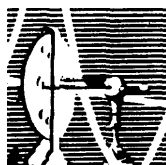


***Flavia Fonseca Bloise***

Modulação da população de linfócitos murinos  
induzida por hipertireoidismo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Flavia Fonseca Bloise

Modulação da população de linfócitos murinos  
induzida por hipertireoidismo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia)

Orientação: Carmen Cabanelas Pazos de Moura

Vivian Mary Rumjanek

Rio de Janeiro  
Agosto, 2008

## Ficha Catográfica

Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Bloise, Flavia Fonseca

Modulação da população de linfócitos murinos induzida por hipertireoidismo – Rio de Janeiro; IBCCF; 2008.  
xiv, 67pg

Dissertações (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2008

Orientação: Carmem Cabanelas Pazos de Moura  
Vivian Mary Rumjanek

1) Hipertireoidismo. 2) Órgãos linfóides. 3) Linfócitos

Flavia Fonseca Bloise

Modulação da população de linfócitos murinos induzida  
por hipertireoidismo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia)

Rio de Janeiro, 12 de agosto de 2008.

---

Prof. Dra. Valéria de Mello Coelho

---

Prof. Dr. Robson Coutinho Silva

---

Prof. Dra. Vânia Maria Corrêa da Costa

Dedico este trabalho a Sonia Maria  
Fonseca, por toda a força e coragem  
de seguir em frente.

## AGRADECIMENTOS

À prof Carmen obrigada pelo empenho, dedicação e carinho. Sou muito grata por ter acreditado que seria capaz de realizar este trabalho.

À prof Vivian Rumjanek por ensinar muito mais do que a ciência, obrigada pelo direcionamento em minha vida científica.

À minha querida família pelo apoio incondicional. Obrigada por sempre acreditarem, e me fazer crer, que tudo vai dar certo. Amo vocês.

Ao Ivan por estar ao meu lado, sempre muito paciente, compreensivo e prudente. Obrigada por todo o carinho e dedicação. *Ci sei tu.*

À Anita minha grande amiga. Obrigada pela sua “insistência” ao longo desta década, não sei como estaria sem ela.

À Aline por todo o carinho e amizade. Obrigada pela ajuda incomensurável.

À Luana sempre alegre e disposta a ajudar e ouvir, sempre com uma palavra de carinho e apoio.

À Gabi, Larissa, Márcio e Marco Aurélio pelas conversas na bancada e ajuda nos experimentos.

À todos os membros do LEM que me receberam com tanto carinho: Tânia, Karen, Norma, Camila, Ricardo, Débora, Rodrigo, Diana, Letícia, Zé, Raquel, Monique, Mariana, Érika e Ana Cláudia.

Ao Eduardo pelos momentos de conversa e descontração.

À Fernanda sempre solícita e atenciosa, obrigada por tudo.

À Dra. Oflía e Graça por todo o carinho e atenção.

À todos os membros do LIT pelo apoio e ajuda a realizar este trabalho: Raphael, Tião, Jack, André, Juliana, Luciana, Renata, Clarissa, Juliana Maria, Thiago, Marina, Nathália, Paula.

À Larissa Langhi por sua alegria contagiante, sou grata pela ajuda.

Aos membros da banca Dra. Vânia Maria Corrêa da Costa, Dra. Valéria de Mello Coelho, Dr. Robson Coutinho Silva.

À Dra. Dóris Rosenthal pela revisão deste trabalho.



## RESUMO

BLOISE, Flavia Fonseca. **Modulação da população de linfócitos murinos induzida por hipertireoidismo**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Os hormônios tireoideanos modulam diversos sistemas do organismo, contudo sua influência sobre o sistema imunológico ainda não está bem elucidada. Ensaio realizado neste trabalho visam investigar a influência do hipertireoidismo sobre a fisiologia de órgãos linfóides primários e secundários de camundongos machos e fêmeas pré-púberes. Observamos que o hipertireoidismo constitui um estímulo trófico ao baço de camundongos machos e fêmeas, sendo capaz de induzir a redução do percentual populacional de linfócitos B residentes deste órgão, significativamente em machos. Entretanto o hipertireoidismo não foi capaz de induzir alterações significativas no perfil populacional de linfócitos T e B residentes dos linfonodos mesentéricos, assim como o percentual populacional dos linfócitos T residentes do baço parece não ser afetado pelo excesso de hormônio tireoideano. Ao analisar a influência do hipertireoidismo na maturação de linfócitos T, observamos que, apesar do peso e celularidade tímica estarem significativamente aumentados em machos hipertireóides, o percentual das subpopulações de timócitos parece não ser afetada. Já as fêmeas hipertireóides não apresentaram alterações significativas do peso, celularidade ou subpopulações tímicas. Os resultados obtidos levam a crer que o hipertireoidismo é capaz de modular as populações de linfócitos B residentes em órgão linfóides secundários de forma tecido específica. No timo, o hipertireoidismo parece não afetar a linfopoiese T, contudo constitui estímulo trófico em machos. Nossos dados levam a crer que a influência exercida pelo hipertireoidismo sobre o sistema imunológico está associada a fatores ligados ao sexo.

Palavras-chave: hipertireoidismo, órgãos linfóides, linfócitos.

## ABSTRACT

BLOISE, Flavia Fonseca. **Mice's Lymphocytes population is modulated by hyperthyroidism**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Thyroid hormones play critical roles in several systems of the organism, although their effects on the immune system are still not well understood. In this work we investigate the role of hyperthyroidism in the physiology of primary and secondary lymphoid organs of pre-puberty male and female mice. Hyperthyroidism is a trofic stimulus to the male and female spleen. In males the excess of thyroid hormone reduces the spleen B lymphocyte population without affecting T lymphocyte population. Meanwhile in the lymph nodes there was no change in the T and B lymphocyte population of the hyperthyroid mice. We also analyzed the influences of hyperthyroidism on the main stages of differentiation pattern of thymocytes. The thymus weight and cellularity were increased in hyperthyroid males, although there was no difference in the thymocyte subpopulations. There was no difference in the female thymus weight, cellularity and thymocyte subpopulations. In conclusion, hyperthyroidism influences the B lymphocyt population of secondary lymphoid organs in a tissue specific manner. In the thymus hyperthyroidism does not affect T lymphopoiesis, although in males the excess of  $T_3$  is a trofic stimulus. Therefore, the influences of hyperthyroidism in the immune system seem to be influenced by factors associated with gender.

Key-words: hyperthyroidism, lymphoid organs, lymphocytes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula apresentadora de antígeno

D1 – Desiodase tipo 1

D2 – Desiodase tipo 2

DN – Timócito duplo negativo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP – Timócito duplo positivo

FITC – Flurosceína

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

PC – Peso corporal

PRCP – Proteína clorofila piridina

HT – Hormônios tireoideanos

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucléico mensageiro

RPE – R- ficoeritina

sc – Subcutâneo

SBF – Soro fetal bovino

SP – Timócito simples positivo

T<sub>3</sub> – Triiodotironina

T<sub>4</sub> – Tiroxina

TCR – Receptor de células T

TR – Receptor de hormônio tireoideano

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina

TSH – Hormônio estimulador da tireóide

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do processo de maturação de linfócitos T no timo .....	6
Figura 2: Esquema representando a estrutura geral do baço .....	8
Figura 3: Estrutura geral do linfonodo .....	9
Figura 4: Esquema de um linfonodo de drenagem .....	11
Figura 5: Esquema da regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide .....	16
Figura 6: Concentração sérica de T3 total .....	25
Figura 7: Peso do baço .....	26
Figura 8: Celularidade dos leucócitos esplênicos.....	27
Figura 9: Número de hemácias do baço .....	28
Figura 10: Expressão de B220 em esplenócitos .....	29
Figura 11: Gráfico da expressão de B220 em esplenócitos .....	30
Figura 12: Expressão de CD4 em esplenócitos .....	31
Figura 13: Expressão de CD8 em esplenócitos .....	32
Figura 14: Gráfico da expressão de CD4 em esplenócitos.....	33
Figura 15: Gráfico da expressão de CD8 em esplenócitos.....	33
Figura 16: Peso dos linfonodos mesentéricos .....	34
Figura 17: Celularidade dos linfonodos mesentéricos .....	35
Figura 18: Expressão de B220 em linfócitos do linfonodo .....	36
Figura 19: Gráfico da expressão de B220 em linfócitos do linfonodo .....	37
Figura 20: Expressão de CD4 em linfócitos do linfonodo .....	38
Figura 21: Expressão de CD8 em linfócitos do linfonodo .....	39

Figura 22: Gráfico da expressão de CD4 em linfócitos do linfonodo .....	40
Figura 23: Gráfico da expressão de CD8 em linfócitos do linfonodo .....	40
Figura 24: Peso do timo em camundongos .....	41
Figura 25: Celularidade do timo em camundongos .....	42
Figura 23: Expressão de CD4 e CD8 em timócitos .....	44
Figura 24: Gráfico da expressão de CD4 e CD8 em timócitos .....	45
Figura 25: Número absoluto das subpopulações de timócitos .....	46

## **TABELA**

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos .....	47
---	----

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Sistema Imunológico .....	1
1.1.1 Timo .....	4
1.1.2 Baço .....	7
1.1.3 Linfonodo .....	8
1.2. Hormônios Tireoideanos .....	11
1.3 Influência dos hormônios tireoideanos no sistema imunológico .....	16
2.OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
3.1. Animais .....	21
3.2 Modelo de Hipertireoidismo .....	21
3.3 Obtenção das células .....	22
3.4 Expressão de moléculas de superfície .....	22
3.5 Contagem de hemácias esplênicas .....	23
3.6 Medida da concentração sérica de triiodotironina .....	23
3.7 Análise estatística .....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Quantificação da concentração sérica de triiodotironina total .....	25
4.2 Efeito do hipertireoidismo sobre o peso do baço .....	26
4.3 Efeito do hipertireoidismo sobre a celularidade do baço .....	27
4.4 População de hemácias do baço de camundongos hipertireóides .....	28
4.5 População de linfócitos B esplênicos de animais hipertireóides .....	29
4.6 População de linfócitos T esplênicos de animais hipertireóides .....	31
4.7 Efeito do hipertireoidismo sobre o peso do linfonodo .....	34
4.8 Efeito do hipertireoidismo sobre a celularidade do linfonodo .....	35

4.9 População de linfócitos B do linfonodo de camundongos hipertireóideos .....	36
4.10 População de linfócitos T do linfonodo de camundongos hipertireóideos .....	38
4.11 Efeito do hipertireoidismo sobre o peso do timo .....	41
4.12 Efeito do hipertireoidismo sobre a celularidade do timo .....	42
4.13 Influência do hipertireoidismo sobre as subpopulações de timócitos ...	44
5. DISCUSSÃO .....	48
6. CONCLUSÕES .....	58
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

# 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas diversos estudos demonstraram a existência de uma interação fisiológica importante e bidirecional entre o sistema neuroendócrino e o sistema imunológico (Kelley *et al*, 2007).

A inter-relação funcional entre estes sistemas é evidenciada pela utilização de vias de comunicação moleculares comuns. Células do sistema imunológico expressam receptores hormonais e produzem hormônios controlados pelo eixo hipotálamo-hipófise, assim como células do sistema neuroendócrino produzem mediadores imunológicos (Weigent e Blalock, 1995; Besedovsky e Del Rey, 1996).

As citocinas, moléculas classicamente conhecidas como intermediadoras de informações imunológicas, exercem efeitos modulatórios sobre a resposta neuroendócrina, através de receptores de citocinas presentes em órgãos e células deste sistema (Tausk *et al*, 2008). Contudo não só o sistema imunológico é capaz de produzir citocinas, como estas também são liberadas e sintetizadas pelo sistema nervoso central e pelo sistema neuroendócrino (Spangelo e Gorospe; 1995, Sternberg, 2006).

Além dos glicocorticóides que apresentam efeitos imunomoduladores clássicos, outros hormônios como a prolactina, o hormônio do crescimento e os hormônios tireoideanos (HT) também apresentam efeitos imunomodulatórios importantes (Savino e Dardenne, 2000; Padgett e Glaser, 2003; Di Comite *et al*, 2007; Kelley *et al*, 2007, Mello-Coelho, 1998). Estudos recentes demonstram o importante papel dos HT sobre os processos de desenvolvimento e maturação de células do sistema imunológico (Arpin *et al*, 2000; Ribeiro-Carvalho *et al*, 2007<sup>a,b</sup>; Yao *et al*, 2007, Mascanfroni *et al*, 2008).



## 1.1 Sistema Imunológico

Todas as células que realizam funções efetoras durante a resposta imunológica são denominadas células efetoras, estas são importantes para a eliminação do patógeno. As células efetoras compõem uma população celular heterogênea, entre elas estão linfócitos T ativados, fagócitos mononucleares e plasmócitos, entre outros leucócitos. Os linfócitos reconhecem antígenos estranhos ao organismo de maneira específica e a eles respondem. As células apresentadoras de antígenos (APCs do inglês *antigen-presenting cells*) capturam e apresentam antígenos a linfócitos específicos, este processo é essencial para o desenvolvimento da resposta imunológica. As células efetoras, as APCs e os linfócitos são as principais células do sistema imunológico (Abbas e Lichtman, 2003).

Os linfócitos, também, são compostos por uma população celular heterogênea, composta pelos linfócitos B, linfócitos T e linfócitos *natural killer*. Estas células diferem na forma de reconhecimento do antígeno e na função imunológica (Welner *et al*, 2008; Seminario e Bunnell, 2008; Phan *et al*, 2007; Montoya *et al*, 2002; Long e Wagtmann, 1997).

Os linfócitos B são células produtoras de anticorpo, que expressam o receptor de célula B (BCR do inglês *B cell receptor*), molécula capaz de reconhecer antígenos extracelulares de acordo com sua estrutura tridimensional e composição química (Phan *et al*, 2007; Welner *et al*, 2008).

Os linfócitos T expressam o receptor da célula T (TCR do inglês *T cell receptor*), molécula presente na superfície celular capaz de reconhecer antígenos peptídicos associados a uma molécula do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) presente em outra célula (Seminario e Bunnell, 2008; Schmitt e Zúñiga-Pflücker, 2006).

Existem duas populações distintas de linfócitos T, os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T auxiliares, quando ativados secretam citocinas, que medeiam a ativação de macrófagos, modulam a atividade de linfócitos B, entre outras funções em diversos grupos celulares. Os linfócitos T citotóxicos reconhecem e induzem a apoptose de diversos tipos celulares, contudo de maneira específica, como no caso de uma infecção viral (Ochoa e Makarenkova, 2005).

A interação celular é extremamente importante em diversos parâmetros da fisiologia imunológica. A organização dos grupos celulares nos órgãos linfóides auxilia o processo de contato celular e, assim, o desenvolvimento da resposta imunológica e maturação celular (Montoya *et al*, 2002; Lämmermann e Sixt, 2008).

Os tecidos linfóides são classificados como tecidos linfóides primários, onde ocorre o processo de maturação dos linfócitos, ou tecidos linfóides secundários, onde é iniciada e desenvolvida a resposta aos antígenos. A medula óssea, sítio hematopoético e de desenvolvimento e maturação dos linfócitos B, e o timo, sítio de maturação dos linfócitos T, são os órgãos linfóides primários. Os tecidos linfóides secundários incluem o baço, os linfonodos, o sistema imunológico cutâneo e o associado à mucosa (Mebius e Kraal, 2005; Crivellato *et al*, 2004; Ohl *et al*, 2003; Hays, 1990).

Os órgãos linfóides secundários apresentam uma organização microanatômica composta por regiões ricas em linfócitos B ou T. Estas se encontram separadas anatomicamente, contudo há uma região de contato entre ambas. A zona de células B é denominada folículo linfóide, a qual pode ou não apresentar uma área central denominada centro germinativo, sendo denominado folículo linfóide secundário ou primários, respectivamente. O centro germinativo é formado por linfócitos B ativados, já os folículos linfóides primários por linfócitos B

*naïve*. A zona de células T envolve os folículos linfóides, nesta região são encontrados um grande número de linfócitos T auxiliares e células dendríticas (Park e Choi, 2008; Ohl *et al*, 2003).

### **1.1.1 O Timo**

O timo é o maior sítio de maturação de linfócitos T. Localizado no mediastino central logo acima do coração, este órgão apresenta duas regiões morfológica e funcionalmente distintas: o córtex e a medula. O processo de maturação consiste na diferenciação de progenitores linfóides, originários da medula óssea, em linfócitos T maduros (Bhandoola e Sambandam, 2006)

A diferenciação da célula progenitora hematopoética em linfócito T maduro pode ser observada pela expressão diferenciada de algumas moléculas de superfície e pela recombinação dos genes que codificam o TCR. O CD4 (co-receptor para o MHC classe II) e o CD8 (co-receptor para MHC classe I) são as principais moléculas de superfície, expressas de forma diferencial durante o processo de maturação (Ceredig e Rolink, 2002).

O processo de maturação de linfócitos T pode ser dividido, didaticamente, em três fases distintas: linfopoiese, seleção mediada pelo TCR e maturação funcional. Cada uma destas fases ocorre em sítios específicos do timo (Lind *et al*, 2004).

As células progenitoras hematopoéticas migram da medula óssea em direção ao timo, penetrando neste órgão na região cortical perimedular. Nesta região, os progenitores linfóides recebem estímulos mitóticos e de diferenciação celular e são denominados timócitos duplo negativo, uma vez que não expressam as moléculas CD4 nem CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) (Lind *et al*, 2004; Schwarz e Bhandoola, 2006).

A linfopoiese ocorre durante o processo de migração das células progenitora hematopoéticas da junção cortico-medular até a zona subcapsular (Lind *et al*, 2004). Durante a linfopoiese ocorre o aumento do comprometimento com a linhagem de linfócito T. Próximo à região subcapsular, os timócitos duplo negativo iniciam o processo de rearranjo do gene da cadeia  $\beta$  do TCR, formando o pré-TCR. Na região subcapsular, ocorre o primeiro ponto de checagem para o próximo estágio, sendo que somente as células que expressaram de forma eficiente este pré-TCR recebem a sinalização de sobrevivência e passam a ser denominadas timócitos duplos positivos por expressarem tanto a molécula CD4 como a CD8 ( $CD4^+CD8^+$ ) na membrana plasmática (Hogquist *et al*, 2005).

A seleção mediada pelo TCR ocorre durante a migração do timócito duplo positivo do córtex até a região medular. Neste processo o TCR maduro das células duplo positiva interagem com o complexo peptídeo-MHC das células do estroma tímico (Takahama, 2006). Os timócitos duplo positivo que forem capazes de se ligar com avidéz intermediária ao complexo recebem um estímulo de sobrevivência e diferenciação. Estas células passam a expressar somente a molécula CD4 ( $CD4^+CD8^-$ ) ou somente a molécula CD8 ( $CD4^-CD8^+$ ), sendo denominadas timócitos simples positivos. Este processo é chamado de seleção positiva (Sprent e Kishimoto, 2002). Os timócitos simples positivos recentes migram por quimiotaxia até a região medular.

O processo de maturação funcional ocorre na medula tímica, os timócitos simples positivos permanecem nesta região por aproximadamente 12 dias (Egerton *et al*, 1990). Neste período, os timócitos interagem com células estromais medulares, as quais apresentam antígenos do próprio organismo. Timócitos auto-reativos são excluídos após forte interação com as células estromais. Após esta

última etapa de maturação os timócitos simples positivos se diferenciam em linfócitos T *naïve*. Estes são atraídos para a periferia por quimiocinas presentes na corrente sanguínea (Takahama, 2006). O processo de maturação de timócitos é resumido na Figura 1.

