

Stella Maria Pedrossian Vecchiatti

**O iodo aumenta e antecipa a incidência de tireoidites
em camundongos não obesos diabéticos (NOD):
estudo histológico e ultra-estrutural**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Chin Jia Lin

São Paulo

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vecchiatti, Stella Maria Pedrossian

O iodo aumenta e antecipa a incidência de tireoidites em camundongos não obesos diabéticos (NOD) : estudo histológico e ultra-estrutural / Stella Maria Pedrossian Vecchiatti. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Chin Jia Lin.

Descritores: 1.Tireoidite auto-imune 2.Iodo 3.Camundongos 4.Imunoistoquímica
5.Autopsia 6.Prevalência

USP/FM/SBD-427/09



Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Astrogildo Renato Vecchiatti e Erminia Pedrossian Vecchiatti, que sempre foram e serão sempre, meu maior orgulho, exemplo e meu maior amor!

Seu simplório olhar cor-de-rosa para com o mundo e o ser humano, a serenidade, a retidão e coragem para buscar seus sonhos, bem como para enfrentar as alegrias e as adversidades da vida, ficarão para sempre em meu coração!

Muito obrigada meus pais, pelo apoio e amor incondicional em todos os minutos de minha vida e por terem sido a parte mais doce e serena de minha existência.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Prof. Dr. Helio Bisi,

Agradeço a oportunidade, confiança, ensinamentos, amizade, paciência, entusiasmo, companheirismo e também pelos conselhos que me fizeram crescer nesses inestimáveis anos de convivência.

Muito obrigada professor!

Um verdadeiro professor não se contenta em ensinar tudo o que sabe, ele instiga a curiosidade, o questionamento dos achados e a necessidade da busca permanente do saber.

Ao Dr. Chin Jia Lin

Todo meu respeito e admiração!

Agradeço à gentil acolhida, a paciência, a atenção, a confiança, ensinamentos e a inestimável ajuda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir trilhar este caminho que é parte de meu sonho....

- Profa. Dra. Vera Luisa Capelozzi, por seu entusiasmo, gentileza e colaboração na realização de todas as lâminas de Imunohistoquímica desta tese.
- Prof. Dr. Eduardo Pompeu e à Mestre Maria Luiza Guzzo, pela amizade e ajuda insubstituível, e a todos os funcionários do Centro de Bioterismo da FMUSP pela atenção, gentileza e apoio no estudo experimental.
- Prof. Dr Adhemar Longatto Filho, pela amizade e incentivo durante esses anos de convivência
- Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini, pela leitura da microscopia eletrônica.
- Sr. Helio Correa e toda equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMUSP pela paciência e ajuda.
- Keila da Silva, do Laboratório de Histopatologia pelo profissionalismo e carinho com todas as lâminas do estudo experimental.
- A Zilá Irina Pieroni, Liduvina da Silva Neto de Barros, Vera Lucia de Carvalho Noya e Emilia Bento de Araujo, da secretaria do Departamento de Patologia pela ajuda e paciência.
- Às técnicas do Laboratório de Imunohistoquímica, Ângela Batista G. dos Santos, Maria Cristina R. Medeiros e Sandra de Moraes Fernezlian por seu trabalho e profissionalismo.
- A Marinalva de Souza Aragão, Valeria Vilhena, Marcia Arruda e todos os funcionários da Biblioteca da FMUSP por sua atenção, eficiência e carinho, sempre prontos a colaborar em nossas pesquisas.
- Ao Prof. Dr. Walter Bloise, por minha formação em Endocrinologia e pelo exemplo de perseverança e dedicação à medicina.

- Aos diretores do Hospital do Servidor Público Municipal, a Dr. Walney di Franco Schiavon e às secretárias da Endocrinologia Márcia Kimiko Tsumita Silva e Domingas Regina Avelino de Sousa, pelo suporte que me deram para poder gerenciar a clínica, nos anos de trabalho desta tese.
- A minha querida irmã Suzana Maria P. Vecchiatti, pela torcida e apoio em todos os momentos bem como ao cunhado Rubens F Gomes e tia Ida Pedrossian.
- A minhas amigas que me ouviram e incentivaram nesses tempos de estudo, Eliana .Steinmann, Maria Walkiria S Egoshi e Silvana Pattoli.
- Ao Dr. Pedro Alberto Arlant, pela presença e suporte emocional em momentos decisivos deste meu caminho.
- A todos os amigos e funcionários da FMUSP, com quem tive o privilégio de conviver nesses anos por terem sempre me recebido com gentileza e profissionalismo!
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Etiopatogênia e fisiopatologia das doenças auto-imunes.....	06
1.2 O papel do iodo.....	11
1.3 A fortificação do sal com iodo.....	14
2 OBJETIVOS.....	20
3 MÉTODOS.....	22
3.1 Estudo das necropsias.....	23
3.1.1 Microscopia óptica.....	23
3.1.2 Imunohistoquímica.....	24
3.1.3 Análise semi-quantitativa das lâminas de imunohistoquímica.....	25
3.1.4 Análise estatística.....	27
3.2 Estudo experimental.....	28
3.2.1 Camundongos.....	28
3.2.2 Microscopia óptica.....	29
3.2.3 Microscopia eletrônica.....	29
3.2.4 Análise estatística.....	30
3.2.5 Comissão de ética em pesquisa.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Resultados - Estudo das necropsias.....	32
4.2 Resultados - Estudo experimental.....	33
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÕES.....	49
7 ANEXOS.....	58
8 REFERÊNCIAS.....	60
9 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
anti-TPO	anti-tireoperoxidase
CD	do inglês <i>cluster of differentiation</i> ou grupo de diferenciação moléculas da superfície de linfócitos e plaquetas que são distinguíveis com anticorpos monoclonais e podem ser usadas para diferenciar populações de células
célula B	linfócitos que se desenvolvem na medula óssea em adultos e produzem anticorpos
célula T	linfócitos que se originam primariamente no timo e são fundamentais no controle e desenvolvimento das respostas imunes, dividem-se em citotóxicos (CTLs) e de ajuda ou T-helper (Th0, Th1 e Th2)
CTLA-4	do inglês <i>cytotoxic T lymphocyte-associated 4</i>
GC	grupo controle
GE	grupo experimental
HE	hematoxilina-eosina
HT1	locus associado a tireoidite de Hashimoto (13q32)
HT2	locus associado a tireoidite de Hashimoto (12q22)
IFN- γ	interferon gama
IL	infiltrado linfocitário
IL-	interleucina
ILP	infiltrado linfoplasmocitário
ME	microscopia eletrônica
MHC	do inglês major <i>histocompatibility complex</i>
MO	microscopia óptica
NIS	do inglês <i>sodium-iodine symporter</i>
NK	do inglês <i>natural killer</i> , linfócitos que reconhecem e destroem células infectadas por vírus ou tumoraes

