKLAND *et al.*, 1991b). E da mesma forma, os que investigaram associação da EM com os genes LMP e TAP não obtiveram resultados positivos (LIBLAU *et al.*, 1993; KELLAR-WOOD *et al.*, 1994; SPURKLAND *et al.*, 1994). Sendo assim, é provável que tais genes não estejam implicados na expressão da EM.

Chama a atenção o fato de que nem todos os autores especificam em seus artigos o grupo de pacientes das amostras estudadas ou os critérios de diagnóstico empregados. E naqueles em que há informações a este respeito, nota-se uma certa diversificação dos critérios de diagnóstico, citando-se os de SCHUMACHER *et al.* (1965) e os de POSER *et al.* (1983) dentre os mais empregados, e outros como McALPINE *et al.* (1972), ROSE *et al.* (1976), McDONALD & HALLIDAY (1977). Quanto aos grupos de pacientes, nota-se uma certa despreocupação dos pesquisadores em realizar estudos em separado de acordo com as características clínicas da EM, citando-se uns poucos que o fizeram, como em FUGGER *et al.* (1990), OLERUP e HILLERT (1991), HILLERT *et al.* (1992); FUKAZAWA *et al.* (1992) e LIBILAU *et al.* (1993).

Levando-se em consideração que a EM é uma doença heterogênea do ponto de vista clínico, um requisito essencial nos estudos de associação com o MHC será analisar os grupos de pacientes que manifestam diferentes formas da doença em separado. Nota-se uma tendência das associações positivas com o haplótipo DR17.DQ2 estarem implicadas na forma SR da EM nas populações caucasóides (OLERUP *et al.*, 1989; OLERUP e HILLERT, 1991; HILLERT *et al.*, 1992). HILLERT *et al.* (1992) sugerem que as formas SR e PCP da EM devam ser consideradas duas doenças distintas que requerem ação preventiva e tratamento específicos, dado que estas diferem quanto à epidemiologia, idade de início, aos dados radiológicos de RNM e às implicações imunogenéticas.

Além disto, deve-se uniformizar os critérios de diagnóstico da EM e as técnicas empregadas nesses estudos a fim de tornar possível a comparação entre os resultados dos diversos trabalhos e para que sejam feitas conclusões pertinentes à possível influência dos fenótipos HLA na EM. Em vista do pequeno número de dados de populações não caucasóides, será interessante realizar mais estudos de associação em amostras de orientais, negros africanos e ameríndios, dentre outras populações *sui genere*. Nestes estudos, obviamente,

o número amostral deverá ser algo maior do que tem sido adotado em caucásios, onde a prevalência da doença é maior.

Outras duas questões que certamente interferem nos resultados das associações são o número amostral e a escolha dos controles. Amostras muito pequenas podem resultar em dados pouco confiáveis, como em MUNTONI *et al.* (1991) (N = 9/25), que encontraram o haplótipo DR15.Dw2.DQ6 em 100% de seus pacientes, e em SPURKLAND *et al.* (1991b) (N = 24/47) que, apesar de terem utilizado uma técnica relativamente segura (PCR-SSO) e terem investigado vários alelos das subregiões DR, DQ e DP, não encontraram nenhuma associação.

A utilização como controle de amostras de diferentes etnias em relação ao grupo de pacientes é igualmente inapropriada, posto que as frequências alélicas variam entre diferentes populações. Note-se, por exemplo, pelos dados na tabela 5.1, as diferentes associações entre italianos do Norte da Itália e da Sardenha. É questionável, portanto, a validade da associação com DP4 encontrada por ODUM *et al.* (1988), cuja amostra de pacientes era composta de suecos e os controles normais eram dinamarqueses. Os autores justificam seu procedimento alegando que as diferenças de distribuição dos genes HLA-DR e -DP entre essas duas populações são mínimas. Porém, estudos posteriores não confirmaram tal associação ou, em alguns casos, a associação com DP foi considerada secundária a DR2 (DRB1*1501) (OLERUP e HILLERT, 1991; BEGOVICH *et al.*, 1990; HOWELL *et al.*, 1991).

Diante do fato de que o RR em relação ao DR2 e/ou haplótipos associados varia de 2,6 até 7,6 (tabela 5.1), e da herdabilidade média da EM ser de apenas 28%, nota-se que a participação do componente genético, e em particular o envolvimento dos genes HLA na suscetibilidade à EM, é insuficiente para desencadear a doença. Compare-se, por exemplo, o RR = 81,8 em relação ao B27 na espondilite anquilosante (STITES e TERR, 1992) e em outras doenças autoimunes, conforme mostrado na tabela 2.2. Certamente outros genes ainda não estudados estão implicados na suscetibilidade à EM. Será também de grande utilidade explorar os fatores ambientais de risco.

6.5 - Sobre o Envolvimento dos Genes TCR

Embora haja controvérsias entre os diversos autores quanto ao tipo de TCR que possa estar associado à suscetibilidade à EM, existe uma tendência geral de aceitação do envolvimento de determinados genes TCR que codificam a região variável de ligação com o complexo MHC-peptídeo da cadeia β na EM.

Fato curioso é que, entre os roedores com EAE, os clones de linfócitos T anti-MBP apresentam um número restrito de TCRs (ZAMVIL e STEINMAN, 1990), enquanto que em humanos notou-se grande heterogeneidade quanto aos rearranjos gênicos de TCR entre os pacientes com EM e uma certa homogeneidade a nível de indivíduo (BEN-NUN *et al.*, 1991).