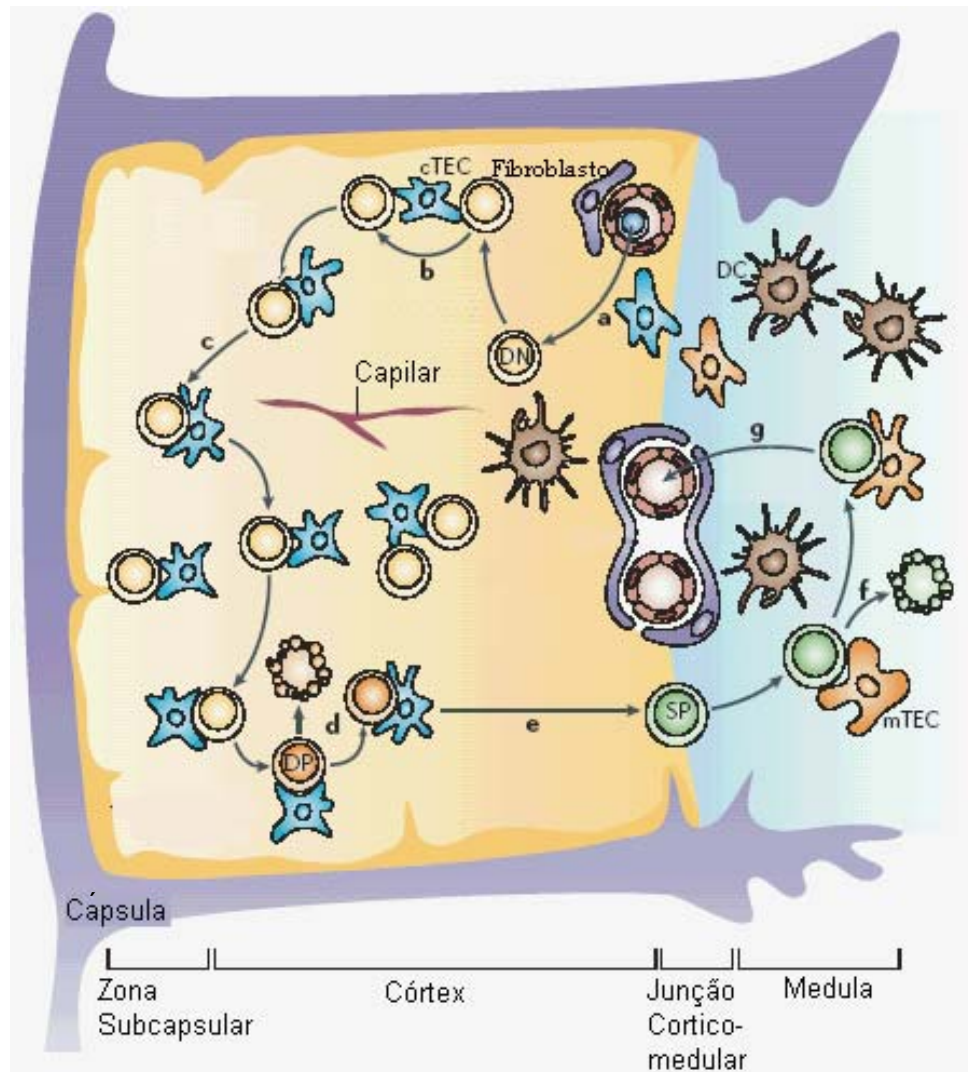


Figura 1: Esquema do processo de maturação de linfócitos T no timo. **a:** entrada do precursor linfóide na junção cortico-medular tímica. **b:** Migração da célula DN através do córtex tímico. **c:** chegada do timócito DN a região subcapsular. **d:** geração do timócitos DP. **e:** seleção dos timócitos DP em SP, com concomitante migração à medula. **f:** seleção medular, com exclusão de linfócitos auto-reativos. **g:** migração do timócitos SP maduro para a corrente sanguínea. DC, célula dendrítica; DN, timócito duplo negativo, DP timócitos duplo positivo, mTEC, células epiteliais tímicas medulares, cTEC, células epiteliais tímicas corticais, SP, timócitos simples positivo. Modificado de Takahama, 2006.

A população de linfócitos T maduros que expressam a molécula CD8 são os linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), já os linfócitos T auxiliares, expressam a molécula CD4 (Abbas e Lichtman, 2003).

### **1.1.2 O Baço**

O baço é o único órgão linfóide entreposto na corrente sanguínea sendo o maior sítio de resposta imunológica a antígenos oriundos do sangue. Este órgão tem um papel importante na remoção de eritrócitos velhos da corrente sanguínea. A estrutura da parede dos sinusóides venosos esplênicos permite que macrófagos fagocitem os eritrócitos velhos (Mebius e Kraal, 2005).

A zona de linfócitos T esplênica é denominada de bainha linfóide periarteriolar, uma vez que pequenas arteríolas são envolvidas por uma bainha de linfócitos T. Junto a ela estão localizados os folículos linfóides, os quais são ricos em linfócitos B. A zona marginal é uma região rica em macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e linfócito B diferentes dos encontrados no folículo linfóide. A zona marginal envolve a bainha linfóide periarteriolar e os folículos linfóides. A bainha linfóide periarteriolar, o folículo linfóide e a zona marginal formam a polpa branca do baço, uma região rica em células linfóides (Crivellato *et al*, 2004).

As arteríolas esplênicas formam os sinusóides vasculares, estes são compostos por uma rede frouxa de células reticulares, macrófagos, monócitos, granulócitos, células dendríticas, e por plasmócitos e linfócitos esparsos. Esta região é denominada polpa vermelha (Mebius e Kraal, 2005; Crivellato *et al*, 2004) (figura 2).

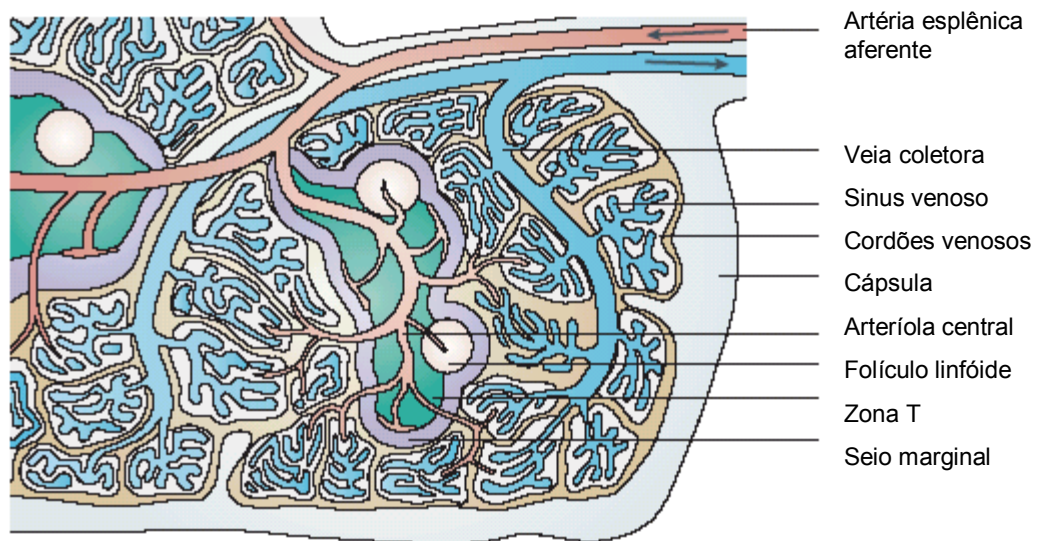


Figura 2: Esquema representando a estrutura geral do baço. Em cinza está representada a estrutura fibrosa que forma a cápsula esplênica, em azul e vermelho está representado o esquema venoso do baço composto por sinus, no qual as setas representam o fluxo do sangue, a associação sistema de vasos ao tecido subjacente, representado pela cor bege, corresponde a polpa vermelha do baço; já a polpa branca é representada pelas cores lilás, verde e branco, correspondendo ao seio marginal, zona T e folículo linfóide, respectivamente. Modificado de Mebius e Kraal, 2005.

Os sinusóides vasculares possuem papel importante na resposta imunológica, pois é através destes que antígenos e linfócitos chegam ao baço. Este órgão é o maior sítio de fagocitose de antígenos opzonizados. O grande número de macrófagos residentes da polpa vermelha auxilia na remoção de patógenos da corrente sangüínea (Abbas e Lichtman, 2003).

### 1.2.3 O Linfonodo

Os linfonodos são órgãos capsulados e apresentam região cortical e medular distintas. A linfa chega ao linfonodo pelos vasos linfáticos aferentes, percorre o córtex até os sinus medulares, por onde é eliminada pelo vaso linfático eferente. Na região cortical está localizada a zona de linfócitos B, os folículos linfóides primários e

secundários e os centros germinativos, já a região paracortical é a zona rica em linfócitos T (Crivellato, *et al*, 2004) (figura 3).

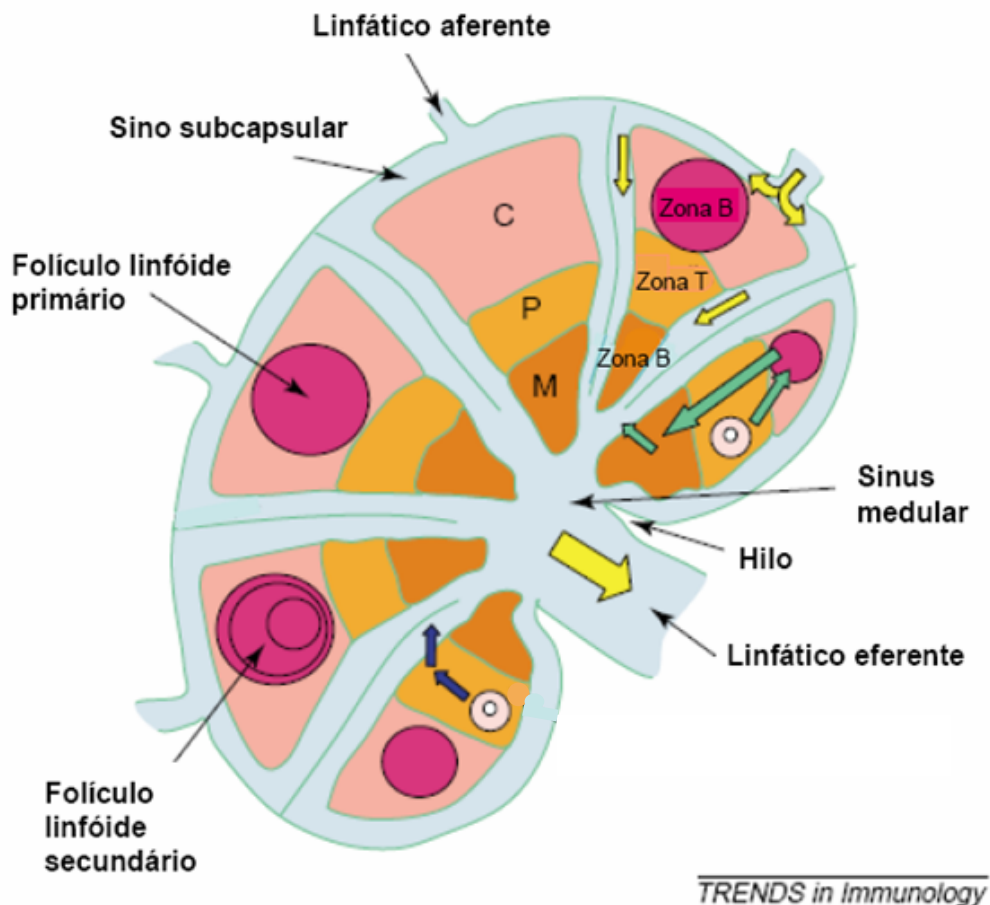


Figura 3: Estrutura geral do linfonodo. Onde a área azul claro corresponde a cápsula de tecido conjuntivo deste órgão, a região rosa claro a zona cortical, os círculos rosa escuro correspondem a zona rica em linfócitos B, podendo representar um folículo linfóide primário ou secundário, a região laranja clara corresponde a região paracortical do linfonodo, sendo rica em linfócitos T e a zona em laranja escura corresponde a região medular rica em linfócitos B. O círculo rosa pastel representa um linfócito e as setas verdes e azul indicam a migração dos linfócitos T e B para compartimentos específicos no linfonodo. Setas amarelas indicam a direção da linfa. C, região cortical; P, região paracortical; M, região medular. Modificado de Crivellato *et al*, 2004.

Os linfonodos têm um papel importante na resposta imunológica, pois possibilitam o contato de antígenos e células apresentadoras de antígenos oriundos dos tecidos com os linfócitos vindos da corrente sanguínea. Os linfócitos presentes



no linfonodo estão em constante processo de recirculação, são oriundos da corrente sanguínea e também de sítios de inflamação teciduais (Lira, 2005).

O sistema linfático é composto pelos vasos linfáticos, os quais drenam a linfa dos tecidos até a corrente sanguínea, e pelos linfonodos, conectados em série a estes vasos. Esta organização anatômica possibilita a filtragem da linfa antes que esta atinja a corrente sanguínea, possibilitando a drenagem de antígenos oriundos do ambiente (Abbas e Lichtman, 2003).

O linfonodo mais próximo ao tecido inflamado é denominado linfonodo de drenagem, pois as células apresentadoras de antígenos deste tecido, assim como os próprios antígenos, são drenados para este linfonodo. No linfonodo de drenagem ocorre o início do processo de ativação linfocitária. Os linfonodos ativados sofrem modificações anatômicas, devida a grande proliferação celular e aumentam visivelmente de tamanho (Bajénoff *et al*, 2007) (figura 4).

Apesar de possuírem os mesmos tipos celulares e a mesma organização anatômica os diferentes linfonodos apresentam tipos de respostas imunológicas diversas de acordo com o tecido drenado. Os linfonodos subcutâneos e mesentéricos são um exemplo, apresentam respostas diferenciadas em múltiplos modelos experimentais (de Meis *et al*, 2008; Bajénoff *et al*, 2007; Henri *et al*, 2001; Wilson *et al*, 2003).

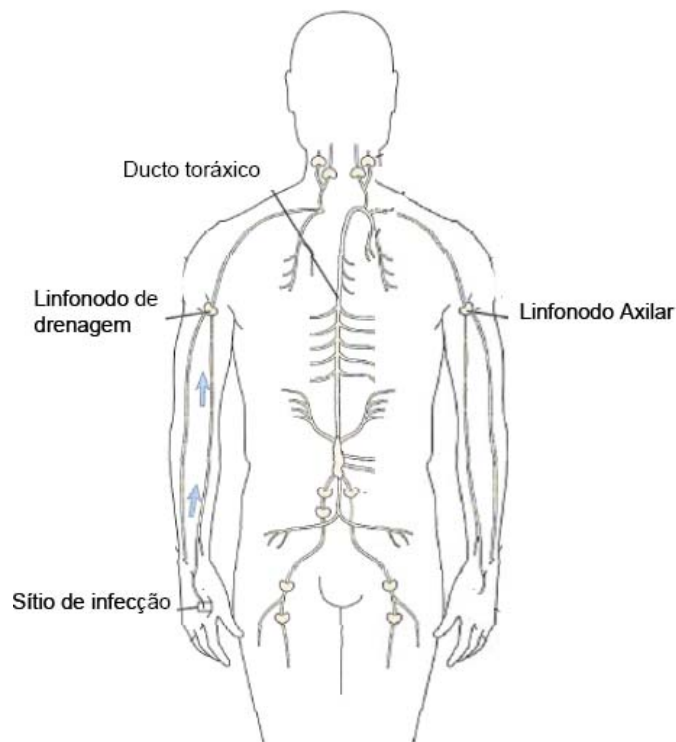


Figura 4: Esquema de um linfonodo de drenagem. As setas azul indicam o sentido de drenagem da linfa contendo o antígeno e células apresentadoras de antígeno ativadas do sítio da infecção (representado pelo quadrada na palma do indivíduo) para o primeiro linfonodo após esta região, linfonodo de drenagem, através do sistema de vasos linfáticos. As linhas beges correspondem ao sistema de vasos linfáticos e as formas arredondadas aos diferentes linfonodos presentes em diversos sítios do organismo. Modificado de Abbas e Lichtman, 2003.

## 1.2 Hormônios Tiroideanos

Os hormônios tiroideanos (HT) são capazes de influenciar o funcionamento de praticamente todos os tecidos do organismo. Eles são fundamentais durante o desenvolvimento embrionário e em diversos processos fisiológicos no indivíduo adulto (Zhang e Lazar, 2000).

A glândula tireóide é o sítio de produção dos HT. Estes são derivados iodados do aminoácido tirosina, sintetizados e secretados pelas células foliculares tiroideanas (Wolff, 1998). A tireóide sintetiza e libera dois tipos principais de HT, uma molécula contendo quatro átomos de iodo, a 3,5,3',5'-tetraiodotironina, ou

tiroxina ( $T_4$ ), e uma com três átomos de iodo, a 3,5,3'-triiodotironina ( $T_3$ ). Embora a concentração sérica de  $T_4$  seja cerca de quarenta vezes maior do que a de  $T_3$ , este apresenta maior afinidade pelos receptores de HT, sendo o hormônio capaz de exercer atividade biológica (Yen, 2001).

A maior fonte de  $T_3$  circulante deve-se à retirada do iodo da posição 5' do anel fenólico do  $T_4$ . Este processo de monodesiodação é realizado pelas enzimas desiodases tipo I (D1) e tipo II (D2) (Bianco *et al*, 2002). A D1 está presente em abundância em tecidos periféricos como o fígado e o rim. Esta proteína é a principal responsável pela conversão do  $T_4$  a  $T_3$  na circulação, visto que a D1 é uma proteína integral da membrana plasmática com o sítio ativo voltado para o citoplasma (Escobar-Morrele *et al*, 1999; Van der Geyten *et al*, 2002). Já a D2 é encontrada, principalmente, no cérebro, na adeno-hipófise e no tecido adiposo marrom. O sítio ativo da D2 também se encontra voltado para o citoplasma, entretanto esta proteína está inserida no retículo endoplasmático, esta localização facilita a conversão do  $T_4$  a  $T_3$  principalmente para uso intracelular, contudo a ação da D2 também é capaz de influenciar a concentração de  $T_3$  sérico (Soutto *et al*, 1996; Bianco *et al*, 2002; Maia *et al*, 2005).

A maioria dos efeitos exercidos pelo HT se deve à modulação da expressão gênica através da ligação aos receptores de hormônio tireoideanos (TR), contudo há evidências de efeitos não-genômicos dos HT (Lazar, 1993; Davis *et al*, 2005).

Os TR são fatores de transcrição ativados por ligante com um sítio de ligação ao HT e um domínio de ligação ao DNA em regiões promotoras de genes alvos (Yen, 2003). Existem dois tipos de TR o  $TR\alpha$  e o  $TR\beta$ , que são produtos de dois genes distintos THRA e THRB, respectivamente. Tanto o produto gênico do THRA como do THRB podem sofrer rearranjo alternativo do RNA mensageiro gerando as

proteínas TR $\alpha$ 1, c-erbA $\alpha$ -2, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2, TR $\beta$ 3. Os receptores TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 ligam o T<sub>3</sub> com grande afinidade e desencadeiam os efeitos biológicos dos HT (Cheng, 2000).

Os TR estão distribuídos de forma ubíqua pelos tecidos do organismo, contudo são expressos de maneira diferenciada de acordo com o tecido e a fase de desenvolvimento. O TR $\alpha$ 1 e o TR $\beta$ 1 são expressos em praticamente todos os tecidos, contudo são particularmente abundantes no fígado e no coração, respectivamente. Já o TR $\beta$ 2 é muito expresso na hipófise (O'Shea e Williams, 2002).

Os efeitos dos HT variam de acordo com o tipo celular, assim como a expressão do TR nos tecidos. Dentre as diversas funções dos HT as mais estudadas estão correlacionadas ao controle do metabolismo basal, da termogênese e a promoção de crescimento e diferenciação celular (Zhang e Lazar, 2000).

Os HT são cruciais para o controle da homeostase metabólica. O excesso dos HT está associado ao aumento do gasto energético e à perda de massa muscular e óssea (Ribeiro, 2008). O T<sub>3</sub> é um importante estimulador da lipogênese e da lipólise hepática, e nos tecidos adiposos branco e marrom, estimulando enzimas-chaves a estes processos (Yen, 2001; Ribeiro, 2008).

A manutenção da homeotermia está correlacionada ao metabolismo basal e produção de energia, estando estes diretamente relacionados com a atividade mitocondrial (Silva, 2006). Os HT estimulam, entre outras, a atividade e expressão da proteína sódio-potássio ATPase e Cálcio-ATPase (Clausen, 2003). Os HT estimulam o vazamento de prótons, devido ao aumento da expressão de proteínas desacopladoras mitocondriais, reduzindo a eficiência da produção de adenosina trifosfato. Sendo assim, os HT regulam os mecanismos fundamentais da termogênese de maneira direta ou indireta (Silvestri *et al*, 2005; Silva, 2006).

Os HT são fundamentais para o crescimento normal e a maturação óssea. O hipotireoidismo na infância causa deficiência no crescimento e atraso da maturação óssea (Yen, 2001). O excesso de HT também prejudica o crescimento, devido à fusão prematura das placas de crescimento. Os HT, também, estimulam a produção de hormônio do crescimento por células hipofisárias, (Yen, 2001).

