

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**SUBTIPOS DA ORBITOPATIA DE GRAVES. ANÁLISE
TOMOGRÁFICA QUANTITATIVA E ASSOCIAÇÃO COM
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA**

Patricia Mitiko Santello Akaishi

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto -
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor

**Ribeirão Preto
2005**

PATRICIA MITIKO SANTELLO AKAISHI

**SUBTIPOS DA ORBITOPATIA DE GRAVES. ANÁLISE
TOMOGRÁFICA QUANTITATIVA E ASSOCIAÇÃO COM
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA**

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto -
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor

Área de Concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Ribeirão Preto

2005

Akaishi, Patricia Mitiko Santello

Subtipos da orbitopatia de Graves. Análise tomográfica quantitativa e associação com marcadores de suscetibilidade genética / Patricia Mitiko Santello Akaishi – 2005

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2005.

97p.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

1. Orbitopatia de Graves – Análise tomográfica – marcadores genéticos

Palavras-chave: Orbitopatia de Graves, Tomografia computadorizada, alelos HLA, microssatélites

DEDICATÓRIA

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Velasco e Cruz

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Luiz Massato Akaishi e Izaura Santello Akaishi**, pelo incentivo e apoio permanentes;

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi**, por viabilizar o estudo, permitindo livre acesso ao seu laboratório, dirimindo dúvidas e conduzindo-me no universo da imunogenética;

À **Dra Nilza Minguini**, por orientar meus primeiros passos no caminho da pós-graduação;

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular da FMRP, **Sandra Silva Rodrigues dos Santos, Renata Simões, Isabela Wastowski, Luis Otavio Guideroli, Eric Castelli, Viriato Campello**, pela paciência, pelos ensinamentos e pela cooperação;

À **Neifi Hassan Saloum Deghaide**, bióloga encarregada do Laboratório de Imunologia Molecular do HCFMRP, pela ajuda valiosa em relação à tipificação HLA;

Aos funcionários do setor de arquivo da Radiologia, pela disponibilidade, atenção e eficiência;

Aos amigos, que incentivaram meu ingresso na pós-graduação.

LISTA DAS ABREVIATURAS

OG – Orbitopatia de Graves

DG – Doença de Graves

TC – Tomografia Computadorizada

MEO – Musculatura extra-ocular

TSH-R – Receptor do hormônio estimulador da tireóide

IL 2 – Interleucina 2

IFN γ – Interferon gama

TNF – Fator de necrose tumoral

HU – Unidades de Hounsfield

HLA – Antígenos leucocitários humanos

CPH - Complexo principal de histocompatibilidade

HSP - Proteína do choque térmico

RR – Risco relativo

FE – Fração etiológica

FP – Fração preventiva

VNTR - *Variable number of tandem repeats*. Repetições consecutivas de uma sequência de nucleotídeos

STR - *Short tandem repeats*. Repetições consecutivas curtas. Sinônimo de microssatélites

LES – Lupus eritematoso sistêmico

AR - artrite reumatóide

EM - Esclerose múltipla

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PPAR-gama: receptor gama ativado do proliferador do peroxissomo

Pb – pares de bases

SSP – primers de seqüência específica

DNA – ácido desoxirribonucéico

Lista de Figuras

Figura 1. Paciente do sexo feminino com bócio e orbitopatia de Graves	2
Figura 2. A. Caleb Hillier Parry (1755-1822). B. Robert James Graves (1796-1853). C. Adolph Von Basedow (1799-1854)	3
Figura 3: A: Paciente com esotropia e hipotropia de olho direito. B: Tomografia computadorizada (TC) de órbitas em corte axial do mesmo paciente, mostrando aumento dos músculos retos mediais e compressão apical do nervo óptico direito	4
Figura 4. A: Orbitopatia de Graves (OG) subtipo 1 de Nunery. Note a presença de áreas hipocrômicas periorais, mostrando a associação da OG com vitiligo. B: Tomografia Computadorizada (TC) orbitária, em corte axial, da mesma paciente, mostrando musculatura extra-ocular normais e proptose secundária ao aumento do conteúdo adiposo orbitário	9
Figura 5. A. Paciente do subtipo 2 de Nunery, apresentado engurgitamento vascular sobre a inserção dos músculos retos horizontais. B: Tomografia Computadorizada (TC) em corte axial mostrando o grande aumento da musculatura extra-ocular com compressão do nervo óptico.....	9
Figura 6. Tomografia Computadorizada (TC) de órbitas em corte axial (A) e coronal (B) mostrando órbita normal à esquerda	11
Figura 7. Tomografia Computadorizada (TC) orbitária axial mostrando alterações típicas da Orbitopatia de Graves (OG) na órbita direita. A órbita esquerda é normal.....	12
Figura 8. Representação gráfica da localização dos genes do CPH.....	13
Figura 9. Localização e ordem dos microssatélites do TNF dentro do CPH	18
Figura 10. Critérios diagnósticos para Orbitopatia de Graves (OG)	28
Figura 11. Tomografia Computadorizada (TC) orbitária em corte coronal. A área da musculatura extra-ocular está delimitada em vermelho	29
Figura 12. A. A área delimitada corresponde a gordura intra e extraconal. B. A proptose foi determinada pela distância entre a esclera posterior e a linha interzigomática.....	30
Figura 13 – Géis de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos locos TNFa, TNFb, TNFc, TNFd e TNFe	43
Figura 14. Gráfico da dispersão dos valores das áreas musculares e das áreas da gordura orbitária dos pacientes com Orbitopatia de Graves (OG) em função da distribuição dos controles (média \pm 2dp) – área hachurada	47

Figura 15. Relação linear entre as exoftalmometrias tomográficas e clínicas	49
Figura 16. Distribuição das freqüências alélicas para o loco HLA-DRB1 nos pacientes com DG, sem e com orbitopatia e grupo controle. Os alelos destacados apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$)	53
Figura 17. Distribuição das freqüências alélicas para o loco HLA-DRB1 nos subtipos da Orbitopatia de Graves (OG) e grupo controle. O alelo destacado apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).....	54
Figura 18. Distribuição das freqüências alélicas do loco HLA-DQB1 nos pacientes e controle. O alelo destacado apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$)	55
Figura 19. Distribuição das freqüências alélicas no loco HLA-DQB1 nos subtipos miogênico e não miogênico.....	56
Figura 20. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFa dos pacientes e grupo controle	63
Figura 21. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFa dos subtipos da Orbitopatia de Graves (OG).....	64
Figura 22. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFb dos pacientes e do grupo controle	65
Figura 23. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFb dos subtipos da Orbitopatia de Graves (OG).....	66
Figura 24. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFc dos pacientes e do grupo controle	67
Figura 25. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFc dos subtipos da Orbitopatia de Graves (OG).....	68
Figura 26. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFd dos pacientes e do grupo controle	69
Figura 27. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFd dos subtipos da Orbitopatia de Graves (OG).....	70
Figura 28. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFe dos pacientes e do grupo controle	71
Figura 29. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFe dos subtipos da Orbitopatia de Graves (OG).....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variáveis utilizadas para estimar a força da associação de um marcador em uma doença	16
Tabela 2. Características dos microssatélites (STRs) do gene TNF	19
Tabela 3. Relação entre os microssatélites do TNF- e a produção da citocina.....	21
Tabela 4 - Condições de amplificação dos alelos de HLA-DR e HLA-DQ	33
Tabela 5 - Identificação dos grupos de especificidades/especificidades dos alelos HLA-DRB1 pelo método SSP-PCR. Os tamanhos dos respectivos produtos de amplificação são também mostrados	35
Tabela 6 - Identificação dos grupos de especificidades/especificidades dos alelos HLA-DQB pelo método SSP-PCR. Os tamanhos dos respectivos produtos de amplificação são também mostrados	36
Tabela 7 - Reagentes utilizados para a amplificação dos microssatélites TNFa, TNFb e TNFc	37
Tabela 8. Reagentes utilizados para amplificação dos microssatélites TNFd e TNFe	38
Tabela 9. Relação dos marcadores polimórficos de DNA utilizados	39
Tabela 10 - Condições de amplificação do loco TNFc e primeira amplificação dos locos TNFa e b.....	40
Tabela 11 - Condições de amplificação dos locos TNFd, TNFe e segunda amplificação dos locos TNFa e b.....	40
Tabela 12 - Condições específicas para eletroforese de cada loco polimórfico estudado	42
Tabela 13 . Resultado da análise de variância entre as áreas da gordura e muscular dos subtipos e grupo controle	49
Tabela 14: Comparação entre os grupos em relação à área da gordura orbitária.....	50
Tabela 15. Comparação entre os grupos em relação à área muscular.....	50
Tabela 16. Caracterização clínica dos subtipos da OG	51
Tabela 17. Frequência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com doença de Graves e controles.....	57

Tabela 18. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com doença de Graves com orbitopatia e controle	58
Tabela 19. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com OG miogênico e controle	59
Tabela 20. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com OG não miogênico e controle	60
Tabela 21. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 em pacientes brasileiros com OG miogênico e não miogênico da MEO.....	61
Tabela 22. Freqüência alélica dos marcadores microssatélites associados à DG e ao subtipo miogênico.....	73

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Orbitopatia de Graves.....	2
1.1.2. Aspectos fisiopatogênicos	5
1.1.3. Subtipos da orbitopatia de Graves.....	7
1.1.4. Tomografia computadorizada de órbitas	10
1.2. Marcadores genéticos	12
1.2.1. Sistema dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA).....	12
1.2.2. O sistema HLA na doença de Graves.....	16
1.2.3. Microssatélites do Fator de Necrose Tumoral.....	17
2. Objetivos	23
3. Casuística e métodos	26
3.1. Primeira etapa: determinação dos subtipos da OG através de análise tomográfica quantitativa	27
3.2. Segunda etapa: tipificação dos alelos HLA-DRB1 e HLADQB1 nos pacientes com os subtipos com e sem aumento muscular da OG	31
3.2.1. Extração do DNA.....	31
3.2.2. Tipificação dos alelos de classe II HLA DR e DQ.....	32
3.2.2.1. Amplificação do DNA	32
3.2.2.2. Análise do produto amplificado em gel de agarose	34
3.3. Terceira etapa: análise dos polimorfismos dos microssatélites do TNF nos subtipos da OG	37
3.3.1. Amplificação do DNA.....	37
3.3.2. Análise do produto amplificado em gel de poliacrilamida	41

3.3.3. Coloração com nitrato de prata.....	44
3.3.4. Registro dos resultados	44
3.3.5. Análises estatísticas	44
3.3.5.1. Estimativa das frequências alélicas e genotípicas	44
4. Resultados	46
4.1. Primeira etapa - determinação dos subtipos da OG através de análise quantitativa tomográfica	47
4.2. Segunda etapa - tipificação dos alelos HLA-DRB1 e HLADQB1 e dos microssatélites do TNF nos pacientes com OG com e sem aumento muscular	52
4.2.1. Análise das frequências alélicas dos HLA-DRB1 e DQB1.....	52
4.2.2. Análise das frequências alélicas dos microssatélites do TNF	62
5. Discussão	74
6. Conclusões	84
7. Referências bibliográficas	86
8. Resumo	94
9. Abstract	96

INTRODUÇÃO

1.1. Orbitopatia de Graves

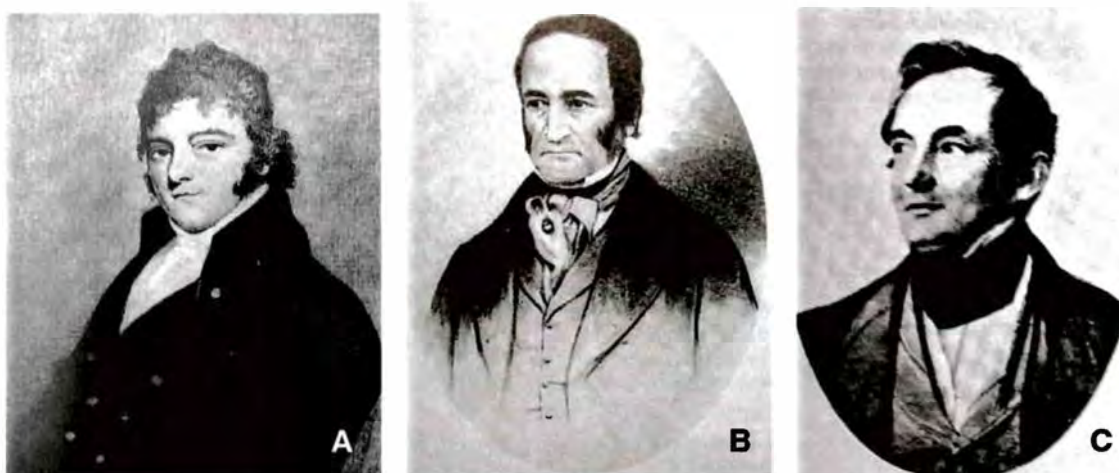
Orbitopatia de Graves (OG) é o nome dado à doença auto-imune orbitária caracterizada clinicamente pela presença de retração palpebral associada à proptose, estrabismo restritivo ou neuropatia óptica (BURCH & WARTOFSKY 1993; BARTLEY & GORMAN 1995). A grande maioria desses pacientes apresenta alguma disfunção tireoidiana auto-imune, com destaque para o hipertireoidismo ou doença de Graves (DG), que ocorre em 90% dos casos (BARTLEY, FATOURECHI *et al.*, 1996)(Figura 1).



Figura 1. Caso clínico típico da doença de Graves. Paciente do sexo feminino com bócio e orbitopatia

A terminologia utilizada para designar o quadro orbitário, referido atualmente como "orbitopatia de Graves", é variada e fonte de confusão. Denominações freqüentemente utilizadas, tais como oftalmopatia distireoidiana, exoftalmo endócrino, oftalmopatia relacionada à tireóide sugerem que a doença orbitária seja indissociável da doença tireoidiana. Uma digressão histórica é útil para entender o fato. No início do século XIX, Robert Graves, Caleb Parry e Carl Adolph Basedow

(Figura 2), identificaram, independentemente, a doença caracterizada pela tríade: taquicardia, bócio e exoftalmo. Em 1862, Armand Trousseau sugeriu o epônimo “doença de Graves” que foi amplamente difundido nos países de língua inglesa (TROUSSEAU 1868).



**Figura 2. A. Caleb Hillier Parry (1755-1822)
B. Robert James Graves (1796-1853)
C. Adolph Von Basedow (1799-1854)**

Anos após, com a descoberta da função tireoidiana, as terminologias hipertireoidismo e tireotoxicose foram acrescentadas à literatura e à denominação da orbitopatia, sugerindo onexo causal. Há pouco mais de 50 anos, surgiram os primeiros indícios da existência dos auto-anticorpos e de seu papel fisiopatogênico na DG, estabelecendo o conceito atual de doença auto-imune para esse tipo de disfunção tireoidiana. A DG é, hoje, caracterizada pela produção de auto-anticorpos contra o receptor do hormônio estimulador da tireóide (TSH-R), induzindo a produção autônoma e descontrolada dos hormônios tireoidianos (WEETMAN 2000).

Embora exista uma forte relação temporal entre o início do hipertireoidismo e da orbitopatia (GORMAN 1983), aproximadamente 50% dos pacientes com hipertireoidismo não apresentam manifestações oculares e 5% dos pacientes com orbitopatia nunca manifestam disfunção tireoidiana (FELDON 1990). A associação

entre orbitopatia e DG sugere mecanismos fisiopatogênicos compartilhados entre órbita e tireóide, possivelmente mediados por antígenos comuns aos dois tecidos (BAHN, DUTTON *et al.*, 1998; BAHN 2002).

A retração palpebral é o sinal mais freqüente da OG e ocorre em 90% dos casos (BARTLEY, FATOURECHI *et al.*, 1996). Embora o envolvimento das pálpebras superiores seja mais evidente, as pálpebras inferiores também podem estar afetadas. Esse sinal, conhecido como sinal de Dalrymple, é causado, principalmente, pela hiperação do músculo de Müller, dependente do tônus simpático, e do elevador da pálpebra superior, innervado pelo nervo oculomotor (CRUZ 1997).

A proptose ou exoftalmo ocorre em, aproximadamente, 60% dos casos, estando relacionada com o aumento dos tecidos muscular e adiposo orbitários. A análise da evolução temporal da exoftalmometria mostra que 72 a 80% dos casos permanecem estáveis, 16 a 23% sofrem aumento maior do que 2 mm e 5% podem diminuir espontaneamente (BARTLEY, FATOURECHI *et al.*, 1996).

Como consequência do aumento muscular, 42,5% dos pacientes desenvolvem estrabismo restritivo e 5% evoluem para neuropatia óptica por compressão do nervo óptico no ápice da órbita (Figura 3).

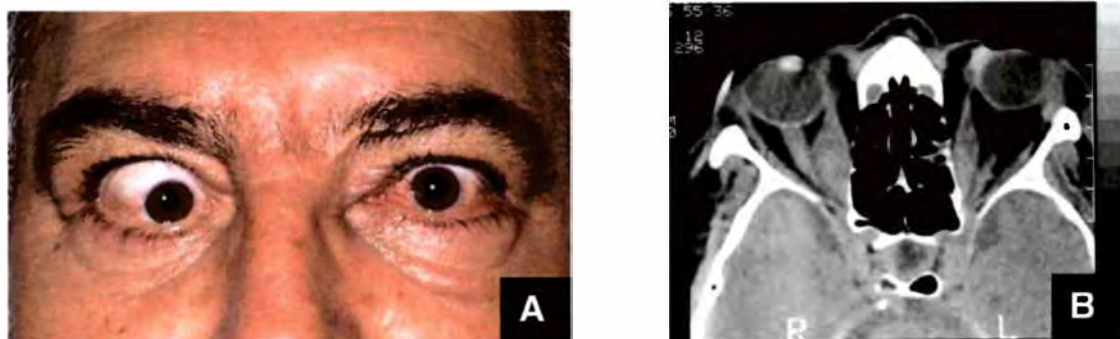


Figura 3: A. Paciente com esotropia e hipotropia de olho direito. B. Tomografia computadorizada (TC) de órbitas em corte axial do mesmo paciente, mostrando aumento dos músculos retos mediais e compressão apical do nervo óptico direito

1.1.2. Aspectos fisiopatogênicos

A fisiopatogenia da OG é, ainda, pouco compreendida. A íntima associação com hipertireoidismo auto-imune sugere a possibilidade de antígenos comuns entre os tecidos orbitários e tireoidianos. A DG é desencadeada pela ligação de auto-anticorpos ao TSH-R nas células foliculares tireoidianas. A estimulação do receptor causa produção excessiva e descontrolada do hormônio tireoidiano, elevando seus níveis séricos na medida em que promove supressão da produção do TSH. O TSH-R é considerado o auto-antígeno da DG. Alguns estudos têm demonstrado a presença desse receptor nos fibroblastos orbitários de pacientes com OG, sugerindo sua participação na patogênese da doença (BAHN, DUTTON *et al.*, 1998; WU, YANG *et al.*, 1999; ANISEWSKI, VALYASEVI *et al.*, 2000; BAHN 2002).

O exame histológico dos tecidos conectivos orbitários de pacientes com OG mostra um infiltrado linfocitário, com predominância de linfócitos T (WEETMAN, COHEN *et al.*, 1989). Ambos os subgrupos linfocitários, Th1 (linfócito T helper que produz as citocinas: interleucina-2, interferon-gama e fator de necrose tumoral-alpha) e Th2 (caracterizado pela produção das interleucinas 4, 5 e 6) já foram relacionados à OG (DE CARLI, D'ELIOS *et al.*, 1993; HEUFELDER &BAHN 1993; ANISEWSKI, VALYASEVI *et al.*, 2000; HIROMATSU, YANG *et al.*, 2000). Um estudo sugere que o perfil Th1 predomine nas fases iniciais da doença enquanto que as células Th2 ocorram na fase tardia (ANISEWSKI, VALYASEVI *et al.*, 2000).

Os fibroblastos orbitários, células responsáveis pelo remodelamento tecidual que ocorre na OG, têm sido intensamente analisados. Esses fibroblastos sofrem a ação de citocinas, secretam proteínas imunomoduladoras, expressam moléculas de adesão, produzem colágeno e diferenciam-se em adipócitos, num processo conhecido como neo-adipogênese (CRISP, STARKEY *et al.*, 2000). Em recente

estudo (SMITH, KOUMAS *et al.*, 2002) foram demonstradas diferenças fenotípicas e funcionais entre os fibroblastos do tecido adiposo e da musculatura extra-ocular (MEO). A diferença fenotípica é dada pela expressão de uma molécula de superfície celular denominada Thy-1. Os fibroblastos perimisiais expressam essa molécula de maneira homogênea e, ao contrário dos fibroblastos do tecido adiposo, não possuem capacidade de neo-adipogênese (SMITH, KOUMAS *et al.*, 2002). Esses dados são de extrema importância, pois foram os primeiros a fornecer um substrato histopatológico para os subtipos clínicos e indicam a possibilidade de mecanismos fisiopatogênicos distintos, atuando na produção da OG.

A contribuição de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento da doença de Graves não pode ser negligenciada. Aproximadamente 50% dos pacientes com DG têm história familiar de doença tireoidiana (BRIX, KYVIK *et al.*, 1998). A taxa de concordância da DG em gêmeos monozigóticos é de 30 a 50% enquanto em gêmeos dizigóticos é menor que 5%. Como a doença é mediada por mecanismos imunológicos, a busca por genes de suscetibilidade concentra-se nos genes que regulam a resposta imune (RATNASINGAM & GOUGH 2002). As principais associações estão relacionadas aos genes HLA classe II, localizados no cromossomo 6 (ORHAN, AZEZLI *et al.*, 1993; MACIEL, RODRIGUES *et al.*, 2001), e ao gene 4 associado ao linfócito T citotóxico - CTLA-4 – localizado no cromossomo 2 (YANAGAWA, HIDAKA *et al.*, 1995). Polimorfismos do gene CTLA-4 também foram associados à suscetibilidade à orbitopatia de Graves (VAIDYA, IMRIE *et al.*, 1999), no entanto, essa associação não tem sido confirmada em outros estudos (VILLANUEVA, INZERILLO *et al.*, 2000).