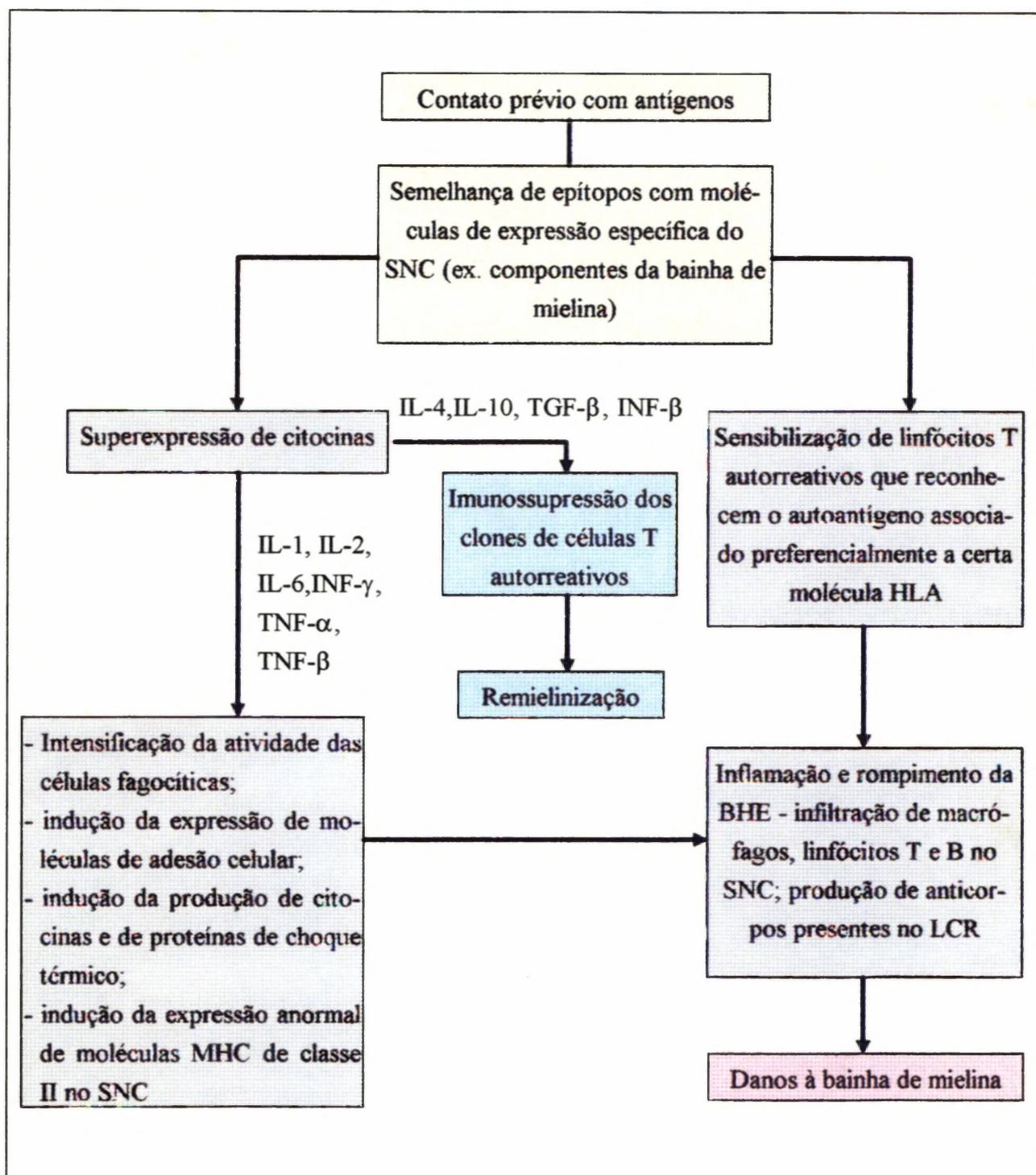
Apesar de RICHERT *et al.* (1991) não terem encontrado tal homogeneidade nas células do mesmo indivíduo, o fato é que eles cultivaram linfócitos de apenas um paciente com EM e observaram uma tendência à restrição dessas células pelo HLA-DR13 associado ao peptídeo 152-170 da MBP. Isto é indicativo de que os produtos dos diversos genes que compõem o repertório de TCR deste paciente poderiam ter um segmento comum na região variável, a despeito dos diferentes padrões de rearranjos gênicos detectados por Southern blot.

No que se refere à presença de linfócitos com TCR $\gamma\delta$ com especificidade para proteínas de choque térmico (SELMAJ *et al.*, 1992; WUCHERPFENNIG *et al.*, 1992; BATTISTINI *et al.*, 1995), isto não parece distintivo da doença, uma vez que esta proteína é encontrada em várias outras doenças nos sítios de inflamação e onde quer que haja danos teciduais. Porém a expressão anormal das hsp nas placas da EM aparentemente influencia na progressão e na manutenção da doença em estado crônico, amplificando a resposta autoimune.

Em vista da escassez dos dados de correlação entre os segmentos gênicos e a especificidade dos TCRs das células dos pacientes com EM, melhores investigações devem ser feitas neste sentido. Há que se cuidar ao selecionar o grupo de pacientes de acordo com a forma de manifestação clínica da doença. Obviamente, entende-se a dificuldade atual das pesquisas relativas ao envolvimento dos genes TCR na EM, dado que o autoantígeno implicado ainda não está completamente definido. Se for o caso de ser detectado algum segmento da molécula de TCR que seja comum entre os vários clones de linfócitos de pacientes com EM, será realmente viável a elaboração de vacinas com anticorpos monoclonais anti-TCR.

6.6 - Seqüência Hipotética dos Eventos

Baseado na análise dos resultados de diversos trabalhos, pode-se supor que a seqüência dos eventos implicados na imunopatologia da EM incluam as etapas esquematizadas no diagrama abaixo.



A expressão da forma PCP ou SR da EM dependerá da intensidade das respostas. Na forma SR, a fase de surto corresponderia à situação em que há agravamento do processo inflamatório e maiores danos à bainha de mielina, enquanto que a fase de remissão corresponderia a uma imunossupressão mais efetiva, permitindo a remielinização dos axônios. A produção de proteínas de choque térmico e de determinadas citocinas podem contribuir para a manutenção da doença em estado crônico.

6.7 - *Perspectivas para o Tratamento da EM*

Com a utilização de técnicas mais precisas de diagnóstico, pode-se optar por novas formas de tratamento. Ainda que não haja por ora uma forma de prevenção efetiva, existem meios de tornar os sintomas mais amenos. Qualquer que seja a forma de tratamento adotada, deve ser feito em paralelo um acompanhamento psicológico do paciente. É necessário conscientizá-lo, ou a seu responsável, da possibilidade de progressão da doença, dos recursos atualmente disponíveis e das perspectivas de adoção, num futuro próximo, de formas mais adequadas de tratamento. Uma visão otimista é preferível ao fatalismo, auxiliando na recuperação do paciente.

No quadro 6.1 são apresentadas algumas das estratégias experimentais em andamento para tratamento da EM, muitas das quais alcançaram êxito nos estudos em pacientes humanos após as aplicações preliminares em animais com EAE. O termo *superantígeno* refere-se ao tipo de molécula que em baixíssimas concentrações pode induzir proliferação de clones específicos de linfócitos T. O superantígeno associa-se a seqüências das moléculas MHC e TCR fora do sítio usual de ligação com peptídeo antigênico e não requer processamento inicial para ser apresentado. Um aspecto marcante da estimulação com o superantígeno é que o organismo inicialmente monta uma resposta vigorosa e depois as células T respondedoras entram em estado de anergia. São reconhecidos dois tipos de superantígenos: retrovírus e toxinas bacterianas. Em estudos experimentais, constatou-se que enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* podem impedir a manifestação da EAE, quando aplicadas em doses mínimas antes do início da doença, de alguma forma suprimindo as células T com potencial autorreativo (OKSENBERG, 1994).