NOD	do inglês <i>non obese diabetic</i>
OMS	organização mundial da saúde
PGF	do inglês <i>placental growth factor</i>
PLAU	do inglês <i>urokinase-type plasminogen activator</i>
SVOC	Serviço de verificação de óbito da capital da Universidade de São Paulo
TH	tireoidite de Hashimoto
ThOx	do inglês <i>thyroid oxidase</i>
TNF- α	do inglês <i>tumor necrosis factor α</i>
TSH	hormônio estimulador da tireóide
USI	do inglês <i>universal salt iodization</i>
VEGF	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Causas de tireoidite conforme sua etiologia.....	3
Tabela 2 - Causas de tireoidites conforme sua apresentação clínica...	4
Tabela 3 - Desordens causadas pela deficiência de iodo.....	16
Tabela 4 - Escores atribuídos às marcações da imunohisto-química para caspase e ensaio do TUNEL.....	27
Tabela 5 - Prevalência de Tireoidite em 4613 casos de necropsias estudados.....	34
Tabela 6 - Prevalência Anual de tireoidites em 4613 necropsias estudadas.....	34
Tabela 7 - Distribuição das tireoidites nas faixas etárias em anos nos dois estudos	36
Tabela 8 - Prevalência comparativa de tireoidites encontradas em estudos anteriores de Bisi <i>et al.</i> e na série atual.....	36
Tabela 9 - Média dos escores encontrados para os marcadores de imunohistoquímica.....	39
Tabela 10 - Regressão do tipo de tireoidite sobre os parâmetros CD4, CD8, CD20, caspase 3 e TUNEL.....	40
Tabela 11 - Análise de variância de cada um dos componentes utilizados na regressão.....	41
Tabela 12 - Resultados grupo experimental (GE) e grupo controle (GC).....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da tireoidite.....	11
Figura 2 - Mapa da OMS especificando a extensão territorial de cada país envolvida na coleta das dosagens de iodo urinário da população, para a classificação de suficiência mundial de iodo.....	18
Figura 3 - Mapa da OMS especificando a suficiência de iodo mundial.....	18
Figura 4 - Método de análise semi-quantitativa dos infiltrados com a divisão dos campos microscópicos e tabela dos escores utilizados para classificar os infiltrados.....	26
Figura 5 - Método utilizado na avaliação das lâminas de imunohistoquímica por varredura.....	27
Figura 6 - Infiltrado linfocitário.....	33
Figura 7 - Infiltrado linfoplasmocitário.....	34
Figura 8 - Distribuição da prevalência de idade. Comparação da série atual e anterior.....	35
Figura 9 - Folículos dilatados com epitélio achatado.Imagem persistente em 94,4% de nossa revisão.....	37
Figura 10 - Imunohistoquímica para CD8 (A) e CD4 (B).....	37
Figura 11 - Imunohistoquímica para CD20.....	38
Figura 12 - Imunohistoquímica para CD68.....	38
Figura 13 - Imunohistoquímica para caspase-3.....	39
Figura 14 - Ensaio do TUNEL.....	40
Figura 15 - Microscopia óptica da tireóide de camundongos. Infiltração linfocítica focal e extensa.Notar paratireóide intraglandular na figura B.....	44
Figura 16 - Microscopia Óptica: Infiltração linfocitária ao redor de folículos coalescentes e/ou cistos.....	45

Figura 17 - Microscopia óptica da tireóide de camundongos com necrose e infiltração linfocítica (A) e grandes folículos com ruptura da membrana basal (B).....	45
Figura 18 - Microscopia óptica da tireóide de camundongos onde se vê célula plasmocitóide dentro do folículo (A) e macrófago dentro da luz do folículo (B).....	45
Figura 19 - Microscopia eletrônica da tireóide de camundongos onde se vê o retículo rugoso dilatado e mitocôndrias edemaciadas, degeneradas com perda de suas cristas....	46
Figura 20 - Microscopia eletrônica do grupo experimental: debris e mitocôndrias edemaciadas.....	47
Figura 21 - Microscopia eletrônica do grupo experimental mostrando mitocôndrias edemaciadas e espaços amorfos.....	47
Figura 22 - Microscopia eletrônica de camundongos normais.....	48

RESUMO

Vecchiatti SMP. *O iodo aumenta e antecipa a incidência de tireoidites em camundongos não obesos diabéticos (NOD): estudo histológico e ultra-estrutural* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

As tireoidites auto-imunes são afecções endocrinológicas relativamente comuns. Há uma noção entre os clínicos de que a incidência das mesmas tem aumentado nos últimos anos. Este aumento foi documentado em algumas regiões no mundo, mas ainda há controvérsias se o mesmo ocorre no nosso país. Apesar de ser alvo de intensos e exaustivos estudos, a fisiopatologia das tireoidites auto-imunes bem como a identidade do fator desencadeante inicial da auto-imunidade permanecem obscuros e fatores genéticos, ambientais, medicamentosos e nutricionais (por exemplo, iodo) têm sido responsabilizados como causas do incremento da frequência da auto-imunidade tireoidiana. O iodo tem sido implicado, como responsável pelo aumento de incidência em diferentes populações após sua introdução para prevenção de bócio endêmico. Na literatura as tireoidites são definidas e classificadas de diferentes formas e há diversidade de metodologias para avaliação de material cirúrgico e de necropsias o que dificulta o estudo comparativo em diferentes séries. Para verificar se houve incremento da frequência de tireoidites em nossa área estudamos retrospectivamente os laudos de 5 anos de necropsias realizadas no SVO da FMUSP e comparamos com levantamento anterior realizado na mesma instituição. Os infiltrados linfocitários foram marcados para CD4, CD8, CD20 e CD68. A participação da apoptose foi analisada pela técnica do TUNEL e marcação de caspase 3. Camundongos NOD (Não Obesos Diabéticos) foram submetidos à sobrecarga oral de iodo por 60 e 90 dias com o objetivo de avaliar o papel do iodo nas alterações histopatológicas da tireóide e para criar um modelo experimental para o estudo da fisiopatologia da tireoidite auto-imune.. Resultados: A frequência de tireoidite em nosso estudo de necropsias aumentou 58 vezes em relação ao estudo anterior (2,3% e 0,04%, respectivamente). À imunohistoquímica, os casos classificados inicialmente como tireoidite linfocítica e tireoidite de Hashimoto mostraram padrão semelhante de infiltrados sugerindo serem as duas condições estágios evolutivos da mesma doença. A apoptose foi marcante nos casos estudados demonstrando ter papel importante na fisiopatologia da tireoidite auto-imune. Nos camundongos NOD o iodo antecipou e aumentou a prevalência de tireoidites. Nas duas tireóides estudadas à microscopia eletrônica encontramos lesões mitocondriais e do retículo endoplasmático rugoso que não foram vistas em nossos controles. Conclusão: Temos um incremento real da prevalência de tireoidites em necropsias realizadas em nossa instituição. O padrão histopatológico das tireoidites auto-imunes estudadas sugere que a tireoidite dita linfocítica poderia corresponder à fase inicial do processo auto-imune que levaria à tireoidite de Hashimoto. O iodo foi o fator desencadeante e que aumentou e antecipou a incidência de tireoidite em nosso estudo experimental.