Agentes infecciosos podem induzir a expressão de moléculas HLA em células que normalmente não expressam o antígeno. Kraemer (KRAEMER, DONADI *et al.*,

1998) demonstrou que a associação entre antígenos virais, relacionados ao vírus Coxsackie-B, e HLA-DR3, podem contribuir para o desenvolvimento da DG em pacientes brasileiros.

O principal fator ambiental estudado na predisposição e severidade da orbitopatia em indivíduos com DG é, indubitavelmente, o tabagismo (PRUMMEL & WIERSINGA 1993). Um dos mecanismos sugeridos consiste na ação imunomoduladora da nicotina, aumentando a expressão de HLA-DR nos fibroblastos orbitários, influenciando, assim, a apresentação de antígenos às células imunocompetentes na órbita (MACK, STASIOR *et al.*, 1999).

1.1.3. Subtipos da Orbitopatia de Graves

A característica mais marcante da OG é o aumento da musculatura extraocular (MEO), que tipicamente poupa as inserções musculares tendinosas (TROKEL & JAKOBIEC 1981). Embora o aumento da gordura orbitária tenha sido observado pela primeira vez por Rundle e Pochin (RUNDLE & POCHIN 1944) esse achado só ganhou importância após sucessivas publicações sobre seu envolvimento na OG (FORBES, GORMAN *et al.*, 1986; PEYSTER, GINSBERG *et al.*, 1986; ANDERSON, TWEETEN *et al.*, 1989).

O aumento muscular foi observado em estudos anatômicos (TROKEL & JAKOBIEC 1981), durante procedimentos cirúrgicos (NAFFZIGER 1933) e em exames radiológicos (FORBES, GORMAN *et al.*, 1983). Análises histológicas do tecido muscular orbitário de pacientes com OG mostram graus variados de aumento volumétrico causado por edema e infiltração de gordura entre as fibras musculares. Observam-se células inflamatórias (linfócitos, macrófagos), depósitos de

glicosaminoglicanos e acúmulo de colágeno. A célula muscular não é primariamente afetada (CAMPBELL 1989).

A gordura orbitária apresenta poucas alterações histológicas apesar da grande hiperplasia, observada durante a cirurgia de decompressão orbitária e em estudos radiológicos (PEYSTER, GINSBERG *et al.*, 1986). As principais alterações ocorrem nos septos de tecido conectivo que permeiam o tecido adiposo e são semelhantes às que ocorrem no interstício muscular (RILEY 1972). Uma característica relevante do acometimento adiposo é a proliferação de adipócitos normais, processo conhecido como neo-adipogênese.

O envolvimento inconstante dos tecidos muscular e adiposo na OG levou Nunery a categorizar os pacientes em 2 subtipos de orbitopatia, apresentando comportamentos clínicos diferentes (NUNERY 1991). Pacientes com OG subtipo 1 têm aumento da gordura orbitária e pouco ou nenhum aumento muscular. Apresentam motilidade ocular normal, proptoses simétricas e ausência de sinais inflamatórios orbitários. Em geral ocorre em mulheres (relação feminino/masculino de 8:1) e têm evolução mais benigna pelo fato de não produzir disfunção muscular (Figura 4A/B). No subtipo 2 o envolvimento muscular é notório, causando diplopia e proptose assimétrica. Há sinais inflamatórios evidentes e risco de neuropatia óptica compressiva. Esse tipo de OG tem menor predisposição pelo sexo feminino do que o subtipo 1 (relação feminino/masculino de 2:1) e inicia-se em idades mais avançadas (Figura 5A/5B) (RUBIN, WATKINS *et al.*, 1998).

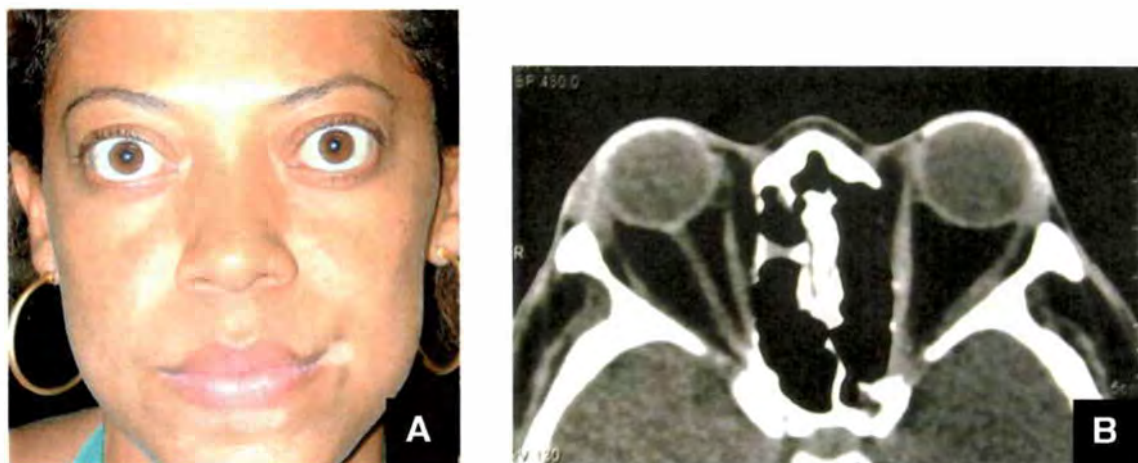


Figura 4. A. Paciente com orbitopatia de Graves (OG) - subtipo 1, apresentando áreas hipocrômicas periorais, mostrando a associação da OG com vitiligo. B. Tomografia computadorizada de órbitas, em corte axial, da mesma paciente, mostrando musculatura extra-ocular normal e proptose secundária ao aumento do conteúdo adiposo orbitário

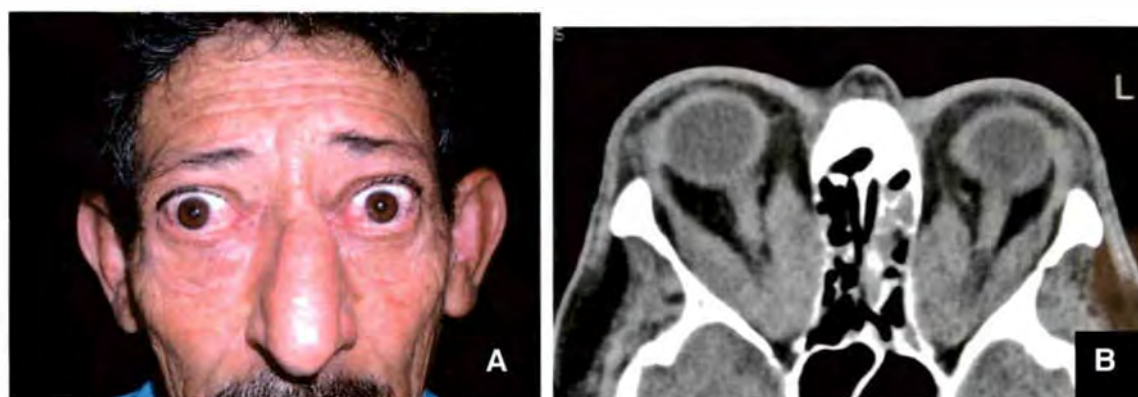


Figura 5. A. Paciente com orbitopatia de Graves - subtipo 2. B. Tomografia computadorizada de órbitas, em corte axial, mostrando o grande aumento da musculatura extra-ocular com compressão do nervo óptico

A categorização em subtipos assume importância prognóstica nas indicações terapêuticas. Pacientes do subtipo 1 têm menor chance de desenvolver diplopia e estrabismo após a cirurgia de descompressão orbitária (NUNERY, NUNERY *et al.*, 1997). Pacientes com OG subtipo 2 tendem a obter melhores respostas a tratamentos antiinflamatórios com corticosteróide e/ou radioterapia.

O envolvimento muscular é uma das principais características da OG. Gaag e cols (GAAG, SCHIMDT *et al.*, 1996) estimaram a ocorrência de aumento muscular

em 68% dos pacientes com OG. No entanto, nesse mesmo estudo, 28% dos pacientes analisados apresentaram somente o aumento da gordura orbitária com MEO normais, correspondente ao subtipo 1 (NUNERY 1991).

1.1.4. Tomografia computadorizada de órbitas

O exame clínico permite extrair grande parte das informações necessárias ao diagnóstico da orbitopatia. É indiscutível, no entanto, o papel dos exames de imagem, em especial da TC de órbitas, na complementação diagnóstica e abordagem terapêutica dessa doença.

A TC foi introduzida em 1970, possibilitando um grande avanço para investigação da anatomia das doenças orbitárias (WEBER 1996). O princípio do funcionamento da TC é resultado de raios-X colimados que atravessam o paciente e incidem sobre um detector. Os raios-X são atenuados pelos tecidos que atravessam, sendo essa atenuação diretamente proporcional à densidade do tecido. Portanto, para quantificação das estruturas, é necessário o conhecimento da quantidade inicial e restante de raios-X. Os valores de atenuação são medidos em unidades de Hounsfield (HU), numa escala de -1000 a +1000. Por convenção, a densidade do ar é fixada em -1000 HU, da água em 0 HU e do osso +1000.

A maioria dos tecidos e fluidos do organismo varia entre -100 e +100 HU. Pelo fato da TC apresentar-se em escala cinza, tecidos com baixa atenuação, ou seja, baixa densidade, permitem que uma quantidade maior de raios-X passe por eles, portanto, aparecem pretos na imagem. Entretanto, áreas com alta atenuação, apresentam-se em coloração esbranquiçadas. Para visualização do olho são utilizados 64 níveis de cinza, numa escala entre preto e branco no filme de raios-X. Portanto, tecidos diferentes, mas com densidades similares, não podem ser

distinguidos pelas TC padrões. Um artifício utilizado para resolução desse problema é denominado técnica de janelas (*windowing*) que possibilita a observação de imagens formadas dentro de determinada faixa de densidade (WEGENER, FASSEL *et al.*, 1993).

A TC orbitária utiliza secções axiais da região orbitária, obtidas no ângulo de -10 a -15° relativos ao plano orbitomeatal (Figura 6A), e, ainda, secções coronais, perpendiculares ao plano axial (Figura 6B). Cada secção ou corte tem espessura milimétrica e o intervalo entre cortes consecutivos é variável, em geral de 3 mm. Durante o exame, o paciente é orientado a manter a posição primária do olhar evitando, assim, contrações assimétricas da musculatura extra-ocular.

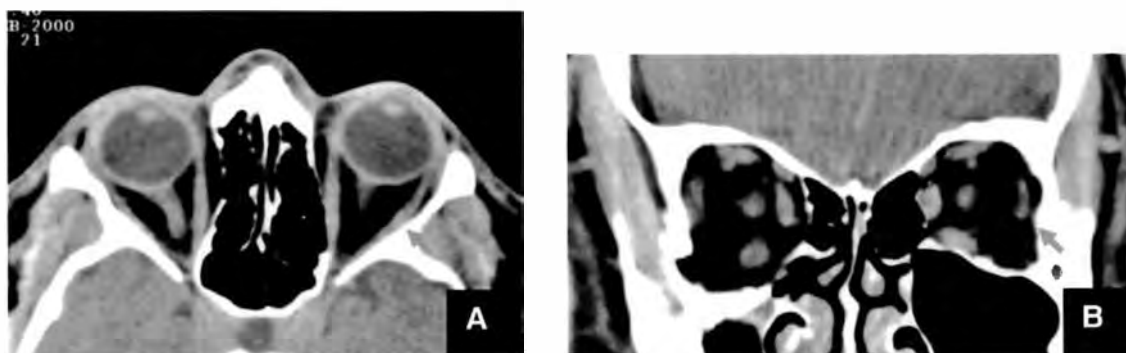


Figura 6. Tomografia computadorizada de órbitas em corte axial (A) e coronal (B). A seta indica a órbita normal

Os músculos extra-oculares são estruturas bem definidas pela TC. Nos cortes axiais, eles são fusiformes e, nos cortes coronais, assumem um aspecto levemente ovalado de densidade homogênea. Ao contrário, a gordura orbitária é representada pela imagem negativa que fica entre os músculos.

Na OG, os achados tomográficos característicos são o aumento muscular que, geralmente, poupa a inserção tendínea escleral, aumento da gordura intra e

extraconal, deslocamento antero-posterior do globo ocular e, raramente, a diminuição da densidade intramuscular (ÖZGEN, ALP *et al.*, 1999) (Figura 7)



Figura 7. Tomografia computadorizada de órbitas, corte axial, mostrando proptose e aumento muscular poupando a inserção escleral na órbita direita, alterações típicas da orbitopatia de Graves. A órbita esquerda é normal

1.2. Marcadores genéticos

1.2.1. Sistema dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA)

O desenvolvimento das doenças auto-imunes é consequência da disfunção do sistema imune, que deixa de reconhecer constituintes do próprio indivíduo, tratando-os como antígenos estranhos. A predisposição às doenças auto-imunes está associada aos genes do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) que tem como função primordial codificar moléculas fundamentais na apresentação de antígenos para linfócitos T. A região CPH está localizada no braço curto (p) do cromossomo 6 e recebeu essa denominação porque, quando descrita, esteve associada à rejeição aos tecidos transplantados em animais. O complexo gênico codifica moléculas ou antígenos de histocompatibilidade, recebendo, no ser humano, o nome de sistema HLA (*human leukocyte antigens*). Didaticamente, esses genes

podem ser reunidos em três grupos, denominados genes de classe I, II e III. Os genes de classe I codificam as moléculas HLA-A, B e C; os genes de classe II codificam as moléculas HLA-DM, DO, DP, DQ e DR. Os genes de classe III não codificam moléculas de histocompatibilidade e, sim, proteínas das vias clássica e alternativa do complemento, os fatores de necrose tumoral alpha e beta (TNF- α e TNF- β), a proteína do choque térmico (Hsp 70) e as enzimas 21-hidroxilase. A Figura 8 apresenta um esquema didático da localização dos genes do sistema HLA .

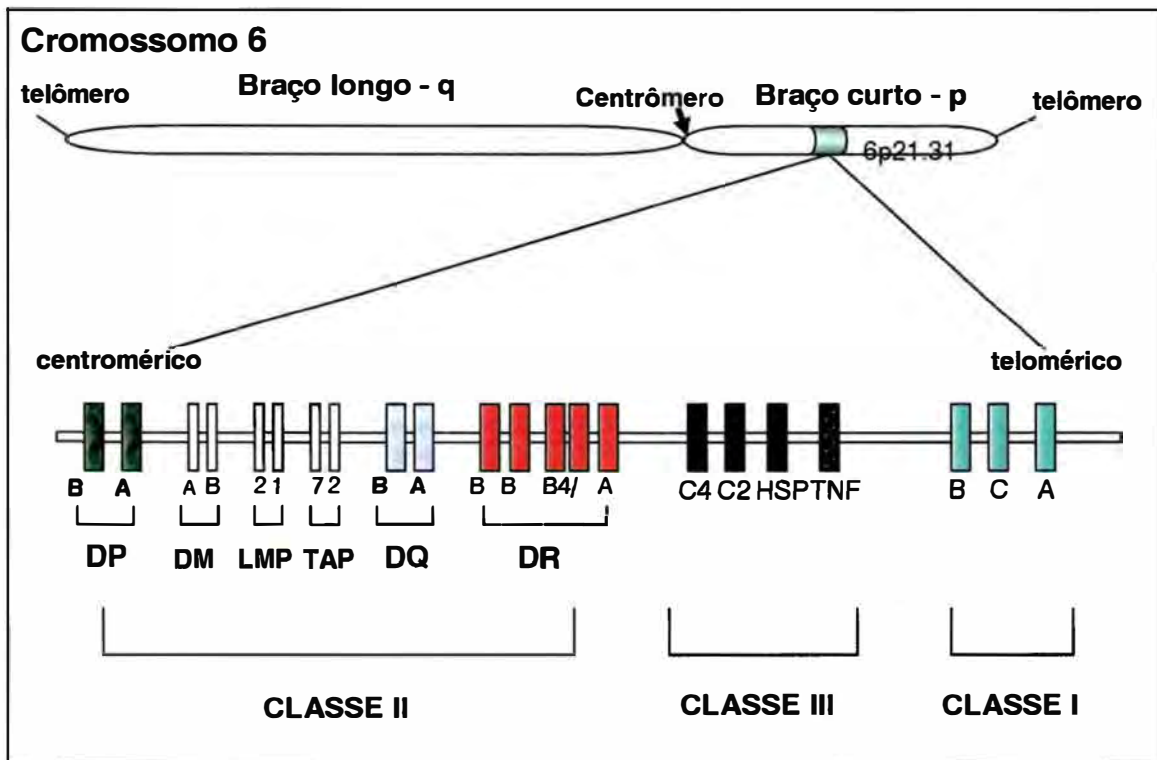


Figura 8. Representação esquemática da localização dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (CPH)

Os genes HLA que estão envolvidos na resposta imune pertencem às classes I e II. Os produtos desses genes são moléculas que ficam na superfície celular, cuja função é a apresentação de peptídeos antigênicos às células T. As moléculas de classe I estão presentes na maioria das células somáticas e as de classe II ocorrem, predominantemente, em linfócitos B e macrófagos, células denominadas

apresentadoras de antígenos, e, ainda, em linfócitos T ativados. Os genes de classe II codificam 2 cadeias polipeptídicas, α e β , que formam o sulco de ligação do antígeno. A nomenclatura segue a designação de seu loco no cromossomo 6 e consiste de 3 letras: a primeira (D) indica a classe, a segunda (M, O, P, Q ou R) indica a família e a terceira (A ou B) indica a cadeia α ou β . Assim, o HLA-DRB, por exemplo, mostra que é um gene de classe II da família R que codifica uma cadeia β . Cada grupo de alelos é identificado pelos dois pelos dois algarismos arábicos iniciais e cada alelo desse grupo, por dois algarismos arábicos finais, sendo 4 algarismos precedidos de um asterisco. Exemplificando, HLA-DRB1*0301 significa que o alelo 0301 do gene DRB1 codifica a cadeia β da molécula de classe II, pertencente à família R (KLEIN & SATO 2000).

Cada gene tem vários alelos que podem codificar moléculas distintas. Uma determinada molécula HLA pode, assim, apresentar um antígeno que não seria reconhecido se estivesse ligado a uma molécula codificada por outro alelo. Essa característica ajuda a explicar a associação de uma doença com alelos específicos (KLEIN & SATO 2000).

Os estudos populacionais são amplamente utilizados para determinar as associações entre antígenos ou alelos HLA e doenças. Nesses estudos, a frequência do antígeno ou alelo observada nos pacientes não aparentados é comparada com aquela verificada em indivíduos que não apresentam a mesma doença ou com indivíduos saudáveis. A associação é avaliada pela comparação das frequências dos marcadores de histocompatibilidade entre os grupos estudados, utilizando os dados de uma tabela de contingência 2 x 2 e empregando-se o teste exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado. Tradicionalmente, a força da associação é estimada pelo risco relativo (RR), descrito por Woolf e Haldane em 1955, que

indica quão mais freqüente uma doença pode ocorrer em portadores de um determinado marcador de histocompatibilidade em relação aos indivíduos que não apresentam o marcador (SVEJGAARD, PLATZ *et al.*, 1983). Quando vários antígenos são estudados, em geral um deles terá uma diferença estatística, considerando a probabilidade de 5%, ou seja, não há diferença verdadeira. Esse fenômeno (erro tipo I) pode ser corrigido multiplicando o valor da probabilidade (p) pelo número de antígenos estudados (correção de Bonferroni). Essa correção é necessária em estudos de novos antígenos ou alelos (SVEJGAARD 1986). Como ilustrado na Tabela 1, o RR é calculado como a razão de probabilidades ou *odds'ratio* (OR), ou seja, o produto cruzado das quatro entradas da tabela 2 x 2. Um RR maior do que 1 indica que a freqüência do marcador nos pacientes é maior do que nos controles, mostrando a suscetibilidade à doença. Por outro lado, quando o RR é menor do que 1 indica que o marcador confere proteção ao desenvolvimento da doença. Nos casos em que o RR é maior do que 1, calcula-se a fração etiológica (FE) que estima a magnitude da suscetibilidade ao marcador, em termos populacionais. Quando o RR é menor do que 1, calcula-se a fração preventiva (FP), indicando a magnitude de proteção do marcador. A Tabela 1 sumaria as fórmulas para os cálculos do RR, FE e FP.

Tabela 1. Variáveis utilizadas para estimar a força da associação de um marcador em uma doença

1. Tabela de contingência 2 X 2.

	Número de indivíduos	
	Com o marcador	Sem o marcador
Pacientes	a	b
Controles	c	d

Frequência do marcador nos pacientes: $h_p = a/a+b$

2. Risco Relativo (RR): $RR = ad/bc$

3. Se a associação for positiva: $RR > 1$, calcula-se a fração etiológica:

$$\text{Fração etiológica (FE): } FE = (RR-1/RR) (a/a+b) = (RR-1/RR) h_p$$

4. Se a associação for negativa: $RR < 1$, calcula-se a fração preventiva

$$\text{Fração preventiva (FP): } FP = (1-RR)h_p / RR(1-h_p) + h_p$$

1.2.2. O sistema HLA na doença de Graves

A suscetibilidade genética à DG é particularmente relacionada aos alelos HLA de classe II em grupos étnicos distintos (ORHAN, AZEZLI *et al.*, 1993; CUDDIHY & BAHN 1996; WONG, CHENG *et al.*, 1999; HUNT, MARSHALL *et al.*, 2001). A principal associação está relacionada ao HLA-DR3 e DQA1*0501 em várias populações, apesar dos riscos relativos serem relativamente baixos (2,5 a 3,8) (RATNASINGAM & GOUGH 2002).

A população brasileira é extremamente miscigenada, ou seja, apresenta substrato genético de múltiplas etnias (LOUZADA-JUNIOR, SMITH *et al.*, 2001). Nessa população, a DG está associada aos alelos HLA-DRB1*0301 ($RR=2.8$;

FE=0,287) e DQA1*0501 (RR=3.74; FE=0,351) e a proteção à doença é atribuída ao alelo HLA-DQB1*0602 (RR=0,18; FP=0,267)(MACIEL, RODRIGUES *et al.*, 2001).