Os HT apresentam papel importante para o desenvolvimento e crescimento cerebral durante a vida embrionária e no período neonatal (Bernal, 1999). O hipotireoidismo neonatal pode causar retardo mental ou defeitos neurológicos (Zhang e Lazar, 2000). Os HT são importantes para o crescimento axonal e arborização dendrítica (Bernal, 1999).

A síntese e secreção dos HT são reguladas por um sistema de retroalimentação negativa envolvendo o hipotálamo, a hipófise e a tireóide, formando o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (Fliers *et al*, 2006).

O hormônio estimulador da tireóide (TSH, do inglês *thyroid stimulating hormone*) é o principal regulador da secreção dos HT. Esse hormônio é crítico para o crescimento e desenvolvimento da glândula tireóide. A ligação do TSH ao seu receptor desencadeia uma cascata de sinalização, culminando na regulação de diversos genes associados à síntese dos HT pelas células foliculares tireoideanas, aumentando a taxa de síntese e secreção dos HT (Fliers *et al*, 2006).

A secreção do TSH é estimulada pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH do inglês *thyrotropin releasing hormone*). Este é um neuropeptídeo sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo. O TRH se liga ao seu receptor presente na membrana plasmática dos tireotrofos hipofisários, estimulando a síntese e a liberação do TSH (Dupré *et al*, 2004).

Tanto a secreção como a síntese do TRH, assim como a do TSH são regulados negativamente pelo HT. Um importante mecanismo de regulação do TSH está associado à redução da sensibilidade dos tireotrofos hipofisários ao TRH, exercida pelos HT, a qual está relacionada com a concentração intracelular de  $T_3$ . Além dos efeitos sobre os tireotrofos, os HT, também, alteram o ritmo de secreção do TRH. A maior parte do  $T_3$  hipofisário é derivado da conversão intra-hipofisária do  $T_4$  circulante a  $T_3$  pela D2 (Bianco, 2002).

A regulação da função tireoideana pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide está associada ao balanço das concentrações séricas de  $T_3$  e  $T_4$ . Quando há uma redução nos níveis plasmáticos de HT, ocorre nos tireotrofos aumento dos níveis de receptores de TRH, assim como aumenta a síntese de TSH. Alterações nas concentrações séricas de HT causam alterações paralelas e inversas nas concentrações de TSH e de TRH, formando a alça de retroalimentação negativa, que determina o patamar de secreção do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide. Outros fatores, de origem neural ou humoral podem modular este eixo. A regulação hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide está esquematizada na figura 5 (Alkemade *et al*, 2005; Fliers *et al*, 2006)

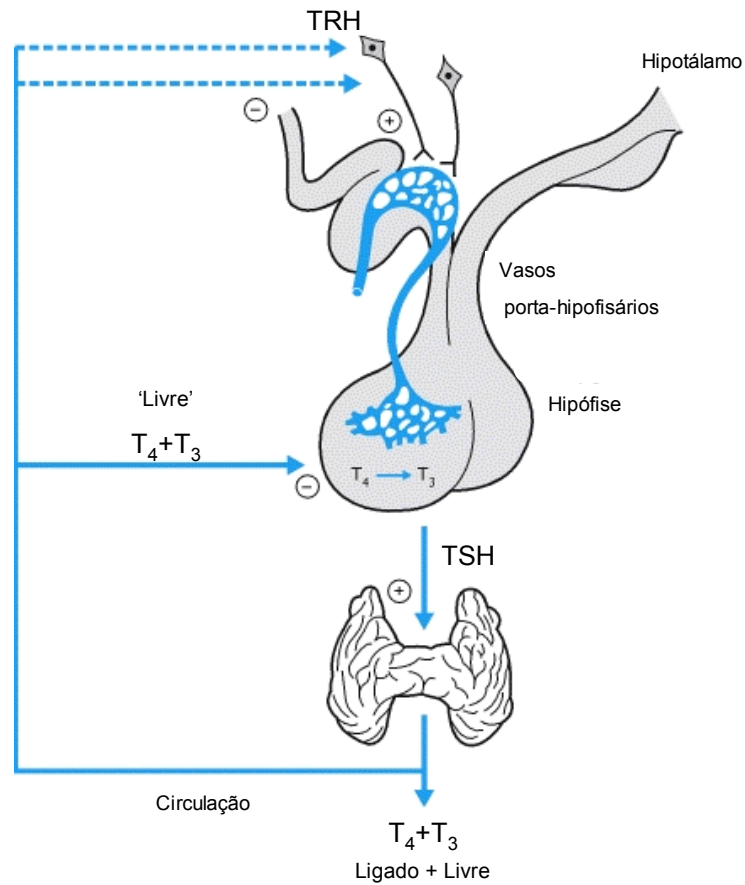


Figura 5. Representação esquemática da regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Adaptado de Nussey e Whitehead, 2001. O hipotálamo sintetiza e secreta o TRH, este é transportado à adeno-hipófise pelo sistema de vasos porta-hipofisário, estimulando a síntese e secreção do TSH, aumentando a concentração deste hormônio na corrente sanguínea. O TSH estimula a síntese e secreção dos HT estimulando o aumento das concentrações séricas de  $T_3$  e  $T_4$ , os quais são encontrados na corrente sanguínea na forma “livre” (não associado à proteínas plasmáticas) ou associada à proteínas plasmáticas (ligado). Somente a forma livre dos HT é capaz de exercer efeitos biológicos. Os HT inibem a taxa de síntese e secreção do TRH e do TSH.

### 1.3 Influência dos hormônios tireoideanos no sistema imunológico

O sistema imunológico e o sistema neuroendócrino agem de maneira coordenada a fim de manter a homeostase do organismo. Dentre os diversos mediadores de integração e controle destes sistemas estão os hormônios tireoideanos.

O timo, órgão linfóide primário, e o baço, órgão linfóide secundário, expressam TR $\alpha$  e TR $\beta$  (Sakurai *et al*, 1989; Takeda *et al*, 1999; Shahrara, 1999; Villa-Verde *et al*, 1992).

Células do sistema imunológico apresentam diferentes formas de TR de acordo com a fase de desenvolvimento e maturação que se encontram (Hastings *et al*, 1997; Mascanfroni *et al*, 2008). A expressão do TR $\alpha$ 1 e c-erbA $\alpha$ -2 varia ao longo do processo de maturação dos linfócitos B (Hastings *et al*, 1997). Células dendríticas, maduras e imaturas, assim como, as células epiteliais tímicas expressam TR $\beta$ 1 em maior quantidade que o TR $\alpha$ 1 (Villa-Verde *et al*, 1992; Mascanfroni *et al*, 2008). Células precursoras hematopoéticas residentes da medula óssea humana também expressam TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 (Grymula *et al*, 2007).

Os HT parecem exercer papel modulador sobre a hematopoiese. Células precursoras hematopoéticas CD34<sup>+</sup> humanas, expressam TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 (Grymula *et al*, 2007). Células mononucleares do sangue periférico apresentam aumento da expressão do RNAm de TR $\alpha$ 1 após o transplante de medula óssea (Omazic *et al*, 2001). Os HT estimulam a eritropoiese humana *in vitro* e são essenciais para a implementação da eritropoiese esplênica murina (Angelin-Ducolos *et al*, 2005, Grymula *et al*, 2007, Kendrick *et al*, 2008).

Alguns estudos demonstram que animais deficientes em HT ou com deleção do TR $\alpha$  apresentam deficiência no processo de maturação de linfócitos B na medula óssea, marcadamente por uma redução da população de células pro-pré B (Montecino-Rodriguez *et al*, 1996; Arpin *et al*, 2000). Também foi demonstrado que os HT parecem ser essenciais para a proliferação destas células (Foster *et al*, 1999).

Os HT também afetam a linfopoiese T e parecem exercer um importante papel na fisiologia tímica. A tireoidectomia, assim como o hipotireoidismo no período



neonatal causa atrofia tímica e redução do número de leucócitos periféricos, já a administração de HT em animais eutireoideos estimula o crescimento do timo (Pierpoli *et al*, 1970 *appud* Marsh e Erf, 1996; Villa- Verde *et al*, 1993; Rooney *et al*, 2003; Ribeiro-Carvalho *et al*, 2007<sup>a</sup>). Os HT estimulam a interação de timócitos com células epiteliais tímicas, assim como a migração destes e a produção de timulina, hormônio tímico produzido pelas células epiteliais tímicas capaz de estimular a proliferação de timócitos e diversas ações de linfócitos maduros na periferia, além de modular a produção de citocinas, (Villa- Verde *et al*, 1993; Savino e Dardenne, 2000; Ribeiro-Carvalho *et al*, 2007<sup>a,b</sup>).

Órgãos linfóides secundários e células linfóides maduras também são influenciados pelos HT. Animais deficientes em HT ou TR $\alpha$  apresentam menor celularidade esplênica, o que é acompanhado pela redução da população de linfócitos B residentes. Nos animais TR $\alpha$ <sup>-/-</sup> também foi observada a redução de linfócitos T, macrófagos e granulócitos residentes do baço. A administração de HT a células dendríticas imaturas é capaz de estimular a maturação das mesmas (Arpin *et al*, 2000; Angelin-Ducolos *et al*, 2005; Mascanfroni *et al*, 2008).

A análise da resposta de linfócitos T e B a mitógenos *in vitro*, demonstrou que células originárias de camundongos hipotireoideos apresentam uma menor resposta proliferativa, já em indivíduos hipertireoideos esta está aumentada. O mesmo padrão foi observado para o conteúdo de proteína cinase C, importante para o processo de ativação linfocitária (Klecha *et al*, 2006).

Apesar da estimulação dos HT sobre o processo de ativação de linfócitos B a influência destes na resposta humoral ainda é pouco clara. Há estudos que relatam um aumento da resposta humoral em indivíduos hipertireóideos e outros uma

redução (Klecha *et al*, 2000; Bittencourt *et al*, 2007). A influência dos HT na produção de citocinas também é conflitante (Klecha *et al*, 2006; Yao *et al*, 2007)

Os HT são capazes de modular diversos parâmetros da fisiologia imunológica; estudo com animais idosos e adultos demonstrou que a administração de tiroxina aos primeiros modula os parâmetros imunológicos tornando-os semelhantes aos dos indivíduos adultos (El-Shaik *et al*, 2006).

Embora existam evidências da influência dos HT sobre o sistema imunológico esta interação ainda não está totalmente elucidada.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho visa estudar as influências do excesso de hormônio tireoideano em células do sistema imunológico de camundongos machos e fêmeas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos do hipertireoidismo sobre o tamanho e a celularidade tímica, esplênica e dos linfonodos mesentéricos de camundongos machos e fêmeas.
- Investigar possíveis variações fenotípicas nas populações linfocitárias do baço e dos linfonodos mesentéricos de camundongos machos e fêmeas.
- Avaliar as possíveis influências do excesso de hormônios tireoideanos sobre o processo de maturação tímica de camundongos machos e fêmeas

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da estirpe C57Bl/6, com idades de 21 a 31 dias. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Laboratório de Imunologia Tumoral, e foram supridos com água e ração *ad libitum* e mantidos em ciclo controlado claro/escuro por 12h, luzes apagadas às 19h, em ambiente com temperatura controlada, em torno de 24°C. Os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação. O sangue do tronco foi coletado e centrifugado a 3 000xg a 4°C por 15 minutos, para a obtenção de soro, sendo este armazenado a -20°C, para posterior dosagem de HT séricos por radioimunoensaio específico.

#### **3.2 Modelo de hipertiroidismo:**

O hipertiroidismo foi induzido através da administração subcutânea diária de triiodotironina (3,5,3'-triiodotironine Sigma – USA), na dose de 5µg/10g de peso corpóreo por 14 dias, o sacrifício foi realizado no 15º dia após o início do tratamento, tendo os animais 36 a 46 dias de vida. Durante todo o período de tratamento os animais foram pesados diariamente e receberam injeção subcutânea com 100µl da solução de T<sub>3</sub>, previamente diluída do estoque (0,5mg/ml) em solução salina estéril de acordo com a faixa de peso corporal do animal, processo realizado em ambiente estéril. A manipulação dos animais foi realizada sempre na mesma faixa horária. Os animais do grupo controle foram pesados e receberam injeção subcutânea com 100µl da solução de dissolução do T<sub>3</sub> diluída em salina estéril, obtendo-se uma concentração final de NaOH de 2,5mN.

### **3.3 Obtenção das células:**

O baço, o timo, a cadeia de linfonodos mesentéricos foram removidos com auxílio de pinças cirúrgicas. Os órgãos foram pesados, cortados e macerados sobre uma rede de nylon imersa em meio de cultura (RPMI-1640 - Sigma-Aldrich) ou solução salina (0,9% NaCl- Merck) suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco). A solução contendo as células foi centrifugada por 6 minutos a 200xg e ressuspendida em 3 ml de meio de cultura ou salina suplementada com 10% de SFB.

### **3.4 Expressão de moléculas de superfície:**

As células obtidas logo após o sacrifício foram analisadas quanto à expressão das seguintes moléculas de superfície: CD45(B220), CD4 ou CD8. Para tal  $5 \cdot 10^5$  células foram incubadas com concentrações saturantes de um dos seguintes anticorpos: anti-CD45 murino acoplado ao fluorocromo R-ficoeritrina (RPE - Southern Biotechnology Associates), anti-CD4 murino acoplado ao fluorocromo proteína clorofila piridina (PerCP - BD Pharmagen), anti-CD8 murino acoplado ao fluorocromo fluoresceína (FITC - Southern Biotechnology Associates), por 30 min a 4°C. As células foram lavadas e ressuspendidas em tampão salina fosfato suplementado com 5% de soro fetal bovino. Após este processamento as células foram analisadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos 10 000 eventos no citômetro de fluxo FACScan, durante a aquisição a população celular correspondente as hemácias foi excluída da janela de aquisição. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.9, para a análise da expressão de moléculas de superfície somente foram analisadas as células presentes na região com tamanho e celularidade específica, correspondente aos linfócitos.

### **3.5 Contagem de leucócitos, tímócitos e hemácias esplênicas**

A determinação da quantidade total de leucócitos do linfonodo mesentérico ou baço, tímócitos e hemácias esplênicas foi realizada através da contagem das respectivas populações celulares presentes no macerado de cada órgão correspondente através da câmara de Neubauer. Para tal, a solução contendo as células do linfonodo mesentérico, baço ou timo foi diluída em solução salina 1:20, desta diluição foram retiradas 10 $\mu$ L, os quais foram adicionados a câmara de Neubauer e nesta foi lida ao microscópio óptico o número de células presente nos quatro quadrantes. O valor total de leucócitos do linfonodo mesentérico ou baço, tímócitos e hemácias esplênicas foi obtido multiplicando o número de hemácias encontradas pelo fator da câmara de Neubauer ( $10^4$ ), este valor foi multiplicado por 20 (índice de correção da diluição) e pelo volume total da solução contendo as células do linfonodo mesentérico, baço ou timo, respectivamente.

### **3.6 Medida da concentração sérica de triiodotironina**

A concentração sérica de T<sub>3</sub> total foi mensurada utilizando-se o kit de radioimunoensaio comercial com anticorpo aderido na parede (T<sub>3</sub> da MP-Biochemical - cat.06B-254215), de acordo com protocolo do fabricante. Os limites mínimo e máximo de sensibilidade informado pelo fabricante são de 50 $\mu$ g/dL, e 800 $\mu$ g/dL, respectivamente. O cociente de variação intraensaio foi de 1,5% e o coeficiente de variação interensaio foi de 3,1%, foi utilizado o ponto de 100 $\mu$ g/dL da curva padrão para o para o cálculo interensaio.

### **3.7 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o teste t não pareado ou *Mann Whitney*, somente foram considerados estaticamente significativos os valores

de  $p < 0,05$ . Todos os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão e, quando apropriado, são também mostrados experimentos representativos. Os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 4 (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Quantificação da concentração sérica de triiodotironina total.

O modelo utilizado para a indução de hipertiroidismo foi eficiente, uma vez que resultou no aumento da concentração sérica de T<sub>3</sub> total de maneira significativa nos camundongos de ambos os sexos, aproximadamente 3,8 vezes em machos e de 3,2 vezes em fêmeas (p=0,0001 e p=0,0004, respectivamente, teste T não pareado).

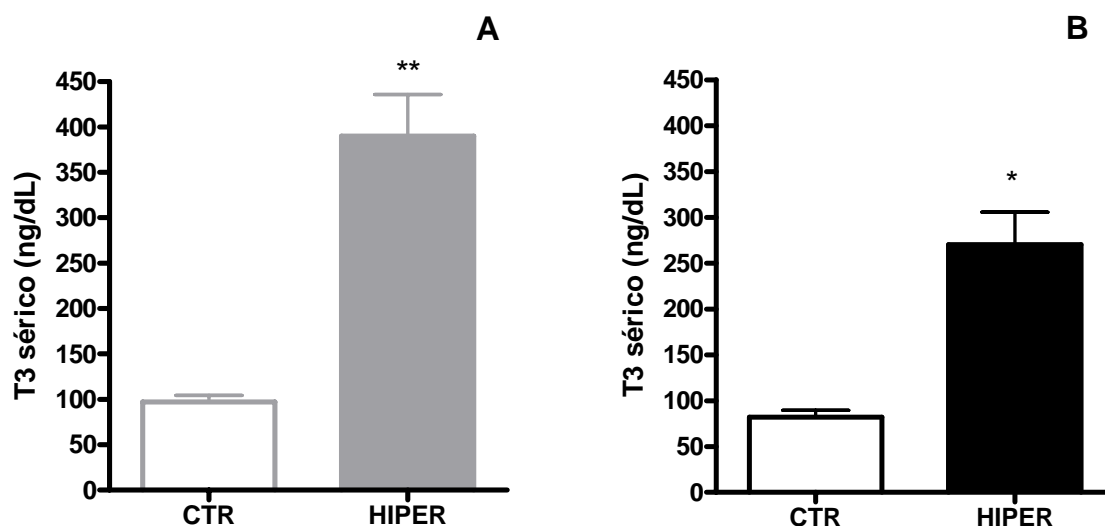


Figura 6: Concentração sérica de T<sub>3</sub> total em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T<sub>3</sub> 5µg/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Os valores correspondem à média ± erro padrão de 9 experimentos independentes para ambos os sexos; \*\*p=0,0001, \* p=0,0004 em relação ao grupo controle, teste T paramétrico não pareado



## 4.2 Efeito do hipertireoidismo sobre o peso do baço.

Os animais hipertireóides apresentaram aumento significativo do peso esplênico (figura 7). Este incremento foi observado em camundongos de ambos os sexos, em machos o excesso de T<sub>3</sub> induz um aumento de 2 vezes o peso do baço, já nas fêmeas este aumento é menor acentuado, cerca de 1,4 vez ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0006$ ; respectivamente, teste T não pareado).

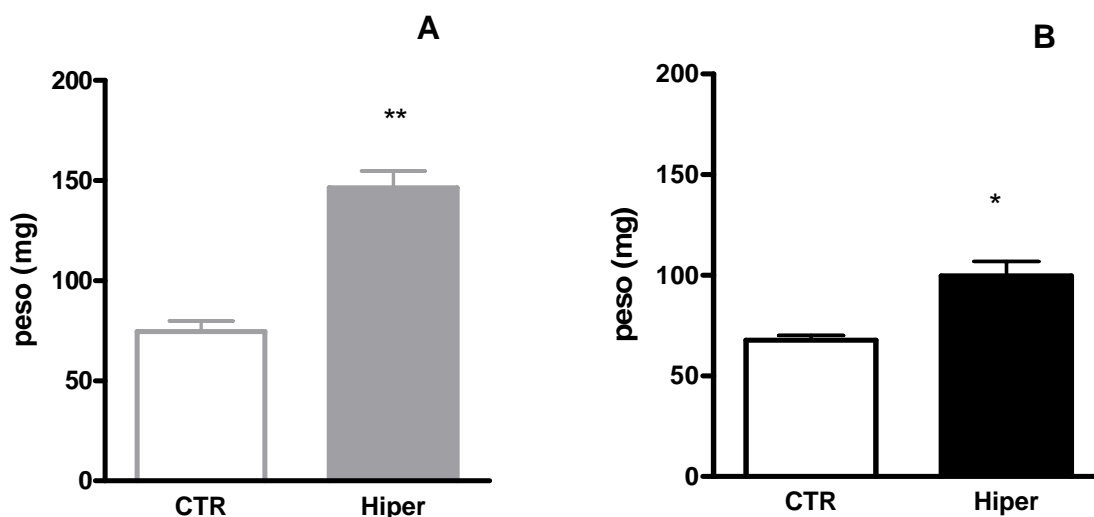


Figura 7: Peso do baço em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T<sub>3</sub> 5µg/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15º dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Os valores correspondem à média ± erro padrão, de 9 experimentos independentes para ambos os sexos; \*\* $p < 0,0001$ , \* $p = 0,0006$  em relação ao grupo controle, teste T não-pareado.