Levando-se em consideração o fato de que a EM é uma doença heterogênea do ponto de vista clínico, genético e imunológico, qualquer que seja a abordagem terapêutica adotada, terá que se fazer menção ao subgrupo de pacientes favorecido. Cada subgrupo requer possivelmente uma terapia específica que deverá ser levada em consideração pelos médicos, a fim de que sejam bem sucedidos no tratamento de seus pacientes.

Um estudo multicêntrico para caracterizar o perfil clínico-evolutivo da EM no Brasil foi proposto por PAPAIS-ALVARENGA *et al.* (1995a). A proposta, intitulada "Projeto Atlântico Sul", visa estabelecer as atividades a serem desenvolvidas no biênio 1995/96. Os resultados parciais referentes aos diferentes centros deverão ser apresentados no próximo Congresso Brasileiro de Neurologia, a ser realizado em Curitiba-PR.

Quadro 6.1 - Estratégias experimentais para tratamento da esclerose múltipla. O sinal (*) indica as que já foram testadas em humanos. (Adaptado de OKSENBURG, 1994.)

- Anticorpos monoclonais contra:
 - subpopulações de células T CD4⁺ (*)
 - TCR e moléculas acessórias
 - moléculas de adesão celular
 - moléculas MHC de classe II
 - citocinas e seus receptores
 - macrófagos
- Vacinação à base de células T (*)
- Vacinação à base de peptídeos TCR (*)
- Indução da tolerância à mielina via oral
- Imunomodulação pelo COPI (*)
- Antagonistas e análogos dos receptores de citocinas
- Aplicação de citocinas (ex: INF- β (*), TGF- β , IL-4, IL-10)
- Bloqueio de sinais intracelulares
- Inibição do complemento
- Regulação da expressão de genes MHC
- Superantígeno

VII - CONCLUSÕES

Como conclusões do presente trabalho, destacam-se os itens abaixo.

1. Através da análise estatística dos dados de estudos populacionais em gêmeos, verificou-se que a taxa de concordância entre gêmeos MZ é significativamente maior do que entre gêmeos DZ, sugerindo a participação de um componente genético na etiologia da EM.
2. Após o cálculo da herdabilidade, estimou-se que a contribuição do componente genético na suscetibilidade à EM está em torno de 28%, sugerindo que se trata de um caráter poligênico e que fatores ambientais ainda desconhecidos são relevantes na etiologia da EM.
3. Nos estudos de associação entre antígenos HLA e EM encontrou-se:
 - 3a. Associações positivas com diferentes especificidades HLA em amostras populacionais distintas, sendo mais freqüentes as associações com haplótipo DR15.Dw2.DQ6 (RR=2,6 a 3,9) ou com as especificidades DR15(2) e DQ6(1) em separado, cujos valores de RR variam no primeiro caso de 2,7 a 7,6 e no segundo caso de 2,2 a 5,7 nas populações caucásicas estudadas;
 - 3b. A heterogeneidade dos critérios de diagnóstico e das formas de manifestação clínica da EM dificultam a comparação dos resultados dos diversos autores. Desta forma deve-se uniformizar a metodologia de estudo e analisar em separado as amostras de pacientes com formas distintas da EM nos trabalhos futuros, a fim de que se possa chegar a conclusões mais claras quanto à participação de alelos HLA na suscetibilidade à EM.
4. No que diz respeito à participação dos genes TCR na manifestação da EM, ainda não há dados conclusivos, porém alguns autores referem-se à utilização preferencial de determinados segmentos gênicos que codificam a região variável da cadeia β pelos clones de linfócitos T com TCR $\alpha\beta$ e potencial autorreativo contra MBP nos pacientes com EM. A presença de células T com TCR $\gamma\delta$ nos sítios de inflamação na EM foi correlacionada com a expressão local de proteínas de choque térmico.

5. Em relação à imunopatologia da EM:

- 5a. Há diversas moléculas que podem ser os autoantígenos envolvidos, citando-se a MBP e a PLP, dentre as mais estudadas, e outros com o gangliosídeo GM1, as proteínas MAG e MOG da mielina e as proteínas de choque térmico hsp60, hsp65 e hsp90. Estas últimas possivelmente são responsáveis pela manutenção do estado crônico da doença;
- 5b. As citocinas IL-1, IL-2, IL-6, INF- γ , TNF- α e TNF- β , cuja produção encontra-se aumentada na EM, contribui para a piora do estado clínico dos pacientes através da indução da expressão anormal de moléculas MHC no SNC e da indução de alterações nas células endoteliais dos capilares sanguíneos que irrigam o SNC, facilitando o rompimento da BHE e a conseqüente invasão de células imunocompetentes no parênquima do SNC, que causam danos à bainha de mielina;
- 5c. Em contrapartida, as citocinas IL-4, IL-10, TGF- β e INF- β exercem efeitos antagônicos às citadas anteriormente, através da supressão dos clones de células que as produzem, e estão implicadas na melhora do estado clínico dos pacientes. O INF- β já vem sendo inclusive adotado no tratamento da EM.
6. Quanto aos fatores ambientais de risco na EM, pouco se sabe até o momento. Existem evidências de que uma exposição prévia a determinados vírus possa induzir a autoimunidade na EM, seja pela indução da produção de INF- γ e de outras citocinas implicadas na inibição da multiplicação viral, seja pela semelhança do agente etiológico com alguma molécula própria do hospedeiro.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. Saunders. Filadélfia, 457 p. 1994.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Molecular Biology of The Cell**. 2ª ed. Garland. Nova Iorque, 1216 p., 1989.
- ALLEN, M.; SANDBERG-WOLLHEIM, M; SJÖGREN, K; ERLICH, H.; PETERSON, U; GYLLENSTEN, U. Association of susceptibility to multiple sclerosis in sweden with HLA classe II DRB1 and DQB1 alleles. **Human Immunology**, v. 39, p. 41-48, 1994.
- ANTEL, J.P.; WEINRICH, M.; ARNASON, B.G.W. Mitogen responsiveness and supressor cell function in multiple sclerosis: influence of age and disease activity. **Neurology**, v. 28, p. 999-1003, 1978.
- ARNASON, B. The role of cytokines in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 45 (S6), p. 54-55, 1995.
- ATKINS, G.; DALY, E.; SHEAHAN B.; HIGGINS, D.; SHARP, P. MS and molecular mimicry. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 16, p. 179, 1990.
- BAILEY, P. Incidence of multiple sclerosis in United States troops. **Arch Neurol. Psychiatry**, v. 7, p. 582-583, 1922.
- BANSAL, H.S.; ABDUL-KARIM, B.; MALIK, R.A.; GOULDING, P.; PUMPHREY, R.S.H; BOULTON, A.J.M.; HOLT, P.L.J.; WILSON, P.B. IgM ganglioside GM1 antibodies in patients with autoimmune disease or neuropathy, and controls. **J. Clin. Pathol.**, v. 47, p. 300-302, 1994.
- BANSIL, S.; COOK, S.D.; ROHOWSKY-KOCHAN, C. Multiple sclerosis: immune mecanism and update on current therapies. **Ann. Neurol.**, v. 37 (S1), p. 87-101, 1995.
- BATTISTINI, L.; SELMAJ, K.; OHMEN, J.; MODLIN, R.L.; RAINE, C.S.; BROSNAN, C.F. Multiple sclerosis: limited diversity of the V δ 2-V δ 3 T-cell receptor in chronic active lesion. **Ann. Neurol.**, v. 37, p. 198-203, 1995.
- BEALL, S.S.; CONCANNON, P.; CHARMLEY, P.; McFARLAND, H.F.; GATTI, R.A.; HOOD, L.E.; McFARLIN, D.E.; BIDDISON, W.E. The germline repertoire of T cell receptor β chain genes in patients with chronic progressive multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, v. 21, p. 59-66, 1989.
- BEGOVICH, A.B.; HELMUTH, R.C.; OKSENBERG, J.R. *et al.* HLA-DP beta and susceptibility to multiple sclerosis: an analysis of caucasoid and japanese patient population. **Human Immunology**, v. 28, p. 365-372, 1990.

- BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos Genes nas Famílias e nas Populações**. SBG. Ribeirão Preto, 460 p., 1994.
- BEN-NUN, A.; LIBLAU, R.S.; COHEN, L.; LEHMANN, D.; TOURNIER-LASSERVE, E.; ROSENZWEIG, A.; JINGWU, Z.; RAUS, J.C.M.; BACH, M.A. Restricted T-cell receptor V β gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: predominant genes vary in individuals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 2466-2470, 1991.
- BERTRAMS, J.; KUWERT, E. HL-A antigen frequencies in multiple sclerosis: significant increase of HL-A3, HL-A10 and W5 and decrease of HL-A12. **Europ. Neurol.**, v. 7, p. 74, 1972.
- BERTRAMS, J.; KUWERT, E.; LIEDTKE, U. HL-A antigens and multiple sclerosis. **Tissue Antigens**, v. 2, p. 405-408, 1972.
- BOBOWICK, A.; KURTZKE, J.F.; BRODY, J.A.; HRUBEC, Z.; GILLESPIE, M. Twin study of multiple sclerosis: an epidemiologic inquiry. **Neurology**, v. 28, p. 978-987, 1978.
- BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; DUPONT, B.; EHRLICH, H.A.; MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.T.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system. **Tissue Antigens**, v. 44, p. 1-18, 1994.
- BRODAL, P. **The Central Nervous System: structure and function**. Oxford. Nova Iorque. 464 p., 1992.
- BROSNAN, C.F.; CANNELLA, B.; BATTISTINI, L.; RAINE, C.S. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. **Neurology**, v. 45(S6), p. 16-21, 1995.
- CARPENTER, M.B. **Core Text of Neuroanatomy**. 4^a ed. Williams & Wilkins. Baltimore, 481 p. 1991.
- CASH, E.; WEERTH, S.; VOLTZ, R.; KORNHUBER, M. Cells of cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients secrete antibodies to myelin basic protein in vitro. **Scand. J. Immunol.**, v. 35, p. 695-701, 1992.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; BODMER, W.F. **The Genetics of Human Populations**. Freeman. São Francisco, 965 p., 1971
- CENDROWSKI, W.S. Multiple sclerosis: discordance in three pairs of dizygotic twins. **J. Med. Genet.**, v. 5, p. 266-268, 1968.
- COLMAN, D.R.; BERNIER, L.; SALZER, J.L.; GILLESPIE, S.; BROPHY, P.; SABATINI, D.D. Synthesis of the myelin polypeptides and mechanisms for their association with the membrane. In: **A Multidisciplinary Approach to Myelin Disease**. G.S.Crescenzi (ed.). Plenum. Nova Iorque, p. 3-11, 1987.

- CURRIER, R.D.; ELDRIDGE, R. Possible risk factors in multiple sclerosis as found in a national twin study. *Arch. Neurol.*, v 39, p. 140-144, 1982.
- DAVENPORT, C. Multiple sclerosis: from standpoint of geographic distribution and race. *Arch Neurol Psychiatry*, v. 8, p. 51-58, 1922.
- DIJKSTRA, C.D.; POLMAN, C.H.; BERKENBOSCH, F. Multiple sclerosis: some possible therapeutic opportunities. *TIPS*, v. 14, p. 124-129, 1993.
- DUFOUR, A.; SALMAGGI, A.; EOLI, M.; LA MANTIA, L.; MILANESE, C.; NESPOLO, A. Phenotype analysis of unstimulated lymphocytes and anti-CD3-stimulated proliferating T-cells from cerebrospinal fluid and peripheral blood in patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Intern. J. Neuroscience*, v. 73, p. 277-285, 1993.
- EBERS, G.C. Genetics and multiple sclerosis: an overview. *Ann. Neurol.*, v. 36 (S), p. 12-14, 1994.
- EBERS, G.C.; BULMAN, D.E.; SADOVNICK, A.D.; PATY, D.W.; WARREN, S.; HADER, W.; MURRAY, T.J.; SELAND, T.P.; DUQUETE, P.; GREY, T.; NELSON, R.; NICOLLE, M.; BRUNET, D. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N. Engl. J. Med.*, v. 315, p. 1638-1642, 1986.
- EBERS, G.C.; PATY, D.W.; STILLER, C.R.; NELSON, R.F.; SELAND, T.P.; LARSEN, B. HLA-typing in multiple sclerosis sibling pairs. *LANCET*, v. 10, p. 88-90, 1982.
- FRENCH RESEARCH GROUP ON MULTIPLE SCLEROSIS. Multiple sclerosis in 54 twinships: concordance rate is independent of zygosity. *Ann. Neurol.*, v. 32, p. 724-727, 1992.
- FUGGER, L. PCR and RFLP studies of inherited susceptibility to autoimmune disorders, with special reference to multiple sclerosis. *Danish Med. Bull.*, v. 41, p. 38-51, 1994.
- FUGGER, L.; RYDER, L.P.; MORLING, N.; ODUM, N.; FRIIS, J.; PEDERSEN, F.K.; HEILMANN, C.; SANDBERG-WOLLHEIM, M; SVEJGAARD, A. DNA typing for HLA-DPB1*02 and -DPB1*04 in multiple sclerosis and juvenile rheumatoid arthritis. *Immunogenetics*, v. 32, p. 150-156, 1990.
- FUKAZAWA, T.; HAMADA, T.; TASHIRO, K.; MORIWAKA, F.; YANAGIHARA, T.; SUGYIAMA, K.; TSUKADA, Y. HLA profiles of multiple sclerosis in Hokkaido, the northernmost island of Japan. *Acta Neurol. Scand.*, v. 86, p. 517-520, 1992.
- GOMES, M.M.; ALMEIDA, G.F.G. Esclerose múltipla e doenças correlatas: tendências diagnósticas no Brasil (capitais), 1979-1987. *Rev. Bras. Neurol.*, v. 27, p. 187-192, 1991.