Embora a predisposição ao desenvolvimento da OG tenha sido relatada em outras populações (INOUE, SATO *et al.*, 1991; OHTSUKA & NAKAMURA 1998), nenhuma associação foi encontrada em uma amostra de pacientes brasileiros, quando estudados pelo método sorológico (MACIEL, NAVARRO *et al.*, 1997).

1.2.3. Microssatélites do Fator de Necrose Tumoral

Microssatélites são seqüências repetidas de DNA encontradas nas regiões não codificadoras do genoma (introns) representando, aproximadamente, 3 % do genoma humano (BENNETT 2000). Considerando seu alto grau de polimorfismo, os microssatélites têm sido utilizados, fundamentalmente, como marcadores genéticos, desde sua descoberta em 1980. Esse polimorfismo é dado por repetições consecutivas (*in tandem*) de uma seqüência de nucleotídeos ou VNTRs (*variable number of tandem repeats*). Quando essas seqüências apresentam de 2 a 6 pares de bases, elas são chamadas de repetições curtas *in tandem* (*Short Tandem Repeats – STRs*) ou microssatélites. Uma das hipóteses relacionadas com a influência dos microssatélites sobre os produtos gênicos é a possibilidade de alterar o dobramento do DNA, afetando a ligação de proteínas e enzimas, podendo afetar a taxa de transcrição do DNA (FIELD 2001; ELLEGREN 2004).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, envolvida nas reações imunes celular e inflamatórias. Atua também no processo de fibrogênese e remodelação tecidual através da estimulação de prostaglandina E2, glicosaminoglicanos e produção de colágeno pelos fibroblastos O TNF- α pertence a uma família de

proteínas que inclui a linfotoxina α ($LT\alpha$, conhecida previamente como $TNF-\beta$) e linfotoxina β ($LT\beta$). É produzido principalmente por macrófagos e linfócitos ativados.

Em meados de 1980, a proteína $TNF\alpha$ foi purificada e seu gene foi mapeado na região de classe III do CPH, no locus TNF , uma região de 7 kb que fica a 250 kb centromérico ao locus $HLA-B$ e aproximadamente 1000 kb do genes DR da classe II do CPH. A localização esquemática do gene $TNF-\alpha$ e do microsátélites do TNF no CPH está demonstrada na Figura 9.

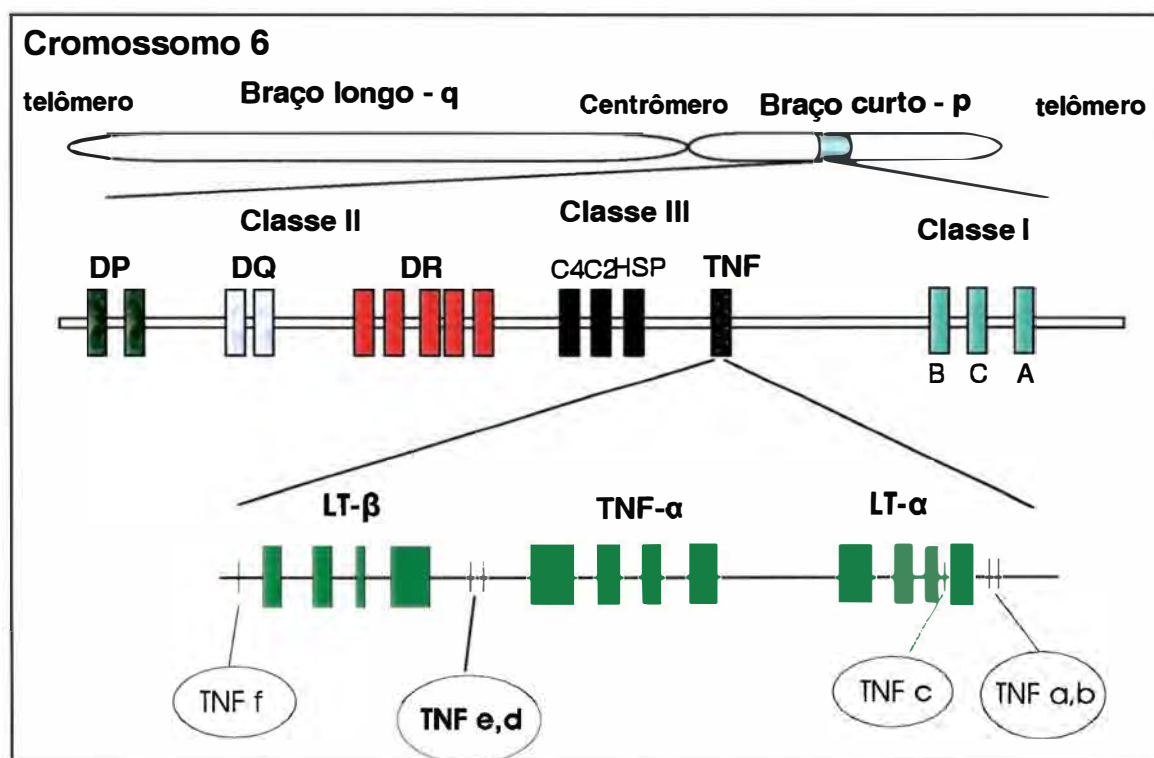


Figura 9. Localização dos microsátélites do TNF dentro do complexo principal de histocompatibilidade

No loco TNF há 6 microsátélites descritos, denominados $TNFa$, $TNfb$, $TNfc$, $TNfd$, $TNfe$ e TNf (UDALOVA, NEDOSPASOV *et al.*, 1993; TSUKAMOTO, OHTA *et al.*, 1998). Os microsátélites $TNFa$ e b são repetições $(GT)_n$ e $(GA)_n$, respectivamente, localizadas, aproximadamente, 3,5 kb teloméricas ao gene do $TNF-\beta$. O $TNfc$ é uma repetição $(GA)_n$, localizada dentro do primeiro intron do gene

TNF- β . Os outros dois microssatélites TNFd e TNFe são repetições (GA) n situadas entre 8 e 10 kb centroméricas ao gene TNF- α e abaixo do gene TNF- β (LT- α) (JONGENEEL, BRIANT *et al.*, 1991) e o TNFf é uma repetição (CA) n localizada acima do gene da LT- β (TSUKAMOTO, OHTA *et al.*, 1998). Cada microssatélite possui um número mínimo de alelos mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Características dos microssatélites (STRs) do gene TNF

Marcador	TNFa	TNFb	TNFc	TNFd	TNFe
Sequência repetitiva	(GT) n	(GA) n	(GA) n	(GA) n	(GA) n
No de alelos	14	7	2	7	3
Tamanho dos alelos (pb)	97-125	125-131	159-161	124-136	98-102

Estudos têm sugerido que os polimorfismos dos genes do TNF podem estar relacionados com a susceptibilidade ou gravidade a vários grupos de doenças. Essa relação entre os polimorfismos e algumas afecções pode ser conseqüente à influência direta da variabilidade genética sobre a expressão gênica, ou ainda, devido ao desequilíbrio de ligação dos genes do TNF com outros genes do CPH. Vários estudos têm demonstrado o forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do TNF e os genes do CPH de classe I e II, contudo, os trabalhos sobre a influência dos polimorfismos sobre a expressão gênica e, conseqüentemente, a sua participação em várias doenças são controversos e inconclusivos (HAJEER & HUTCHINSON 2001).

Os microssatélites do TNF têm sido associados a várias doenças auto-imunes. Em indivíduos caucasianos ingleses com lupus eritematoso sistêmico (LES),

por exemplo, a frequência do haplótipo TNFa2-b3-d3 mostrou-se aumentada, além de se encontrar em forte desequilíbrio de ligação com o haplótipo HLA-A1-B8-DR3 (HAJEER, WORTHINGTON *et al.*, 1997). Em pacientes gregos com LES houve aumento na frequência do alelo TNFa11, que se mostrou em desequilíbrio de ligação com o HLA-DRB1*15 (TARASSI, CARTHY *et al.*, 1998). Já em pacientes com artrite reumatóide (AR) o haplótipo TNFa6-b5-c1-d4 foi associado ao haplótipo HLA-B44-DRB1*0401 (HAJEER, WORTHINGTON *et al.*, 1996). O alelo TNFa2 já foi relacionado à forma erosiva da artrite reumatóide, pois estudos *in vitro* demonstraram o aumento da produção de TNF- α em indivíduos com a doença e que apresentavam esse alelo (MARTINEZ, FERNANDEZ-ARQUERO *et al.*, 2000). Na esclerose múltipla (EM) a distribuição dos alelos TNFa11 e TNFb4 foi mais freqüente nos pacientes do que no grupo controle. Em pacientes japoneses com ES que apresentavam anticorpo anti-Scl-70, a frequência do alelo TNFa13 estava aumentada (TAKEUCHI, NABETA *et al.*, 2000).

A presença de determinados alelos dos microssatélites do TNF têm sido associadas com a magnitude da expressão da citocina, como mostra a Tabela 3. No entanto, a produção do TNF α pode ser influenciada pela associação com outros genes do mesmo cromossomo, agindo em desequilíbrio de ligação, ou, ainda, em cromossomos diferentes. Alguns alelos HLA-DRB1 são, reconhecidamente, associados à produção do TNF α *in vitro*. Assim, o HLA DR3, DR1, DR4 e DR7 estão associados a uma maior produção do TNF α , enquanto o DR2 e DR5 associam-se a menor produção da citocina (HAJEER & HUTCHINSON 2001).

Tabela 3. Relação entre os microssatélites do TNF e a produção da citocina

	Microssatélites	Produção do TNF- α (in vitro)
Pociot et al(POCIOT, BRIANT <i>et al.</i> , 1993)	a2, c2	aumentada
	a6, c1	diminuída
Derkx et al(DERKX, BRUIN <i>et al.</i> , 1995)	a4, a11	aumentada
	a2, a6, a10	diminuída
Turner et al (TURNER, GRANT <i>et al.</i> , 1995)	d3	aumentada

O papel do TNF α no desenvolvimento da OG tem sido investigado. Níveis elevados de RNAm do TNF α foram encontrados nos músculos extraoculares de pacientes com OG e a magnitude do aumento muscular foi correlacionado com o aumento da expressão do RNAm da citocina (HIROMATSU, YANG *et al.*, 2000).

Polimorfismos genéticos da região promotora do TNF foram associados com a suscetibilidade a orbitopatia em populações geneticamente diferentes (BEDNARCZUK, HIROMATSU *et al.*, 2004). Não há estudos envolvendo os microssatélites do TNF na orbitopatia de Graves. Um único estudo, relacionando a doença de Graves aos polimorfismos do microssatélite TNF α na população tunisiana, não foi capaz de demonstrar qualquer associação (MAALEJ, KACEM *et al.*, 2000).

Apesar da inexistência de estudos a respeito dos microssatélites do TNF na OG, parece razoável inferir que esses marcadores genéticos podem estar associados a essa doença, baseados na sua proximidade com os genes HLA dentro do CPH, e no papel do TNF α no aumento da musculatura extraocular em pacientes com OG.

Nesse sentido, o presente estudo foi desenvolvido, com a finalidade de caracterizar os subtipos da OG em relação às suas características imunogenéticas,

utilizando como marcadores genéticos os alelos HLA classe II DRB1 e DQB1 e os microssatélites do TNF.

OBJETIVOS

Considerando que os mecanismos patogênicos envolvidos na orbitopatia de Graves permanecem desconhecidos e que as manifestações clínicas da orbitopatia podem ser variáveis, de acordo com o tecido orbitário acometido, aventa-se a possibilidade da existência de mecanismos fisiopatogênicos distintos gerando subtipos da OG, em indivíduos geneticamente predispostos.

1. Gerais

Determinar a prevalência dos subtipos da orbitopatia de Graves, na população brasileira, e avaliar a presença de marcadores de suscetibilidade genética nesses subtipos, localizados no complexo de histocompatibilidade principal, representados pelos genes da classe II, DR e DQ, e pelos genes da classe III, os microssatélites do TNF.

2. Específicos

2.1. Caracterizar os subtipos da orbitopatia de Graves, de acordo com o tecido orbitário predominantemente acometido pela doença, utilizando estudo tomográfico quantitativo das áreas da musculatura extra-ocular e do tecido adiposo orbitário, comparando-as com o grupo controle.

2.2. Comparar dados clínicos (idade, sexo, presença de neuropatia óptica e diplopia e duração da orbitopatia) entre os subtipos

2.3. Analisar a freqüência dos alelos HLA classe II DR e DQ nos subtipos da orbitopatia de Graves

2.4 Analisar a frequência dos polimorfismos dos microssatélites do TNF nos subtipos da orbitopatia de Graves

CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em 3 etapas. A primeira etapa foi constituída de uma análise tomográfica quantitativa a fim de identificar, através de um método facilmente reproduzível, os subtipos da orbitopatia de Graves. A partir da identificação radiológica, foram estudados os principais aspectos clínicos em cada grupo. Na segunda etapa, as freqüências dos alelos HLA-DRB e DQB nos pacientes com OG foram determinadas, comparando-as com as freqüências do grupo controle, devidamente pareados quanto à faixa etária e o sexo, provenientes da mesma região geográfica. Na terceira etapa foram identificados os polimorfismos genéticos de 5 microssatélites do TNF nos pacientes com OG, comparando suas freqüências entre os subtipos.

3.1. Primeira etapa: determinação dos subtipos da OG através de análise tomográfica quantitativa

Foram analisadas 101 TC orbitárias de pacientes com OG (78 mulheres e 23 homens), atendidos consecutivamente no ambulatório de oculoplástica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. De acordo com o protocolo de avaliação dos pacientes com OG deste serviço, cada paciente deve ser submetido ao exame tomográfico de órbitas e campimetria visual computadorizada após a 1ª consulta. A idade dos pacientes variou de 13 a 76 anos (média= $41,34 \pm 13,07$ anos). O diagnóstico da OG foi baseado em critérios estabelecidos por Bartley e Gorman (BARTLEY & GORMAN 1995). Os critérios de Bartley estabelecem o diagnóstico clínico da OG em pacientes que apresentam retração palpebral associada a, pelo menos, um dos seguintes sinais: disfunção tireoidiana, proptose, estrabismo ou neuropatia óptica, depois de afastadas as outras causas possíveis, por meio de exames de imagem. Quando não há retração palpebral, o diagnóstico da OG só

pode ser considerado se algum dos sinais mencionados estiver associado à disfunção tireoidiana, na ausência de outros fatores causais (Figura 10).

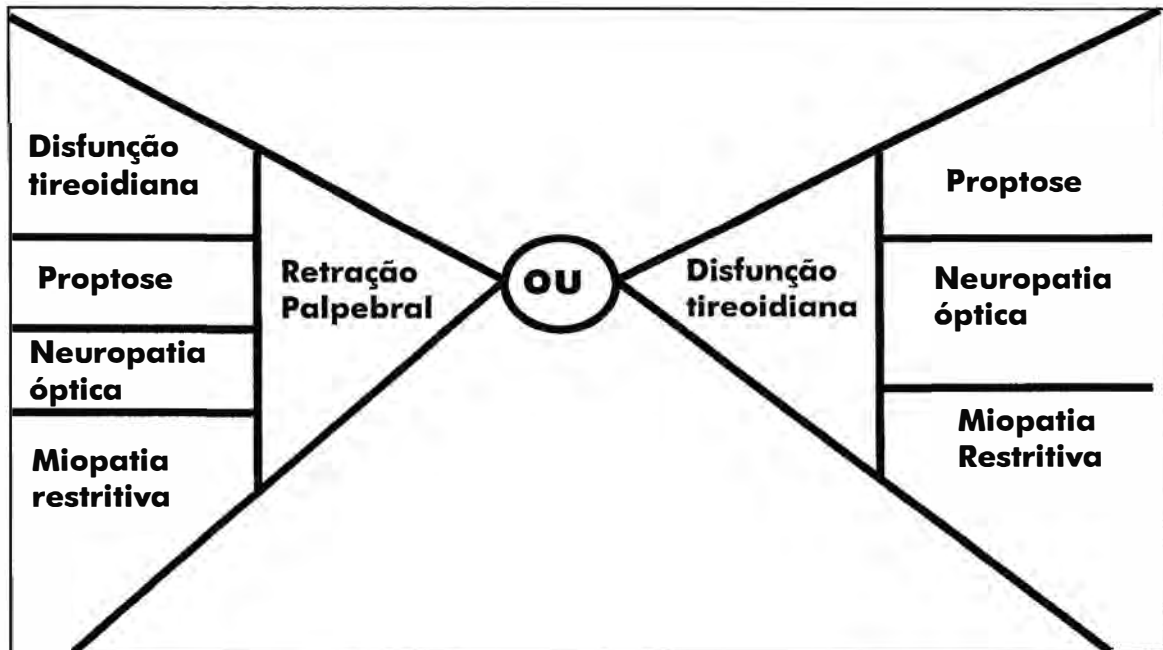


Figura 10. Critérios diagnósticos para orbitopatia de Graves (BARTLEY & GORMAN 1995)

Somente uma órbita de cada paciente foi selecionada para análise. Para casos com envolvimento orbitário assimétrico selecionou-se a órbita mais acometida e, nos casos simétricos, foi selecionado o exame de melhor padrão radiológico. Cada órbita foi avaliada através de 1 corte coronal e 1 corte axial. A posição dos cortes tomográficos foi constante, ou seja, cortes coronais posicionados a 9 mm posteriores ao fechamento do rebordo orbitário e cortes axiais que incluíam os músculos retos medial e lateral e o nervo óptico.

As imagens selecionadas foram fotografadas com uma câmera fotográfica digital Nikon Coolpix 995 e transferidas para um computador Macintosh, modelo Power G3, onde foram processadas pelo programa NIH 1.62 (programa desenvolvido no National Institute of Health por Wayne Rasband, disponível gratuitamente no site <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html>). No corte

coronal, os limites musculares foram delineados determinando suas áreas. Os músculos retos lateral e inferior foram analisados individualmente; os grupos musculares reto superior/levantador da pálpebra superior e reto medial/oblíquo superior foram analisados em conjunto pois, devido a sua proximidade, perdem seus limites, impossibilitando a análise individual (Figura 11)

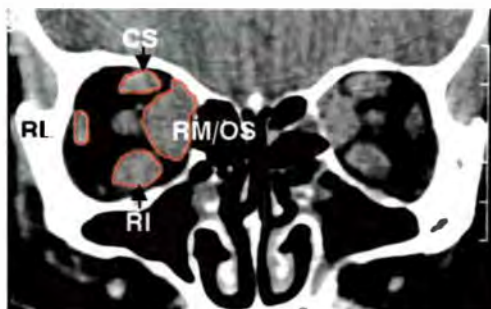


Figura 11. Tomografia computadorizada de órbitas em corte coronal. A área da musculatura extra-ocular está delimitada em vermelho. Os músculos estão indicados: CS: complexo superior (reto superior/levantador da pálpebra superior); RM/OS: reto medial/oblíquo superior; RI: reto inferior; RL: reto lateral

O corte axial foi utilizado para determinação da área do tecido adiposo, presente entre as paredes orbitárias e os músculos retos medial e lateral (gordura extraconal) e entre esses e o nervo óptico (gordura intraconal) (Figura 12A). A posição ântero-posterior do globo ocular também foi estimada no corte axial, utilizando a medida da distância entre a esclera posterior e uma linha reta horizontal posicionada entre as eminências zigomáticas (linha interzigomática) (Figura 12B).

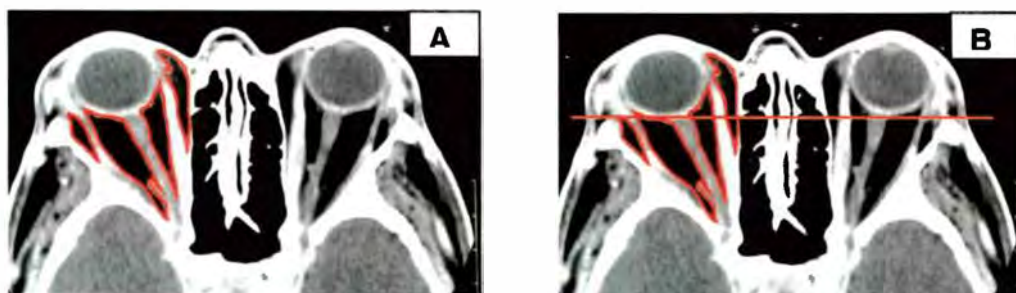


Figura 12. A. A área delimitada corresponde à gordura intra e extraconal. B. A proptose foi determinada pela distância entre a esclera posterior e a linha interzigomática.

As mesmas medidas foram realizadas em 56 órbitas normais de pacientes sem patologias sistêmicas, submetidos ao exame tomográfico devido a patologias orbitárias unilaterais (42 mulheres e 14 homens; idade média= $36,48 \pm 17,5$ anos).

Para determinar os subtipos da OG de acordo com o tecido orbitário aumentado (músculo e/ou gordura), as medidas das áreas musculares e da gordura orbitária dos pacientes com OG foram arbitrariamente consideradas anormais quando as áreas desses tecidos excediam 2 desvios-padrão acima da média do grupo controle.

A análise estatística foi aplicada às áreas medidas, comparando-se cada subtipo da OG e o grupo controle, utilizando-se a análise de variância unifatorial (ANOVA) e teste de Tukey.

Foram registradas as seguintes características clínicas dos pacientes estudados: idade no momento da 1ª consulta oftalmológica, sexo, exoftalmometria, medida com exoftalmômetro de Hertel, presença de estrabismo, presença de neuropatia óptica, avaliada através do exame do campo visual e o tempo de duração da orbitopatia.

Os valores das variáveis contínuas (exoftalmometria, idade, duração da orbitopatia) foram apresentados pela média e \pm desvio-padrão e comparados pelo

teste t. As variáveis categóricas (sexo, neuropatia óptica e diplopia) foram apresentadas pela frequência absoluta e comparadas pelo teste de Fisher bicaudal.