### 4.3 Efeito do hipertireoidismo sobre a celularidade do baço.

O peso do baço aumentou significativamente em camundongos hipertireóides de ambos os sexos (figura 7), contudo o incremento da celularidade esplênica só foi significativo nos camundongos machos (cerca de 1,5 vez,  $p=0,038$ , teste de T não pareado). As fêmeas hipertireóides apresentam tendência ao aumento da celularidade, contudo este não foi significativo (figura 8).

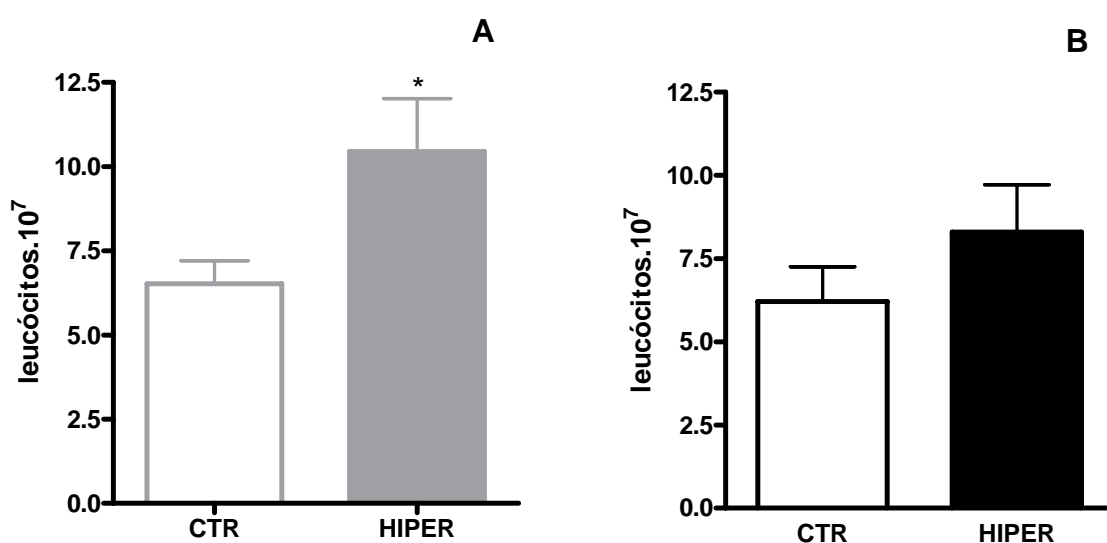


Figura 8: Celularidade dos leucócitos esplênicos em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T<sub>3</sub> 5μg/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Os valores correspondem à média ± erro padrão de 8 experimentos independentes para machos e 9 para fêmeas; \* $p=0,038$  em relação ao grupo controle, teste T não-pareado.

#### 4.4 População de hemácias do baço de camundongos hipertireóideos.

Ao avaliar o número de hemácias do baço observamos tendência ao aumento da celularidade nos machos e nas fêmeas hipertireóideos (aumento de aproximadamente 1,4 vez e 2,3 vezes, respectivamente). Contudo somente nas fêmeas hipertireóideas o aumento foi significativo ( $p=0,0213$ , teste T paramétrico e não pareado, figura 9).

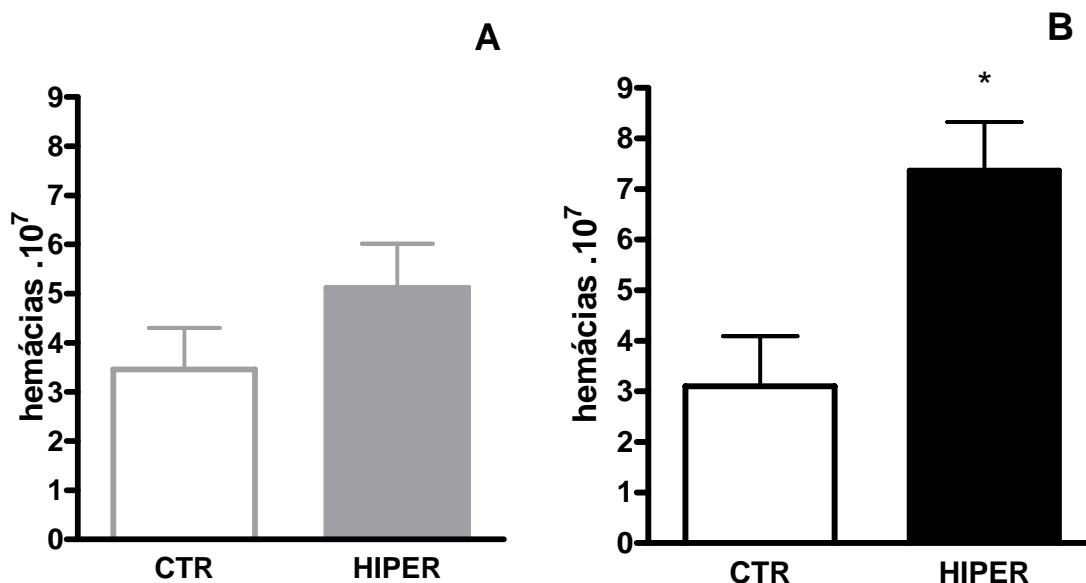


Figura 9: Número de hemácias do baço em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T<sub>3</sub> 5µg/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Os valores correspondem a média ± erro padrão de 5 experimentos independentes para machos e 4 para fêmeas; \* $p= 0,0213$ , teste T paramétrico e não-pareado .

#### 4.4 População de linfócitos B esplênicos de animais hipertireóideos.

A fim de avaliar a influência do hipertireoidismo sobre a população de células do sistema imunológico em órgãos linfóides secundários, investigamos a proporção de linfócitos B esplênicos em relação ao total de leucócitos do baço.

Os machos hipertireóideos apresentaram redução significativa da proporção de linfócitos B esplênicos (aproximadamente 10% menor,  $p=0,026$ , teste *Mann Whitney*, figuras 10 e 11). Apesar de padrão semelhante ter sido observado nas fêmeas hipertireóideas, não houve alteração significativa na proporção de linfócitos B destas (figuras 10 e 11).

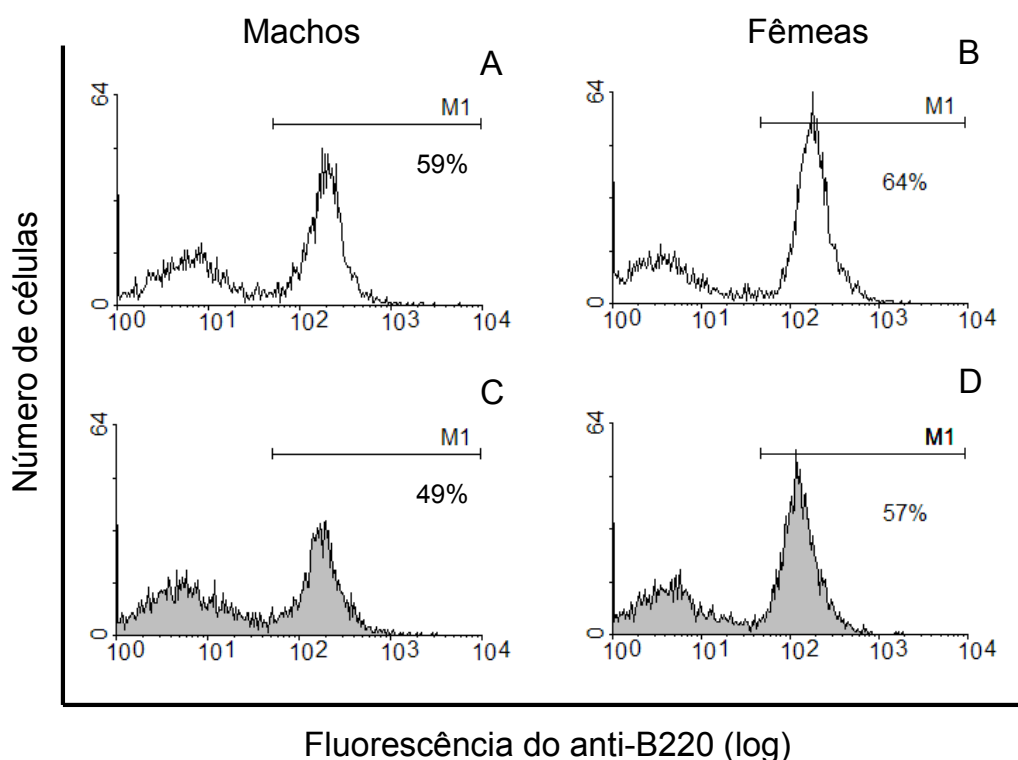


Figura 10: Expressão de B220 (CD45) em esplenócitos de camundongos machos (painéis A e C) e fêmeas (painéis B e D). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g}$  PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. Animais do grupo controle (painéis A e B); animais sob tratamento (painéis C e D). A figura corresponde a experimento representativo de 6 experimentos independentes para machos e 7 animais para fêmeas. M1 corresponde a região com fluorescência correspondente a marcação específica do anticorpo

associado ao fluorocromo. Valores correspondem à porcentagem da população de esplenócitos B220 positivos (CD45<sup>+</sup>), linfócitos B.

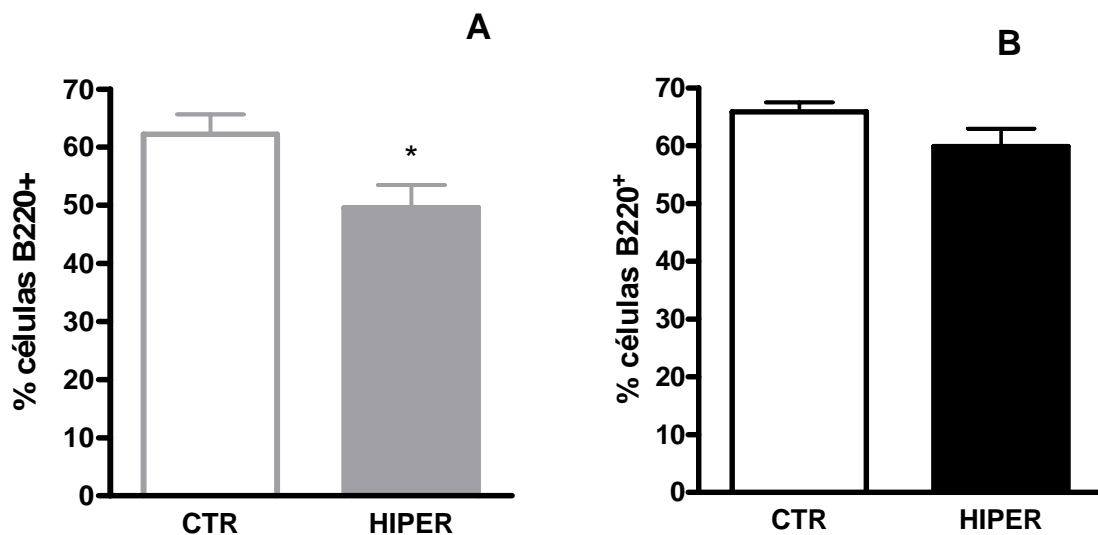


Figura 11: Expressão de B220 (CD45) em relação à população total de esplenócitos de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T<sub>3</sub> 5µg/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Valores correspondem a média ± erro padrão de 6 experimentos independentes para machos e 7 para fêmeas. \*p=0,026 em relação ao grupo controle, teste *Mann Whitney*.

#### 4.5 População de linfócitos T esplênicos de animais hipertireóideos.

Como o excesso de  $T_3$  foi capaz de modular a proporção de linfócitos B esplênicos em relação ao total de esplenócitos, avaliamos se o hipertireoidismo também exerceria efeito imunomodulatório sobre as proporções de linfócitos T auxiliares e citotóxicos do baço.

Camundongos machos e fêmeas hipertireóideos apresentam as proporções de linfócitos T auxiliares (figuras 12 e 14) e citotóxicos (figuras 13 e 15) semelhantes ao observado nos indivíduos eutireóideos.

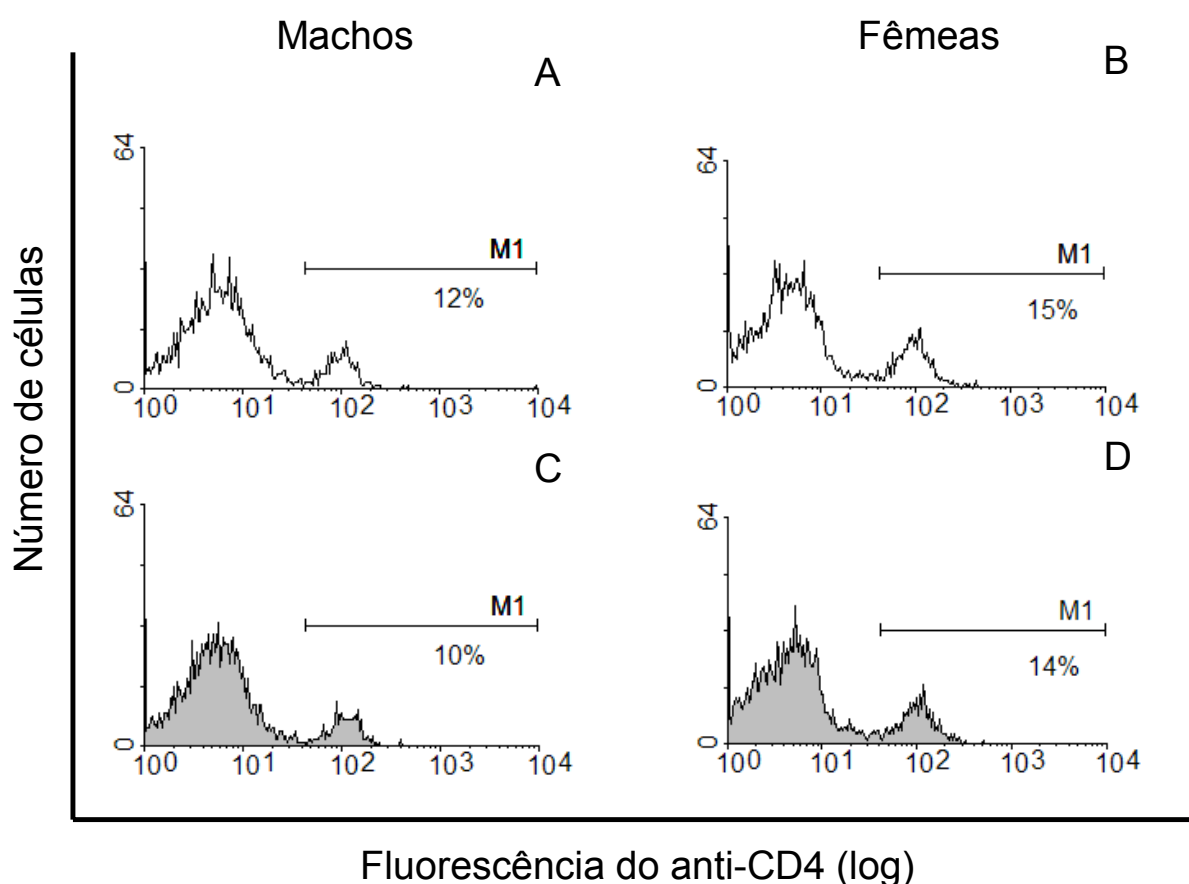


Figura 12: Expressão de CD4 em esplenócitos de camundongos machos (painéis A e C) e fêmeas (painéis B e D). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$  5 $\mu$ g/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (painéis A e B); HIPER-animais sob tratamento (painéis C e D). Figura corresponde a experimento representativo de 4 experimentos independentes para machos e 5 para fêmeas. M1 corresponde a região com fluorescência correspondente a marcação específica do anticorpo associado ao fluorocromo. Valores correspondem à porcentagem da população de esplenócitos CD4 positivos, linfócitos T auxiliares.

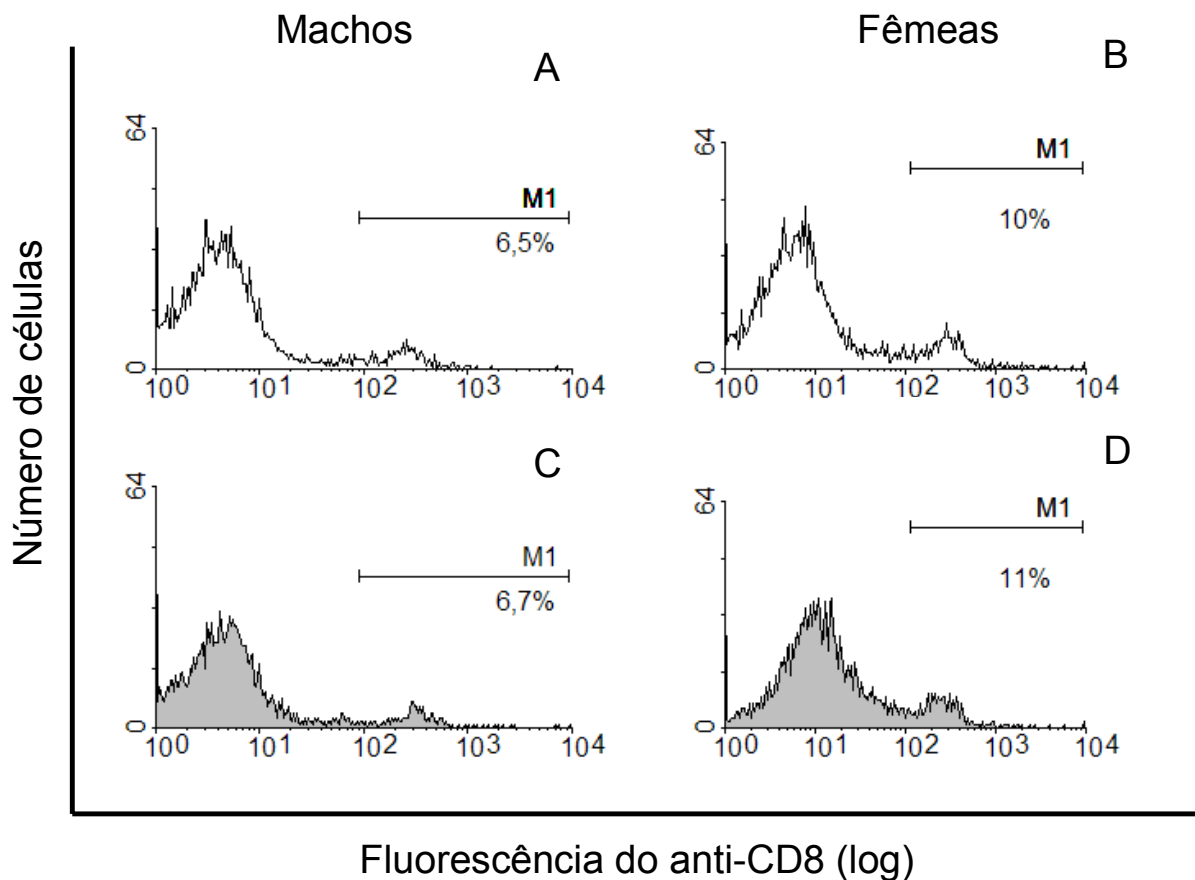


Figura 13: Expressão de CD8 em esplenócitos de camundongos machos (painéis A e C) e fêmeas (painéis B e D). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$  5 $\mu$ g/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (painéis A e B); HIPER-animais sob tratamento (painéis C e D). Figura corresponde a experimento representativo de 4 experimentos independentes para machos e 5 para fêmeas. M1 corresponde a região com fluorescência correspondente a marcação específica do anticorpo associado ao fluorocromo. Valores correspondem à porcentagem da população de esplenócitos CD8 positivos, linfócitos T citotóxicos.