Descritores: 1.Tireoidite auto-imune 2.Iodo 3.Camundongos 4.Imunoistoquímica 5.Autopsia 6.Prevalência

SUMMARY

Vecchiatti SMP. *Iodine increases and anticipates the incidence of thyroiditis in non-obese diabetic (NOD): a histological and ultra-structural study* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Autoimmune thyroiditis are relatively common endocrine diseases. There is a common perception among clinicians that its incidence has been increasing in recent years. Such an increase has been documented in a number of regions worldwide; it remains controversial, however, whether the frequency of thyroiditis is increasing in our country. Despite of being a subject of intense and exhaustive studies, the pathophysiology of auto-immune thyroiditis as well as the identity of the factor that triggers the initial autoimmunity have remained undetermined and genetics, environmental factors, drugs and, nutrition (e.g., iodine) have been implicated in the increase of frequency of thyroid autoimmunity. The iodine has been hold responsible for the increase in the incidence of autoimmune thyroiditis in different populations after its introduction in iodine-deficient regions as a prophylaxis for endemic goiter. There is a myriad of different definitions and classifications for thyroiditis. There is also a great diversity in methods used in the assessment of surgical specimens and necropsy materials. Such a diversity of classification systems and study protocols creates a barrier for comparison of data from different series/studies. In order to verify whether an increase in frequency of thyroids is occurring in our population we retrospectively analyzed the report of necropsies performed in a period of five years in the service of death verification of University of Sao Paulo School of Medicine and compared to a published study performed previously at the same institution. Lymphocytic infiltrations were labeled with antiserum against CD4, CD8, CD20 e CD68. The involvement of apoptosis was assessed by TUNEL and caspase 3 labeling. NOD (Non Obese Diabetic) mice were exposed with high dose oral iodine for 60 or 90 days in order to evaluate the role of iodine in the genesis of histopathological derangements of thyroid and to create an experimental model for the study of autoimmune thyroiditis. Results: In this study, we found a 58-fold increase in the frequency of thyroiditis in comparison to the study performed previously (2,3% e 0,04%, respectively). Cases categorized initially as lymphocytic thyroiditis showed a cell infiltrate that labeled by immunohistochemistry in a similar way as the infiltrates of cases classified as Hashimoto's thyroiditis which suggests that these entities might be different stages of a same disease. All cases displayed strong labeling for apoptosis markers demonstrating its important role in the pathophysiology of autoimmune thyroiditis. Iodine anticipated and increased the frequency of thyroiditis in NOD mice. In both thyroids studied with electron microscopy, we found mitochondrial and rough endoplasmic reticulum lesions that were not seen on control thyroids. Conclusion: there is an actual increase in thyroiditis prevalence in necropsies performed at our institution. The histological pattern of autoimmune thyroiditis we studied suggests that the so called lymphocytic thyroiditis might be the initial stage of an autoimmune process that would eventually lead to Hashimoto's thyroiditis. The iodine was the triggering factor which increased and anticipated the incidence of thyroiditis in our experimental study.

Descriptors: 1. Autoimmune thyroiditis 2.Iodine 3.Mice 4. Immunohistochemistry 5.Autopsy 6.Prevalence

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas e títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

1 INTRODUÇÃO

O termo tireoidite descreve um conjunto de entidades que têm a inflamação da glândula tireóide causando dano e/ou morte celular como os aspectos mais proeminentes de sua fisiopatologia e histopatologia^{1,2,3,4}.

A tireoidite pode ser desencadeada por várias causas (Tabela 1). A inflamação tireoidiana resultante pode estar associada à tireotoxicose, hipotireoidismo ou eutireoidismo, muitas vezes com o paciente transitando de um estado de função tireoidiana para outro, ao longo da evolução deste processo⁵. Pacientes portadores de uma mesma causa de tireoidite podem apresentar ainda diferentes combinações do estado funcional tireoidiano, com presença ou ausência de dor (Tabela 2) e existência ou não de bócio. Assim, as tireoidites formam uma categoria de considerável heterogeneidade tanto na sua etiopatogenia quanto na sua apresentação clínica.

Uma considerável morbidade está associada às alterações da função tireoidiana nas tireoidites. A tireotoxicose pode desencadear alterações funcionais em diferentes sistemas com repercussões graves para o indivíduo como arritmias (indivíduos com mais de 60 anos podem desenvolver fibrilação atrial em 28% dos casos⁴), hiperatividade, fadiga, labilidade emocional, *déficit* de atenção e o hipotireoidismo diminuição do volume de ejeção e frequência cardíaca, por *déficit* no efeito inotrópico e cronotrópico dos hormônios tireoidianos e conseqüente redução do fluxo sanguíneo para os tecidos. Nos *déficits* graves o aumento da área cardíaca pode ser visto pela dilatação cardíaca e por efusão para o saco pericárdico, de fluído rico

em proteínas e glicosaminoglicans que também pode ser visto em derrames pleurais. O hipotireoidismo pode ainda acarretar redução de funções cognitivas e intelectuais incluindo a fala, iniciativa, e memória, psiquiátricas como paranóia, depressão ou letargia. O atraso de crescimento e desenvolvimento em crianças por deficiência dos hormônios tireoidianos também são encontrados dentre outras alterações⁶.

Tabela 1 - Causas de tireoidite conforme sua etiologia^{3,4,7}

Genética Familiar

Doença autoimune (tireoidite silenciosa ou subaguda, tireoidite de Hashimoto),

Associada a doenças auto-ímmunes (ex: diabetes tipo1, artrite reumatóide lúpus, anemia perniciosa, etc.)

Gestação (tireoidite pós parto ou não dolorosa)

Tireoidite de Riedel

Infecção

Bacteriana

Viral tireoidite subaguda: de Quervain

Iatrogênicas

Iodo radioativo

Drogas

Interferom- α , amiodarona, interleucina-2

Ambientais

Poluentes candidatos: hidro-carbonetos poliaromáticos, bifenóis polibrominados, bifenóis policrominados

Produtos químicos sintéticos: pesticidas, produtos industriais

Tabela 2 - Causas de tireoidites conforme sua apresentação clínica^{4,8}

Indolores	Tireoidite pós parto
	Silênciosa ou não dolorosa
	Tireoidite auto-imune
Dolorosas	Tireoidite sub-aguda ou não supurativa ou de Quervain (viral?)
	Tireoidite aguda Infecciosa (bacteriana ou fúngica)
	Tireoidite de Riedel
Tireoidite após-irradiação (ou após-iodo radioativo ou irradiação cervical)	
Sarcoidose	

As tireoidites formam a categoria provavelmente mais freqüente de doença tireoidiana^{9,10}. Isso se deve ao fato de essa classificação englobar as tireoidites auto-imunes que, de longe, são as doenças tireoidianas mais facilmente encontradas na prática clínica. As tireoidites são mais prevalentes em mulheres de 45 a 65 anos, apresentam freqüência variável nos diferentes estudos populacionais, sendo em média sua freqüência de 350/100.000 mulheres, 80/100.000 homens segundo revisão sistemática de 2008¹¹.

O protótipo e a forma mais freqüente de tireoidite auto-imune é a tireoidite de Hashimoto (TH), descrita em 1912 e também conhecida como tireoidite crônica autoimune^{2,7,10,12}. Acomete também crianças sendo a principal causa de bócio esporádico na população pediátrica^{10,13}.