- GOVERMAN, J.; WOODS, A.; LARSON, L.; WEINER, L.P.; HOOD, L.; ZALLER, D.M. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. **Cell**, v. 72, p. 551-560, 1993.
- GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J.; BÜRINGER D.; SPARKS, D.L.; KREUTZBERG, G.W. Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. **J. Neuropath. Exp. Neuro.**, v. 51, p. 303-311, 1992.
- HAEGERT, D.G.; FRANCIS, G.S. Contribution of a single DQ beta chain residue to multiple sclerosis in french canadians. **Hum Immunol.**, v.34, p. 85-90, 1992.
- HAEGERT, D.G.; FRANCIS, G.S. HLA-DQ polymorphisms do not explain HLA class II associations with multiple sclerosis in two Canadian patient groups. **Neurology**, v.43, p. 1207-1210, 1993.
- HAEGERT, D.G.; MARROSU, M.G. Genetic susceptibility to multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 36 (S2), p.204-210, 1994.
- HAM, A.W. **Histologia**. 6^a. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 990 p., 1972.
- HARTUNG, H.P; ARCHELOS, J.J; ZIELASEK, J.; GOLD, R.; KOLTZENBURG, M; REINERS, K.H.; TOYKA, K.V. Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: a review. **Neurology**, v. 45 (S6), p. 22-32, 1995.
- HAYES, G.M.; WOODROOFE, M.N. CUZNER, M.L. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter; **J. Neurol. Sci.**, v. 80, p. 25-37, 1987.
- HELTBERG, A.; HOLM, N.V. Concordance in twins and recurrence in sibships in multiple sclerosis. **LANCET**, v. 1, p. 1068, 1982.
- HILLERT, J. Human leukocyte antigen studies in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 36(S), p. 15-17, 1994.
- HILLERT, J.; GRÖNNING, M.; NYLAND, H.; LINK, H.; OLERUP, O. An Immunogenetic heterogeneity in multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 55, p. 887-890, 1992.
- HILLERT, J.; OLERUP, O. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,DW2 haplotype. **Neurology**, v. 43, p. 163-168, 1993.
- HOHLFELD, R. MEINL, E.; WEBER, F.; ZIPP, F.; SCHMIDT, S.; SOTGIU, S.; GOEBELS, M.; VOLTZ, R.; SPULER, S.; IGLESIAS, A.; WEKERLE, H. The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Neurology**, v. 45 (S6), p. 33-38, 1995.

- HOWELL, W.M.; SAGE, D.A.; EVANS, P.R.; SMITH, J.L.; FRANCIS, G.S.; HAEGERT, D.G. No association between susceptibility to multiple sclerosis and HLA-DPB1 alleles in the french canadian population. **Tissue Antigens**, v. 37, p. 156-160, 1991.
- HUGUES R.A.C. Immunotherapy for multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 57, p. 3-6, 1994.
- JINGWU, Z.; MEDAER, R.; HASHIM, G.A.; CHIN, Y.; van den BERGER-LOONEN, E.; RAUS, J.C.M. Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. **Ann. Neurol.**, v. 32, p. 330-338, 1992a.
- JINGWU, Z.; SCHREURS, M.; MEDAER, R.; RAUS, J.C.M. Regulation of myelin basic protein-specific helper T cells in multiple sclerosis: generation of suppressor T cell lines. **Cellular Immunology**, v. 139, p. 118-130, 1992b.
- JINGWU, Z.; MEDAER, R.; STINISSEN, P.; HAFLE, D.; RAUS, J. MHC-restricted depletion of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. **Science**, v. 261, p. 1451-1454, 1993.
- JINGWU, Z.; MARKOVIC-PLESE, S.; LACET, B.; RAUS, J.; WEINER, H.L.; HAFLE, D.A. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 973-984, 1994.
- JOHNSON, R.T. The virology of demyelinating diseases. **Ann. Neurol.**, v. 36(S), p. 54-60, 1994.
- KARASZEWSKI, J.W.; REDER, A.T.; ANLAR, B. *et al.* Increased lymphocyte beta adrenergic receptor density in progressive multiple sclerosis is specific for the CD8⁺, CD28⁻ suppressor cell. **Ann. Neurol.**, v. 319, p. 369-377, 1991.
- KARASZEWSKI, J.W.; REDER, A.T.; MASELLI, R. *et al.* Sympathetic skin responses are decreased and lymphocyte beta-adrenergic receptors are increased in progressive multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 27, p. 366-372, 1990.
- KELLAR-WOOD, H.F.; POWIS, S.H.; GRAY, J.; COMPSTON, D.A.S. MHC-encoded TAP1 and TAP2 dimorphisms in multiple sclerosis. **Tissue Antigens**, v. 43, p. 129-132, 1994.
- KELLY, M.A.; JACOBS, K.H.; PENNY, M.A.; MIJOVIC, C.H.; NIGHTINGALE, S.; BARNET, A.H.; FRANCIS, D.A. An Investigation of HLA-encoded genetic susceptibility to multiple sclerosis in subjects of asian indian and afro-caribbean ethnic origin. **Tissue Antigens**, v. 45, p. 197-202, 1995.
- KINNUNEN, E.; JUNTUNEN, J.; KETONEN, L. KOSKIMIES, S.; KONTTINEN, Y.T.; SALMI, T.; KOSKENVUO, M.; KAPRIO, J. Genetic susceptibility to multiple sclerosis: a co-twin study of a nation-wide series. **Arch. Neurol.**, v. 45, p. 1108-1111, 1988.