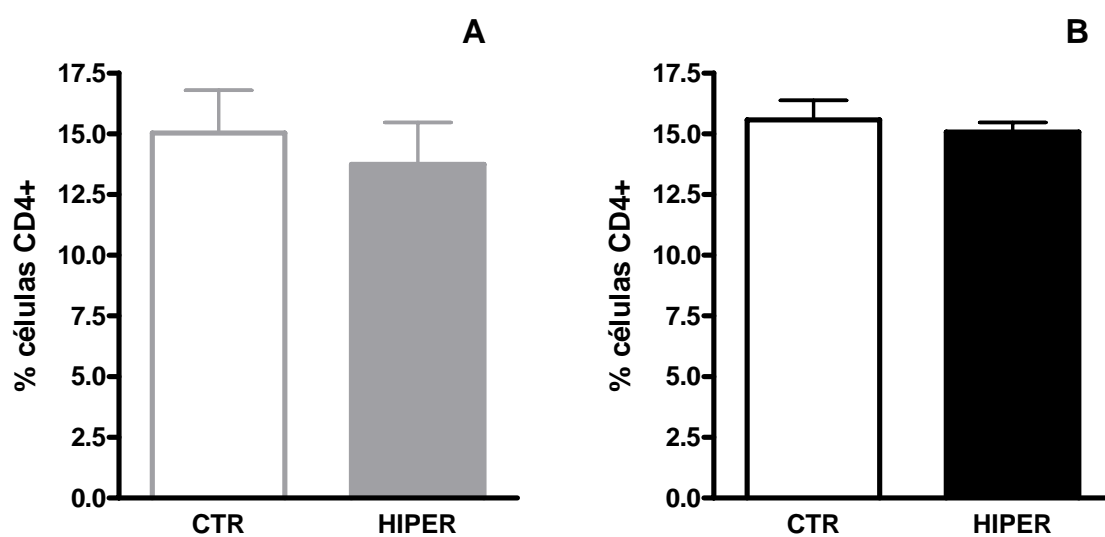


Figura 14: Expressão de CD4 (linfócitos T auxiliares) em esplenócitos de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g}$  PC/dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos independentes para machos e 5 para fêmeas.

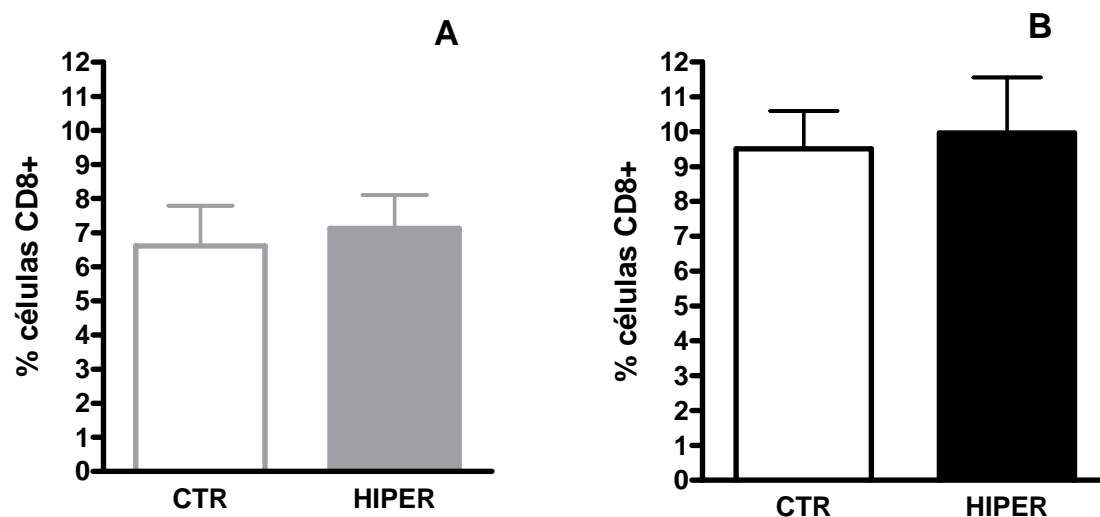


Figura 15: Expressão de CD8 (linfócitos T citotóxicos) em esplenócitos de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g}$  PC/dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos independentes para machos e 5 para fêmeas.



#### 4.7 Efeito do hipertireoidismo sobre o peso do linfonodo.

Como o hipertireóidismo foi capaz de induzir aumento do peso esplênico, avaliamos se este efeito seria restrito ao baço ou comum aos demais órgãos linfóides secundários, como os linfonodos mesentéricos.

O hipertireoidismo parece não modular o peso do linfonodo mesentéricos em camundongos de ambos os sexos, contudo há tendência ao aumento do peso em machos (figura 16).

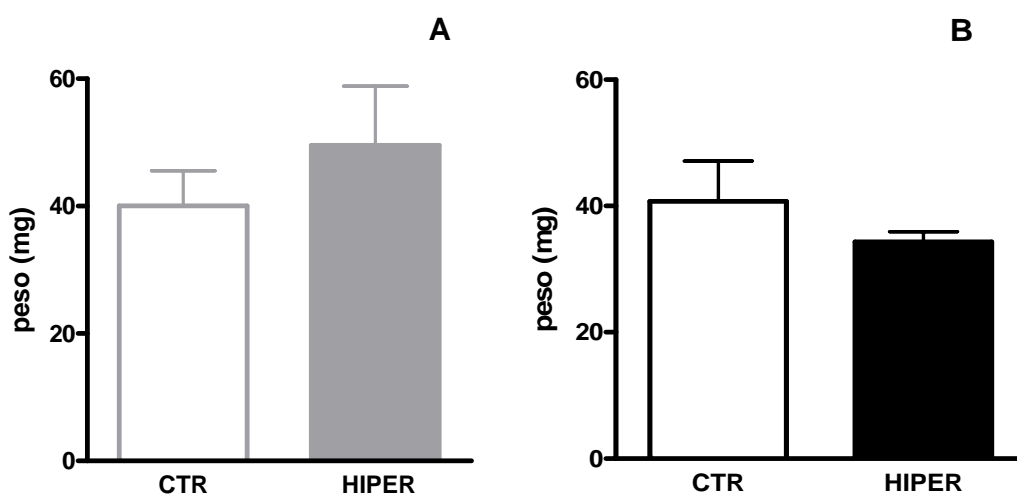


Figura 16: Peso dos linfonodos mesentéricos em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g PC/ dia}$ , sc, durante 14 dias, sacrificados no 15º dia, com idades entre 36 e 46 dias. Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos independentes para cada grupo em ambos os sexos.

#### 4.8 Efeito do hipertireoidismo sobre a celularidade do linfonodo.

Assim como ocorreu em relação ao peso dos linfonodos mesentéricos, a celularidade dos animais hipertireóides foi semelhante à dos animais eutireóides em camundongos machos e fêmeas (figura 17).

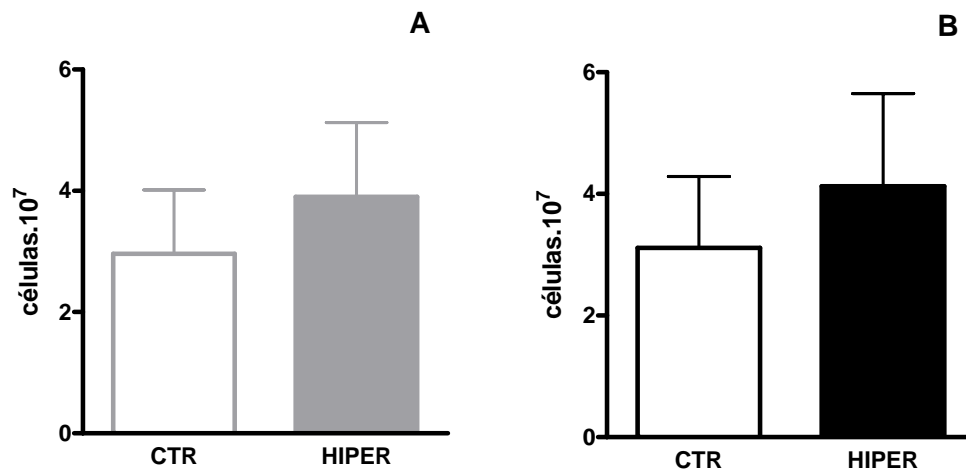


Figura 17: Celularidade dos linfonodos mesentéricos em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T<sub>3</sub> 5µg/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. Os valores correspondem a média ± erro padrão de 5 experimentos independentes para cada grupo em ambos os sexos.

#### 4.9 População de linfócitos B do linfonodo de camundongos hipertireóides .

O hipertireoidismo parece não afetar a proporção de linfócitos B em relação ao total de linfócitos residentes do linfonodo mesentérico tanto em fêmeas como em machos (figura 18 e 19).

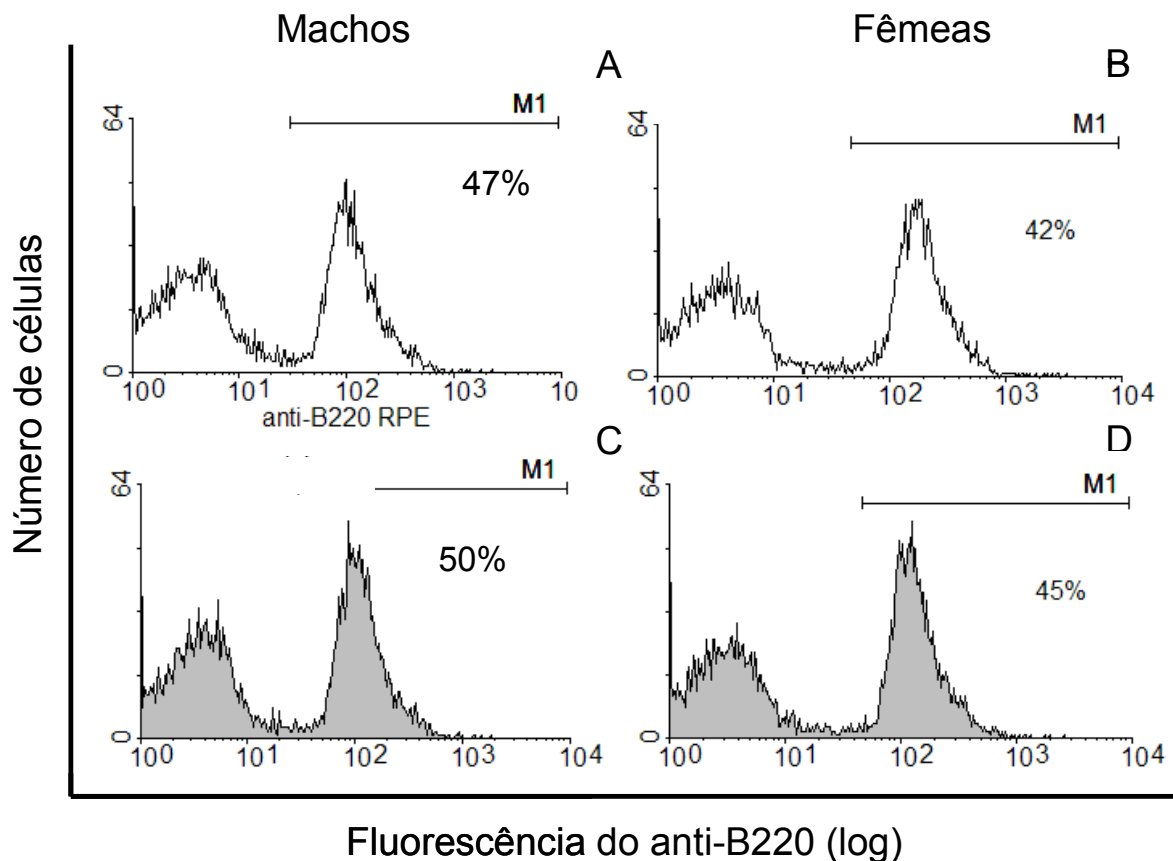


Figura 18: Expressão de B220 (CD45) em linfócitos do linfonodo de camundongos machos (painéis A e C) e fêmeas (painéis B e D). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$  5 $\mu$ g/10g PC/dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (painéis A e B); HIPER-animais sob tratamento (painéis C e D). Figura corresponde a experimento representativo de 5 experimentos independentes para machos e 4 para fêmeas. M1 corresponde a região com fluorescência correspondente a marcação específica do anticorpo associado ao fluorocromo. Os valores correspondem à porcentagem da população de esplenócitos B220 positivos (CD45<sup>+</sup>), linfócitos B.

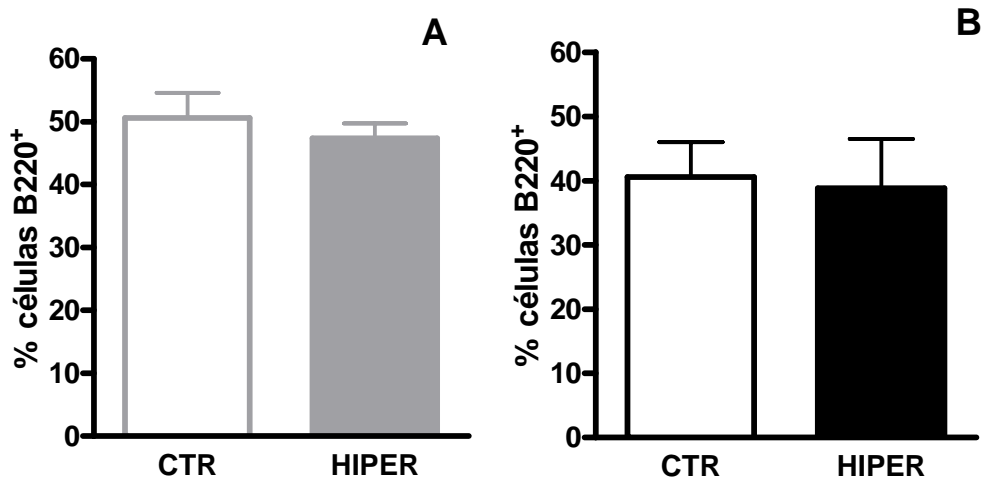


Figura 19: Expressão de B220 (CD45) em linfócitos do linfonodo de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$  5 $\mu$ g/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos independentes para cada grupo em machos e 4 experimentos independentes para cada grupo em fêmeas.

#### 4.9 População de linfócitos T do linfonodo de camundongos hipertireóides .

A proporção da população de linfócitos T originários do linfonodo de camundongos de ambos os sexos (figuras 20 a 23) parece não ser afetada pelo hipertireoidismo, assim como observado para linfócitos T esplênicos (figuras 11 a 14), apesar da tendência à redução da proporção de linfócitos T auxiliares e citotóxicos em camundongos fêmeas hipertireóides (figuras 20 a 23, painel B e D).

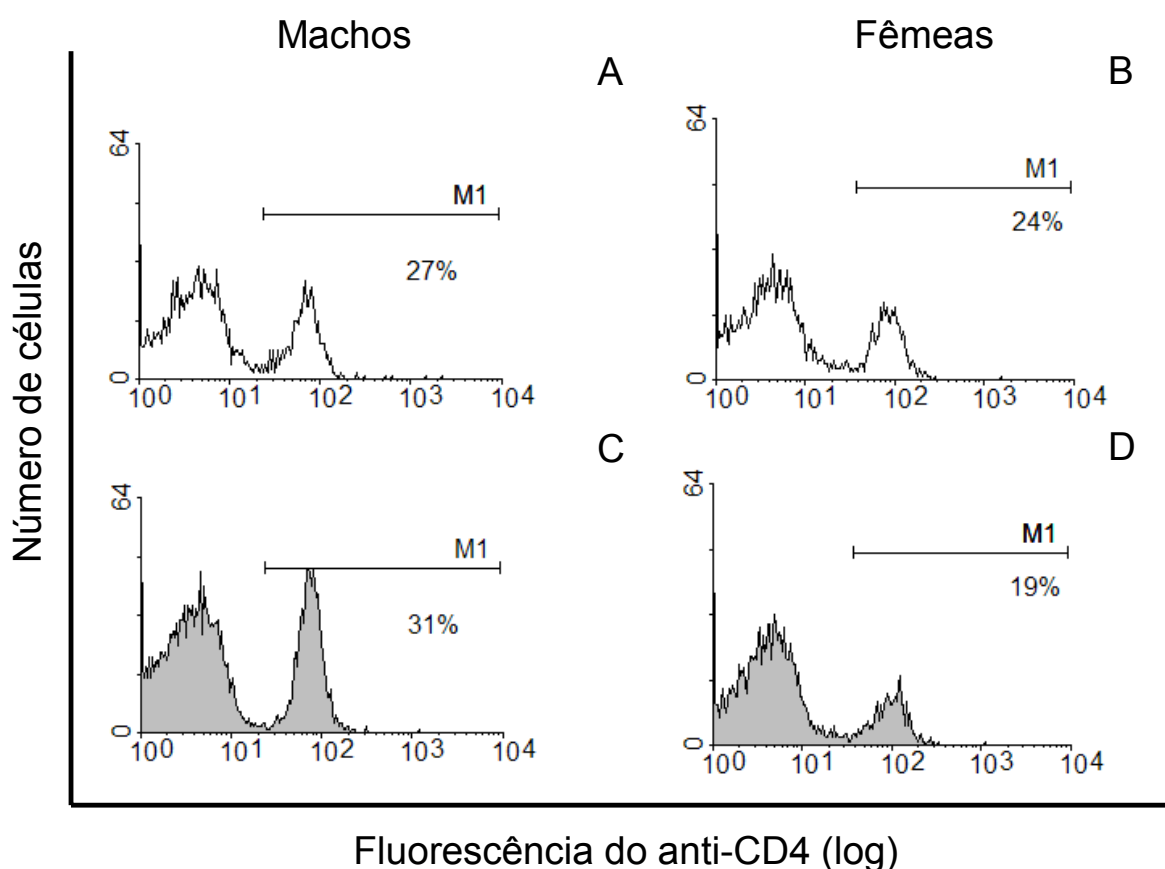


Figura 20: Expressão de CD4 em linfócitos do linfonodo mesentérico de camundongos machos (painéis A e C) e fêmeas (painéis B e D). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g}$  PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15º dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (painéis A e B); HIPER-animais sob tratamento (painéis C e D). A figura corresponde a experimento representativo de 4 experimentos independentes para machos e 3 para fêmeas. M1 corresponde a região com fluorescência correspondente a marcação específica do anticorpo associado ao fluorocromo. Os valores correspondem à porcentagem da população de esplenócitos CD4 positivos, linfócitos T auxiliares.

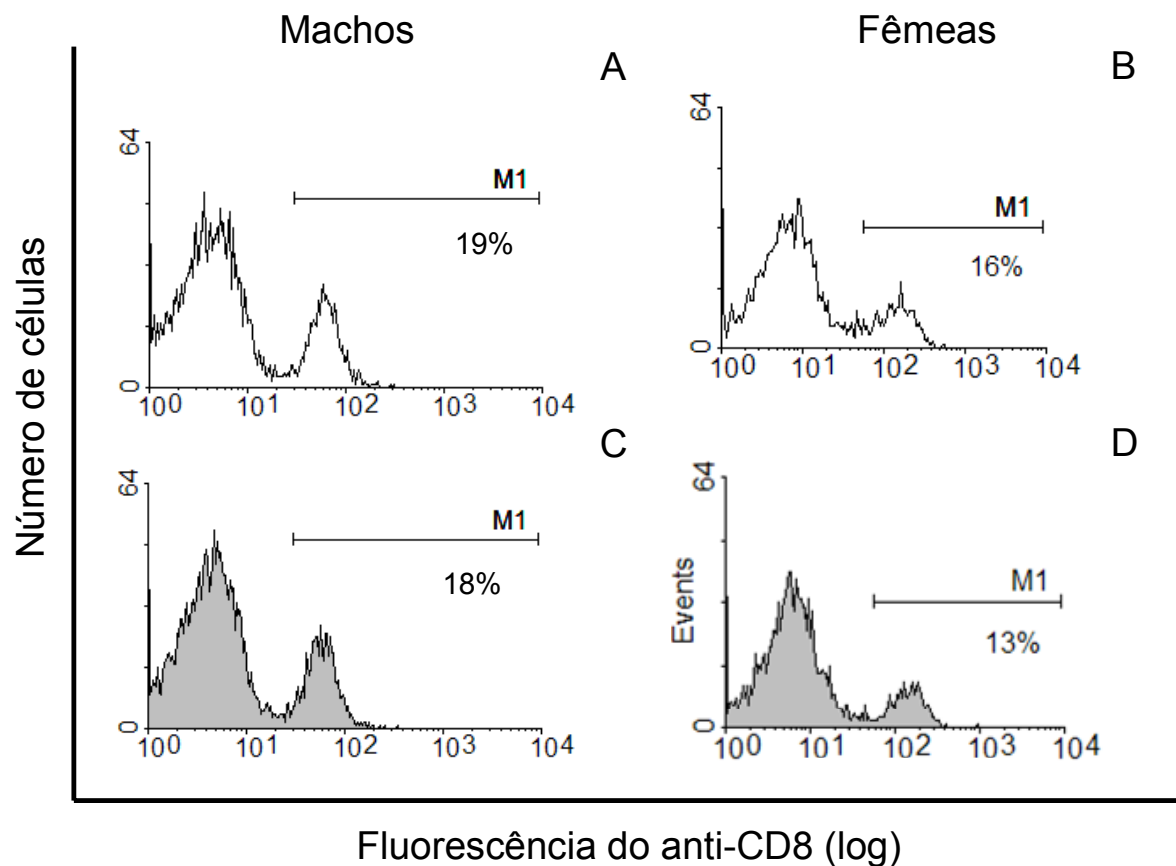


Figura 21: Expressão de CD8 em linfócitos do linfonodo mesentérico de camundongos machos (painéis A e C) e fêmeas (painéis B e D). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g PC}/\text{dia}$ , sc, durante 14 dias, sacrificados no 15º dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (painéis A e B); HIPER-animais sob tratamento (painéis C e D). A figura corresponde a experimento representativo de 4 experimentos independentes para machos e 3 para fêmeas. M1 corresponde a região com fluorescência correspondente a marcação específica do anticorpo associado ao fluorocromo. Valores correspondem à porcentagem da população de esplenócitos CD8 positivos, linfócitos T citotóxicos.