As tireoidites de origem auto-imune se caracterizam laboratorialmente pela presença de auto-anticorpos dirigidos contra antígenos tireoidianos como os anticorpos anti-tireoperoxidase (anti-TPO) e anti-tireoglobulina^{7,13}.

Anticorpos dirigidos contra o receptor de TSH (em geral bloqueadores) também podem ser encontrados. A doença de Graves, apesar de ser doença auto-imune com presença de auto-anticorpos, não é considerada como tireoidite^{4,13,14} embora alguns autores a incluam como tal¹⁵.

As tireoidites de origem auto-imune estão associadas a outras doenças da imunidade como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, anemia perniciosa, diabetes *mellitus* e síndrome de Sjögren¹⁰. Uma complicação grave, porém rara de TH é o linfoma da tireóide¹⁰. Há predisposição genética para auto-imunidade tireoidiana que é herdada como traço autossômico dominante¹⁰. A contribuição estimada da carga genética para desenvolvimento tanto da doença de Graves quanto das tireoidites auto-ímunes é em torno de 50% em gêmeos monozigóticos, enfatizando a importância de fatores ambientais em sua patogênese^{2,7}. A predisposição familiar/genética das tireoidites auto-ímunes pode ser mais bem apreciada a partir do fato de parentes de primeiro grau de indivíduos com hipotireoidismo de origem auto-imune, freqüentemente serem portadores de doenças tireoidianas auto-ímunes ou apresentarem alta prevalência de positividade para auto-anticorpos anti-tireoideanos².

Todas as formas de tireoidite auto-imune têm em comum a presença de infiltrado mononuclear acompanhado de alterações na morfologia das células foliculares e lesão folicular de algum grau. Não há, no entanto, um consenso internacionalmente aceito quanto aos critérios morfológicos que diferenciem as diferentes formas de tireoidite auto-imune^{13,16}. Alguns patologistas defendem que TH seja diagnosticada mediante presença do

padrão descrito inicialmente por Hashimoto: infiltração linfoplasmocitária, destruição da estrutura folicular, formação de centros germinativos, presença de células oncocíticas (de Hürthle, Askanazy, ou oxifílicas) atrofia parenquimatosa e fibrose¹⁶. Em outro extremo, há autores que consideram que todas as tireoidites com infiltrado mononuclear como sendo manifestações da mesma doença, independentemente do padrão histológico apresentado^{16,17,18}. Até o momento, não há elementos suficientes para favorecer uma ou outra corrente.

1.1 Etiopatogenia e fisiopatologia das tireoidites auto-ímmunes

A etiopatogenia das tireoidites auto-ímmunes é complexa e não está completamente esclarecida^{2,12}. Como mencionado acima, a participação da hereditariedade na gênese das tireoidites foi estimada em 50%^{2,3}. Este resultado ressalta a importância da contribuição de fatores ambientais. Até o momento nenhum gene ou locus inequivocamente associado a tireoidites auto-ímmunes foi identificado¹⁹. Da mesma forma, apesar de vários fatores ambientais terem sido incriminados como causadores de tireoidites auto-ímmunes, nenhuma associação causal foi demonstrada de maneira definitiva nem os mecanismos que ligam a exposição a estes fatores à inflamação tireoidiana estão adequadamente esclarecidos¹⁹.

Consideráveis esforços têm sido dedicados à busca de genes e/ou regiões cromossômicas associadas ao fenótipo de auto-imunidade tireoidiana. Duas regiões cromossômicas, HT1, localizada no cromossomo 13q33, e HT2, no cromossomo 12q22³ foram detectadas em estudos de escrutínio do genoma inteiro como sendo associadas à tireoidite de Hashimoto¹⁹. O envolvimento do HT2 já foi confirmado ao passo que o papel do HT1 ainda aguarda confirmação. Estudos mais dirigidos examinaram a participação de genes imunomoduladores do sistema MHC (*Major histocompatibility complex*), CTLA-4 (*Citotoxic T Lymphocyte-Associated 4*), CD40) e de Tg (tireoglobulina). A presença de alelo DR3 do MHC da classe II parece causar susceptibilidade à TH ao passo que os alelos DQA1*0102 e DQB1*0602 parecem proteger seus portadores. Estes achados ainda precisam ser replicados. A participação do CTLA-4 na gênese da TH é controversa. Até agora nenhuma associação do CD40 com TH foi observada. Finalmente, variantes do intron 27 do gene da Tg foram apontadas como associadas à gênese da TH¹⁹. Estes estudos indicam que mecanismos moleculares de imunomodulação e, possivelmente, a produção da tireoglobulina fazem parte da etiopatogenia das tireoidites auto-imunes. Nenhum fator descrito pode, porém, explicar a especificidade tecidual do processo auto-imune^{2,20}.

Vários fatores ambientais como tiocianatos do fumo de tabaco, iodo em doses acima da necessidade diária ou sua suplementação para tratamento de bócio endêmico, estresse²¹ e alguns fármacos como amiodarona²² e lítio têm sido implicados como fatores de risco no

desenvolvimento do processo auto-imune tireoidiano²³. Fatores endógenos, como o estado pós-parto, estão associados ao início ou à exacerbação de tireoidites auto-imunes. É possível que essa exacerbação esteja relacionada ao microquimerismo fetal intratireoidiano (implantação de células fetais no tecido tireoidiano materno)^{24,25}. Outro fator endógeno possivelmente associado a tireoidites auto-imunes é o envelhecimento. O declínio da função imune a ele associado provavelmente predispõe à auto-imunidade^{26,27}.

Apesar de uma profusão de fatores terem sido relacionados à tireoidite auto-imune, os eventos iniciais que a desencadeiam ainda não são bem compreendidos. A exposição de antígeno e sensibilização de células imunes seria a primeira etapa lógica do desenvolvimento de auto-imunidade tireoidiana. Isso está bem documentado em animais de experimentação tratados com altas doses de iodo^{28,29,30}. Nestes animais, a necrose induzida por iodo é acompanhada de infiltração por células imunes, entre as quais as células MHC Classe II⁺ (apresentadoras de antígenos) o que leva à sensibilização e ativação das células imunes. Em humanos, a necrose de células foliculares não é um evento habitualmente descrito ou encontrado nas tireoidites auto-imunes. Dessa maneira, outras formas de exposição e apresentação de antígenos devem estar associadas.

Outro mecanismo que tem sido implicado na exposição de antígenos tireoidianos ao sistema imune é a apoptose. Ao contrário da necrose, que utiliza fagócitos recrutados pela inflamação para remover os restos e *debris* celulares, a apoptose lança mão de fagocitose não especializada (com

eficiência menor do que os fagócitos “profissionais”). Quando a remoção de corpos apoptóticos é deficiente, é possível que o acúmulo de antígenos apoptóticos altere a tolerância normal e cause sensibilização dos linfócitos. Lúpus eritematoso sistêmico é uma das doenças auto-imunes para o qual este mecanismo tem sido proposto³¹. A frequência de apoptose é de aproximadamente 1% em tireóides normais e 20-30% nas tireóides com tireoidite². Pode-se especular que, além de ser mecanismo efetor de destruição folicular, a apoptose participe da perpetuação da auto-imunidade tireoidiana.