- KINNUNEN, E.; KOSKENVUO, M.; KAPRIO, J.; AHO, K. Multiple sclerosis in a nationwide series of twins. *Neurology*, v. 37, p. 1627-1629, 1987.
- KURDI, A.; AYESH, I.; ABDALLAT, A.; MAAAYTA, U.; McDONALD, W.I.; COMPSTON, D.A.S.; BATCHELOR, J.R. Different B lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis in arabs and north europeans. *LANCET*, v. 28, p. 1123-1125, 1977.
- KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairements in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, v. 33, p. 1444-1452, 1983.
- LAMM, L.U.; OLAISEN, B. Report of the comittee constitution of chromosomes 5 and 6. *Cytogen. Cell Genet.*, v. 40, p. 128, 1985.
- LAURSEN, R.A.; SAMIULLAH, M.; LEES, M.B. The structure of bovin brain myelin proteolipid and its organization in myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 2912-2916, 1984.
- LIBLAU, R.; van ENDERT, P.N.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; PATEL, S.D.; LOPEZ, M.T.; LAND, S.; FUGGER, L.; McDEVITT, H.O. Antigen processing gene polymorphisms in HLA-DR2 multiple sclerosis. *Neurology*, v. 43, p. 1192-1197, 1993.
- LININGTON, C.; BERGER, T.; PERRY, L.; WEERTH, S.; HINZE-SELCH, D.; ZHANG, Y.; LU, H.; LASSMANN, H.; WEKERLE, H. Tcell specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur. J. Immunol.*, v. 23, p. 1364-1372, 1993.
- LININGTON, C.; LASSMANN, H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelination activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J. Neuroimmunol.*, v. 17, p. 61-69, 1987.
- LINK, J. Interferon- γ , interleukin-4 and transforming growth factor- β mRNA expression in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 90, S158, 1994.
- LOWIS, G.W. Ethnic factors in multiple sclerosis: review and critique of epidemiological literature. *Intern. J. Epid.*, v. 17, p. 14-20, 1988.
- MacKAY, R.P.; MYRIANTHOPOULOS, N.C. Multiple sclerosis in twins and their relatives. *Arch. Neurol.*, v 15, p. 449-462, 1966.
- MARROSU, M.G.; MUNTONI, F.; SPINICCI, G.; PISCHEDDA, M.P.; GODDI, F.; COSSU, P.; PIRASTU, M. Sardinian multiple sclerosis is associated with HLA-DR4: a serologic and molecular analysis. *Neurology*, v. 38, p. 1749-1753, 1988.

- MARROSU, M.G.; MUNTONI, F.; MURRU, M.R. *et al.* HLA-DQB1 genotype in sardinian multiple sclerosis: evidence for a key role of DQB1*0201 and *0302 alleles. **Neurology**, v. 42, p. 883-886, 1992.
- MARTIN, R.; HOWELL, M.D.; JARAQUEMADA, D.; FLERLAGE, M.; RICHERT, J.; BROSTOFF, S.; LONG, E.O.; McFARLIN, D.E.; McFARLAND, H.F. A myelin basic peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.173, p. 19-24, 1991.
- MARTIN, R.; VOSKUHL, R.; FLERLAGE, M. *et al.* Myelin basic protein-specific T-cell responses in identical twins discordant or concordant for multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 34, p. 524-535, 1993.
- MATSIOTA-BERNARD, P.; ROULLET, E.; RAGIMBEAU, J.; AVRAMEAS, S. T cell activation by autoantigens in multiple sclerosis. **Autoimmunity**, v. 16, p. 237-243, 1993.
- MATTHEWS, H.B.; COMPSTON, A.; ALLEN, I.V.; MARTYN, C.N. **McAlpine's Multiple Sclerosis**. 2^a ed. Churchill Livingstone. Nova Iorque, 401 p. 1991.
- McALPINE, D.; LUMSDEN, C.E.; ACHESON, E.D. **Multiple Sclerosis, a Reappraisal**. 2^a ed. Londres. 1972.
- McDONALD, W.I.; HALLIDAY, A.M. Diagnosis and classification of multiple sclerosis. **Br. Med. Bull.**, v. 33, p. 4, 1977.
- MEINL, E.; ALOISI, F.; ERTL, B.; WEBER, F.; MALEFYT, R.W.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R. Multiple sclerosis: immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. **Brain**, v. 117, p. 1323-1332, 1994.
- MUMFORD, C.J.; WOOD, N.W.; KELLAR-WOOD, H.; THORPE, J.W.; MILLER, D.H.; COMSTON, D.A.S. The british isles survey of multiple sclerosis in twins. **Neurology**, v. 44, p. 11-15, 1994.
- MUNTONI, F.; MURRU, M.R.; COSTA, G.; CONGIA, M.; CUCCA, F.; COSSU, P.; CAO, A.; DESSALVI, L.; PIRASTU, M.; MARROS, M.G. Different HLA DR2-DQw1 haplotypes in Sardinian and northern Italian populations: implications for multiple sclerosis susceptibility. **Tissue Antigens**, v. 38, p. 34-36, 1991.
- NAITO, S.; KURDIWA, Y.; ITOYAMA, T.; TSUBAKI, T.; HORIKAWA, A.; SAKAZUKI, T.; NOGUCHI, S.; OHTSUKI, S.; TOKUOMI, H.; MIYATAKE, T.; TAKAHATA, N.; KAWANAMI, S.; McMICHAEL, A.J. HLA and japanese MS. **Tissue Antigens**, v. 12, p. 19-24, 1978.
- NAITO, S.; MANEROW, N.; MICKEY, M.R.; TERASAKI, P.I. Multiple sclerosis: association with HL-A3. **Tissue Antigens**, v. 2, p. 1-4, 1972.