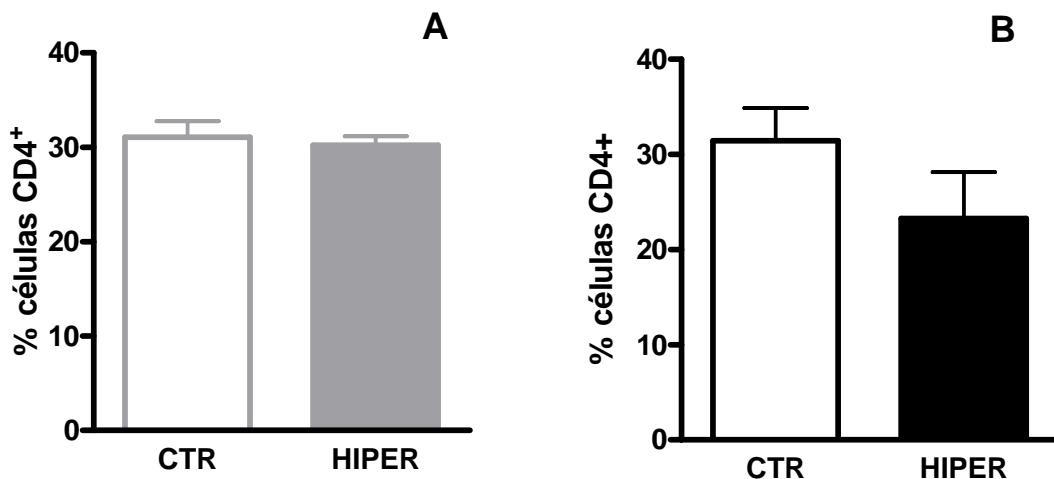


Figura 22: Expressão de CD4 em linfócitos do linfonodo mesentérico de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$  5 $\mu$ g/10g PC/dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos independentes para machos e 3 experimentos independentes para fêmeas.

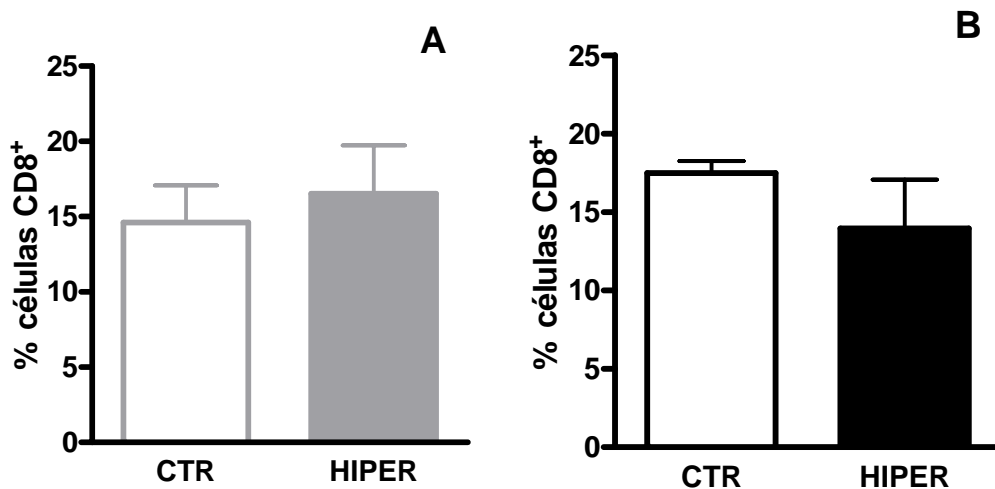


Figura 23: Expressão de CD8 em linfócitos do linfonodo mesentérico de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$  5 $\mu$ g/10g PC/dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos independentes para cada grupo em machos e 3 experimentos independentes para cada grupo em fêmeas.

#### 4.10 Efeito do hipertireoidismo sobre o peso do timo.

Os machos hipertireóides apresentaram aumento significativo no peso do timo (cerca de 1,2 vez,  $p=0,061$ , teste T não pareado), contudo este parâmetro parece não ser afetado nas fêmeas hipertireóides (figura 24).

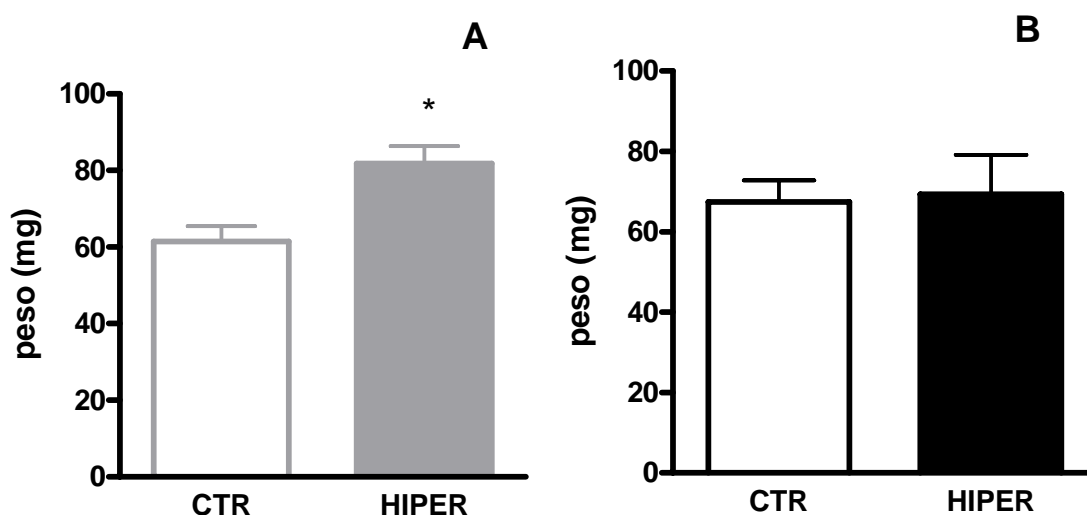


Figura 24: Peso do timo em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g PC/ dia, sc}$ , durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 8 experimentos independentes em ambos os sexos. \* $p=0,0061$ , teste T não pareado.



#### 4.11 Efeito do hipertireoidismo sobre a celularidade do timo.

A celularidade do timo (figura 25) em resposta ao hipertireoidismo apresentou o mesmo padrão observado em relação ao peso deste órgão em ambos os sexos (figura 24). A celularidade dos camundongos machos hipertireóides estava significativamente aumentada em relação aos animais controle (cerca de 1,9 vez,  $p=0,0287$ , teste T não pareado). Em fêmeas o hipertireoidismo parece não induzir alterações na celularidade tímica (figura 25).

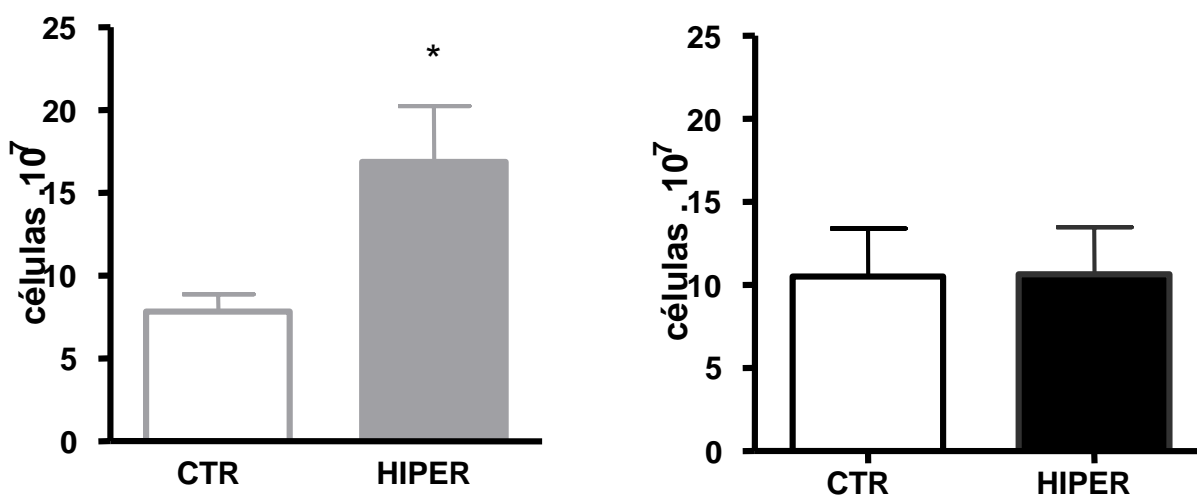


Figura 25: Celularidade do timo em camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T3 5 $\mu$ g/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia). Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos independentes para machos e 5 para fêmeas; \*  $p=0,0287$ , teste T não pareado.

#### **4.12 Influência do hipertireoidismo sobre as subpopulações de timócitos.**

Como o hipertireoidismo constitui um estímulo trófico ao timo de machos (figuras 24 e 25) avaliamos se este seria capaz de influir no processo de maturação tímica modulando a proporção das subpopulações de timócitos duplo negativo, duplo positivo e simples positivo em relação ao total de timócitos.

Camundongos machos e fêmeas hipertireóides não apresentaram alteração na proporção das subpopulações de timócitos duplo negativo, duplo positivo e simples positivo em relação ao total de timócitos (figuras 26 e 27).

A correlação entre a proporção de cada subpopulação (figuras 26 e 27) e a celularidade tímica (figura 25) permite avaliar o número absoluto de timócitos em cada um dos estágios de maturação (figura 28). Este parâmetro revelou aumento de todas as subpopulações do timo de camundongos machos, contudo de maneira significativa somente nas subpopulações duplo positivo (2,1 vezes,  $p=0,026$  teste *Mann Whitney*) e simples positivo  $CD8^+$  (1,9 vez,  $p=0,026$  teste *Mann Whitney*); o aumento médio dos demais grupos foi na mesma faixa, contudo, devido a maior variabilidade, não chegaram a ter expressão estatística. As fêmeas hipertireóides não apresentaram alterações do número absoluto das subpopulações de timócitos com expressão estatística (figura 28, painel B).

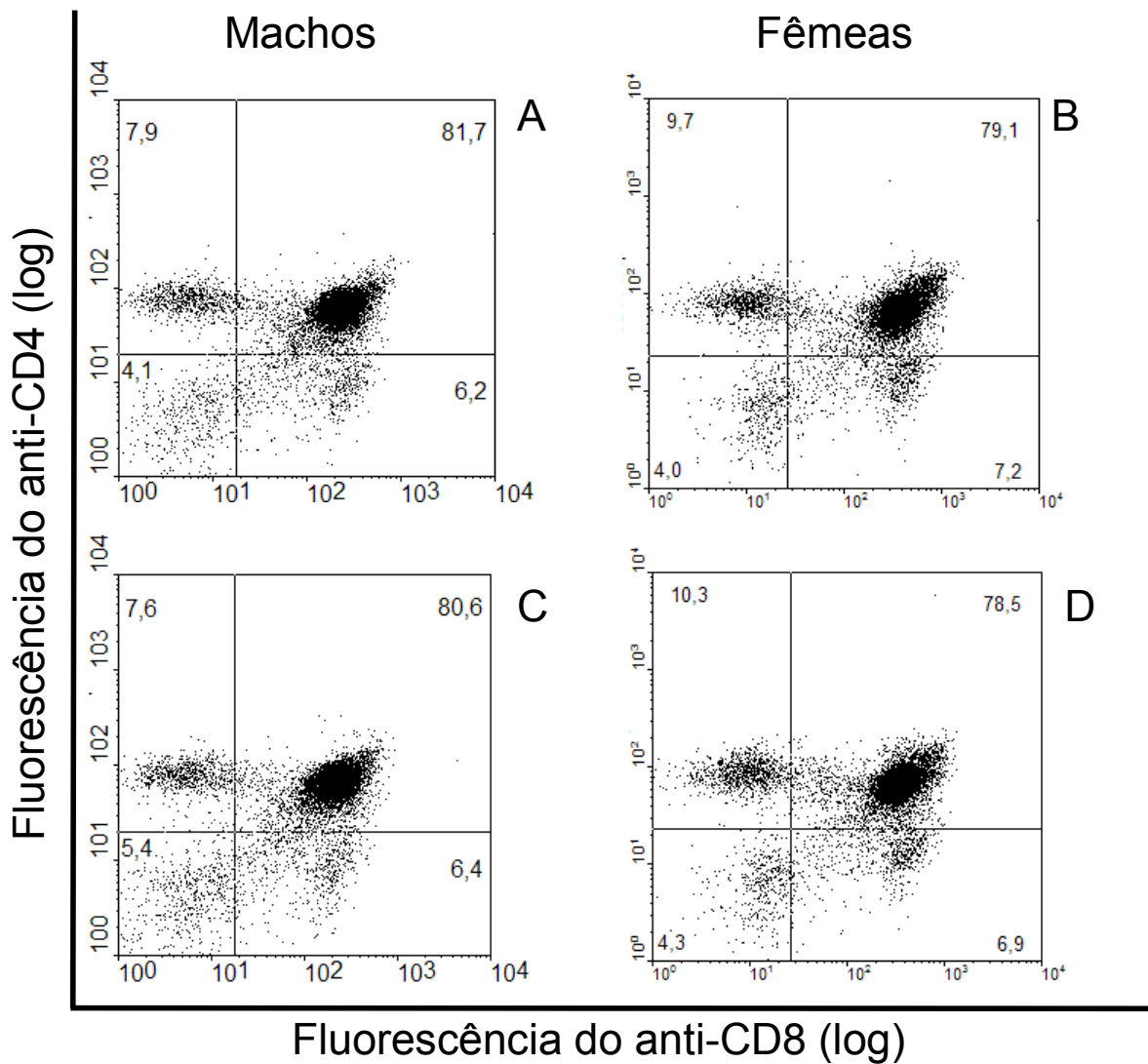


Figura 26: Expressão de CD4 e CD8 em timócitos de camundongos machos (painéis A e C) e fêmeas (painéis B e D). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g PC}/\text{dia}$ , sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. Animais do grupo controle (painéis A e B); animais sob tratamento (painéis C e D), quadrante esquerdo baixo: timócitos duplo negativo ( $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ ); quadrante direito alto: timócitos duplo positivos ( $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ ); quadrante esquerdo alto: timócitos simples positivos CD4 ( $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ ), quadrante direito baixo: timócitos simples positivos CD8 ( $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ ). A figura corresponde a experimento representativo de 6 experimentos independentes para machos e 4 experimentos independentes para fêmeas.

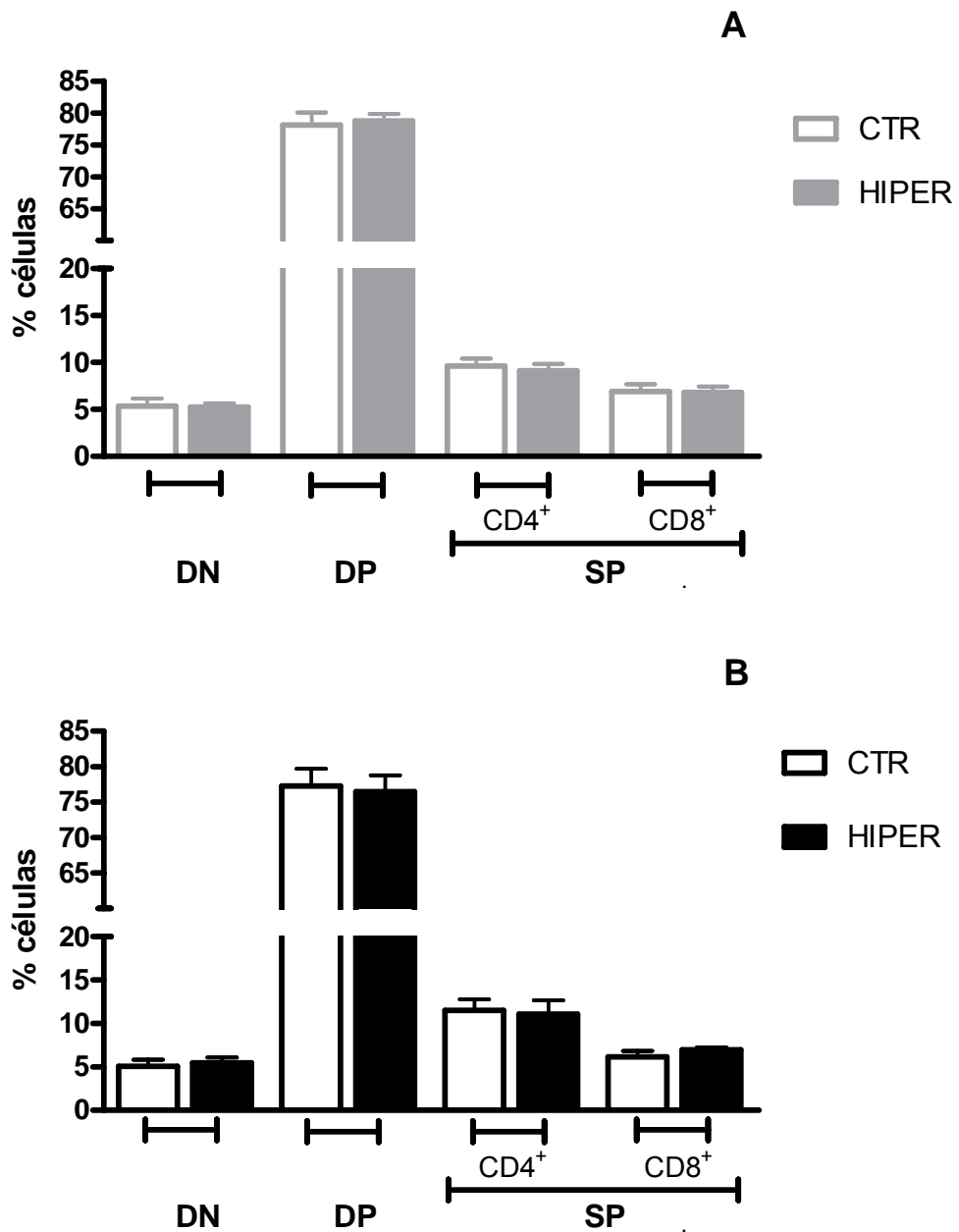


Figura 27: Expressão de CD4 e CD8 em timócitos de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$   $5\mu\text{g}/10\text{g}$  PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia); DN: timócitos duplo negativo ( $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ ); DP: timócitos duplo positivos ( $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ ); SP: timócitos simples positivos ( $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$  ou  $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ ). Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos independentes para machos e 4 experimentos independentes para fêmeas.