3.2. Segunda etapa: tipificação dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 nos pacientes com OG subtipos miogênico e não miogênico

Foram obtidas amostras do sangue periférico de 51 pacientes (43 mulheres, idade: $44,9 \pm 12,49$) com OG, provenientes da população submetida à análise tomográfica. De acordo com os critérios adotados para estratificação em subtipos, 25 pacientes (23 mulheres, idade: $39,16 \pm 11,97$) pertenciam ao subtipo não miogênico e 26 pacientes (20 mulheres, idade: $50,64 \pm 10,32$) pertenciam ao subtipo miogênico. Todos os pacientes apresentavam diagnóstico de hipertireoidismo auto-imune. A frequência dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 foi comparada entre os subtipos da OG, entre os 51 pacientes com OG e 44 pacientes com DG sem orbitopatia e 161 controles pertencentes à mesma região geográfica (região noroeste do estado de São Paulo). Essa população controle apresenta substrato genético de múltiplas etnias, decorrente da forte miscigenação característica da população brasileira, conforme definido em estudo prévio (LOUZADA-JUNIOR, SMITH *et al.*, 2001).

Para tipificação dos alelos HLA de classe II, DRB1 e DQB1, o DNA genômico foi extraído a partir de 20 mL de sangue venoso periférico, colhido de cada indivíduo, utilizando-se tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA), contendo EDTA K3 (0.054 mL/ tubo).

3.2.1.Extração do DNA

O DNA foi extraído por *salting-out*, conforme metodologia previamente descrita (MILLER, DYKES *et al.*, 1998). Utilizaram-se 10 mL de sangue total ao qual

se adicionou 4 volumes de tampão de lise de glóbulos vermelhos (sacarose 0.3M, Tris-HCL 10mM, MgCl 5mM e TRITON X100 a 1%). A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 2400xg, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e ao precipitado foram adicionados 4,5 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (NaCl 0,075 M, Na-EDTA 0,024 M), 1,1 mL de perclorato de sódio 5M e 125 µL de SDS a 10%. A preparação era agitada vigorosamente por 10 segundos à temperatura ambiente. Para a extração de proteínas, foram adicionados 2,0 mL de NaCl a 6,0 mM, agitando-se os tubos vigorosamente por 15 segundos. Após a centrifugação a 1500xg por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi recolhido em um tubo de polipropileno de 50 mL, sendo adicionados 7 mL de isopropanol absoluto. A precipitação do DNA ocorreu por inversão manual lenta. O DNA precipitado foi então retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur selada. O DNA foi lavado duas vezes em 3 mL de etanol a 70% e redissolvido em 100 a 300 µL de água bidestilada desionizada esterilizada (H₂O_{dd}). O DNA foi então quantificado por espectrofotometria em 260 e 280 nm. O grau de pureza do DNA extraído foi calculado pela razão entre as absorvâncias obtidas em 260 e 280 nm (A₂₆₀:A₂₈₀), sendo considerados adequados valores entre os valores 1,6 a 2,0.

3.2.2. Tipificação dos alelos de classe II HLA-DR e HLA-DQ

3.2.2.1 Amplificação do DNA

As tipificações dos alelos de classe II HLA-DRB e -DQB foram realizadas por intermédio da hibridação de DNA amplificado pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR) com iniciadores (*primers*) seqüência específicos

(SSP-Sequence Specific Primers), utilizando-se kits comerciais preparados pelo Grupo de Transplantes de Heidelberg (Ruprecht-Karls-Universitat, Heidelberg, Alemanha). Para as tipificações dos grupos de alelos de classe II HLA-DRB e DQB, cerca de 1-2 μL de DNA (0,5-1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a ser amplificado, era adicionado a 17 μL de soluções previamente preparadas pelo fornecedor, contendo os pares de iniciadores específicos, as bases nitrogenadas, o tampão da enzima Taq-polimerase e 50mM de MgCl_2 . Somente após a preparação dessa mistura, adicionavam-se 2,0 μL da enzima Taq-polimerase (1U/ reação; Pharmacia, Suécia). Como controle negativo, em todas as reações, foram utilizados todos os reagentes acima, exceto o DNA. A reação foi realizada no termociclador PE-9600 (Perkin-Elmer-CA, EUA), utilizando-se os ciclos de temperatura/tempo descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de amplificação dos alelos de HLA-DR e HLA-DQ

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	2'	
1. Desnaturação	94°C	10"	10x
2. Pareamento e extensão	65°C	1'	
3. Desnaturação	94°C	10"	20X
4. Pareamento	61°C	50"	
5. Extensão	72°C	30"	

Aos produtos amplificados foram adicionados 2 μL solução contendo 0,25% de azul de bromofenol e 15% de Ficoll em água, para posterior discriminação dos fragmentos de amplificação em géis de agarose.

3.2.2.2. Análise do produto amplificado em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel, contendo agarose a 2% em tampão 5XTAE (Tris HCl 10mM, pH=7,5, Na-EDTA 1,0mM, pH=8,0). A agarose foi dissolvida por ebulição e resfriada até 60°C, com adição de 1% de brometo de etídio (Sigma, St Louis, USA). Um pente de teflon foi colocado na borda superior do gel, que permaneceu em repouso por uma hora à temperatura ambiente. Após a solidificação e remoção do pente, o gel foi colocado na cuba de eletroforese (Pharmacia-GNA200-Suécia), com nível da solução tampão (5X TAE) de 2 a 3 mm acima da superfície do gel. Os produtos da amplificação foram aplicados sempre na mesma ordem padronizada, o controle negativo foi colocado por último. A eletroforese foi realizada por 15 a 25 minutos, a 170 V. Após esse período, o gel foi colocado em transiluminador UV (312nm-Hybaib-EUA) e fotografado para documentação e interpretação. A tipificação HLA-DRB genérica foi realizada por intermédio de 24 reações de amplificação por indivíduo, sendo 21 para DRB1 (DRB1*01-*16). Na Tabela 5 estão descritas as especificidades e tamanhos dos produtos de amplificação. Para a tipificação HLA-DQB, foram realizadas 13 reações de amplificação por indivíduo e uma reação controle negativo. As especificidades e os tamanhos dos produtos de amplificação para os alelos DQB1 estão ilustradas na Tabela 6.

Tabela 5 - Identificação dos grupos de especificidades/especificidades dos alelos HLA-DRB1 pelo método SSP-PCR. Os tamanhos dos respectivos produtos de amplificação são também mostrados.

ESPECIFICIDADES IDENTIFICADAS	TAMANHOS (PARES DE BASE-pb)
DRB1*0101-*0102	200
DRB1*0103	200
DRB1*1501-*1511	215
DRB1*1601-*1602	210
DRB1*03011-*0320	225
DRB1*0301*0801*1402*1201	170/175
DRB1*03011/012	220
DRB1*03021/-*1302-*1305-*1402-*1403-	190
DRB1*0401-*1410	260
DRB1*0701-*0703*0704*0705	115
DRB1*0801	165/215
DRB1*09012	235
DRB1*10011/2	205
DRB1*1101-	125
DRB1*1201-*1208	105
DRB1*1301-*1302	130
DRB1*1303-*1304	170
DRB1*1305	130
DRB1*1301*1304	200
DRB1*1305*1402-*1403-*1406-*1409	145/150
DRB1*1401-*1404-*1405-*1407-*1408	165/175/215/225

Tabela 6 - Identificação dos grupos de especificidades/especificidades dos alelos HLA-DQB pelo método SSP-PCR. Os tamanhos dos respectivos produtos de amplificação são também mostrados.

ESPECIFICIDADES IDENTIFICADAS	TAMANHOS (PARES DE BASE-pb)
DQB1*0501 - *0504	218
DQB1*0601	218
DQB1*0602 - *0603	152
DQB1*0604 - *0606	212
DQB1*0201*0202*0203	199
DQB1*0301 - *0304	209
DQB1*0302*0307	125
DQB1*0303*0306*0203	128
DQB1*0302*0303*0305*0306*04*0503	143
DQB1*0305	145
DQB1*0306	192
DQB1*03011*0302*0303*0304*0307	156
DQB1*0401 - *0402	208

As freqüências gênicas foram calculadas dividindo-se o número de alelos observados pelo número de alelos da população estudada. Essas freqüências foram comparadas pelo teste exato de Fisher utilizando o programa GraphPad in Stat, versão 3.0. A força da associação foi estimada pelo cálculo do risco relativo, sendo, também, determinadas as frações etiológica ou preventiva.

3.3. Terceira etapa: Análise dos polimorfismos dos microssatélites do TNF alpha nos subtipos da OG

3.3.1. Amplificação do DNA

As reações de amplificação para os STRs ou microssatélites foram realizadas utilizando-se 0,5µL de cada amostra de DNA. Para preparar a mistura da reação de amplificação, foram utilizados tubos de 0,2 mL, nos quais foram colocadas as seguintes concentrações de reagentes para cada grupo de STRs (Tabelas 7 e 8) :

Tabela 7 - Reagentes utilizados para a amplificação dos microssatélites TNFa, TNFb e TNFc

Reagentes	Concentrações	Quantidades (µL)
Água		15,65
Tampão	(10x)	2,50
MgCl ₂	(50mM)	0,50
Iniciador	(0,2µM)	2,00
dNTP	(20mM)	0,25
Taq	(5U/ul)	0,10
Total		21
DNA		0,5

Tabela 8. Reagentes utilizados para amplificação dos microssatélites TNFd e TNFe

Reagentes	Concentrações	Quantidades (μL)
Água		14,90
Tampão	(10x)	2,50
MgCl ₂	(50mM)	1,25
Iniciador	(0,2 μM)	2,00
dNTP	(20mM)	0,25
Taq	(5U/ μl)	0,10
Total		21
DNA		0,5

As quantidades e concentrações dos reagentes descritos acima são para uma reação (uma amostra). Em cada reação foram utilizadas seqüências iniciadoras específicas para cada microssatélite (UDALOVA, NEDOSPASOV *et al.*, 1993), como ilustra a Tabela 9.

Tabela 9. Relação dos marcadores polimórficos de DNA utilizados (UDALOVA, NEDOSPASOV *et al.*, 1993)

Loco	Localização cromossômica	Seqüências iniciadoras
TNFa	6p21.3	5'-GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA -3' 5'-CCT CTC TCC CCT GCA ACA CAC A -3'
TNFb	6p21.3	5'- GCA CTC CAG CCT AGG CCA CAG A -3' 5'-GTG TGT GTT GCA GGG GAG AGA G -3'
TNFc	6p21.3	5'-GGT TTC TCT GAC TGC ATC TTG TCC -3' 5'-TCA TGG GGA GAA CCT GCA GAG AA -3'
TNFd	6p21.3	5'- AGA TCC TTC CCT GTG AGT TCT GCT -3' 5'- CAT AGT GGG ACT CTG TCT CCA AAG -3'
TNFe	6p21.3	5'-GTG CCT GGT TCT GGA GCC TCT C -3' 5'- TGA GAC AGA GGA TAG GAG AGA CAG -3'

O volume final de cada reação foi de 21µL. Os microssatélites TNFa e TNFb foram tipificados, utilizando-se duas reações de amplificação, sendo a segunda reação realizada com o produto da primeira, como descrito por Udalova (UDALOVA, NEDOSPASOV *et al.*, 1993).

Após a preparação da mistura da reação de amplificação, essas foram submetidas aos seguintes ciclos no termociclador (Applied Biosystems 9700) (Tabelas 10 e 11):

Tabela 10 - Condições de amplificação do loco TNFc e primeira amplificação dos locos TNFa e b

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5'	1X
1. Denaturação	94°C	1'	
2. Pareamento	61°C	1'	32X
3. Extensão	72°C	1'	
	72°C	10'	1X
	4°C	∞	

Tabela 11 - Condições de amplificação dos locos TNFd, TNFe e segunda amplificação dos locos TNFa e b

Estágio	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5'	1X
1. Denaturação	94°C	50"	
2. Pareamento	60°C	30"	28X
3. Extensão	72°C	40"	
	72°C	10'	1X
	4°C	∞	

3. 3.2. Análise do produto amplificado em gel de poliacrilamida:

Os produtos de amplificação foram submetidos à separação eletroforética em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida acrescidos de uréia (a preparação dos géis desnaturantes encontra-se no anexo - reagentes e soluções).

Uma vez preparado, o gel foi imediatamente aplicado a um cassete previamente montado. Este cassete é composto por duas placas de vidro colocadas sobre um suporte, separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos de aço. Logo após a aplicação do gel entre as placas, colocou-se um pente de teflon na borda superior, formando sulcos onde, posteriormente, eram aplicadas as amostras. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 30 minutos. Com o gel polimerizado, o pente era retirado e o gel montado em uma cuba de eletroforese vertical, contendo tampão TBE (o mesmo utilizado na preparação do gel, diluído mais 10 vezes) em ambos pólos.

Para a realização da corrida eletroforética, foram utilizados 3 μ L do produto amplificado, acrescidos a 7 μ L de tampão de amostra, contendo formamida a 75%. Essa mistura foi aquecida por 10 minutos a 94°C, sendo em seguida, resfriada bruscamente em um banho de gelo e, imediatamente, aplicada no gel desnaturante. Foram aplicados, juntamente com as amostras, padrões que permitissem a identificação dos alelos. Esses padrões foram obtidos por meio de uma escada alélica feita com amostras aleatórias, tipificadas previamente e comparadas entre si, objetivando-se a determinação de bandas maiores e menores.

A leitura prévia foi confirmada em novos géis, nos quais as amostras, que em princípio pareciam conter o mesmo alelo, foram aplicadas lado a lado. Então, uma amostra de cada alelo era escolhida para definir a escada alélica de cada sistema, tornando, assim, precisa a tipificação (Figura 13). O gel foi submetido a 20mA, pelo

tempo determinado para cada marcador. Os tempos de corrida para cada marcador são descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições específicas para eletroforese de cada loco polimórfico estudado.

Loco	Tempo
TNFa	4:00hs
TNFb	5:15hs
TNFc	3:30hs
TNFd	3:00hs
TNFe	3:15hs

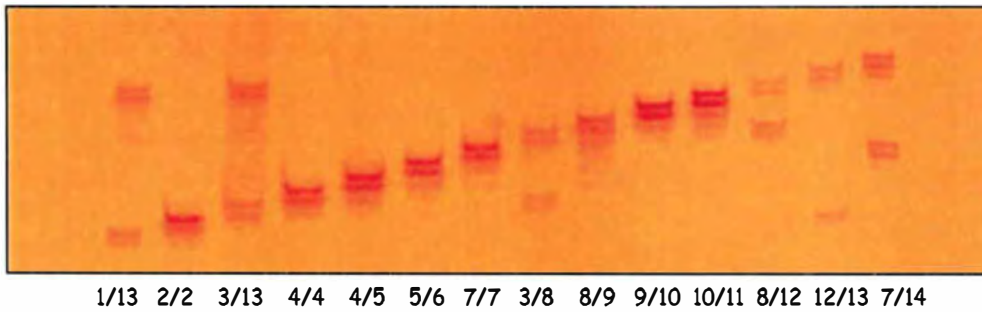
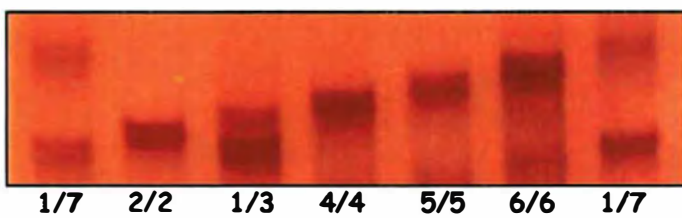
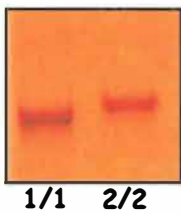
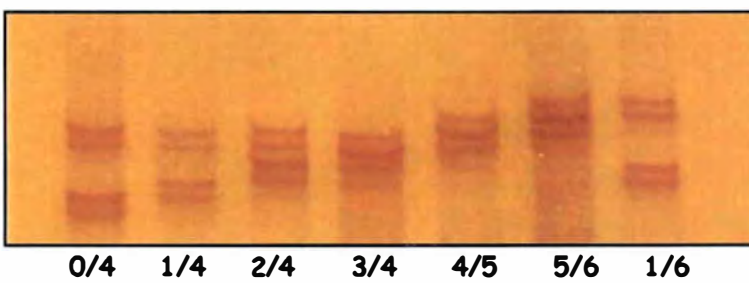
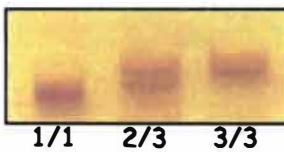
TNFa**TNFb****TNFc****TNFd****TNFe**

Figura 13 – Géis de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos locos TNFa, TNFb, TNFc, TNFd e TNFe.

3.3.3 Coloração com nitrato de prata

Após ser retirado da placa, o gel foi colocado em 100mL solução fixadora acrescida de 2 mL de solução de nitrato de prata, e mantido sob agitação à temperatura ambiente por 5 min. Depois de descartada a solução fixadora com prata, o gel foi lavado 1 vez em água, sendo adicionado em seguida 100mL de solução reveladora acrescida de 1mL de formaldeído. O gel foi colocado sobre agitação até o aparecimento das bandas (os componentes das soluções fixadora e reveladora encontram-se no anexo – reagentes e soluções).

3.3.4 Registro dos Resultados

Após a análise do comportamento eletroforético dos produtos de amplificação, os géis foram secados entre duas folhas de papel celofane embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente por 2 ou 3 dias.

3.3.5 Análises Estatísticas

3.3.5.1 Estimativa das freqüências alélicas

Os microssatélites analisados apresentam alelos codominantes, que permitem inferir os genótipos a partir dos respectivos fenótipos. As freqüências alélicas (xi) e genotípicas (Xii), para cada loco em cada grupo de amostras, foram estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET 1995) versão 2.0 para Windows, segundo as equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad \text{e} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Em que:

x_i é a frequência do alelo "i"

X_{ii} é a frequência do genótipo "ii"

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i , respectivamente;

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

A comparação das distribuições das frequências alélicas foi realizada pelo teste exato de Fisher bicaudal (GraphPad in Stat, versão 3.0). Todos os alelos foram comparados entre os dois subtipos da OG (miogênico e não miogênico).

RESULTADOS

4.1. Primeira etapa: determinação dos subtipos da OG por meio de análise quantitativa tomográfica

A distribuição das áreas da gordura orbitária e da MEO dos pacientes e do grupo controle está demonstrada na Figura 14. No eixo horizontal estão as medidas das áreas musculares e no eixo vertical encontram-se as das áreas da gordura orbitária. Os intervalos delimitados pelos retângulos hachurados em rosa e amarelo indicam a distribuição do grupo controle (média \pm 2 desvios-padrão). Os valores à direita do retângulo rosa identificam os pacientes com aumento muscular e os valores acima do retângulo amarelo mostram os pacientes com aumento da gordura orbitária.

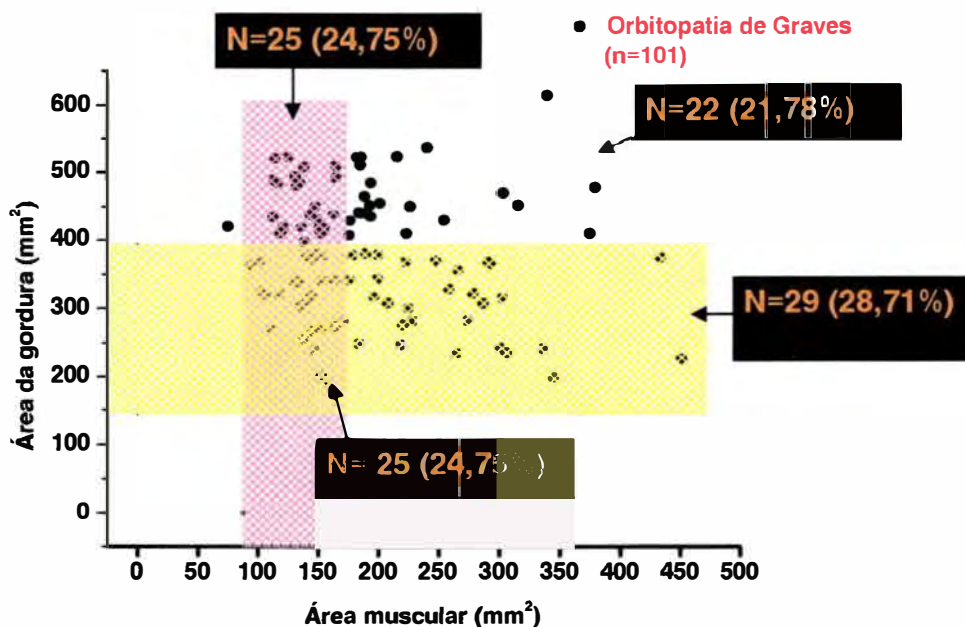


Figura 14. Gráfico da dispersão dos valores das áreas musculares e das áreas da gordura orbitária dos pacientes com OG em função da distribuição dos controles (média \pm 2dp) – área hachurada.

Observa-se que 50 pacientes estão localizados no retângulo rosa, ou seja, possuem área muscular dentro dos limites da normalidade. No entanto, desses 50, 25 (24,75%) encontram-se acima do retângulo amarelo, o que indica que esses pacientes apesar de terem dimensões musculares dentro da normalidade apresentam aumento da gordura orbitária. Esses pacientes foram então denominados como subtipo lipogênico.

No retângulo amarelo há 54 pacientes (áreas de gordura orbitária dentro dos limites da normalidade), dos quais 29 (28,71%) localizados à direita do retângulo rosa e, portanto, com valores da musculatura extra-ocular acima dos limites do grupo controle. Esses pacientes foram denominados como subtipo miogênico.

Há 22 pacientes (21,78%) posicionados acima do retângulo amarelo e a direita do rosa, ou seja, com valores superiores aos limites do grupo controle tanto em relação à área muscular como em relação à gordura orbitária. Esses pacientes foram denominados de subtipo misto.

Finalmente, o grupo de 25 pacientes (24,75%) que apresentou medidas dentro da distribuição do grupo controle para as áreas da gordura orbitária e MEO foi denominado subtipo sem aumento tecidual.