A exposição inicial de auto-antígenos tireoidianos (por necrose ou por apoptose) é seguida por uma fase caracterizada pela produção, aparentemente descontrolada, de células T CD4⁺, células citotóxicas CD8⁺ e auto-anticorpos da classe IgG. Durante esta fase tecido linfóide pode se desenvolver dentro da tireóide, com a formação estruturas organizadas como folículos linfóides com centros germinativos³². Numa terceira fase, as células T auto-reativas se acumulam e infiltram o parênquima tireoidiano e causam, através de diversos mecanismos, a morte das células foliculares e destruição dos folículos tireoidianos.

Vários mecanismos imunológicos têm sido implicados na morte dos tireócitos embora a sensibilização da célula T-*helper* CD4⁺ por antígenos pareça ser o evento inicial. Dependendo do padrão de citocinas produzidas pelas células T *helper* poderemos ter evolução para destruição auto-imune da glândula com polarização para Th1 (predomínio de produção citocinas IFN- γ , TNF- α , e IL-2) e mecanismos de imunidade celular ou polarização

para Th2 (predomínio de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13) com mecanismos de imunidade humoral e produção de auto-anticorpos dirigidos contra receptores de TSH. A primeira é a via predominante de lesão de tirócitos na TH ao passo que a imunidade humoral é vista na doença de Graves mas também ocorre na tireoidite atrófica^{14,33,34}.

A polarização Th1 acarreta infiltração linfocitária da tireóide e citotoxicidade mediada por linfócitos CD8 citotóxicos. A apoptose poderá ocorrer através de mecanismos dependentes do receptor Fas ou CD95, levar assim à destruição celular^{14,33}.

Dentre os mecanismos de morte celular que podem estar envolvidos, os seguintes caminhos são descritos¹⁴ (Figura 1):

1- Via de linfócitos T *helper* CD4⁺⁺: estas células ativadas por antígenos liberam citocinas, principalmente intérferon- γ (INF- γ), ativando o processo da inflamação. Recrutam e ativam os macrófagos, como nas reações de hipersensibilidade retardada, resultando em lesão tireoidiana por produtos tóxicos das células inflamatórias. CD4⁺ via IL-2 promove também a maturação e diferenciação de linfócitos B a plasmócito e conseqüente produção de anticorpos;

2- Via dos linfócitos T CD8⁺: com a ligação Fas Fas-ligande (receptor de morte celular) desencadeia a via extrínseca da apoptose da célula folicular ou ainda, via liberação de grânulos de granzima e perforina promove a morte celular por apoptose ou necrose;

3- Via da citotoxicidade: após a ligação de antígenos aos anticorpos ocorre desestabilização da membrana celular com recrutamento de células natural killer (NK) não existindo, porém ainda evidências que comprovem esta via.

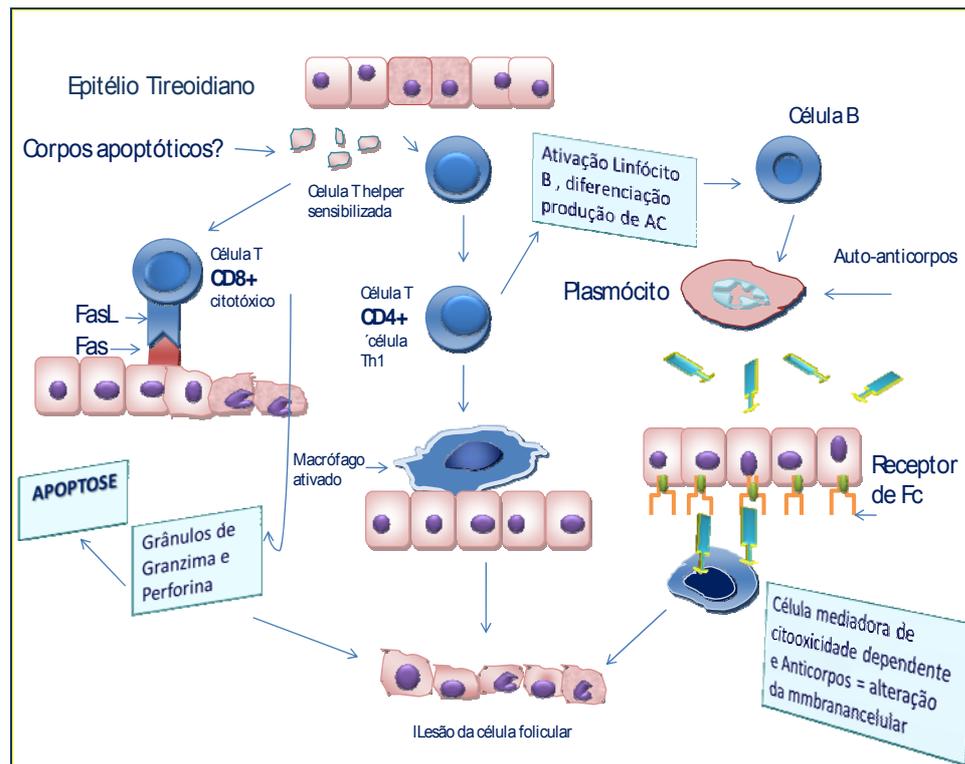


Figura 1 - Fisiopatologia da tireoidite (Adaptado e modificado de Kumar et al., 1999¹⁴)

1.2 Papel do iodo

O iodo é um oligoelemento encontrado no corpo humano em pequenas quantidades (15 a 25 mg) quase exclusivamente na glândula tireóide, sendo essencial à síntese dos hormônios tireoidianos, tiroxina e triiodotironina³⁵. A necessidade do organismo humano é inteiramente

suprida através de produtos alimentares (sal iodado, algas marinhas, conservantes e corantes de cor vermelha)⁷. Uma vez ingerido, o iodo é ativamente captado por células de folículos tireoidianos num mecanismo de transporte que utiliza o simportador sódio-iodo (NIS, do inglês *sodium-iodide symporter*) presentes na porção basal das células tireoidianas. Na porção apical destas células, o iodo é ligado covalentemente aos anéis aromáticos dos resíduos de tirosina presentes na cadeia da tireoglobulina num processo conhecido como organificação. A organificação de iodo é catalisada pela peroxidase tireoidiana (TPO) e requer a participação de H₂O₂ como cofator. Estes últimos são gerados por oxidases de NADPH conhecidos como (ThOx, do inglês thyroid oxidase) 1 e 2. A dose diária recomendada de iodo para adultos é de 150 µg sendo a excreção urinária correspondente a 75-90% da quantidade de iodo ingerida²⁰. A dosagem de iodo urinário (ou iodúria) é tecnicamente simples e apresenta um custo acessível³⁶. Por causa disso, a dosagem do iodo urinário é um método aceito internacionalmente para estimar a quantidade de iodo ingerida nas diferentes populações. Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) a iodúria maior ou igual a 200 µg/l indica uma ingestão em níveis que colocam em risco a saúde ao passo que um valor menor do que 100 µg/l é indicativo de deficiência de ingestão de iodo³⁷.