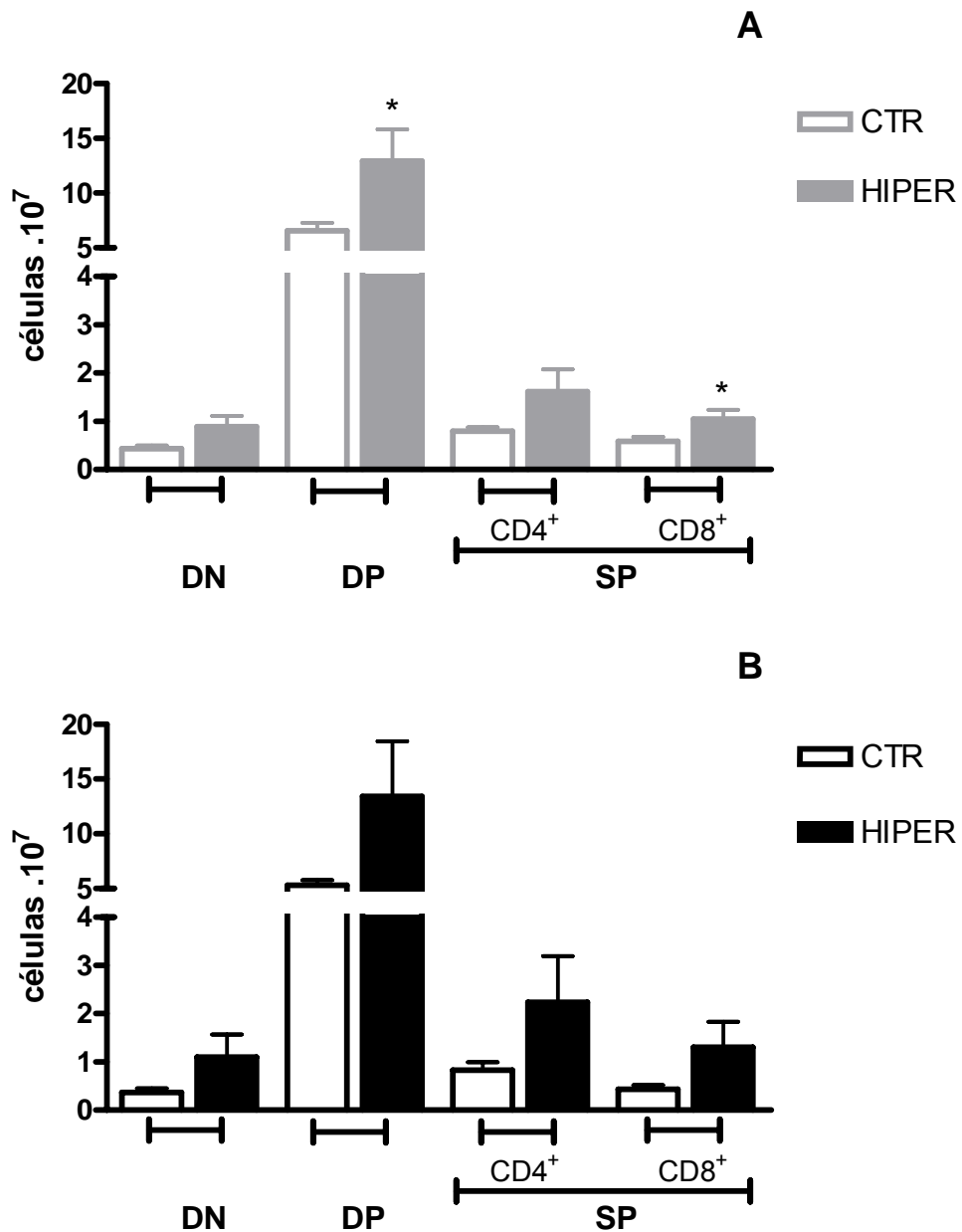


Figura 28: Número absoluto da subpopulação de timócitos em relação a expressão de CD4 e CD8 em timócitos de camundongos machos (painel A) e fêmeas (painel B). Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com  $T_3$  5 $\mu$ g/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15<sup>o</sup> dia, com idades entre 36 e 46 dias. CTR-animais do grupo controle (coluna vazada); HIPER-animais sob tratamento (coluna cheia); DN: timócitos duplo negativo ( $CD4^-CD8^-$ ); DP: timócitos duplo positivos ( $CD4^+CD8^+$ ); SP: timócitos simples positivos ( $CD4^+CD8^-$  ou  $CD4^-CD8^+$ ). Os valores correspondem a média  $\pm$  erro padrão de 6 experimentos independentes para machos e 4 experimentos independentes para fêmeas; \* $p=0,026$ , teste *Mann Whitney*.

A tabela abaixo resume todos os resultados obtidos.

Baço	Machos		Fêmeas	
	controle	hipertireóideo	controle	hipertireóideo
Peso (mg)	76±5	147±8***	68±2	100±7**
Celularidade dos leucócitos (células.10 <sup>7</sup> )	7±1	10±2*	6±1	8±1
Expressão de B220 (%)	62±3	50±4*	66±2	60±3
Expressão de CD4 (%)	15±2	14±2	16±1	15±0,4
Expressão de CD8 (%)	8±2	8±1	10±1	10±2
Celularidade dos eritrócitos (células.10 <sup>7</sup> )	4±1	5±1	3±1	7±1*
<b>Linfonodos Mesentéricos</b>				
Linfonodos Mesentéricos	Machos		Fêmeas	
	controle	hipertireóideo	controle	hipertireóideo
Peso (mg)	40±5	50±9	41±6	34±2
Celularidade (células.10 <sup>7</sup> )	3±1	3±1	3±1	4±2
Expressão de B220 (%)	51±4	47±2	50±2	40±16
Expressão de CD4 (%)	34±3	3±1	31±3	23±5
Expressão de CD8 (%)	15±3	17±3	18±1	14±3
<b>Timo</b>				
Timo	Machos		Fêmeas	
	controle	hipertireóideo	controle	hipertireóideo
Peso (mg)	63±4	78±6	67,4±5,4	69,3±9,8
Celularidade dos tímócitos (células.10 <sup>7</sup> )	8±1	15±3	10,5±2,9	10,7±2,8
Expressão de CD4/8 (%) - subpopulações				
Duplo Negativa CD4-CD8- (%)	5±1	5±0,4	5±1	6±1
Duplo Positiva CD4+CD8+ (%)	78±2	79±1	77±2	77±2
Simples Positiva CD4+CD8- (%)	10±1	9±1	12±1	11±2
Simples Positiva CD4-CD8+ (%)	7±1	7±1	6±1	7±0,3
Número absoluto (células.10 <sup>7</sup> ) – subpopulações				
Duplo Negativa CD4-CD8-	0,4±0,1	0,9±0,2	0,4±0,09	1±0,5
Duplo Positiva CD4+CD8+	7±0,1	13±3*	5±0,5	13±5
Simples Positiva CD4+CD8-	0,6±0,1	2±0,5	0,8±0,2	2±1
Simples Positiva CD4-CD8+	0,6±0,1	1,1±0,07*	0,4±0,08	1±1

Tabela 1 – Resumo dos resultados. Animais com idades entre 21 e 31 dias tratados com T<sub>3</sub> 5µg/10g PC/ dia, sc, durante 14 dias, sacrificados no 15º dia, com idades entre 36 e 46 dias. \*p<0,05; \*\* p=0,0006; \*\*\*p<0,0001 valores de significância em relação ao grupo controle correspondentes do mesmo sexo.

## 5. DISCUSSÃO

Estudos correlacionando a glândula tireóide, os hormônios tireoideanos com o sistema imunológico existem há mais de um século, contudo esta interação ainda é pouco clara (Axelrod e Berman, 1951; Shrewsbury e Reinhardt, 1955; Alexander e Bisset, 1961). Os HT influenciam diversos parâmetros da fisiologia imunológica como a fisiologia tímica (Savino e Dardenne, 2000), a hematopoiese (Foster *et al*, 1999; Dorshkind e Horseman, 2000; Arpin *et al*, 2000; Grymula *et al*, 2007), além da modulação de órgãos linfóides secundários e de células maduras (Klecha *et al*, 2006 Nakamura *et al*, 2007; Yao *et al*, 2007, Mascanfroni *et al*, 2008).

Células e órgãos do sistema imunológico contêm TR, demonstrando a possibilidade de influência direta dos HT sobre este sistema. A expressão das diferentes isoformas de TR varia de acordo com a fase de desenvolvimento e estado de maturação em que as células do sistema imunológico se encontram (Villa-Verde *et al*, 1992; Hastings *et al*, 1997, Mascanfroni *et al*, 2008). Neste contexto, a expressão de TR $\alpha$ 1 oscila ao longo do processo de maturação do linfócitos B, sem contudo apresentar um padrão claro (Hastings *et al*, 1997). Células dendríticas maduras e imaturas, assim como as células epiteliais tímicas expressam TR $\beta$ 1 em maior quantidade que o TR $\alpha$ 1 (Villa-Verde *et al*, 1992; Mascanfroni *et al*, 2008). Células precursoras hematopoéticas humanas, CD34<sup>+</sup>, também expressam TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 (Grymula *et al*, 2007). Além disso, células mononucleares do sangue periférico apresentam um aumento da expressão do RNAm de TR $\alpha$ 1 após o transplante de medula óssea (Omazic *et al*, 2001).

A influência dos HT sobre o sistema imunológico foi demonstrada em estudos com modelos experimentais deficientes para hormônios tireóideos e TR, estes apresentaram quadros de depleção imunológica (Dorshkind e Horseman, 2000;

Arpin *et al*, 2000; Foster *et al*, 1999). Em animais *Snell dwarf* (*dw/dw*), que apresentam mutação no fator de transcrição *pit 1*, o que causa deficientes na produção de prolactina, hormônio do crescimento, TSH e HT, o timo é hipoplásico e apresenta redução da população de timócitos duplo positivo; a linfopoiese B também é afetada, com redução da frequência de células B220 positivas, além da depressão da resposta humoral a antígenos dependentes da resposta T (Dorshkind e Horseman, 2000).

Animais hipotireóideos e *Pax8<sup>-/-</sup>* (modelo de hipotireoidismo congênito) apresentam o baço mais leve e hipoplásico, quando comparados a animais eutireoideos, e o tratamento com HT é capaz de induzir aumento destes parâmetros (Angelin-Duclos *et al*, 2004; Nakamura *et al*, 2007). Esses trabalhos demonstraram a importância dos HT para a manutenção do peso e celularidade esplênica dentro da faixa de normalidade, neste contexto decidimos investigar a influência do excesso de HT sobre esses parâmetros do baço.

O presente trabalho demonstrou que o hipertireoidismo foi capaz de induzir aumento do peso e celularidade esplênica. Entretanto estes efeitos foram mais marcantes nos machos, levando a crer que há algum fator associado ao sexo que influencie as ações dos HT no sistema imunológico.

A associação dos estudos anteriores em animais hipotireóideos e dos dados aqui reportados levam a crer que os HT constituem potente estímulo trófico ao baço murino, visto que em situações de depleção e excesso deste hormônio o peso e a celularidade do baço reduz e aumenta, respectivamente.

Visto que o excesso de HT foi capaz de induzir hiperplasia e hipertrofia do baço avaliamos se estes parâmetros estavam associados à modulação das populações linfocitárias esplênicas.



Nossos dados demonstraram que o excesso de HT foi capaz de reduzir significativamente a população de linfócitos B maduros e imaturos, B220<sup>+</sup>, residentes do baço em machos. Contudo, nas fêmeas, a proporção destes linfócitos não apresentou redução significativa, demonstrando a hipótese que a influência dos HT sobre o baço está associada a fatores ligados ao sexo.

Em relação à população de linfócitos B esplênicos em animais hipotireóideos e TR $\alpha$ <sup>-/-</sup> estudos anteriores demonstram a redução da proporção destes em relação ao total de esplenócitos (Arpin *et al*, 2000; Rooney *et al*, 2003; Nakamura *et al*, 2007), assim como foi reportado por nós no presente trabalho, utilizando animais hipertireóideos.

Em princípio os dados reportados no quadro de deficiência de HT, e os nossos de excesso destes, sobre a população de linfócitos B do baço parecem conflitantes, contudo acreditamos que a redução deste parâmetro seja devido à influência do HT sobre processos imunológicos distintos. O prejuízo na linfopoiese medular parece ser o principal fator responsável pela redução da população de linfócitos B em animais TR $\alpha$ <sup>-/-</sup> e hipotireóideos, visto que estes apresentam deficiência na linfopoiese B, marcadamente pela redução de células pró/pré-B da medula óssea (Montecino-Rodriguez *et al*, 1996; Arpin *et al*, 2000; Angelin-Duclos *et al*, 2005). Já a redução da população de linfócitos B esplênicos, observada no presente trabalho, pode estar associada ao processo de diferenciação destes linfócitos.

Klecha e colaboradores (2006) demonstraram haver maior conteúdo de proteína cinase C, importante para o desencadeamento da cascata de sinalização de ativação linfocitária, nos linfócitos B esplênicos originários de animais hipertireóideos e a resposta proliferativa aumentada após a estimulação por

mitógenos em ensaios *in vitro* utilizando linfócitos originários de animais hipertireóideos. Já linfócitos oriundos de animais hipotireóideos apresentam redução da resposta proliferativa após estimulação imunológica (Klecha *et al*, 2006; Schoenfeld *et al*, 1995; Chatterjee *et al*, 1983) Neste contexto, o excesso de HT parece agir estimulando o processo de diferenciação dos linfócitos B. Os plasmócitos, estado final de maturação e diferenciação celular dos linfócitos B, deixam de expressar a molécula B220 (Justement, 2001), utilizada como marcador da população de linfócitos B esplênicos neste trabalho. Sendo assim, a redução da população B220<sup>+</sup> esplênica que encontramos nos animais hipertireoideos pode estar associada ao aumento da população de plasmócitos no baço.

A estimulação do processo de ativação dos linfócitos B também pode desencadear aumento da migração destes para órgãos periféricos, induzindo aumento da população linfocitária do sangue e de sítios de infecção. Este estímulo migratório ocorre fisiologicamente em processos de infecção por patógenos (Abbas e Lichtman, 2003). Portanto, o estímulo ao processo de ativação de linfócitos B poderia ser o responsável pela redução da população de linfócitos B esplênicos nos animais hipertireóideos.

Mihara e colaboradores (1999) demonstraram que a tiroxina e a triiodotironina induzem apoptose de linfócitos em ensaios *in vitro*. Assim, a redução da população de linfócitos B dos animais hipertireóideos, também, poderia ser devido a este efeito indutor de apoptose dos HT. Contudo, a proporção dos linfócitos T, tanto auxiliares como citotóxicos, não foi alterado, sendo assim esta hipótese não explica totalmente os efeitos observados neste trabalho.

Estudos com animais hipotireóideos relatam efeitos contraditórios sobre a população de linfócitos T esplênicos, podendo induzir redução ou aumento da

mesma (Rooney *et al*, 2003, Nakamura *et al*, 2000; Erf, 1993). Nossos dados em animais hipertireóideos demonstraram que o excesso de HT não foi capaz de modular a proporção dos linfócitos T auxiliares e nem dos citotóxicos; contudo, houve aumento do seu número total, concordando com dados anteriores que demonstram a modulação dos HT sobre a resposta linfóide T (Klecha *et al*, 2006, Schoenfeld *et al*, 1995; Erf,1993). Sendo assim a não alteração da proporção dos linfócitos T esplênicos não está associado à incapacidade de resposta destes ao excesso de HT.

O hipertireoidismo induziu o aumento da celularidade esplênica, associada à redução da população B220<sup>+</sup>, que é composta no baço pelos linfócitos B imaturos e maduros, sem contudo afetar a proporção de linfócitos T auxiliares e citotóxicos. Devido ao aumento da celularidade total, alguma população de leucócitos deve estar aumentada, como os linfócitos *natural killer*, que não foram avaliados neste trabalho. Sendo assim, nossos resultados levam a crer que o hipertireoidismo afetou toda a população de leucócitos.

É possível, também, que nos animais hipertireóideos tenha ocorrido a estimulação da mielopoiese da medula óssea. Sendo assim, a maturação de células da linhagem mielóide estaria aumentada, o que acarretaria acréscimo do número de macrófagos, monócitos e granulócitos residentes em órgãos linfóides secundários, como o baço. Por conseguinte, a análise da proporção de linfócitos B estaria reduzida em relação ao maior número de leucócitos totais.

Precursos de linfócitos B são encontrados no baço que é um sítio hematopoético até a quarta semana de vida pós-natal em murinos (Rolink *et al*, 1993). Em determinadas situações patológicas o baço pode voltar a ser um sítio hematopoiético, desta forma o hipertireoidismo poderia agir como estímulo positivo à

hematopoiese esplênica, induzindo o aumento da mielopoiese e eritropoiese neste órgão. Este padrão resultaria na redução relativa do número de linfócitos B, assim como foi sugerido para a medula óssea. O aumento do número de hemácias, que encontramos, corrobora esta hipótese, visto que este acréscimo pode ser devido ao incremento da eritropoiese esplênica, cujo progenitor é comum ao das células mielóides (Abbas e Litchman, 2003).

Como o hipertireoidismo foi capaz de induzir efeitos imunomodulatórios sobre o baço, decidimos avaliar se o excesso de HT seria capaz de influenciar outro órgão linfóide secundário, os linfonodos mesentéricos.

O hipertireoidismo não foi capaz de induzir aumento do peso ou da celularidade dos linfonodos mesentéricos, contudo existem descrições de que estes parâmetros se encontram aumentados em linfonodos subcutâneos de animais hipertireóideos (Ribeiro-Carvalho *et al*, 2007<sup>b</sup>). No entanto já foram reportadas respostas imunológicas diversas em linfonodos subcutâneos e mesentéricos (de Meis *et al*, 2008; Bajénoff *et al*, 2007).

A redução da população de linfócitos B não foi comum a todos os órgãos linfóides secundários, já que esta só foi observada no baço, visto que o perfil populacional das células B220<sup>+</sup> dos linfonodos em animais hipertireóideos permaneceu semelhante ao encontrado nos indivíduos eutireoideos.

Sendo assim, nossos dados levam a crer que a influência dos HT sobre os órgãos linfóides secundários pode estar associada à modulação exercida por esse sobre fatores teciduais específicos, como a liberação local de citocinas e a expressão de receptores de citocinas pelas células estromais e linfóides de maneira diferencial de acordo com o órgão linfóide secundário.

Além dos HT produzirem efeitos sobre o perfil da população de linfócitos do baço, também, parecem modular a eritropoiese esplênica. O hipotireoidismo humano está associado a algumas formas de anemia (Green e Ng, 1986 *appud* Angelin-Duclos *et al*, 2005). Animais *Pax8<sup>-/-</sup>* e *TRα<sup>-/-</sup>*, com hipotireoidismo intra-uterino, têm deficiência na eritropoiese esplênica (Angelin-Duclos *et al*, 2005, Kendrick *et al*, 2008). Animais hipotireóideos apresentam redução da polpa vermelha do baço e menor hematócrito (Nakamura *et al*, 2007). Nossa análise do número de hemácias do baço demonstrou aumento deste parâmetro em animais hipertireóideos, contudo este aumento só chegou a ser significativo nas fêmeas. Sendo assim nossos achados, de aumento do número de hemácias esplênicas em animais hipertireóideos, associado aos demais estudos anteriormente reportados levam a crer que os HT possuem papel crucial para a manutenção da eritropoiese esplênica murina e possivelmente da medula óssea de humanos.

Além dos efeitos imunomodulatórios sobre células maduras os HT influenciam a fisiologia tímica (Savino e Dardenne, 2000). Animais com hipotireoidismo apresentam alterações das subpopulações de timócitos, marcadamente pela redução dos timócitos simples positivos  $CD8^+$ , levando a crer que os HT influenciam a diferenciação das subpopulações de linfócitos T (Dorshkind e Horseman, 2000). Portanto avaliamos a influência do hipertireoidismo sobre a fisiologia tímica.

O hipertireoidismo também foi capaz de modular a fisiologia do timo, um órgão linfóide primário. Nós demonstramos que o excesso de  $T_3$  em camundongos machos é capaz de induzir o aumento de peso e celularidade do timo, corroborando achados de Villa-Verde e colaboradores (1993). Contudo, os mesmos parâmetros permaneceram inalterados em fêmeas hipertireóideas. Esse grupo também reportou manutenção da proporção das subpopulações de timócitos e aumento do número

absoluto de timócitos em diferentes estágios de maturação, assim como no presente trabalho. Entretanto, o presente estudo foi o primeiro a estudar a influência do hipertireoidismo sobre a fisiologia tímica em animais de ambos os sexos. Não obstante os achados observados no timo de camundongos machos, o hipertireoidismo não induziu alterações dos parâmetros observados nas fêmeas no início da puberdade.