- NERENBERG, S.T.; PRASAD, R.; ROTHMAN, M.E. Cerebrospinal fluid IgG, IgA, IgM, IgD and IgE levels in central nervous system disorders. **Neurology**, v. 28., p. 988-990, 1978.
- ODUM, N.; HYLDIG-NIELSEN, J.; MORLING, N.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; PLATZ, P.; SVEJGAARD, A. HLA-DP antigens are involved in susceptibility to multiple sclerosis. **Tissue Antigens**, v. 31, p. 235-237, 1988.
- ODUM, N.; SAIDA, T.; OHTA, M.; SVEJGAARD, A. HLA-DP Antigens and HTLV-1 antibody status among japonese with multiple sclerosis evidence for an increased frequency of HLA-DPw4. **J. Immunogenet.**, v. 16, p. 467-473, 1989.
- OKSENBERG, J.R.; SHERRITT, M.; BEGOVICH, A.B.; ERLICH, H.A.; BERNARD, C.C.A.; CAVALLI-SFORZA, L.L.; STEINMAN, L. T cell receptor V α and C α alleles associated with multiple sclerosis and myasthenia gravis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 988-992, 1989.
- OKSENBERG, J.R.; BEGOVICH, A.B.; ERLICH, H.A.; STEINMAN, L. Genetic factors in multiple sclerosis. **JAMA**, v. 270, p. 2362-2369, 1993.
- OKSENBERG, J.R. Selective targeting of the immune response in autoimmune demyelination. **West. J. Med.**, v161, p. 255-259, 1994.
- OLERUP, O.; HILLERT, J.; FREDRIKSON, S.; OLSSON, T.; KAM-HANSEN, S.; MÖLLER, E.; CARLSSON, B.; WALLIN, J. Primarily chronic progressive and relapsing/remitting multiple sclerosis: two immunogenetically distinct disease entities. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p. 7113-7117, 1989.
- OLERUP, O.; HILLERT, J. HLA Class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. **Tissue Antigens**, v. 38, p. 1-15, 1991.
- OLSSON, T. Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myeline autoreactive T cell production of interferon-gamma. **J. Neuroimmunol.**, v. 40, p. 211-218, 1992.
- OTA, K; MATSUI, M.; MILFORD, E.L.; MACKIN, G.A.; WIENER, H.L.; HAFNER, D.A. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. **Nature**, v. 346, p. 183-187, 1990.
- PAPAI-ÁLVARENGA, R.M.; ALVARENGA, H. Esclerose Múltipla. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 31, p. 61-70, 1995.
- PAPAI-ÁLVARENGA, R.M.; ALVES, S.V.; SANTOS, C.M.M.; TILBERY, C.P. Esclerose múltipla (EM): apresentação de projeto de pesquisa para análise do perfil clínico e evolutivo da EM no Brasil - Projeto Atlântico Sul - 1995/1996. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 31(2), p. 51-59, 1995a.
- PAPAI-ÁLVARENGA, R.M.; SANTOS, C.M.M.; CLAPAUCH, R.; ANDRADE, C.C.B. Alterações endócrinas na esclerose múltipla. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 31, p. 99-105, 1995b.

- PAPAI-ALVARENGA, R.M.; SANTOS, C.M.M.; COLIN, D.D.; PEIXOTO, E.C.; CAMARGO, S.M.G.G. Esclerose múltipla (EM): influência do sexo e da etnia no perfil clínico de 88 pacientes no município do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 31, p. 89-98, 1995c.
- PORRINI, A.M.; REDER, A.T. INF- γ , INF- β and PGE1 affect monokine secretion: relevance to monocyte activation in multiple sclerosis. **Cellular Immunology**, v. 157, p. 428-438, 1994.
- POSER, C.M. Multiple sclerosis: diagnosis and treatment. **Med. Principles Pract.**, v. 3, p. 1-16, 1992. (Revisão)
- POSER, C.M. The dissemination of multiple sclerosis: a viking saga? a historical essay. **Ann. Neurol.**, v. 32(S2), p. 231-243, 1994.
- POSER, C.M.; PATY, D.W.; SCHEINBERG, L.; McDONALD, W.I.; DAVIS, F.A.; EBERS, G.C.; JOHNSON, K.P.; SIBLEY, W.A.; SILBERBERG, D.H.; TOURTELLOTTE, W.W. New diagnostic for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. **Ann. Neurol.**, v. 13, p. 227-231, 1983.
- RAGHEB, S.; LISAK, R.P. Multiple sclerosis: genetic background versus environment. **Ann. Neurol.**, v. 43, p. 1207-1210, 1993.
- RICHERT, J.R.; ROBINSON, E.D.; JOHNSON, A.H.; BERGMAN, C.A.; DRAGOVIC, L.J.; REINSMOEN, N.L.; HURLEY, C.K. Heterogeneity of the T-cell receptor β gene rearrangements generated in myelin basic protein-specific T-cell clones isolated from a patient with multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 29, p. 299-306, 1991.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 2^a ed. Manole. São Paulo, 1992.
- ROSATI, G. Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview. **Ann. Neurol.**, v. 35 (S2), p. 164-174, 1994.
- ROSE, A.S.; ELLISON, G.W.; MYERS, L.M.; TOURTELLOTTE, W.W. Criteria for the clinical diagnosis of multiple sclerosis. **Neurology**, v. 26(S), p. 20-22, 1976.
- ROTH, H.; KRONQUIST, K.E.; KERLERO de ROSBO, N.; CRANDALL, B.F.; CAMPAGNONI, A.T. Evidence for the expression of four myelin basic protein variants in the developing human spinal cord through cDNA cloning. **J. Neurosci. Res.**, v.17, p. 321, 1987.
- SADOVNICK, A.D. Genetic epidemiology of multiple sclerosis: a survey. **Ann. Neurol.**, v. 36(S2), p. 194-203, 1994a.
- SADOVNICK, A.D. Genetic of multiple sclerosis in British Columbia and throughout Canada. **Ann. Neurol.**, v. 36(S2), p. 18-21, 1994b.

- SADOVNICK, A.D.; ARMSTRONG, H.; RICE, G.P.A; BULMAN, D.; HASHIMOTO, L.; PATY, D.W.; HASHIMOTO, S.A.; WARREN, S.; HADER, W.; MURRAY, T.J.; SELAND, T.P.; METZ, L.; BELL, R.; DUQUETTE, P.; GRAY, T.; NELSON, R.; WEINSHENKER, B.; BRUNET, D.; EBERS, G.C. A population-based study of multiple sclerosis in twins: updates. **Ann. Neurol.**, v. 33, p. 281-285, 1993.
- SADOVNICK, A.D.; EBERS, G.C. Genetics of multiple sclerosis. In: ANTEL, J.P. (ed.). **Multiple Sclerosis**. Saunders. Filadélfia, p. 99-118, 1995.
- SEBOUR, E.; ROBINSON, M.A.; DOOLITTLE, T.H.; CIULLA, T.A.; KINDT, T.J.; HAUSER, S.L. A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor β chain complex. **Cell**, v. 57, p. 1095-1100, 1989.
- SELA, M; ARNON, R. Synthetic approaches to vaccines for infectious and autoimmune diseases. **Vaccine**, v. 10, p. 991-999, 1992.
- SELMAJ, K.; BROSNAN, C.F.; RAINE, C.S. Colocalization of lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T-cell receptor and heat shock protein hsp65⁺ oligodendrocytes in multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6452-6456, 1991.
- SHOTT, S. **Statistics for Health Professionals**. Saunders. Filadélfia, 418 p., 1990.
- SCHUMACHER, G.A.; BEEBE, G.; KIBLER, R.F.; KURLAND, L.T.; KURTZKE, J.F.; McDOWELL, F.; NAGLER, B.; SIBLEY, W.A.; TOURTELLOTTE, W.W; WILLMON, T.L. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. **Ann. NY Acad. Scic.**, V.122, p. 552-568, 1965.
- SMITH, M.E.; SOMMER, M.A. Association between cell-mediated demyelination and astrocyte stimulation. **Progress in Brain Research**, v. 94, p. 411-422, 1992.
- SÖDERSTRÖM, M.; LINK, H.; XU, Z.; FREDRIKSON, S. Optics neuritis and multiple sclerosis. **Neurology**, v. 43, p. 1215-1222, 1993.
- SPURKLAND, A.; RONNINGEN, K.; VANDVIK, B.; THORSBY, E.; VARTDAL, F. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly determine susceptibility to develop multiple sclerosis. **Hum. Immunol.**, v.30, p. 69-75, 1991a.
- SPURKLAND, A.; TABIRA, T.; RONNINGEN, K.S.; VANDVIK, B.; THORSBY, E.; VARTDAL, F. HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1 and -DPB1 in Japanese multiple sclerosis patients. **Tissue Antigens**, v. 37, p. 171-173, 1991b.
- SPURKLAND, A.; KNUTSEN, I.; UNDLIEN, D.E.; VARTDAL, F. No association of multiple sclerosis to alleles at the TAP2 locus. **Hum. Immunol.**, v. 39, p. 299-301, 1994.
- STEINMAN, L. Autoimmune disease. **Sc. Am.**, Supl. especial, p. 106-114, Set./1993.