A associação entre a introdução do sal iodado nas áreas endêmicas de bócio e o desenvolvimento de tireoidites auto-imunes tem sido relatada em vários trabalhos^{38,39,40,41,42}. Embora existam controvérsias ainda não plenamente resolvidas, valores elevados de iodúria (maiores do que

200 µg/l), apresentados por populações que vivem em áreas suficientes de iodo, vêm sendo relacionados ao aumento da incidência e prevalência da doença auto-imune da tireóide^{27,40,41,43,44}. Em adição a estes achados, é possível observar uma relação dose-resposta entre o iodo alimentar (estimado por iodúria) e a frequência de hipotireoidismo e tireoidites auto-imunes⁴². Estes achados encontram eco também em trabalhos realizados no nosso meio^{36,43}. Essa noção adquirida em estudos populacionais vem ao encontro das observações, já bem conhecidas dos clínicos, de que substâncias iodadas como contrastes radiológicos^{45,46,47,48} e medicamentos ricos em iodo²², são capazes de levar a alterações hormonais e aparecimento de auto-anticorpos em adultos e crianças.

Iodo em doses acima de 5 mg/dia inibe inicialmente a síntese e liberação de hormônios tireoidianos. Isso ocorre por inibição da produção, induzida por TSH, de cAMP – mensageiro intracelular que intermédia boa parte das ações do TSH. Além disso, sabe-se que a expressão de TPO e de ThOx é reduzida na exposição aguda a iodo em altas doses. O fenômeno descrito acima é conhecido como efeito de Wolff-Chaikoff agudo. Após aproximadamente 10 dias de excesso de iodo esse efeito se desfaz, havendo adaptação aos elevados níveis de iodo (fase de escape). Acredita-se que o efeito de Wolff-Chaikoff seja mediado pela geração de algum composto orgânico iodado ainda não identificado. Em suporte a este modelo o mRNA e a proteína do NIS diminui durante o escape ao efeito de Wolff-Chaikoff⁴⁹ possivelmente levando à redução da produção deste composto iodado. Durante a fase aguda do efeito de Wolff-Chaikoff ocorre uma

redução da vascularização tireoidiana possivelmente resultante da redução da expressão de fatores angiogênicos como VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*), VEGF-B e PGF (*Placental growth factor*) e aumento de fatores anti-angiogênicos como PLAU (*urokinase-type plasminogen activator*) observados em cultura de células tireoidianas com excesso de iodo⁵⁰.

Estudos experimentais têm demonstrado que o iodo pode exercer um efeito tóxico direto. Observações independentes feitos em cultura de tireócitos humanos mostram que iodo per se, em altas concentrações (na faixa de 10-3M), provoca a morte de tireócitos por apoptose e por necrose^{30,51}.

Medidas de espécies reativas de oxigênio intracelular por método fluorescente e quantificação de peroxidação de lípidos indicam que o iodo, nestas concentrações, produz estresse oxidativo nas células tireoidianas⁵¹. Finalmente, tireóide de animais tratados com até 100 mg/kg/dia de iodeto de sódio apresentou alterações na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo⁵². Portanto, o iodo exerce por si só efeito tóxico direto mediado provavelmente por estresse oxidativo.

1.3 Fortificação do sal com iodo

Dada a importância que o iodo tem na fisiologia da síntese de hormônios tireoidianos e o papel crítico que estes últimos exercem na regulação do metabolismo orgânico e no desenvolvimento do sistema

nervoso central, não é difícil deduzir que impactos negativos a deficiência de iodo pode provocar (Tabela 3). De fato, a OMS criou o termo “doenças por deficiência de iodo” – para designar todos os efeitos deletérios à saúde por deficiência de iodo não limitado a um órgão, sistema ou faixa etária específicos⁵³ (Tabela 3). Todas estas alterações reduzem a capacidade produtiva e a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Visto que o alimento é a única fonte significativa de aporte de iodo para seres humanos e que são poucos os alimentos naturalmente ricos em iodo, a deficiência de iodo é uma condição que afeta normalmente uma comunidade ou uma região inteira. Segundo a OMS, atualmente ainda existem 54 países (Figuras 2 e 3) cuja população se encontra com deficiência de iodo⁵³.

Tabela 3 - Desordens causadas pela deficiência de iodo

Expectro das desordens causadas pela deficiência de iodo	
Grupos fisiológicos	Conseqüências para a saúde da deficiência de iodo
Todas as idades	Bócio Hipotireoidismo Maior susceptibilidade à radiação nuclear
Feto	Abortamento espontâneo Prematuridade Anomalias congênitas Mortalidade peri-natal
Neonato	Cretinismo endêmico incluindo deficit mental com mistura de mutismo, diplegia espástica, estrabismo, hipotireoidismo e baixa estatura
Criança e adolescente	Diminuição da função mental Desenvolvimento físico retardado Hipertireoidismo iodo-induzido
Adultos	Diminuição da função mental

Em vista do impacto da carência de iodo na saúde de populações inteiras varias medidas vem sendo tomadas pela OMS a partir de 1960 ao iniciar o monitoramento global da deficiência de iodo e recomendar ações de controle. A iodação de sal, por ser um método eficiente e de baixíssimo custo (2 a 9 centavos de dólar americano/pessoa/ano ou seja menos de vinte centavos de real/pessoa/ano), foi adotada por vários países como a estratégia para corrigir a carência de iodo. Baseado nos resultados obtidos

por esses países, em 1994, numa sessão conjunta com UNICEF, a OMS recomendou oficialmente a adoção da iodação universal de sal (USI, do inglês universal *salt iodization*) por seus países membros.

A iodação do sal no Brasil foi iniciada com a lei de 1953 que tornava obrigatória a fortificação do sal consumido em áreas endêmicas de bócio. Desde então, a regulamentação oficial desse assunto passou por várias modificações e foram sendo definidas as autoridades responsáveis por normatização e fiscalização dos níveis de iodação do sal bem como a responsabilidade dos usineiros na adição de iodo ao sal. Esta legislação trouxe um avanço significativo no controle de bócio endêmico. Entretanto, em nosso meio há uma heterogeneidade considerável no que diz respeito à suficiência de iodo. Um estudo brasileiro de 1994 detectou uma ingestão relativamente baixa de iodo em 20.000 crianças em idade escolar estudadas (mediana da excreção urinária de iodo $< 100 \mu\text{g/l}$)³⁶. Por causa disso, a iodação foi aumentada de 40-60 mg de iodo/kg de sal para 40-100 mg de iodo/kg de sal em 1998⁴³. Estudos posteriores^{54,55} documentarem que a população brasileira foi exposta ao iodo em excesso (mediana da excreção urinária de iodo $> 300 \mu\text{g/l}$) de 1998 a 2003 após o que os limites de iodação do sal foram reduzidos para 20-60 mg de iodo/kg de sal. Dessa maneira, nas duas últimas décadas, a população brasileira foi submetida a regimes diversos de aporte de iodo através do sal. O efeito dessa variação do regime ainda não foi apreciado na sua totalidade.