Os HT estimulam a proliferação de precursores linfóides comprometidos com a linhagem B na medula óssea (Montecino-Rodriguez *et al*, 1996) e modulam o endereçamento de linfócitos recém saídos do timo (Ribeiro-Carvalho *et al*, 2007<sup>a</sup>), levando a crer que os HT influenciam a população dos precursores linfóides e são capaz de modular a migração de células linfóides. Sendo assim, os efeitos hipertróficos e hiperplásicos observado no timo de machos hipertireóideos podem estar associados ao aumento da migração de precursores linfóides da medula óssea ao timo, estimulando a linfopoiese T e, conseqüentemente, o aumento do número de células e tamanho do timo.

O estímulo trófico exercido pelos HT pode estar associado ao aumento da sinalização de sobrevivência durante o processo de maturação dos timócitos. O hipertireoidismo estimula a produção de componentes de matriz extracelular por células epiteliais tímicas, nas quais induz a produção de timulina, hormônio que estimula a sobrevivência de timócitos (Villa-Verde *et al*, 1993). A interação dos timócitos com as células que compõem o estroma tímico é fundamental para a diferenciação desses e para a sua sobrevivência (Savino e Dardenne, 2000). Os linfócitos imaturos cuja interação com as células estromais é inadequada, ou por não reconhecê-las de maneira eficiente ou por apresentarem interação muito forte, sofrem apoptose (Takahama, 2006). Sendo assim, a estimulação dos HT sobre

diversos fatores associados à sinalização de sobrevivência dos timócitos pode ser o principal responsável pelo aumento do número de células deste órgão.

Ribeiro-Carvalho e colaboradores (2007<sup>b</sup>) demonstraram que camundongos fêmeas com 4 semanas de idade, púberes, tratadas durante 30 dias com T<sub>3</sub> (adultas jovens ao final do tratamento) apresentaram aumento do peso e celularidade tímica, acompanhados de subpopulações de timócitos inalteradas, perfil semelhante ao encontrado em camundongos machos no presente estudo.

Nossos dados associados com os experimentos de Ribeiro-Carvalho e colaboradores levam a crer que a influência exercida pelos HT é dependente não só de fatores associados ao sexo, como também da duração do tratamento com HT e a idade.

Neste contexto é importante ressaltar que os hormônios sexuais influenciam a fisiologia tímica. O processo de atrofia tímica está intimamente associado ao início da puberdade e, conseqüentemente, com os hormônios sexuais (Bouman *et al*, 2005). Tanto os andrógenos como os estrógenos são capazes de induzir a atrofia tímica e a deficiência destes hormônios retarda este processo (Hince *et al*, 2008). Entretanto, os hormônios sexuais parecem induzir efeitos diversos. Os andrógenos parecem estimular a apoptose de timócitos, o que resulta em repostas periféricas, como a atrofia esplênica, já os efeitos induzidos pelos estrógenos são mais complexos e multifatoriais (Hince *et al*, 2008). Os estrógenos influenciam não só a timopoiese, mas também induzem a redução do processo de maturação dos linfócitos B, o qual ocorre na medula óssea (Hince *et al*, 2008).

O sistema imunológico humano e murino apresentam dimorfismo sexual, contudo este ainda não está totalmente elucidado. Dentre as diferenças da reposta imunológica entre machos e fêmeas estão o maior conteúdo de plasmócitos e a

maior produção de anticorpos por fêmeas após a imunização (Lleo *et al*, 2008). O estrogênio é capaz de alterar os mecanismos de indução de sobrevivência e ativação de linfócitos B (Grimaldi *et al*, 2002). Em conjunto esses dados levam a crer que os hormônios sexuais femininos ou uma influência genética modulam a fisiologia dos linfócitos B (Lleo *et al*, 2008)..

No presente trabalho demonstramos o dimorfismo da resposta ao hipertireoidismo sobre o repertório populacional de linfócitos B esplênicos, assim como a resposta diferencial do timo de machos e fêmeas ao excesso de HT. Contudo os fatores associados a estas diferenças não são claros. É importante ressaltar que analisamos as repostas de animais no início da puberdade, sendo assim é pouco provável que a diferença entre os sexos esteja associada à função gonadal. Alguns fatores de dimorfismo sexual estão associados a genes codificados pelo cromossomo X (Lleo *et al*, 2008), sendo assim as alterações aqui relatadas podem estar associadas ao sexo cromossomial.

De forma geral, nosso trabalho traz contribuições importantes para a compreensão da regulação da fisiologia imunológica pelos HT, num contexto integrado, *in vivo*. Demonstramos que o excesso de HT é capaz de modular o perfil linfocitário de órgão linfóides periféricos de maneira tecido e sexo dependente, assim como influenciar a fisiologia tímica, levando a crer que a imunomodulação dos HT seja associada a uma complexa rede de fatores, relacionada a componentes teciduais específicos, como citocinas, e modulada por fatores associados ao sexo. Contudo os parâmetros responsáveis por esta modulação diferencial ainda não estão totalmente elucidados.



## 6. CONCLUSÕES

No timo, a influência trófica exercida pelo excesso de HT é dependente de fatores associados ao sexo, uma vez que o hipertireoidismo somente foi capaz de influenciar camundongos machos.

Nos órgãos linfóides secundários, os efeitos induzidos pelo hipertireoidismo sobre a população linfocitária madura parecem estar associados a fatores teciduais específicos de cada órgão analisado e ligados ao sexo, já que a redução da proporção de linfócitos B somente foi observada no baço de machos.

O excesso de hormônios tireoideanos é capaz de modular o sistema imunológico tanto de órgão linfóides primários como secundários. Esta modulação parece sofrer influência de fatores associados ao sexo em animais com idade entre 21 e 46 dias.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas K.A e Lichtman HA. *Cellular and molecular immunology*. 5ed: Editora Elsevier. 2003; Seção 1, p3-39 capítulo 7, p 151 a 161.

Alexander WD e Bisset SK. The correlation of thyroid function with the rate of oxygen uptake of human leucocytes. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Science* 1961;46: 46-49.

Alkemade A, Friesema EC, Unmehopa UA, Fabriek BO, Kuiper GG, Leonard JL, Wiersinga WM, Swaab DF, Visser TJ, Fliers E. Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90: 4322–4334.

Angelin-Duclos C, Domenget C, Kolbus A, Beug H, Jurdic P, Samarut J. Thyroid hormone T<sub>3</sub> acting through the thyroid hormone  $\alpha$  receptor is necessary for implementation of erythropoiesis in the neonatal spleen environment in the mouse. *Development*. 2005; 132: 925-934

Arpin C, Pihlgren M, Fraichard A, Aubert D, Samarut J, Chassande O, Marvel J. Effects of TR alpha 1 and TR alpha 2 gene deletion on T and B lymphocyte development. *Journal Immunology*. 2000; 164:152-60.

Axelrod A e Berman L. The Bone Marrow in Hyperthyroidism and Hypothyroidism. 1951, 6: 436-453 *Blood*.

Bajénoff M, Egen JG, Qi H, Huang AYC, Castellino F, Germain RN. Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *TRENDS in Immunology*. 2007; 28:346-352.

Bernal J. Iodine and brain development. *Biofactors*. 1999; 10: 271–276.

Besedovsky HO e Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 1996; 14:64-102.

Bhandoola A. e Sambadam A. From stem cell to T cell: one route or many? *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6, 117-126.

Bianco AC Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*. 2002; 23:38–89.

Bittencourt CS, Azzolini AECS, Ferreira DA, Assis-Pandochi AI. Antibody responses in hyperthyroid rats. *International Immunopharmacology*. 2007; 7:989–993.

Bouman A, Heineman MJ e Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Human Reproduction Update*. 2005; 11: 411-423.

Ceredig R, Rolink T. A positive look at double-negative thymocytes. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2: 2-10.

Chatterjee S, Chandel AS. Immunomodulatory role of thyroid hormones: in vivo effect of thyroid hormones on the blastogenic response of lymphoid tissues. *Acta Endocrinologica Copenhagen*. 1983;103: 95–100.

Cheng SY. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2000,1:9-18.

Clausen T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> Pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiological Reviews*. 2003; 83:1270-1324.

Crivellato E, Vacca A. e Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *TRENDS in Immunology*.2004, 25: 210-217.

Davis PJ, Davis FB, Cody V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 2005, 16: 429-435.

de Meis J, Ferreira LMS, Guillermo LVC, Silva EM, DosReis GA, Lopes MF. Apoptosis differentially regulates murine mesenteric and subcutaneous lymph node immune responses to *Trypanosoma cruzi* block changes OK? *European Journal Immunology*. 2008; 38.

Di Comite G, Grazia Sabbadini M, Corti A, Rovere-Querini P, Manfredi AA. Conversation galante: how the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *Autoimmunology Reviews*. 2007; 7:23-9.

Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine Reviews*. 2000; 21:292-312.

Dupré SM, Guissouma H, Flamant F, Seugne I, Scanlan TS, Baxter JD, Samarut J, Demeneix BA, Becker N. Both thyroid hormone receptor TR $\beta$ 1 and TR $\beta$ 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 2004; 145: 2337-2345.

Egerton M, Scollay R, e Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *PNAS*.1990; 87: 2579-2582.

El-Shaikh KA, Gabry MS, Othama GA. Recovery of age-dependent immunological deterioration in old mice by thyroxine treatment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2006; 90: 244-254.

Erf, GF Immune development in young-adult C.RF-hyt mice is affected by congenital and maternal hypothyroidism, *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 1993; 204: 40–48.

Escobar-Morrele HF, Obregón MJ, Del Rey FE, Escobar GM. Tissue specific pattern change in 3,5,3'-triiodo-L-tyrosine concentration in thyroidectomized rats infused with increasing doses of hormone. Which are the regulatory mechanisms? *Biochemistry*. 1999, 81: 453-462.

Fliers E, Unmehopa UA, Alkemade A. Functional microanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 251: 1–8.

Foster MP, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Proliferation of bone marrow pro-B cells is dependent on stimulation by the pituitary/thyroid axis. *The Journal of Immunology*.1999; 163: 5883–5890.

Green ST, Ng JP. Hypothyroidism and anemia. *Biomedical Pharmacotherapy*. 1986, 40:326-331 *appud* Angelin-Duclos C, Domenget C, Kolbus A, Beug H, Jurdic P, Samarut J. Thyroid hormone T<sub>3</sub> acting through the thyroid hormone  $\alpha$  receptor is necessary for implementation of erythropoiesis in the neonatal spleen environment in the mouse. *Development*. 2005; 132: 925-934

Grimaldi CM, Cleary , Dagtas AS, Moussai D, Diamond B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 109:1625–1633.

Grymula K, Paczkowska E, Dziedziejko V, Bakiewicz-Masiuk M, Kawa M, Baumert B, Celewicz Z, Gawrych E, Machalisnki B. The influence of 3,3',5- triiodo- L- thyronine on human haematopoiesis. *Cell Proliferation*. 2007; 40: 302–315.

Hastings ML, Milcarek C, Martincic K, Peterson ML, Munroe SH. Expression of the thyroid hormone receptor gene, *erbA $\alpha$* , in B lymphocytes: alternative mRNA processing is independent of differentiation but correlates with antisense RNA levels. *Nucleic Acids Research* 1997; 25:4296–4300.

Hays K. Physiology of normal bone marrow. *Seminars in Oncology Nursing*. 1990; 6:3-8.

Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, Burnham K, Saeland S, Handman E, Shortman K. The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes. *The Journal of Immunology*. 2001; 167: 741–748.

Hince M, Sakkal S, Vlahos K, Dudakov J, Boyd R, Chidgey A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. *Cellular Immunology* 2008; doi:10.1016/j.cellimm.2007.10.007.

Hogquist K.A, Baldwin T.A. e Jameson S.C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology*. 2005; 5: 772-782.

Justement LB. The role of the protein tyrosine phosphatase CD45 in regulation of B lymphocyte activation. *International Reviews Immunology*. 2001;20:713-38.

Kelley KW, Weigent DA, Kooijman R. Protein hormones and immunity. *Brain Behave Immunology*. 2007, 21:384-92.

Kendrick TS, Payne CJ, Epis MR, Schneider JR, Leedman PJ, Klinken SP, Ingley E. Erythroid defects in TR $\alpha$ -/- mice. *Blood*. 2008; 111: 3245-3248.

Klecha AJ, Genaro AM, Gorelik G, Marco MLB, Silberman DM, Schuman M, Garci SI, Pirola C, Cremaschi GA. Integrative study of hypothalamus–pituitary–thyroid–immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. *Journal of Endocrinology*. 2006; 189: 45–55.

Klecha AJ, Genaro AM, Lysionek AE, Caro RA, Coluccia AG, Cremaschi GA. Experimental evidence pointing to the bidirectional interaction between the immune system and the thyroid axis. *International Journal of Immunopharmacology*. 2000; 492: 491-500.

Lämmermann T, Sixt M. The microanatomy of T-cell responses. *Immunological Reviews*. 2008; 221: 26–43.

Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews*. 1993; 14: 184-193.

Lind EF, Prockop SE, Porritt HE e Petrie HT. Mapping Precursor Movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *Journal of Experimental Medicine*. 2004; 194: 127–134.

Lira AS. A passport into the lymph node. *Nature Immunology*. 2005; 6:866-868.

Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmunity Reviews*. 2008; doi:10.1016/j.autrev.2008.06.009.

Long E, Wagtmann N. Natural killer cell receptors. *Current Opinion in Immunology*. 1997; 9:344-350.

Maia AL, Kin, BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115:2524–2533.

Mascanfroni I, Montesinos MM, Susperreguy S, Cervi L, Illarregui JM, Ramseyer VD, Masini-Repiso AM, Targovnik HM, Rabinovich GA, Pellizas CG. Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *FASEB Journal*. 2008, 22: 1032–1042.

Mebius RE e Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*. 2005, 5: 606-616.

Mello-Coelho V, Savino W, Postel-Vinay MC, Dardenne M. Role of prolactin and growth hormone on thymus physiology. *Developmental Immunology*. 1998; 6:317-23.

Mihara S, Suzuki N, Wakisaka S, Suzuki S, Sekita N, Yamamoto S, Saito N, Hoshino T, Sakane T. Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999; 84: 1378–1385.

Montecino-Rodriguez E, Clark R, Johnson A, Collins L, Dorshkind K. Defective B cell development in snell dwarf (*dw/dw*) mice can be corrected by thyroxine treatment. *The Journal of Immunology*. 1996;157: 3334-3340.

Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunological Reviews*. 2002; 186:68-82.

Nakamura R, Teshima R, Hachisuka A, Sato Y, Takagi K, Nakamura R, Woo GH, Shibutani M, Sawada J. Effects of developmental hypothyroidism induced by maternal administration of methimazole or propylthiouracil on the immune system of rats. *International Immunopharmacology*. 2007; 7: 1630–1638.

Nussey SS e. Whitehead AS. *Endocrinology\_An Integrated Approach*. 2001, capítulo 3. Ed. Taylor & Francis.

Ochoa JB, Makarenkova V. T lymphocytes. *Critical Care Medicine*. 2005; 33:S510-S513.

Ohl L, Bernhardt G, Pabst O, Förster R. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Seminars in Immunology*. 2003; 15: 249–255.

Omazic B, Näsman-Björk I, Johansson J, Hentschke P, Mattsson J, Permert J, Lundkvist I. Altered expression of receptors for thyroid hormone and insulin-like growth factor-1 during reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2001; 27:1163–1171.

O'Shea PJ e Williams GR. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *Journal of Endocrinology*. 2002, 175:553–570

Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *TRENDS in Immunology*. 2003; 24:444-8.

Park CS, Choi YS. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology*. 2005; 114: 2–10.

Phan TG, Grigorova I, Okada T, Cyster JG. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nature Immunology*. 2007; 8:992-1000.

Pierpoli W, Fabris N e Sorkin E. Developmental hormones and immunological maturation. *Hormone and immune response*. Ciba Foundation study group No.36, Wolstheinenholme GEW w Knight J. Ed J & A Churchill, London p.126. 1997 appud Marsh JA e Erf GAF. *The physiology of immunity*. Ed CRC Press p 211-235.

Ribeiro MO. Thyroid economy—regulation, cell biology, thyroid hormone metabolism and action: the special edition: metabolic effects of thyroid hormones. *Thyroid*. 2008; 18:197-203.

Ribeiro-Carvalho MM, Lima-Quaresma KR, Mouço T, Carvalho VF, Mello-Coelho V, Savino W. Triiodothyronine modulates thymocyte migration. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007<sup>b</sup>; 66:17-25.

Ribeiro-Carvalho MM, Smaniotto S, Neves-dos-Santos S, Mouço T, Savino W, Mello-Coelho V. Triiodothyronine modulates differential homing of recent thymic emigrants to peripheral lymphoid organs thymocyte migration. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007<sup>a</sup>; 66:8-16.

Rolink A, Haasner D, Nishikawa S e Melchers F. Changes in frequencies of clonable pre B cells during life in different lymphoid organs of mice. *Blood*. 1993; 81:2290-2300.

Rooney AA, Fournier M, Bernier J, Cyr DG. Neonatal exposure to propylthiouracil induces a shift in lymphoid cell sub-populations in the developing postnatal male rat spleen and thymus. *Cellular Immunology*. 2003; 223: 91–102.

Sakurai A, Nakai A, DeGroot LJ. Expression of three forms of thyroid hormone receptor in human tissues. *Molecular Endocrinology*. 1989; 3:392-9.

Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Reviews*. 2000; 21:412-43.

Schmitt TM e Zúñiga-Pflücker JC. T-cell development, doing it in a dish. *Immunological Reviews*. 2006; 209:95-102.

Schoenfeld PS, Myers JW, Myers L, LaRocque JC. Suppression of cell-mediated immunity in hypothyroidism. *Southern Medical Journal*. 1995; 88: 347–349.



Schwarz BA e Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunological Reviews*. 2006; 209: 47–57.

Seminario MA, Bunnell SC. Signal initiation in T-cell receptor microclusters. *Immunological Reviews*. 2008; 221:90-106.

Shahrara S, Drvota V, Sylvén C. Organ specific expression of thyroid hormone receptor mRNA and protein in different human tissues. *Biol Pharm Bull*. 1999; 22:1027-1033.

Shrewsbury MM e Reinhardt WMO. Relationships of adrenals, gonads, and thyroid to thymus and lymph nodes, and to blood and thoracic duct leukocytes. *Blood*. 1955; 10: 633-645.

Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiology Reviews*. 2006; 86: 435–464.

Silvestri E, Schiavo L, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiology Scandinavian*. 2005; 18: 265–283.

Soutto M, Guerrero JM, Molinero P.  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenergic mechanisms are involved in regulating type II thyroxine 5'-deiodinase in rat thymus. *Life Sciences*. 1996; 58: 1-18.

Spangelo BL, Gorospe WC. Role of the cytokine in the neuroendocrine-immune system axis. 1995. *Frontier in Neuroscience*. 1995, 16: 1-22.

Sprent J. e Kishimoto H. The thymus and negative selection. *Immunological Reviews*. 2002; 185: 126-135.

Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 2006, 6: 318-328.

Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6: 117-135.

Takeda T, Suzuki S, Nagasawa T, Liu RT, DeGroot LJ. DNA binding affinity of hTR $\beta$ 1 mutants as heterodimers with traps from different tissues. *Biochimie*. 1999; 81: 297-308.

Tausk F, Elenkov I, Moynihan J. Psychoneuroimmunology. *Dermatol Ther*. 2008; 21:22-31.

Van der Geyten, Eynde IV, Segers IB, Kühn ER, Darras VM. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. *General and Comparative Endocrinology*. 2002; 128: 65–73.

Villa-Verde DMS, Defresne MP, Vannier-dos-Santos MA, Dussault JH, Boniver J, Savino W. Identification of nuclear triiodothyronine receptors in the thymic epithelium. *Endocrinology*. 1992; 131:1313–1320.

Villa-Verde DMS, Mello-Coelho V, Farias-de-Oliveira DA, Dardenne M, Savino W. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology*. 1993; 133: 867-875.

Weigent DA e Blalock EJ. Associations between the neuroendocrine and immune systems *Journal of Leukocyte Biology*. 1995, 57: 137-150.

Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nature Reviews Immunology*. 2008; 8:95-106.

Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood*. 2003;102:2187-2194.

Wolff J. Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacological Reviews*. 1998; 50:89-105.

Yao C, Zhang J, Wang L, Guo Y, Tian Z. Inhibitory effects of thyroxine on cytokine production by T cells in mice. *International Journal Immunopharmacology*. 2007; 7:1747-54.

Yen PM. Molecular basis of resistance to thyroid hormone *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 2003; 14: 327-333.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*. 2001; 81:1097-142.

Zhang J e Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol*. 2000; 62:439–66.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)