A exoftalmometria, medida com o exoftalmômetro de Hertel, foi correlacionada linearmente com a medida tomográfica, como demonstrado na Figura 15. O coeficiente de correlação (r) foi igual a 0.73 com $p < 0.0001$.

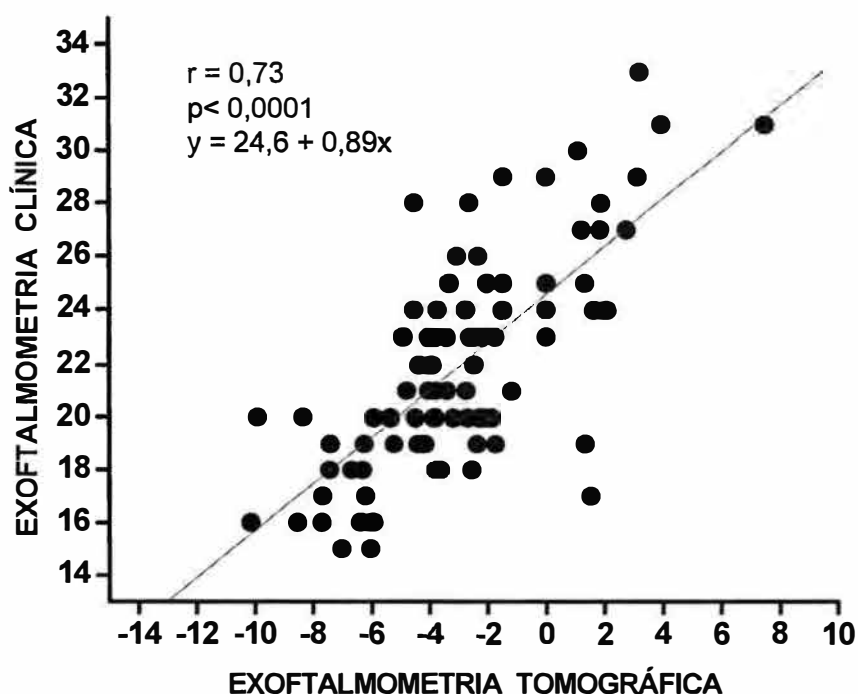


Figura 15. Relação linear entre as exoftalmometrias tomográficas e clínicas

Os resultados da análise de variância unifatorial (ANOVA) e do teste de Tukey na comparação entre as áreas teciduais dos 4 subtipos e do grupo controle encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 . Resultado da análise de variância entre as áreas da gordura e muscular dos subtipos e grupo controle

	Miogênico n=29	Misto n=22	Lipogênico n=25	Sem aumento n=25	Controle n=56	F
Área da gordura (média±dp)	308,29 ± 55,73	470,0 ±50,73	453,09 ±40,49	309,43 ±53,83	268,81 ±61,61	85,16
Área muscular (média±dp)	261,22 ± 69,39*	232,63 ±66,03*	135,08 ±20,63	138,35 ±21,2	130,53 ±21,42	65,55

A análise mostrou que houve diferenças significantes, tanto entres as áreas da MEO, quanto da gordura orbitária ($p < 0.05$).

A comparação entre as médias através do teste de Tukey mostrou que a área da gordura orbitária esteve aumentada de maneira significativa em relação ao controle em todos os subtipos (Tabela 14).

Já em relação à área da MEO, os subtipos misto e miogênico não foram diferentes entre si e se diferenciaram de todos outros grupos (inclusive o controle), os quais não foram diferentes entre si (Tabela 15).

Tabela 14: Comparação entre os grupos em relação à área da gordura orbitária.

GRUPOS	MÉDIAS	DIFERENÇA ENTRE OS SUBTIPOS E O GRUPO CONTROLE	SIGNIFICÂNCIA (p=0,05)
CONTROLE	268,80946		
LIPOGÊNICO	453,089	-184,27974	SIM
MIOGÊNICO	308,29379	-39,48433	SIM
MISTO	470,00636	-201,1969	SIM
SEM AUMENTO TECIDUAL	309,4284	-40,61894	SIM

Tabela 15. Comparação entre os grupos em relação à área muscular

GRUPOS	MÉDIAS	DIFERENÇA ENTRE OS SUBTIPOS E O GRUPO CONTROLE	SIGNIFICÂNCIA (p=0,05)
CONTROLE	130,53304		
LIPOGÊNICO	135,0844	-4,55136	NÃO
MIOGÊNICO	261,22	-130,68696	SIM
MISTO	232,62955	-102,09651	SIM
SEM AUMENTO TECIDUAL	138,3484	-7,81536	NÃO

Considerando-se os resultados das tabelas 14 e 15, pode-se notar que a gordura orbitária não foi um elemento diferenciador de subtipos, uma vez que esteve

aumentada em todos os sub-grupos. Já em relação às dimensões musculares, os grupos miogênico e misto se diferenciaram em relação aos outros grupos e, por isso, foram reunidos em um só grupo denominado miogênico, devido a presença constante do aumento muscular (n = 51). Os subtipos lipogênico e sem aumento tecidual foram, então, reunidos em outro grupo denominado não miogênico (n = 50). Dessa maneira, a análise foi simplificada, pois ao invés de quatro grupos definidos arbitrariamente, a amostra foi subdividida de acordo com a significância estatística das variáveis medidas, ou seja, em dois únicos grupos: miogênico e não miogênico.

A tabela 16 mostra os dados relativos à distribuição quanto ao sexo, valores de exoftalmometria, presença de neuropatia óptica e diplopia, faixa etária e tempo de duração da orbitopatia desses dois grupos.

Tabela 16. Caracterização clínica dos subtipos da OG

	Subtipo miogênico (n = 51)	Subtipo não miogênico (n =50)	p
F:M	1,8:1	9:1	0,0038*
Exoftalmometria	22,89 ± 3,61	21,45 ± 4,27	0,08**
Neuropatia	10	0	0,0012*
Diplopia	22	0	<0,001*
Idade (anos)	45,94 ± 12,9	36,52 ± 11,6	0,0002**
Duração da orbitopatia (anos)	2,53 ± 4,27	3,74 ± 3,66	0,15**

*teste exato de Fisher bicaudal

**teste t

A OG ocorreu predominantemente em mulheres, com uma tendência à redução da relação feminino:masculino no subtipo miogênico. A exoftalmometria foi semelhante entre os grupos. Os sinais que indicam gravidade na OG, como

neuropatia óptica e diplopia, foram exclusivamente relacionados ao subtipo miogênico e a idade de início da OG foi significativamente mais avançada nesse subtipo. O tempo médio de duração da OG nos subtipos indica que os pacientes foram avaliados no período tardio da doença.

4.2. Segunda etapa. Tipificação dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 e dos microssatélites do TNF nos subtipos miogênico e não miogênico da OG

A tipificação dos alelos HLA-DRB1 (14 grupos de alelos) e HLA-DQB1 (5 grupos de alelos) e dos cinco microssatélites, TNFa (14 alelos), TNFb (7alelos), TNFc (2 alelos), TNFd (7 alelos) e TNFe (3 alelos) foi realizada através da utilização da técnica de eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida, respectivamente.

A freqüência dos alelos analisados foi comparada entre os seguintes grupos:

1. Doença de Graves (n=95) e controle (n=161)
2. Orbitopatia de Graves (n=51) e controle (n=161)
3. Subtipo miogênico (n=26) e controle (n=161)
4. Subtipo não miogênico (n=25) e controle (n=161)
5. Subtipo miogênico (n=26) e não miogênico (n=25)

4.2.1. Análise das freqüências alélicas dos HLADRB1 e DQB1

A representação gráfica das freqüências alélicas dos *loci* HLA analisados encontra-se nas Figuras 16 a 19. Nas Tabelas 18 a 21 encontram-se as freqüências de cada alelo, os valores dos riscos relativos, frações etiológicas e preventivas.

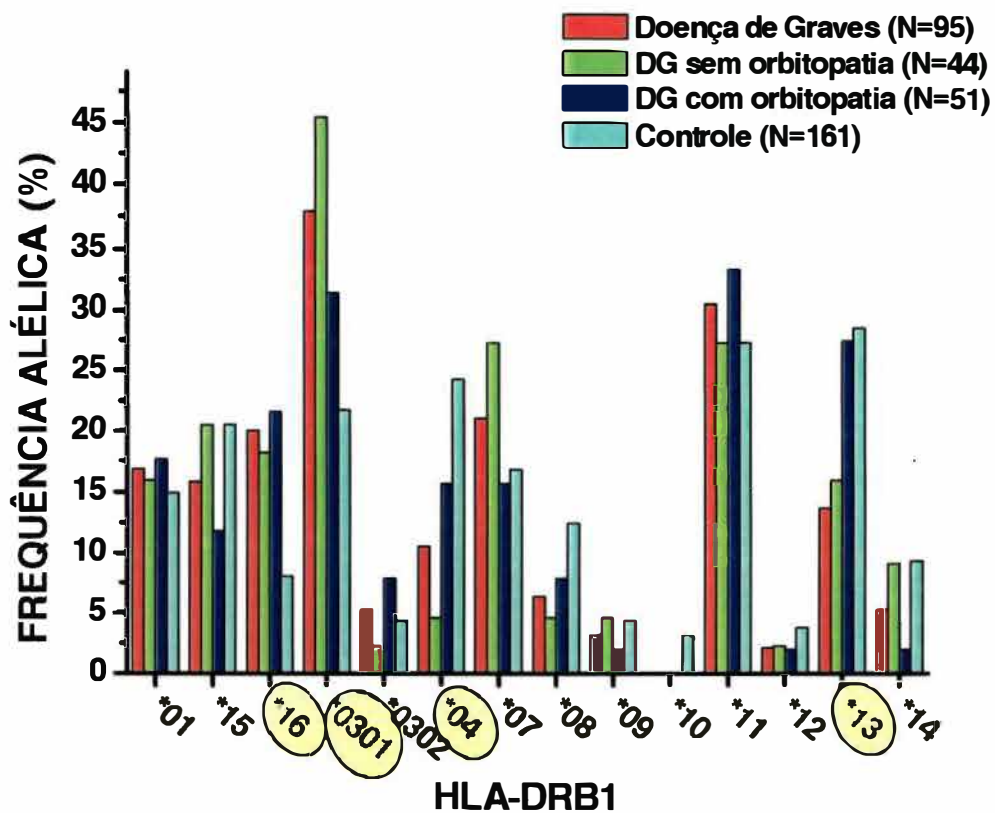


Figura 16. Distribuição das frequências alélicas para o loco HLA-DRB1 nos pacientes com DG, sem e com orbitopatia e grupo controle. As frequências dos alelos destacados apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$)

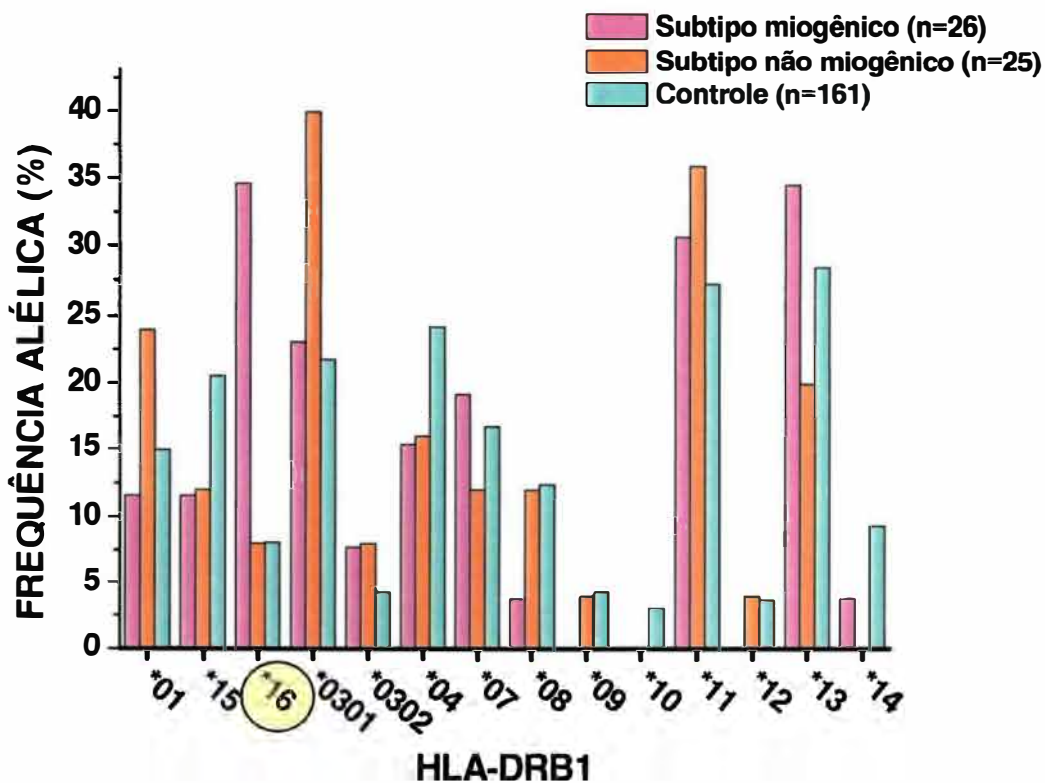


Figura 17. Distribuição das frequências alélicas para o loco HLA-DRB1 nos subtipos da OG e grupo controle. A frequência do alelo destacado apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$)

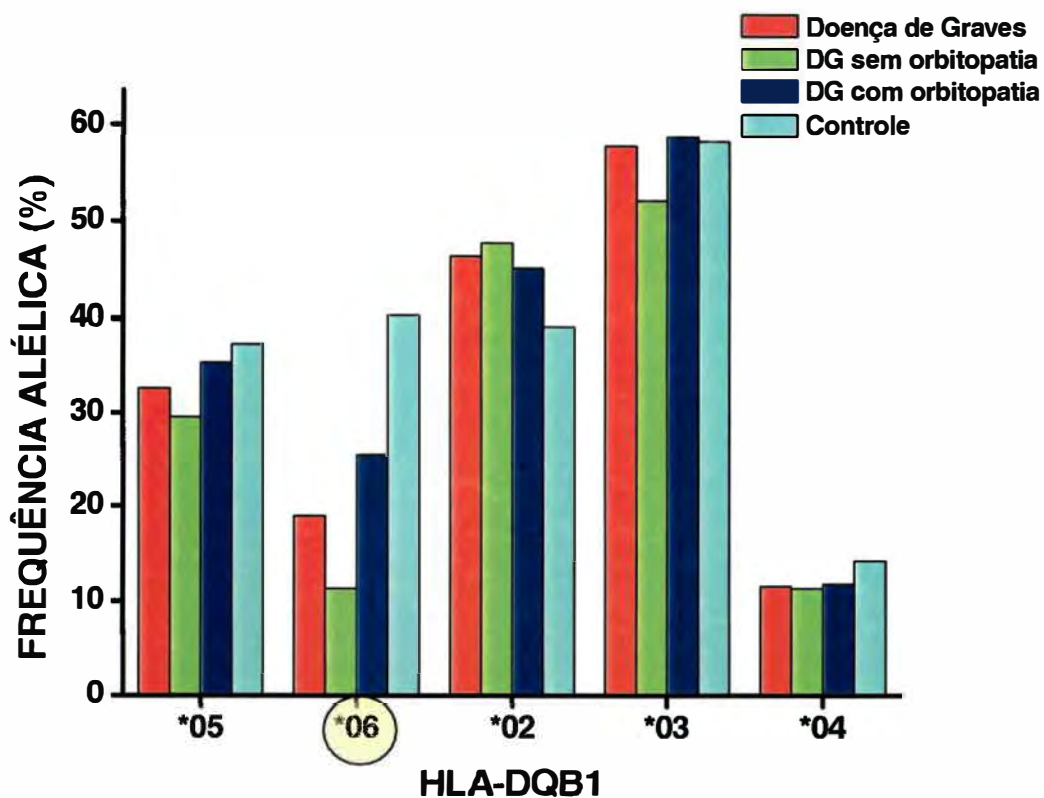


Figura 18. Distribuição das freqüências alélicas do loco HLA-DQB1 nos pacientes e controle. A freqüência do alelo destacado apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$)

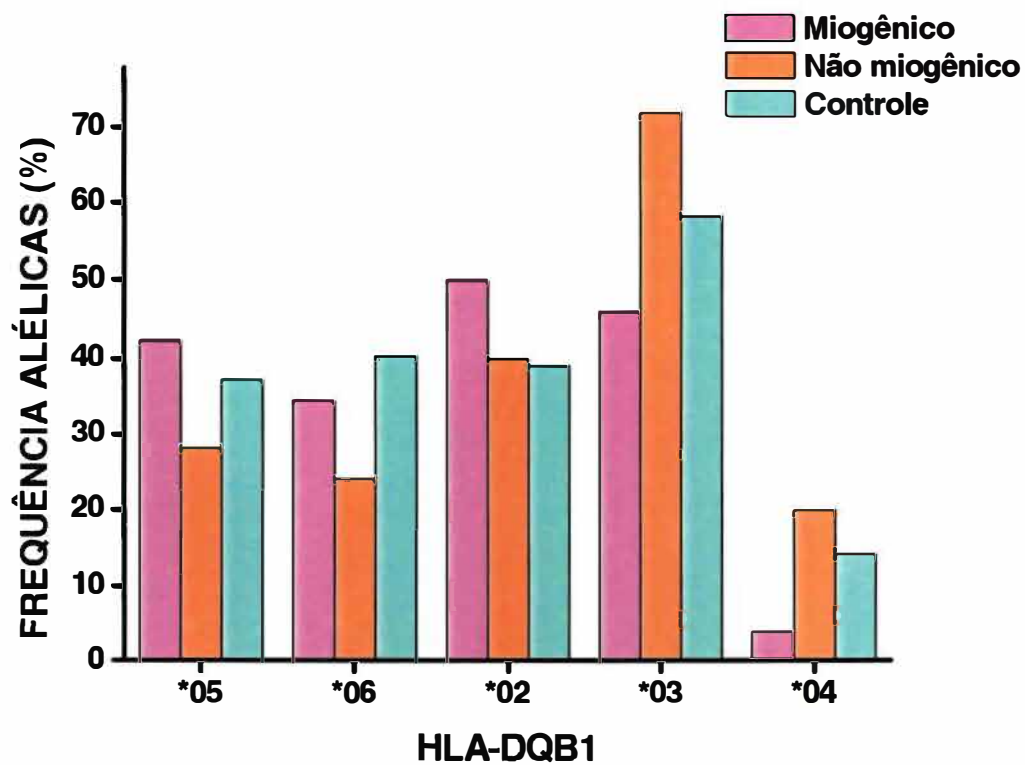


Figura 19. Distribuição das freqüências alélicas no loco HLA-DQB1 nos subtipos miogênico e não miogênico

Tabela 17. Frequência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com doença de Graves e controles

HLA	Pacientes N: 95 (%)	Controle N: 161 (%)	P	RR	IC 95%	FE	FP
DRB1							
*01	16 (16,84)	24 (14,91)	0,72				
*15	15 (15,79)	33 (20,5)	0,41				
*16	19 (20)	13 (8,07)	0,01	2,85	1,334-6,073	0,13	
*0301	36 (37,89)	35 (21,74)	0,006	2.2	1,256-3,841	0,20	
*0302	5 (5,26)	7 (4,35)	0,77				
*04	10 (10,53)	39 (24,22)	0,008	0,37	0,174-0,778		0,15
*07	20 (21,05)	27 (16,77)	0,23				
*08	6 (6,32)	20 (12,42)	0,14				
*09	3 (3,16)	7 (4,35)	0,75				
*10	0	5 (3,11)	0,16				
*11	29 (30,53)	44 (27,33)	0,67				
*12	2 (2,11)	6 (3,73)	0,71				
*13	13 (13,68)	46 (28,57)	0,006	0,3963	0,201-0,781		0,17
*14	5 (5,26)	15 (9,32)	0,34				
DQB1							
*05	31 (32,63)	60 (37,27)	0,5				
*06	18 (18,95)	65 (40,37)	0,0005**	0,3453	0,189-0,631		0,26
*02	44 (46,32)	63 (39,13)	0,29				
*03	55 (57,89)	94 (58,39)	1,0				
*04	11 (11,58)	23 (14,29)	0,57				

P: Probabilidade pelo teste exato de Fisher bicaudal; RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança; FE: fração etiológica; FP: fração preventiva

**pc (p corrigido):0,0025

Tabela 18. Frequência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com doença de Graves com orbitopatia e controle

HLA	Pacientes N: 51 (%)	Controle N: 161 (%)	P	RR	IC 95%	FE
DRB1						
*01	9 (17,65)	24 (14,91)	0,07			
*15	6 (11,76)	33 (20,5)	0,21			
*16	11 (21,57)	13 (8,07)	0,019	3,13	1,304-7,517	0,15
*0301	16 (31,37)	35 (21,74)	0,19			
*0302	4 (7,84)	7 (4,35)	0,3			
*04	8 (15,67)	39 (24,22)	0,25			
*07	8 (15,67)	27 (16,77)	1,00			
*08	4 (7,84)	20 (12,42)	0,46			
*09	1 (1,96)	7 (4,35)	0,68			
*10	0	5 (3,11)	0,34			
*11	17 (33,33)	44 (27,33)	0,48			
*12	1 (1,96)	6 (3,73)	1,00			
*13	14 (27,45)	46 (28,57)	1,00			
*14	1 (1,96)	15 (9,32)	0,13			
DQB1						
*05	18 (35,29)	60 (37,27)	0,87			
*06	13 (25,49)	65 (40,37)	0,07			
*02	23 (45,1)	63 (39,13)	0,51			
*03	30 (50,82)	94 (58,39)	1,0			
*04	6 (11,76)	23 (14,29)	0,81			

P: Probabilidade pelo teste exato de Fisher bicaudal; RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança; FE: fração etiológica

Tabela 19. Frequência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com OG subtipo miogênico e controle