Type of Urinary Iodine Data

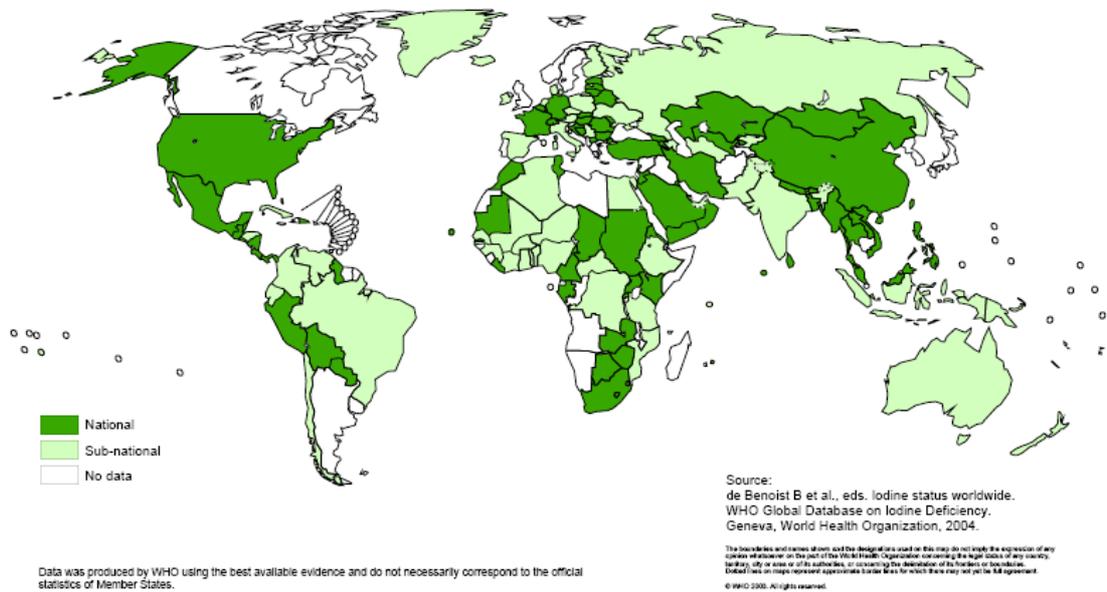


Figura 2 - Mapa da OMS especificando a extensão territorial de cada país envolvida na coleta das dosagens de iodo urinário da população, para a classificação de suficiência mundial de iodo³⁷

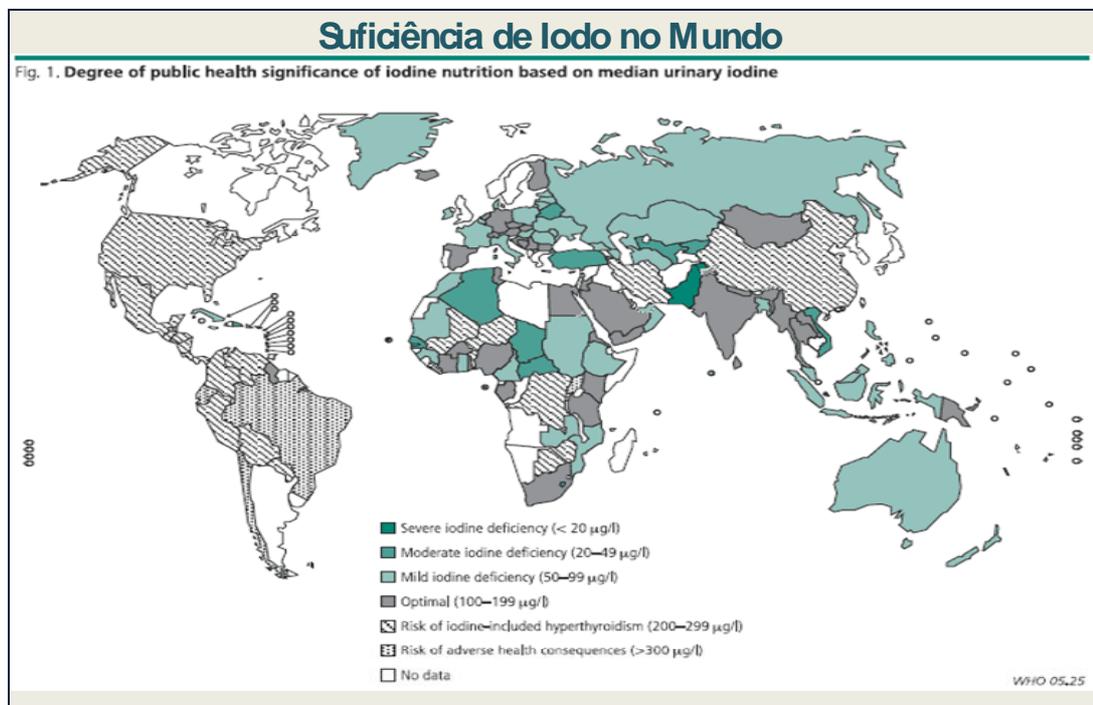


Figura 3 - Mapa da Organização Mundial da Saúde especificando a suficiência de iodo mundial³⁷

Pelo exposto, ficam evidentes algumas lacunas no nosso conhecimento em relação a esta condição tão comum que é a tireoidite auto-imune. O verdadeiro significado dos infiltrados linfocitários tireoidianos requer uma clarificação antes que uma classificação histológica concisa, coerente com a fisiopatologia e aceita pela comunidade de clínicos e patologistas possa ser proposta. Adicionalmente, as controvérsias quanto ao papel do iodo na indução de tireoidite poderia e deveria ser mais bem examinada à luz de modelos experimentais que simulem ao máximo as condições de exposição ao iodo de pessoas que vivem em regiões não carentes deste elemento. Por estas razões desenvolvemos o presente estudo, composto de um estudo retrospectivo em necropsias para avaliar se houve aumento de prevalência de tireoidites na população estudada e uma avaliação em animais de experimentação que apresentam predisposição natural a doenças auto-imunes, inclusive tireoidianas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1- Detectar e caracterizar infiltrados mononucleares em tireóides não neoplásicas nas necropsias realizadas de 2003 a 2007 no SVOC da Universidade de São Paulo e comparar a prevalência deste achado com aquela encontrada no mesmo serviço de 1931 a 1989.
- 2- Avaliar a presença e intensidade de marcadores de apoptose nas tireóides que apresentam o infiltrado mononuclear.
- 3- Avaliar o papel de iodo na gênese da tireoidite auto-imune em animais de experimentação e o efeito do iodo na histologia tireoidiana desses animais.
- 4- Desenvolver um modelo experimental para o estudo de tireoidite.

3 MÉTODOS

3.1 Estudos das necropsias

Revisamos retrospectivamente 4613 necropsias consecutivas no período de 2002 a 2007, realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Universidade de São Paulo compreendendo necropsias de verificação de óbitos naturais domiciliares mal definidos e de óbitos ocorridos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

As necropsias realizadas neste serviço, por residentes do Serviço de Patologia são supervisionadas por professores e médicos da Faculdade de Medicina, em sua realização e análise histológica do material. Todas as necropsias têm ampla coleta material, embora não sistemática⁵⁷.