- STEVENS, A.; WELLER, M.; WIETHÖLTER, H. CSF and serum ganglioside antibody patterns in MS. *Acta Neurol. Scand.*, v. 86, p. 485-489, 1992.
- STITES, D.P.; TERR, A.I. **Basic and Clinical Immunology**. LANGE, Califórnia, 1991.
- STITES, D.P.; TERR, A.I. **Imunologia Básica**. PHB, Rio de Janeiro, 1992.
- SUN, J.B. Autoreactive T and B cells in nervous system diseases. *Acta Neurol. Scand.*, v. 87(S), 142, 1993.
- TANIGAKI, N.; FRUCI, D.; GROOME, N.; BUTLER, R.H.; LONDEI, M.; TOSI, R. Exploring myelin basic protein for HLA class I-binding sequences. *Eur. J. Immunol.*, v. 24, p. 2196-2202, 1994.
- TIENARI, P.J. Multiple sclerosis: multiple etiologies, multiple genes? *Ann. Med.*, v. 26, p. 259-269, 1994.
- TIENARI, P.J.; WIKSTRÖM, J.; KOSKIMIES, S.; PARTANEN, J.; PALO, J.; PELTONEN, L. Reappraisal of HLA in multiple sclerosis: close linkage in multiplex families. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 1, p. 257-268, 1993.
- TIENARI, P.J.; WIKSTRÖM, J.; SAJANTILA, A.; PALO, J.; PELTONEN, L. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *LANCET*, v. 340, p. 987-991, 1992.
- TILBERY, C.P. Imunologia na Esclerose Múltipla. *Rev. Bras. Neurol.*, v.31, p. 71-74, 1995.
- TRAUGOTT, U.; SCHEINBERG, L.C.; RAINE, C.S. On the presence of Ia-positive endothelial cells and astrocytes in multiple sclerosis lesions and its relevance to antigen presentation. *Neuroimmunol.*, v. 8. p. 1-14, 1985.
- TROJANO, M.; MANZARI, C; LIVREA, P. Blood-brain barrier changes in multiple sclerosis. *Ital. J. Neurol. Sci.*, v. 2 (S), p. 55-64, 1992.
- TSUKADA, N; MATSUDA, M.; MIYAGI, K.; YANAGISAWA, N.; Increased levels of intercellular adhesion molecule_1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology*, v. 43, p. 2679-2682, 1993.
- UTZ, U. e McFARLAND, H.F. The role of T cells in multiple sclerosis: implications for therapies targeting the T cell receptor. *J. Neuropath. Exp. Neuro.*, v. 53, p. 351-358, 1994.
- VARTDAL, F.; SOLLID, L.M.; VANDVIK, B.; MARKUSSEN, G.; THORSBY, E. Patients with multiple sclerosis carry DQB1 genes which encode shared polymorphic amino acid sequences. *Human Immunology*, v. 25, p. 103-110, 1989.

- VOSKUHL, R.; ROBINSON, E.D.; SEGAL, B.M.; TRANQUILL, L.; CAMPHAUSEN, K.; ALBERT, P.S.; RICHERT, J.R.; McFARLAND, H.F. HLA restriction and TCR usage of T lymphocytes specific for a novel candidate autoantigen, X2 MBP, in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, v. 153, p. 4834-4844, 1994.
- WEBER, F.; MEINL, E.; ALOISI, F.; NEVINNY-STICKEL, C.; ALBERT, E.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R. Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells: possible implications for lesion development in multiple sclerosis. *Brain*, v. 117, p. 59-69, 1994.
- WEILBACH, F.X.; VOLTZ, R.; HOHLFELD, R.; HARTUNG, H.P. Copolymer-1 in der Therapie der multiplen Sklerose. *Nevenarzt*, v. 66, p. 473-477, 1995.
- WEINSTEIN, D.L.; WALKER, D.G.; AKIYAMA, H.; MCGREER, P.L. Herpes simplex virus type I infection of CNS induces major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia. *J. Neurosc. Res.*, v. 26, p. 55-65, 1990.
- WILLIAMS, A.; ELDRIDGE, R.; McFARLAND, H.; HOUFF, S.; KREBS, H.; McFARLIN, D. Multiple sclerosis in twins. *Neurology*, v. 30, p. 1139-1147, 1980.
- WILLIAMS, A.C.; MINGIOLI, E.S.; McFARLAND, H.F.; TOURTELLOTTE, W.W.; McFARLIN, D.E. Increased CSF IgM in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 28, p. 996-998, 1978.
- WUCHERPFENNIG, K.W. Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition. *Clin. Immunol. Immunopath.*, v. 72, p. 293-306, 1994.
- WUCHERPFENNIG, K.W.; NEWCOMBE, J.; LI, H.; KEDDY, C.; CUZNER, M.L.; HAFLER, D.A. $\delta\gamma$ T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 4588-4592, 1992.
- WUCHERPFENNIG, K.W.; SETTE, A.; SOUTHWOOD, S.; OSEROFF, C.; MATSUI, M.; STROMINGER, J.L.; HAFLER, D.A. Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J. Exp. Med.*, v. 179, p. 279-290, 1994.
- ZAMVIL, S.S.; STEINMAN, L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 8, p. 579-621, 1990.
- ZOUKOS, Y.; LEONARD, L.P.; THOMAIDES, T.; THOMPSON, A.F.; CUZNER, M.L. β -adrenergic receptor density and function of peripheral blood mononuclear cells are increased in multiple sclerosis: a regulatory role for cortisol and interleukin-1. *Ann. Neurol.*, v. 31, p. 657-662, 1992.