HLA	Pacientes N: 26 (%)	Controle N: 161 (%)	P	RR	IC 95%	FE
DRB1						
*01	3 (11,54)	24 (14,91)	1,00			
*15	3 (11,54)	33 (20,5)	0,42			
*16	9 (34,62)	13 (8,07)	0,0007**	6,027	2,246-16,18	0,29
*0301	6 (23,08)	35 (21,74)	1,00			
*0302	2 (7,69)	7 (4,35)	0,36			
*04	4 (15,38)	39 (24,22)	0,45			
*07	5 (19,23)	27 (16,77)	0,78			
*08	1 (3,85)	20 (12,42)	0,32			
*09	0	7 (4,35)	0,6			
*10	0	5 (3,11)	1,00			
*11	8 (30,77)	44 (27,33)	0,81			
*12	0	6 (3,73)	1,00			
*13	9 (34,62)	46 (28,57)	0,64			
*14	1 (3,85)	15 (9,32)	0,70			
DQB1						
*05	11 (42,31)	60 (37,27)	0,66			
*06	9 (34,62)	65 (40,37)	0,67			
*02	13 (50)	63 (39,13)	0,39			
*03	12 (46,15)	94 (58,39)	0,29			
*04	1 (3,85)	23 (14,29)	0,21			

P: Probabilidade pelo teste exato de Fisher bicaudal; RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança; FE: fração etiológica

**pc: (P corrigido): 0,0098

Tabela 20. Frequência dos alelos HLA-DRB1 and DQB1 em pacientes brasileiros com OG subtipo não miogênico e controle

HLA	Pacientes N: 25 (%)	Controle N: 161 (%)	P
DRB1			
*01	6 (24)	24 (14,91)	0,25
*15	3 (12)	33 (20,5)	0,42
*16	2 (8)	13 (8,07)	1,00
*0301	10 (40)	35 (21,74)	0,08
*0302	2 (8)	7 (4,35)	0,35
*04	4 (16)	39 (24,22)	0,45
*07	3 (12)	27 (16,77)	0,77
*08	3 (12)	20 (12,42)	1,00
*09	1 (4)	7 (4,35)	1,00
*10	0	5 (3,11)	1,00
*11	9 (36)	44 (27,33)	0,47
*12	1 (4)	6 (3,73)	1,00
*13	5 (20)	46 (28,57)	0,47
*14	0	15 (9,32)	0,23
DQB1			
*05	7 (28)	60 (37,27)	0,50
*06	6 (24)	65 (40,37)	0,13
*02	10 (40)	63 (39,13)	1,00
*03	18 (72)	94 (58,39)	0,27
*04	5 (20)	23 (14,29)	0,55

P: Probabilidade pelo teste exato de Fisher bicaudal

Tabela 21. Frequência dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 em pacientes brasileiros com os subtipos miogênico e não miogênico da OG

HLA	Subtipo miogênico N = 26 (%)	Subtipo não miogênico N = 25 (%)	P	RR	IC 95%	FE
DRB1						
*01	3 (11,54)	6 (24)	0,29			
*15	3 (11,54)	3 (12)	1,00			
*16	9 (34,62)	2 (8)	0,039	6,09	1,162-31,89	0,29
*0301	6 (23,08)	10 (40)	0,24			
*0302	2 (7,69)	2 (8)	1,00			
*04	4 (15,38)	4 (16)	1,00			
*07	5 (19,23)	3 (12)	0,70			
*08	1 (3,85)	3 (12)	0,35			
*09	0	1 (4)	0,49			
*10	0	0	0			
*11	8 (30,77)	9 (36)	0,77			
*12	0	1 (4)	0,49			
*13	9 (34,62)	5 (20)	0,35			
*14	1 (3,85)	0	1,00			
DQB1						
*05	11 (42,31)	7 (28)	0,38			
*06	9 (34,62)	6 (24)	0,54			
*02	13 (50)	10 (40)	0,58			
*03	12 (46,15)	18 (72)	0,09			
*04	1 (3,85)	5 (20)	0,1			

P: Probabilidade pelo teste exato de Fisher bicaudal; RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança; FE: fração etiológica

Os alelos HLA-DRB1*16 (RR de 2,85) e *301 (RR de 2,2) foram associados com a suscetibilidade à DG, conferindo FE de 0,13 e 0,2, respectivamente, enquanto os alelos DRB1*04 (RR de 0,37), *13 (RR de 0,39) e HLADQB1*06 (RR de 0,35) estiveram associados com a proteção à DG, apresentando as FP de 0,15, 0,17 e 0,26, respectivamente (Tabela 17).

Ao analisar o grupo de pacientes com OG, nota-se que apenas o HLA-DRB1*16 apresentou associação significativa com a orbitopatia, demonstrada pelo RR de 3,13 e FE de 0,15 (Tabela 18). Quando esses pacientes foram estratificados de acordo com o subtipo, observou-se a manutenção da forte associação com o HLA-DRB1*16 no subtipo miogênico ($p=0,0007$), conferindo o RR de 6,027 e FE de 0,29 em relação ao grupo controle (Tabela 19). A associação desse alelo também foi mantida quando os subtipos foram comparados (Tabela 21). Nenhum alelo HLA estudado esteve associado ao subtipo não miogênico da OG (Tabela 20).

4.2.2. Análise das freqüências alélicas dos microssatélites do TNF

Nas figuras 20 a 29 são apresentadas as freqüências alélicas de cada microssatélite do TNF nas populações estudadas. Os alelos que apresentaram freqüências significantes nas populações estudadas foram listados na Tabela 22 .

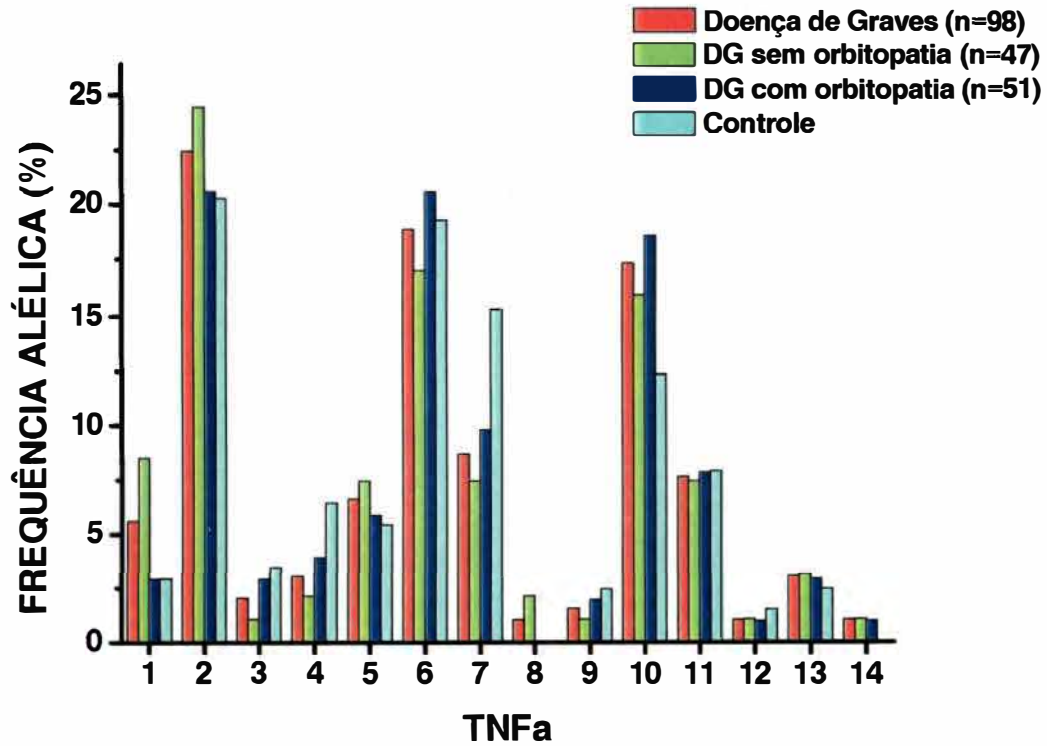


Figura 20. Distribuição das frequências alélicas do loco TNFa dos pacientes e grupo controle

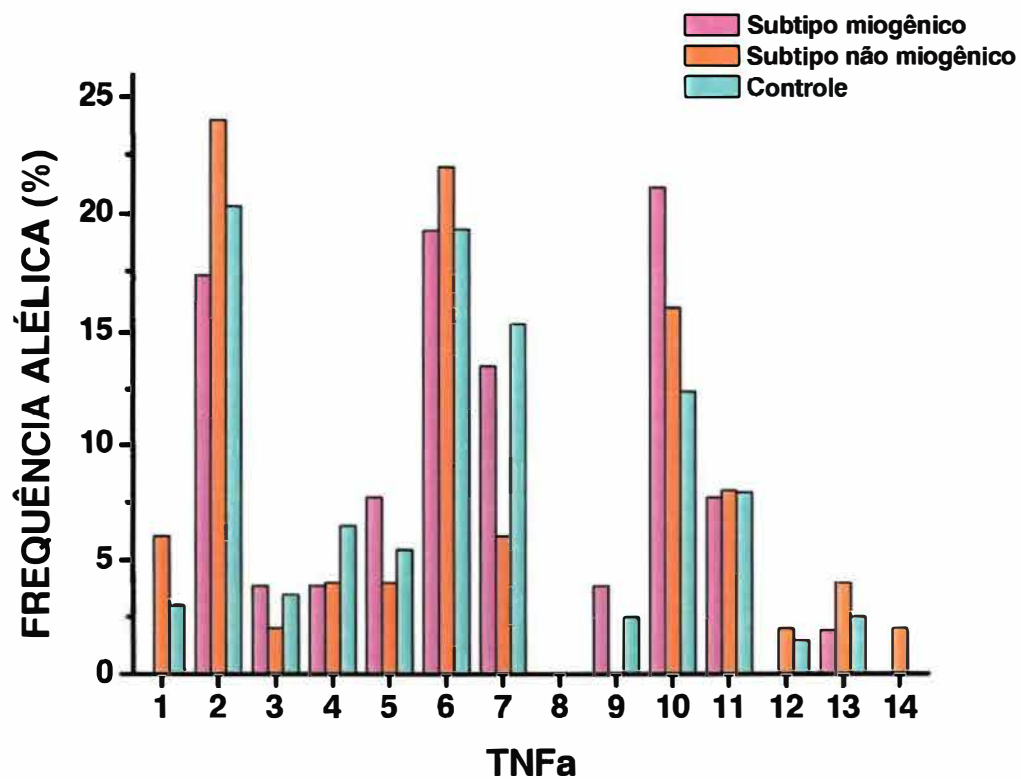


Figura 21. Distribuição das frequências alélicas do loco TNFa os subtipos da OG

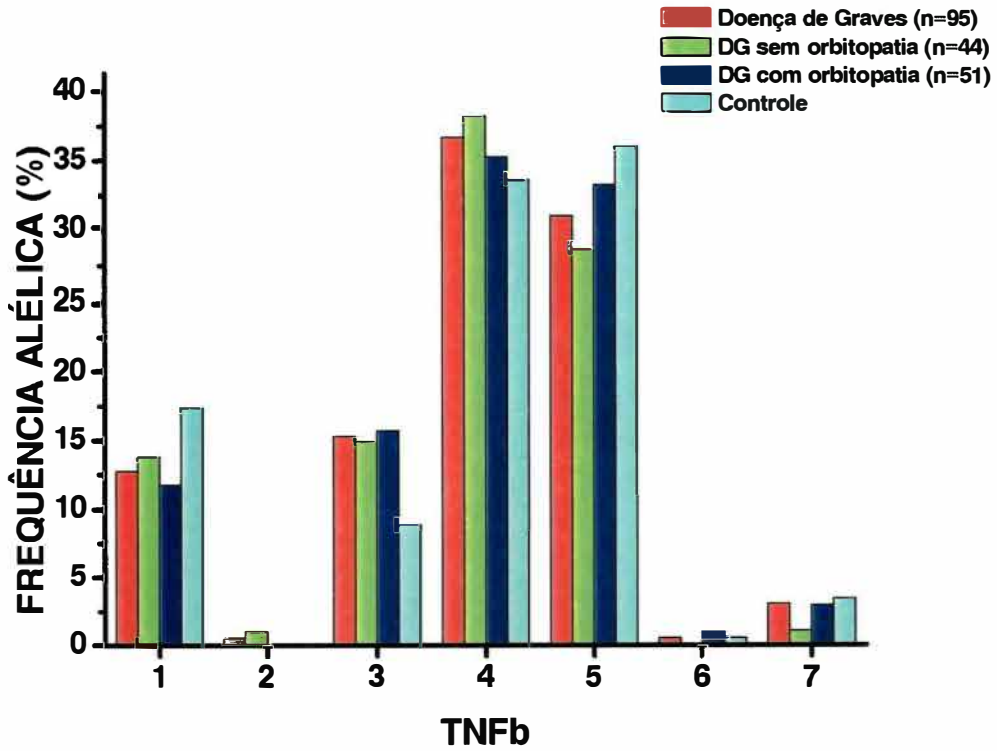


Figura 22. Distribuição das frequências alélicas do loco TNFb dos pacientes e do grupo controle.

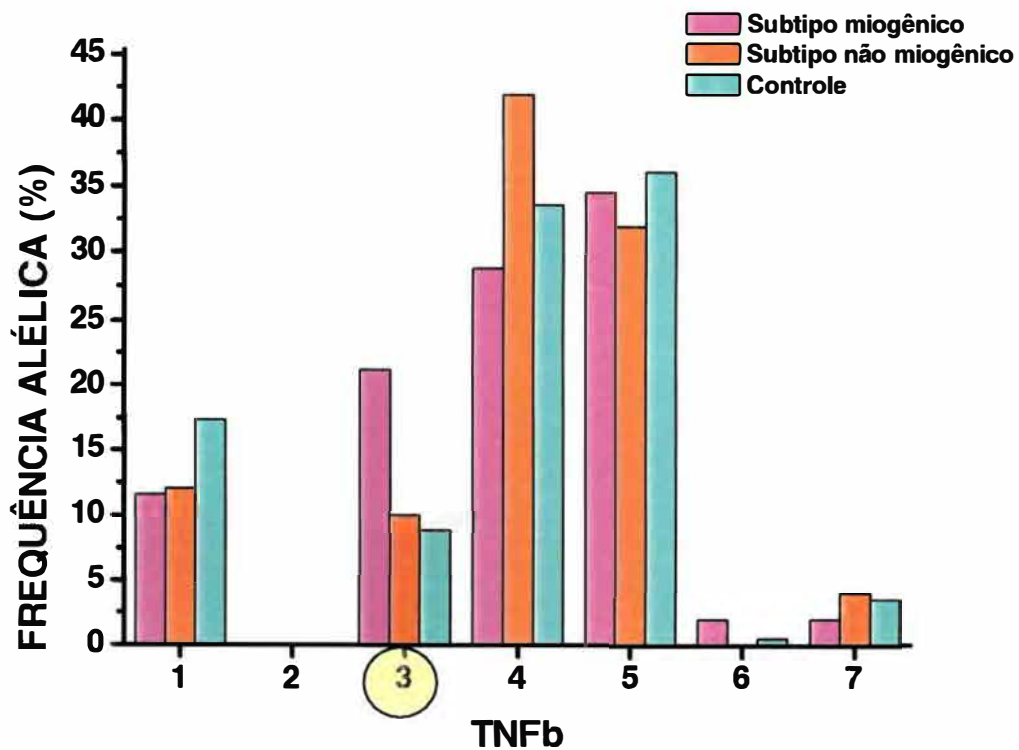


Figura 23. Distribuição das frequências alélicas do loco TNFb dos subtipos da OG

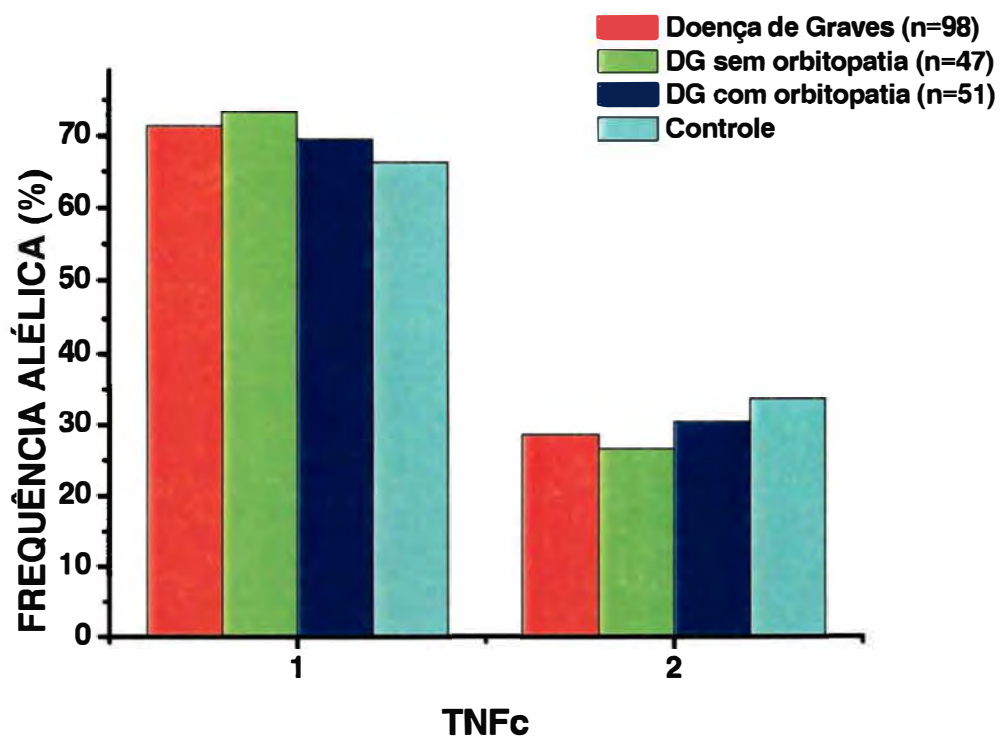


Figura 24. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFc dos pacientes e do grupo controle

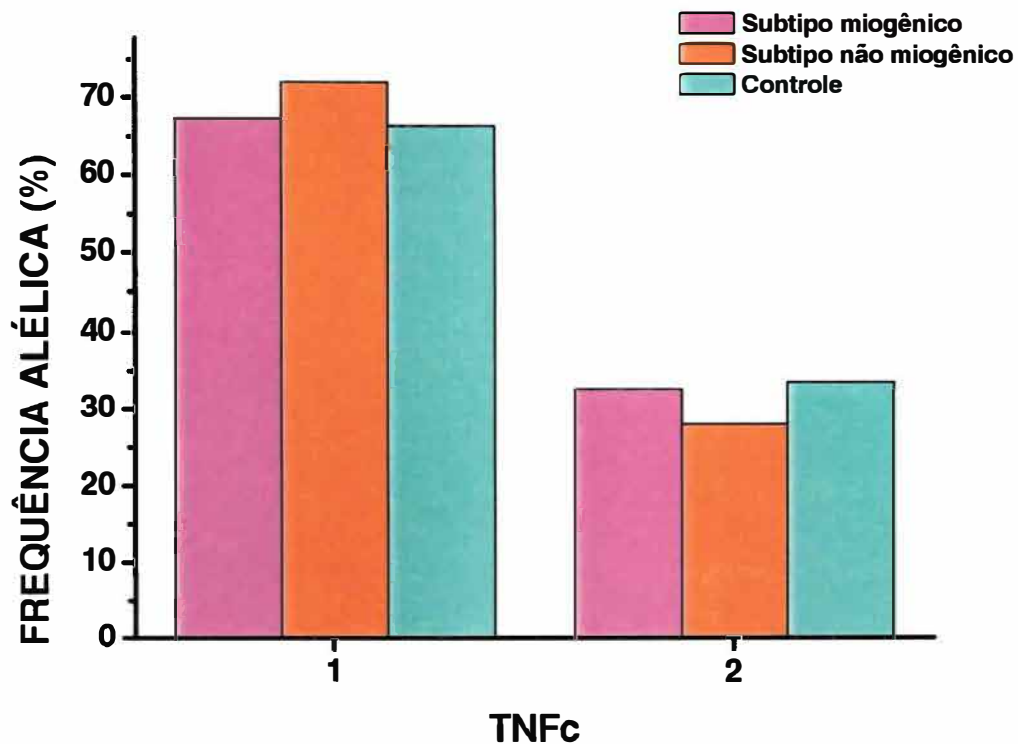


Figura 25. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNF α dos subtipos da OG

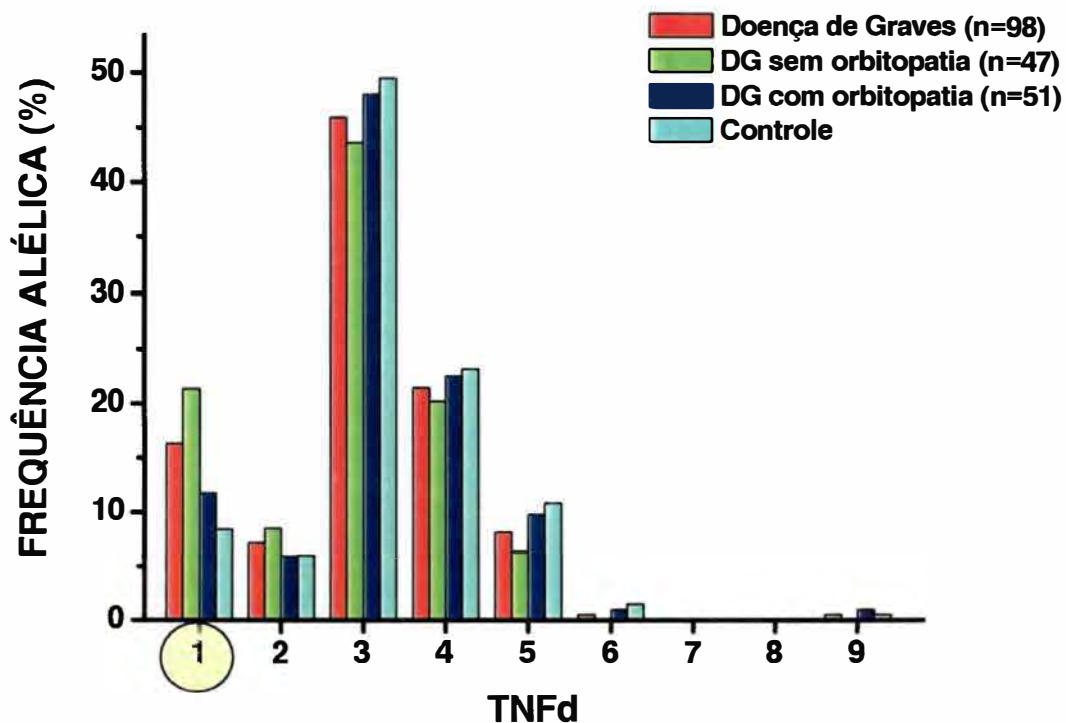


Figura 26. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFd dos pacientes e do grupo controle. A freqüência alélica do alelo destacado apresentou diferença significativa em relação ao controle

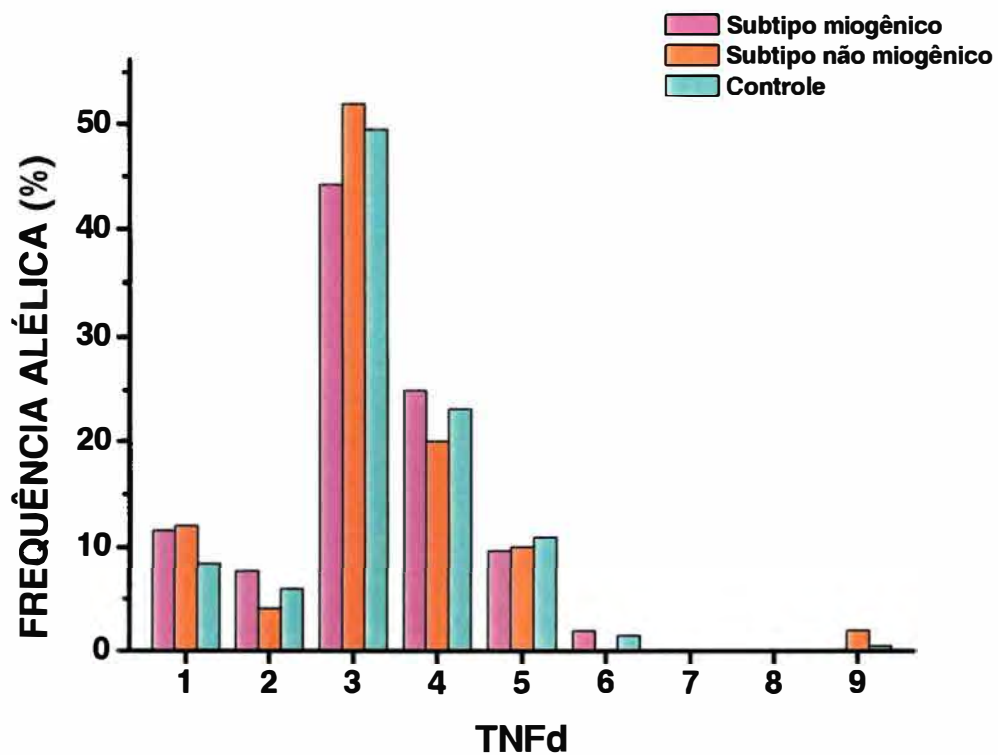


Figura 27. Distribuição das frequências alélicas do loco TNFd dos subtipos da OG

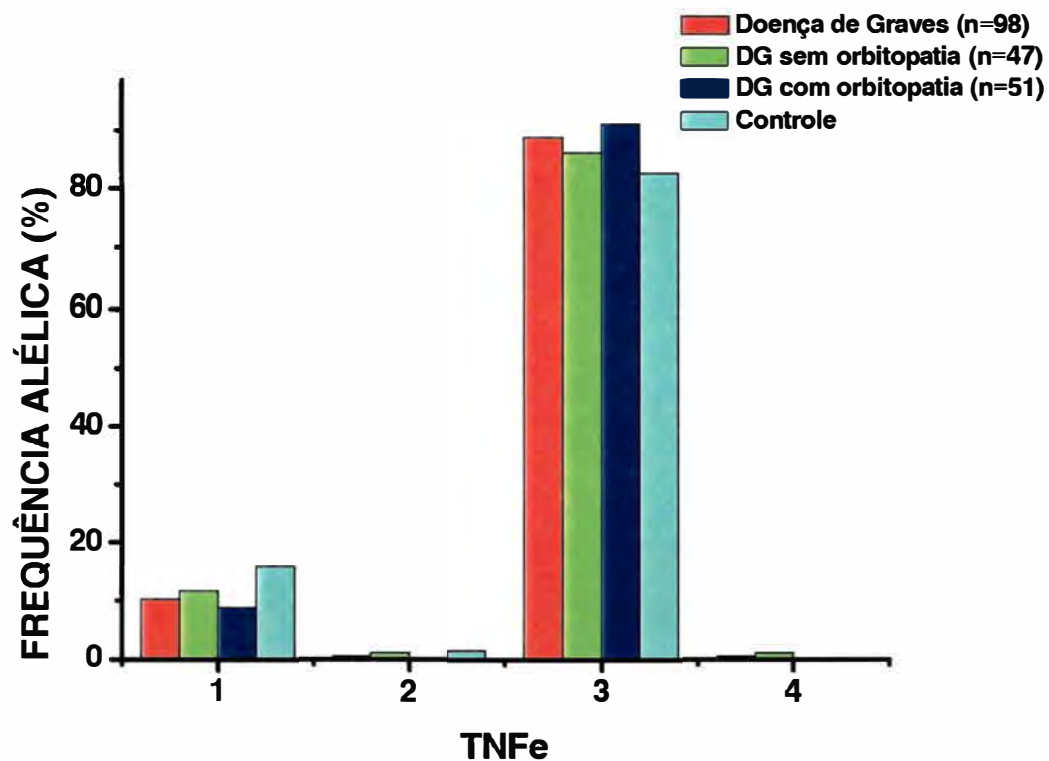


Figura 28. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFe dos pacientes e do grupo controle

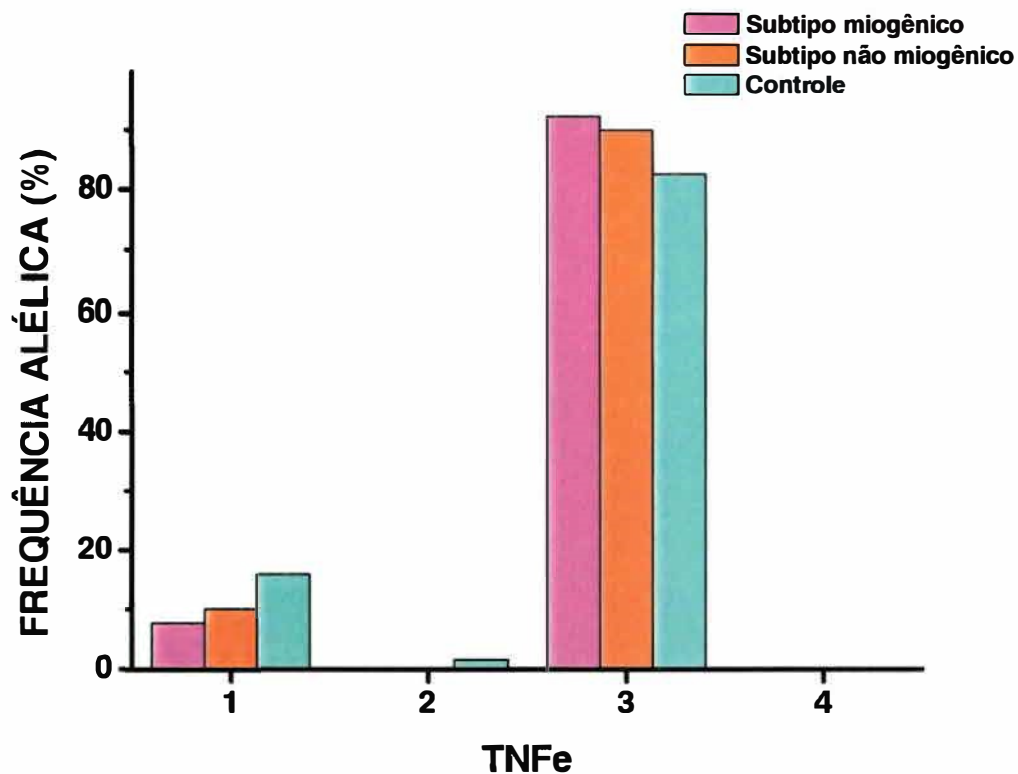


Figura 29. Distribuição das freqüências alélicas do loco TNFe dos subtipos da OG

As freqüências alélicas dos microssatélites foram comparadas pelo teste de Fisher de modo semelhante à análise realizada para os loci HLA. A DG esteve associada ao alelo d1 ($p=0,021$), conferindo o risco relativo de 2,12 (95% IC 1,137-3,966) e FE de 0,13. Não houve diferença significativa entre as freqüências alélicas nos pacientes com OG e controle. No entanto, o subtipo miogênico apresentou associação com o alelo b3 ($p=0,025$), conferindo o RR de 2,743 (95% IC 1,204-6,246) e FE de 0,09 (Tabela 22).

Tabela 22. Freqüência alélica dos marcadores microssatélites associados à Doença de Graves e ao subtipo miogênico

Alelo	Pacientes com DG (n=196)	fg [†]	Subtipo miogênico (n=52)	fg [†]	Controles (n=202)	fg [†]	P	RR	FE
B3			N=11	21,15	N=18	8,91	0,025	2,743	0,13
D1	N=32	16,33			N=17	8,42	0,021	2,12	0,09

[†] A freqüência gênica (fg) foi calculada, dividindo-se N (número observado de alelos do microssatélite) pelo número total de alelos possíveis em cada grupo.

DISCUSSÃO

No estudo da OG há questões controversas, que vão desde a nomenclatura ideal até a melhor opção terapêutica. A inexistência de um modelo fisiopatogênico adequado impede o esclarecimento de pontos fundamentais para a compreensão da doença. Várias denominações são utilizadas para definir os achados oftalmológicos relacionados à doença de Graves, como oftalmopatia tireoidiana, oftalmopatia distireoidea, oftalmopatia relacionada à tireóide. Essas denominações sugerem uma relação de dependência entre a condição orbitária e a doença tireoidiana, fato que não tem suporte fisiopatogênico. Apesar da freqüente associação com hipertireoidismo, aproximadamente 5% dos pacientes são eutireoideos e 5% tem hipotireoidismo primário (WEETMAN 1992). O curso clínico da OG independe do tratamento da doença tireoidiana e requer uma abordagem específica. Orbitopatia ou oftalmopatia de Graves é o termo preferido por diferentes autores (SERGOTT & GLASER 1981; BARTLEY & GORMAN 1995) porque a doença afeta primariamente os tecidos orbitários. Adicionalmente, o uso do epônimo não faz referências diretas à participação da tireóide.

Os sistemas atuais de classificação da OG refletem o crescente avanço na compreensão da doença, porém ainda não há um sistema completamente aceito ou satisfatório. A primeira classificação proposta por Werner e aprovada pela ATA (American Thyroid Association) em 1969 (WERNER 1969) e suas posteriores modificações (WERNER 1977; VAN DYK 1981) têm aplicação bastante limitada quanto à categorização e prognóstico (GORMAN 1998). A classificação de Werner sugere índices gradativos de gravidade clínica. Porém, Sergott e cols (SERGOTT, FELBERG *et al.*, 1979) notaram que pacientes podem pertencer à mesma classe de Werner e ter características clínicas e imunológicas diferentes.

Não há exames laboratoriais para o diagnóstico da OG, o qual é, eminentemente, baseado em critérios clínicos. Em pacientes com exoftalmo, retração palpebral bilateral, aumento da MEO, principalmente dos músculos retos mediais e inferiores, e hipertireoidismo auto-imune, o diagnóstico da OG não é difícil. Mas, devido à variabilidade da apresentação clínica, inclusive sem a associação constante da tireoidopatia e a existência de pacientes com proptose sem aumento muscular, o diagnóstico pode ser menos evidente. Nesse sentido, critérios diagnósticos foram propostos, baseados em uma cuidadosa meta-análise das observações clínicas (BARTLEY & GORMAN 1995). Esses critérios são bastante úteis, pois permitem incluir os portadores da OG em suas diferentes formas de apresentação.

Clinicamente, a OG pode ser dividida em 2 subtipos: 1) miogênicos, cuja principal característica é o aumento dos músculos extraoculares, podendo apresentar diplopia ou distúrbios da função visual, e 2) não miogênicos, com músculos extraoculares normais ou pouco aumentados, que desenvolvem exoftalmia por expansão do volume da gordura orbitária (por isso, também são denominados lipogênicos). (TROKEL & JAKOBIEC 1981; HIROMATSU, YANG *et al.*, 2000; SMITH, KOUMAS *et al.*, 2002) As freqüências de cada tipo de apresentação variam de acordo com o critério utilizado para selecionar os pacientes, porém há um consenso sobre a menor prevalência da forma lipogênica pura (FORBES, GORMAN *et al.*, 1986; GAAG, SCHIMDT *et al.*, 1996).

No presente estudo, a metodologia empregada para definir subtipos da OG mostrou que, entre os 101 pacientes selecionados de acordo com os critérios de Bartley, 76 (75,25%) apresentaram aumento tecidual orbitário em relação ao controle, permitindo estratificá-los de acordo com o tecido aumentado em

miogênicos (somente aumento muscular) 29 (38,16%) pacientes; lipogênicos (somente aumento da gordura) 25 (35,89%) e mistos (aumento muscular e adiposo) 22 (28,95%). Esses índices são semelhantes aos encontrados em outros estudos (GAAG, SCHIMDT *et al.*, 1996).

Ao serem comparadas as médias das áreas entre os subtipos e o controle, observou-se que houve aumento da gordura em todos os subtipos, inclusive nos miogênicos e nos inicialmente classificados como sem aumento tecidual. Por outro lado, a análise das áreas musculares confirmou o aumento significativo do tecido muscular somente nos subtipos miogênico e misto. Assim, do ponto de vista morfológico, houve apenas dois subtipos de OG que se diferenciaram pela presença do envolvimento da MEO: subtipo miogênico e não miogênico.

O subtipo não miogênico ocorreu preferencialmente em mulheres jovens e não cursou com diplopia ou neuropatia óptica. Pacientes com esse subtipo de OG podem ter grandes proptoses e sub-luxações espontâneas do globo ocular (RUBIN, WATKINS *et al.*, 1998).

No subtipo miogênico, o acometimento em relação ao sexo foi menos pronunciado, apesar da manutenção da predisposição pelo sexo feminino. A idade do aparecimento desse subtipo foi mais tardia, em média na 5ª década de vida, e as manifestações clínicas sugestivas de gravidade da OG, como neuropatia óptica e diplopia, foram associadas a esse subtipo. A variabilidade da apresentação clínica em relação ao sexo e faixa etária já foi analisada por outros autores, (KENDLER, LIPPA *et al.*, 1993) com resultados semelhantes aos observados no presente estudo.

A nítida dicotomia clínica entre os pacientes com OG foi observada por Nunery, que sugeriu mecanismos histopatológicos distintos para cada subtipo

(NUNERY 1991). Para esse autor, o subtipo 1 (correspondente ao subtipo sem aumento muscular), estava relacionado à estimulação dos fibroblastos que passariam a produzir grandes quantidades de colágeno e glicosaminoglicanos, gerando o edema intersticial. O subtipo 2 era caracterizado por miosite, causada pela agressão imunológica aos músculos extra-oculares em resposta a antígenos musculares. A base histopatológica dos subtipos proposta por Nunery é puramente especulativa, porém sua caracterização clínica é bastante adequada e tem sido observada em outros estudos (ANDERSON, TWEETEN *et al.*, 1989; NUNERY, NUNERY *et al.*, 1997; RUBIN, WATKINS *et al.*, 1998).

Os fibroblastos orbitários têm sido apontados como as principais células efectoras na OG, devido a sua capacidade de resposta à ação de algumas citocinas, produzindo mediadores inflamatórios quando estimulados. Além disso, esses fibroblastos expressam proteínas que os distinguem dos fibroblastos extra-orbitários (BAHN 2003). Uma vez ativados por citocinas, eles passam a produzir níveis elevados de hialuronato (glicosaminoglicano não sulfatado) que tem alta afinidade pela água, causando o edema tecidual na OG.

Recentemente, foi demonstrado que os fibroblastos dos tecidos muscular e adiposo orbitários e apresentavam diferenças fenotípicas e funcionais entre si. (KOUMAS, SMITH *et al.*, 2002; SMITH, KOUMAS *et al.*, 2002) No perimísio, os fibroblastos expressam uniformemente uma molécula de superfície denominada Thy-1 (Thy-1⁺). Por outro lado, no tecido adiposo encontra-se uma população mista de fibroblastos, em relação à presença dessa molécula (Thy-1⁺ e Thy-1⁻). Todos os fibroblastos apresentaram uma outra molécula de superfície celular conhecida como receptor ativado do proliferador de peroxissoma (PPAR γ), que tem participação fundamental na diferenciação dos fibroblastos pré-adipócitos em adipócitos, porém

somente os fibroblastos Thy-1⁻ exibiram essa capacidade, quando tratados com agonistas do PPAR γ (SMITH, KOUMAS *et al.*, 2002). Fibroblastos Thy-1⁺ produzem quantidades duas vezes maiores de prostaglandinas E2 quando tratados com interleucina 1 β . Essa prostaglandina associa-se à indução da resposta linfocitária Th2, que está associada à produção de fibrose tecidual (PHIPPS, STEIN *et al.*, 1991). A fibrose pode ocorrer nos grandes aumentos musculares da OG (HUFNAGEL, HICKEY *et al.*, 1984). Por outro lado, os fibroblastos Thy-1⁻, quando tratados com interferon gama, expressam moléculas HLA-DR na superfície celular. Esse fenômeno pode indicar uma participação ativa dessas células na apresentação de antígenos aos linfócitos T, atraindo células imunes para a órbita (KOUMAS, SMITH *et al.*, 2002).

A neo-adipogênese orbitária, ou seja, a diferenciação de fibroblastos em adipócitos maduros, foi demonstrada por Sorisky e cols (SORISKY, PARDASANI *et al.*, 1996). Esse fenômeno pode ser modulado pela interação entre citocinas, produzindo grandes proptoses.

Baseados nas evidências descritas e nos resultados obtidos com a classificação em subtipos foram pesquisados possíveis marcadores genéticos envolvidos na fisiopatogênese desses subtipos. Nesse sentido, foram selecionados alelos HLA de classe II DR e DQ e microssatélites do TNF, devido as suas associações descritas com a DG e outras doenças auto-imunes (FIELD 2001; MARGA, DENISOVA *et al.*, 2001), incluindo a OG (HIROMATSU, YANG *et al.*, 2000).

Em relação aos alelos HLA, foi encontrada uma significativa associação do HLA-DRB1*16 com a suscetibilidade à OG em relação aos controles (RR:3,13). No entanto, após corrigir o valor de p pelo número de alelos testados essa associação

só se mantém para o subtipo miogênico (RR: 6,027, FE:0,29). Nesse subtipo, encontram-se os casos mais severos da OG. Ohtsuka (OHTSUKA & NAKAMURA 1998) observou que a predisposição as formas graves da OG em pacientes japoneses, excluindo pacientes que não apresentavam aumento muscular, esteve associada aos antígenos HLA-DR14 e DQ1 (DQ5 e DQ6). Bednarczuk e cols (BEDNARCZUK, HIROMATSU *et al.*, 2004) mostraram associação da OG, em poloneses, com o HLA-DRB1*03, em presença do TNF G-238 (alelo da região promotora do TNF). Esses autores consideram, em seu estudo, todos os pacientes com OG pertencentes às classes III (proptose), IV (envolvimento muscular), V (alterações corneanas) e VI (neuropatia óptica) da classificação de Werner. As diferenças encontradas nesses estudos podem ser consequência da arbitrariedade na categorização das amostras ou dos diferentes substratos genéticos de cada grupo.

O HLA DRB1*16 está associado aos processos cicatriciais patológicos, presentes nos casos graves de tracoma (WHITE, BOGH *et al.*, 1997) e em indivíduos que desenvolvem cicatrizes hipertróficas consequentes a queimaduras (CASTAGNOLI, PERUCCIO *et al.*, 1990). A fibrose muscular pode ocorrer na OG, em fases tardias da doença, quando os músculos mantêm a capacidade de contração, porém são incapazes de relaxar (TROKEL & JAKOBIEC 1981). Embora estudos adicionais sejam necessários para confirmar a influência do HLA-DRB1*16 na predisposição dos subtipos da OG, a presença aumentada desse alelo pode indicar um mecanismo fisiopatogênico distinto para o subtipo com aumento muscular.

A associação do alelo HLA-DRB1*0301 com a suscetibilidade e HLA-DQB1*06 com a proteção à doença de Graves. já foi registrada em nossa população

(MACIEL, RODRIGUES *et al.*, 2001). O presente estudo confirma esses dados, porém, a associação como HLA-DRB1*0301 foi menos pronunciada, o que pode ser conseqüente ao maior contingente de pacientes com OG miogênica. O grupo de alelos HLA-DRB1*04 e DRB1*13 apresentaram associação com a proteção à DG. No entanto, essas associações não se mantêm após a correção do valor de p pelo número de especificidades testadas. Assim, é possível que não haja uma associação verdadeira, fato que pode ser comprovado em estudos adicionais.

No presente estudo, a DG e o subtipo miogênico da OG também estiveram associados aos microssatélites do TNF. A freqüência do microssatélite TNFd1 foi significativamente mais elevada no grupo de pacientes com doença de Graves (incluindo os indivíduos com e sem orbitopatia) em relação aos controles ($p=0,021$, $RR=3,12$, $FE=0,09$). Esses resultados indicam que, em termos populacionais, que esse alelo contribui em 9% para a suscetibilidade à doença. Nenhum outro microssatélite do TNF foi associado à DG neste estudo. Um outro estudo, acerca da tipificação do microssatélite TNFa na doença de Graves, não demonstrou associação relacionada a esse alelo (MAALEJ, KACEM *et al.*, 2000). No entanto, outros polimorfismos da região TNF já foram associados a suscetibilidade à DG em pacientes poloneses (KULA, JURECKA-TULEJA *et al.*, 2001).

Associações da região promotora do gene TNF também foram relacionadas à predisposição ao desenvolvimento da OG (KAMIZONO, HIROMATSU *et al.*, 2000; BEDNARCZUK, HIROMATSU *et al.*, 2004). Na população japonesa foram observadas freqüências significativamente elevadas dos alelos TNF-1031C e -863A em pacientes com OG (classes III a VI de Werner) em relação ao controle e a força das associações aumentavam com a gravidade da oftalmopatia. (KAMIZONO, HIROMATSU *et al.*, 2000)

No presente estudo, não houve associação dos microssatélites do TNF com o grupo de pacientes com orbitopatia. No entanto, ao analisar os subtipos da OG, observou-se elevada frequência alélica do TNFb3 nos pacientes com o subtipo miogênico (11/ 52 – 21,15%) em relação ao controle (18/202 - 8,91%) ($p=0,025$), conferindo um RR de 2,74 e FE de 13%. Não há outros estudos sobre a influência dos polimorfismos dos microssatélites do TNF na OG. O alelo TNFb3 compõe haplótipos com outros microssatélites e com alelos HLA, associados à produção aumentada do TNF α em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (HAJEER, WORTHINGTON *et al.*, 1997).

O TNF α é uma importante citocina envolvida em processos inflamatórios. Uma das suas funções é influenciar a expressão de auto-antígeno tireoidiano (TSHR) e de proteínas imunomoduladoras (HLA DR, ICAM-1, HSP 72) nos fibroblastos orbitários (BAHN 2003). Níveis elevados do TNF α estão presentes nos tecidos orbitários de pacientes com OG e o aumento da MEO correlaciona-se fortemente com a expressão do RNAm do TNF nesse tecido (HIROMATSU, YANG *et al.*, 2000). Como a produção do TNF α está sob controle genético, é razoável inferir que os genes que regulam a produção do TNF podem estar associados ao desenvolvimento da OG. No entanto, é difícil tecer considerações abrangentes sobre os polimorfismos do TNF e a produção da citocina ou uma doença específica. Os genes TNF estão em uma região altamente polimórfica e, além disso, eles estão em desequilíbrio de ligação entre si e com os genes HLA. Portanto não se pode afirmar, baseado nos resultados apresentados, que os alelos HLA-DRB1*16 e TNFb3 tenham papel fisiopatogênico direto no desenvolvimento da OG. No entanto, podem ser considerados marcadores genéticos para o subtipo miogênico da OG.

A fisiopatogenia da OG ainda é desconhecida. Não há um consenso sobre o tipo de resposta imune que atua nos tecidos orbitários (DE CARLI, D'ELIOS *et al.*, 1993; MCLACHLAN, PRUMMEL *et al.*, 1994). Em geral, estudos que relacionam o perfil de citocinas na OG são realizados a partir de amostras teciduais provenientes de pacientes submetidos à descompressão orbitária por orbitopatia grave. Esse critério pode incluir pacientes de ambos os subtipos da OG.

A caracterização imunogenética dos subtipos clínicos da OG reforça a necessidade de estudar os mecanismos fisiopatogênicos da OG separadamente.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir:

1. Houve dois subtipos da OG, que se diferenciaram pelo aumento da musculatura extraocular, ao exame tomográfico orbitário, e pelas características clínicas apresentadas.

2. O subtipo não miogênico foi caracterizado pelo aumento exclusivo do tecido adiposo orbitário. Esses pacientes não desenvolveram aumento muscular e, portanto, não apresentaram diplopia e/ou neuropatia óptica. Afetou, proporcionalmente, mais mulheres, com relação feminino:masculino de 9:1. Os pacientes iniciaram a doença mais precocemente, na 4ª década de vida.

3. O subtipo miogênico foi caracterizado, fundamentalmente, pelo aumento da musculatura extra-ocular, embora a gordura também estivesse aumentada, porém, em graus variáveis. Nesse subtipo concentraram-se as formas mais severas da OG, identificadas pelo estrabismo restritivo e neuropatia óptica. A proporção de homens afetados foi maior do que no subtipo não miogênico, causando uma relação feminino:masculino de 1,8:1. A doença iniciou-se em idade mais avançada, em torno da 5ª década.

3. Os grupos de alelos HLA DRB1 e DQB1 e os polimorfismos dos microsatélites do TNF são considerados marcadores genéticos, associados à suscetibilidade ou proteção a diversas doenças auto-imunes. Essa associação pode estar relacionada a cada alelo, separadamente, ou em conjunto, pela possibilidade de constituir haplótipos. No presente estudo, esses marcadores, representados pelo HLA DR16 e pelo TNF b3, estiveram associados à predisposição ao subtipo miogênico da OG. Esse fato indica que podem existir mecanismos fisiopatogênicos distintos para o subtipo miogênico da OG, sendo necessária à categorização prévia desses pacientes ao se estudar os diversos aspectos da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, TWEETEN *et al.*, (1989). "Dysthyroid optic neuropathy without extraocular muscle involvement." Ophthalmic Surgery **20**: 568-574.
- ANISEWSKI, VALYASEVI *et al.*, (2000). "Relationship between disease duration and predominant orbital T cell subset in Graves' ophthalmopathy." J Clin Endocrinol Metab **85**: 776-780.
- BAHN (2002). "Thyrotropin receptor expression in orbital adipose/connective tissues from patients with thyroid-associated ophthalmopathy." Thyroid **12**: 193-195.
- BAHN (2003). "Pathophysiology of Graves' ophthalmopathy: the cycle of disease." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **88**: 1939-1946.
- BAHN, DUTTON *et al.*, (1998). "Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **83**: 998-1002.
- BARTLEY, FATOURECHI *et al.*, (1996). "The Chronology of Graves' Ophthalmopathy in an Incidence Cohort." American Journal of Ophthalmology **121**: 426-434.
- BARTLEY & GORMAN (1995). "Diagnostic criteria for graves' ophthalmopathy." American Journal of Ophthalmology **119**: 792-795.
- BEDNARCZUK, HIROMATSU *et al.*, (2004). "Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy." Human Immunology **65**: 632-639.
- BENNETT (2000). "Demystified...microsatellites." Mol Pathol **53**: 177-183.
- BRIX, KYVIK *et al.*, (1998). "What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review." Thyroid **8**: 727-734.
- BURCH & WARTOFSKY (1993). "Graves' Ophthalmopathy: Current Concepts Regarding Pathogenesis and Management." Endocrine Reviews **14**: 747-793.
- CAMPBELL (1989). "Immunology of Graves' ophthalmopathy: retrobulbar histology and histochemistry." Acta Endocrinol. Copenh. **121**: 9-16.
- CASTAGNOLI, PERUCCIO *et al.*, (1990). "The HLA-DR beta 16 allotype constitutes a risk factor for hypertrophic scleritis." Human Immunology **29**: 229-232.
- CRISP, STARKEY *et al.*, (2000). "Adipogenesis in thyroid eye disease." Investigative Ophthalmology and Visual Science **41**: 3249-3255.
- CRUZ (1997). Retrações palpebrais. Blefaroptoses e retrações palpebrais. MÉDICA. Rio de Janeiro, RJ. **1**: 102-125.
- CUDDIHY & BAHN (1996). "Lack of an independent association between the human leukocyte antigen allele DQA1*0501 and Graves' disease." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **81**: 847-849.

- DE CARLI, D'ELIOS *et al.*, (1993). "Cytolytic T cells with Th1-like cytokine profile predominate in retroorbital lymphocytic infiltrates of Graves' ophthalmopathy." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **77**: 1120-1124.
- DERKX, BRUIN *et al.*, (1995). "Familial differences in endotoxin-induced TNF release in whole blood mononuclear cells *in vitro*: relationship to TNF gene polymorphism." J Endotoxin Res **2**: 19-25.
- ELLEGREN (2004). "Microsatellites: simple sequences with complex evolution." Nature **5**: 435-445.
- FELDON (1990). "Graves' ophthalmopathy. Is it really thyroid disease?" Arch Intern Med **150**: 948-950.
- FIELD (2001). "Tumor necrosis factor polymorphisms in rheumatic diseases." Q. J. Med. **94**: 237-246.
- FORBES, GORMAN *et al.*, (1986). "Ophthalmopathy of Graves'disease:computerized volume measurements of the orbital fat and muscle." AJNR. American Journal of Neuroradiology **7**: 651-656.
- FORBES, GORMAN *et al.*, (1983). "Computer analysis of orbital fat and muscle volumes in Graves ophthalmopathy." AJNR. American Journal of Neuroradiology **4**: 737-740.
- GAAG, SCHIMDT *et al.*, (1996). "Orbital pathology in thyroid-associated ophthalmopathy." Orbit **15**(3): 109-117.
- GORMAN (1983). "Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and diagnosis of thyrotoxicosis." Mayo Clinic Proceedings **58**: 515-519.
- GORMAN (1998). "The measurement of changes in Graves' ophthalmopathy." Thyroid **8**(6): 539-556.
- HAJEER &HUTCHINSON (2001). "Influence of TNF gene polymorphisms on TNF production and disease." Human Immunology **62**: 1191-1199.
- HAJEER, WORTHINGTON *et al.*, (1997). "TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus." Tissue Antigens **49**: 222.
- HAJEER, WORTHINGTON *et al.*, (1996). "Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLA-DRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients." Arthritis Rheum **39**: 1109.
- HEUFELDER &BAHN (1993). "Detection and localization of cytokine immunoreactivity in retro-ocular connective tissue in Graves' ophthalmopathy." European Journal of Clinical Investigation **23**: 10-17.

- HIROMATSU, YANG *et al.*, (2000). "Cytokine profiles in eye muscle tissue and orbital fat tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy." J Clin Endocrinol Metab **85**: 1194-1199.
- HUFNAGEL, HICKEY *et al.*, (1984). "Immunohistochemical and ultrastructural studies on the exenterated orbital tissues of a patient with Graves' disease." Ophthalmology **91**: 1411-1419.
- HUNT, MARSHALL *et al.*, (2001). "Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease." Clinical Endocrinology **55**: 491-499.
- INOUE, SATO *et al.*, (1991). "Genetic differences shown by HLA typing among japanese patients with euthyroid Graves' ophthalmopathy, Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: genetic characteristics of euthyroid Graves' ophthalmopathy." Clinical Endocrinology **34**: 57-62.
- JONGENEEL, BRIANT *et al.*, (1991). "Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9717-9721.
- KAMIZONO, HIROMATSU *et al.*, (2000). "A polymorphism of the 5' flanking region of tumor necrosis factor α gene is associated with thyroid-associated ophthalmopathy in japanese." Clinical Endocrinology **52**: 759-764.
- KENDLER, LIPPA *et al.*, (1993). "The initial clinical characteristics of Graves' orbitopathy vary with age and sex." Archives of Ophthalmology **111**: 197-201.
- KLEIN & SATO (2000). "The HLA system." The New England Journal of Medicine **7**: 702-786.
- KOUMAS, SMITH *et al.*, (2002). "Fibroblasts subsets in the human orbit: Thy-1+ and Thy-1- subpopulations exhibit distinct phenotypes." Eur J Immunol **32**: 477-485.
- KRAEMER, DONADI *et al.*, (1998). "Relationship between HLA antigens and infectious agents in contributing towards the development of Graves' disease." Immunological Investigations **27**: 17-29.
- KULA, JURECKA-TULEJA *et al.*, (2001). "Association of polymorphism of LT α and TNF genes with Graves' disease." Folia Histochemica et Cytobiologica **39**: 77-78.
- LOUZADA-JUNIOR, SMITH *et al.*, (2001). "HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo." Tissue Antigens **57**: 158-162.

- MAALEJ, KACEM *et al.*, (2000). "Polymorphisms of HLA DQB1 CAR1/CAR2 and TNF alpha IR2/IR4 microsattelite markers in patients affected with Graves disease." Clinical Immunology **96**: 91-93.
- MACIEL, NAVARRO *et al.*, (1997). "Antígenos de histocompatibilidade de classe I em pacientes brasileiros portadores da doença de Graves com ou sem oftalmopatia." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia **41**(2): 76-81.
- MACIEL, RODRIGUES *et al.*, (2001). "Association of the HLA-DRB1*0301 and HLA-DQA1*0501 alleles with Graves' disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds." Thyroid **11**(1): 31-35.
- MACK, STASIOR *et al.*, (1999). "The effect of cigarette smoke constituents on the expression of HLA-DR in orbital fibroblasts derived from patients with Graves ophthalmopathy." Ophthal Plast Reconstr Surg **15**(4): 260-271.
- MARGA, DENISOVA *et al.*, (2001). "Two HLA DRB1 alleles confer independent genetic susceptibility to Graves disease: relevane of cross-population studies." American Journal of Medical Genetics **102**: 188-191.
- MARTINEZ, FERNANDEZ-ARQUERO *et al.*, (2000). "Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**: 1366.
- MCLACHLAN, PRUMMEL *et al.*, (1994). "Cell-mediated or humoral immunity in Graves' ophthalmopathy? Profiles of T-cell cytokines amplified by polymerase chain reaction from orbital tissue." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **78**: 1070-1074.
- MILLER, DYKES *et al.*, (1998). "A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**: 1215.
- NAFFZIGER (1933). "Pathologic changes in the orbit in progressive exophthalmus." Archives of Ophthalmology **9**: 1-12.
- NUNERY (1991). "Ophthalmic Graves'disease. A dual theory of pathogenesis." Ophthalmology clinics of North America **4**: 73-87.
- NUNERY, NUNERY *et al.*, (1997). "The risk of diplopia following orbital floor and medial wall decompression in subtypes of ophthalmic Graves' disease." Ophthal Plast Reconstr Surg **13**: 153-160.
- OHTSUKA & NAKAMURA (1998). "Human leukocyte antigens associated with hyperthyroid Graves ophthalmopathy in japanese patients." American Journal of Ophthalmology **126**(6): 805-810.
- ORHAN, AZEZLI *et al.*, (1993). "Human lymphocyte antigens (HLA) and Graves'disease in Turkey." Journal of clinical Immunology **13**(5): 339-343.

- ÖZGEN, ALP *et al.*, (1999). "Quantitative CT of the orbit in Graves' disease." British Journal of Radiology **72**: 757-762.
- PEYSTER, GINSBERG *et al.*, (1986). "Exophthalmos caused by excessive fat: ct volumetric analysis and differential diagnosis." AJR. American Journal of Roentgenology **146**: 459-464.
- PHIPPS, STEIN *et al.*, (1991). "A new view of prostraglandin E regulation of the immune response." Immunol. Today. **12**: 349-352.
- POCIOT, BRIANT *et al.*, (1993). "Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus." Eur J Immunol **23**: 224-231.
- PRUMMEL &WIERSINGA (1993). "Smoking and risk of Graves' disease." JAMA **27**(4): 479-482.
- RATNASINGAM &GOUGH (2002). Genetics of Graves' disease. Thyroid Eye Disease. Diagnosis and treatment. DUTTON &HAIK. New York, Marcel Dekker, Inc.: 113-125.
- RAYMOND &ROUSSET (1995). "Genepop (version 1.2). Population genetics software for exact test and ecumenicism." Journal Heredity **49**: 1280-1283.
- RILEY (1972). "Orbital Pathology in Graves' Disease." Mayo Clinic Proceedings **47**: 975-979.
- RUBIN, WATKINS *et al.*, (1998). "Orbital computed tomographic characteristics of globe subluxation in thyroid orbitopathy." Ophthalmology **105**: 2061-2064.
- RUNDLE &POCHIN (1944). "The orbital tissues in thyrotoxicosis: a quantitative analysis relating to exophthalmos." Clin Sci **5**: 51-74.
- SERGOTT, FELBERG *et al.*, (1979). "E-rosette formation in Graves' ophthalmopathy." Investigative Ophthalmology and Visual Science **18**: 1245-1251.
- SERGOTT &GLASER (1981). "Graves' Ophthalmopathy. A clinical and Immunologic review." Survey of Ophthalmology **26**: 1-21.
- SMITH, KOUMAS *et al.*, (2002). "Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **87**(1): 385-392.
- SORISKY, PARDASANI *et al.*, (1996). "Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **81**: 3428-3431.
- SVEJGAARD (1986). HLA and disease: 912-920.

- SVEJGAARD, PLATZ *et al.*, (1983). "HLA and disease 1982 - a survey." Immunological Rev **70**: 193-217.
- TAKEUCHI, NABETA *et al.*, (2000). "Association of the TNFa13 microsatellite with systemic sclerosis in Japanese patients." Ann Rheum Dis **59**: 293-296.
- TARASSI, CARTHY *et al.*, (1998). "HLA-TNF haplotype heterogeneity in Greek SLE patients." Clin Exp Rheumatol **16**: 66.
- TROKEL & JAKOBIEC (1981). "Correlation of CT Scanning and Pathologic Features of Ophthalmic Graves' Disease." Ophthalmology **88**: 553-564.
- TROUSSEAU (1868). Lecture XIX. Lectures on clinical medicine delivered at the Hôtel-Dieu, Paris. APUD SAWIN (1998). 'Theories of causation of Graves disease.' Endocrinol Met Clin N Am **27**: 63-72
- TSUKAMOTO, OHTA *et al.*, (1998). "A highly polymorphic (CA) repeat marker at in the human tumor necrosis factor alpha." J Human Genetics **43**(4): 278-279.
- TURNER, GRANT *et al.*, (1995). "A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients." Transplantation **60**: 1113-1117.
- UDALOVA, NEDOSPASOV *et al.*, (1993). "Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers." Genomics **16**: 180-186.
- VAIDYA, IMRIE *et al.*, (1999). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism confers susceptibility to thyroid associated orbitopathy." The Lancet **354**(28): 743-744.
- VAN DYK (1981). "Orbital Graves' disease. A modification of the "NO SPECS" classification." Ophthalmology **88**(6): 479-483.
- VILLANUEVA, INZERILLO *et al.*, (2000). "Limited genetic susceptibility to severe Graves' ophthalmopathy: no role for CTLA-4 but evidence for an environmental etiology." Thyroid **10**(9): 791-798.
- WEBER (1996). Neuroimaging clinics of North America. Philadelphia.
- WEETMAN (1992). "Thyroid-associated ophthalmopathy." Autoimmunity **12**: 215-222.
- WEETMAN (2000). "Graves' disease." New England Journal of Medicine **343**: 1246-1248.
- WEETMAN, COHEN *et al.*, (1989). "Immunohistochemical analysis of the retrobulbar tissues in Graves' ophthalmopathy." Clin Exp Immunol **75**: 222-227.
- WEGENER, FASSEL *et al.*, (1993). Whole body computed tomography. Boston, Blackwell Scientific Publications.

- WERNER (1969). "Classification of the Eye Changes of Graves'Disease." American Journal of Ophthalmology **68**: 646-648.
- WERNER (1977). "Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease." American Journal of Ophthalmology **83**: 725-727.
- WHITE, BOGH *et al.*, (1997). "HLA antigens in Omanis with blinding trachoma: markers for disease susceptibility and resistance." British Journal of Ophthalmology **81**: 431-434.
- WONG, CHENG *et al.*, (1999). "The HLA-DQ associations with Graves'disease in chinese children." Clinical Endocrinology **50**: 493-495.
- WU, YANG *et al.*, (1999). "Demonstartion of thyrotropin receptor mRNA in orbital fat and eye muscle tissues from patients with Graves'ophthalmopathy by in situ hybridization." J Endocrinol Invest **22**: 289-295.
- YANAGAWA, HIDAKA *et al.*, (1995). "CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population." J Clin Endocrinol Metab **80**: 41-45.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de caracterizar os subtipos da orbitopatia de Graves em 101 pacientes com essa condição. Utilizando-se a tomografia computadorizada de órbitas para quantificar as áreas da musculatura extraocular e da gordura orbitária, foram identificados dois subtipos, com características clínicas e radiológicas distintas.

O aumento muscular foi superior ao grupo controle em 51 pacientes, que receberam a denominação de subtipo miogênico. O aumento da gordura foi superior ao grupo controle em todos os pacientes, no entanto, em 50 pacientes não houve aumento muscular. Esse grupo foi denominado subtipo não miogênico.

O subtipo miogênico exibe menor predisposição em relação ao sexo do que o subtipo não miogênico (relação feminino/masculino = 1,8:1) e ocorre em faixas etárias mais avançadas (5ª e 6ª décadas). As formas mais severas da OG, com neuropatia óptica e estrabismo restritivo, ocorrem somente nesse subtipo. O subtipo sem aumento muscular predomina em mulheres (9:1), jovens (4ª década de vida) e não se associa a diplopia e neuropatia óptica.

A análise dos alelos HLA e dos microssatélites do TNF, mostrou que a suscetibilidade ao subtipo com aumento muscular foi relacionada ao HLA-DRB1*16 (RR=6,027) e TNFb3 (RR=2,743). Embora os riscos relativos conferidos pelos alelos sejam relativamente baixos, esses resultados indicam que fatores imunogenéticos podem influenciar o desenvolvimento dos subtipos da OG.

ABSTRACT

The purpose of this work was to characterize Graves' orbitopathy subtypes in 101 patients with this disease. Utilizing quantitative analysis of the areas of extraocular muscle in computed tomography of the orbits, two distinct subtypes of orbitopathy could be differentiated. The orbital fat area was increased in whole sample. In 51 patients the area of extraocular muscles was significantly greater than the controls. This group was labeled as "myogenic". The 50 patients who did not show a significantly increment in the extraocular muscle area was named as "non-myogenic".

The myogenic type was more prevalent in elder patients (fifth and sixth decades), the gender predilection was less marked (female to male ratio = 1.8:1) and was associated with strabismus and optic neuropathy. The non-myogenic subtype was predominant in females (female/male ratio = 9:1) in fourth decade of life and was not associated with strabismus or optic neuropathy.

The analysis of HLA DRB1 and DQB1 alleles and the five polymorphic TNF α microsatélites demonstrated that HLA DRB1*16 (RR=6,027) and TNFb3 (RR= 2,743) were significantly associated with susceptibility to the myogenic subtype. Although the relative risks conferring by these alleles are low, these results corroborate the participation of the immunogenetic markers for a specific subtype of Graves' orbitopathy.