3.1.1 Microscopia óptica

Separamos para revisão as lâminas dos casos que receberam diagnóstico de tireoidites. As tireoidites específicas e outras patologias tireoidianas foram excluídas, por não fazerem parte dos objetivos deste estudo. Os espécimes de tireóide e outros órgãos foram fixados em formaldeído a 10% e incluídos em parafina e cortes de 3 a 5µm foram corados pelo HE (Hematoxilina-eosina). As lâminas selecionadas foram reavaliadas por um único observador HB (Prof. Dr. Helio Bisi) e classificadas

de acordo com o padrão dos infiltrados em: infiltrado linfocitário (IL) e infiltrado linfoplasmocitário (ILP).

IL foi definida para nosso estudo como infiltrado linfocitário intersticial, focal ou difuso, sem distorção da arquitetura lobular e ILP como o infiltrado de linfócitos em diferentes fases de maturação, com ou sem a presença de macrófagos e obrigatoriamente de plasmócitos sendo as células oncocíticas facultativas em nossa classificação assim como a distorção da arquitetura lobular. As células oncocíticas não foram consideradas como critério diagnóstico porque elas são encontradas em outras doenças tireoidianas como, por exemplo, bócio adenomatoso.

3.1.2 Imunohistoquímica

Blocos de material tireoidiano de 40 casos de tireoidite foram recuperados (20 casos classificados à microscopia óptica como IL e 20 como ILP) e submetidos ao estudo imunohistoquímico e foi usada uma tireóide normal como controle. Cortes de 3 μ m de tecido, em lâminas silanizadas foram submetidos a técnicas de imunohistoquímica para pesquisa de marcadores de linfócito T CD4⁺(Dako), CD8⁺(Dako), de macrófagos por CD68⁺(Dako) e linfócito B(CD20⁺) foram realizados para identificação dos infiltrados. Para pesquisa de apoptose foram realizadas caspase-3 e a técnica do TUNEL (Roche).

A desparafinação foi feita com banhos de xilol primeiro por 10 minutos à 60°-65°C e em seguida de três banhos em temperatura ambiente. Os tecidos depois foram re-hidratados em banhos de álcool (95% e 70%) e lavados em água corrente.

A recuperação dos antígenos foi realizada por um minuto em solução de citrato 10mM, pH 6,0 em panela de pressão a temperatura elevada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por incubação de 10 minutos em água oxigenada (H₂O₂) e o bloqueio de imunoglobulinas não específicas foi obtido por imersão em leite desnatado a 2% por 20 minutos. Finalmente as lâminas foram encubadas em geladeira por 12 horas com anticorpos primários a 4°C, em câmara úmida. Antes da incubação com o anticorpo secundário biotilado, as lâminas foram lavadas por 3 minutos em PBS (salina tamponada por fosfato) antes da incubação com o anticorpo secundário biotilado. A revelação foi realizada com complexo de peroxidase conjugado por 30 minutos a 37° C (Novocastra Novolink) usando DAB (diaminobenzidina- Sigma) como cromógeno. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris.

3.1.3 Análise semi-quantitativa das lâminas de imunohistoquímica

Para a análise semi-quantitativa das lâminas de imunohistoquímica foi realizada a varredura de cada lâmina estudada no aumento médio (100X).

Para a avaliação dos infiltrados todas as marcações positivas (“Hot spots”) foram classificadas nas seguintes graduações: Total (todo o campo a difusamente ou > 75%), Dominante (superior a 50% do campo óptico), Média (de 25 a 50% do campo óptico), Escassa (menor de 25% do campo óptico), Rara (apenas algumas raras células marcadas no campo óptico) e Ausente (ausência de células marcadas). A cada graduação foi atribuído um escore para estabelecer uma quantificação relativa da positividade: Total escore 5, Dominante escore 4, Média escore 3, Escassa escore 2, Raras células escore 1 e Ausente escore 0 (Figura 4).

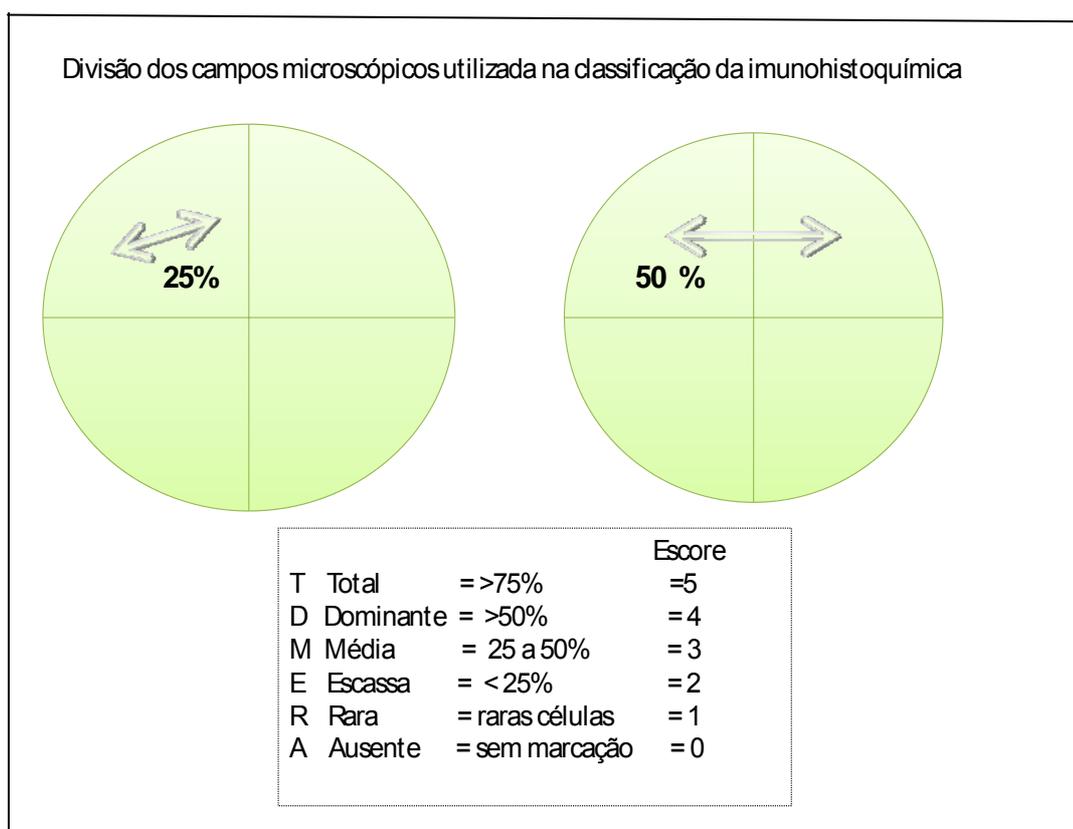


Figura 4 - Método de análise semi-quantitativa dos infiltrados com a divisão dos campos microscópicos e tabela dos escores utilizados para classificar os infiltrados dos infiltrados

Para a avaliação da marcação para caspase e TUNEL, a lâmina toda foi examinada e todos os campos da amostra classificados conforme sua marcação (Tabela 4 e Figura 5). A somatória dos escores foi dividida pelo número de campos marcados e a média dos escores submetida a análise estatística.

Tabela 4 - Escores atribuídos às marcações da Imunohistoquímica para caspase e ensaio do TUNEL

Marcador	Infiltrado	Escore
negativo	negativo	0
negativo	positivo	1
positivo	negativo	2
positivo	positivo	3

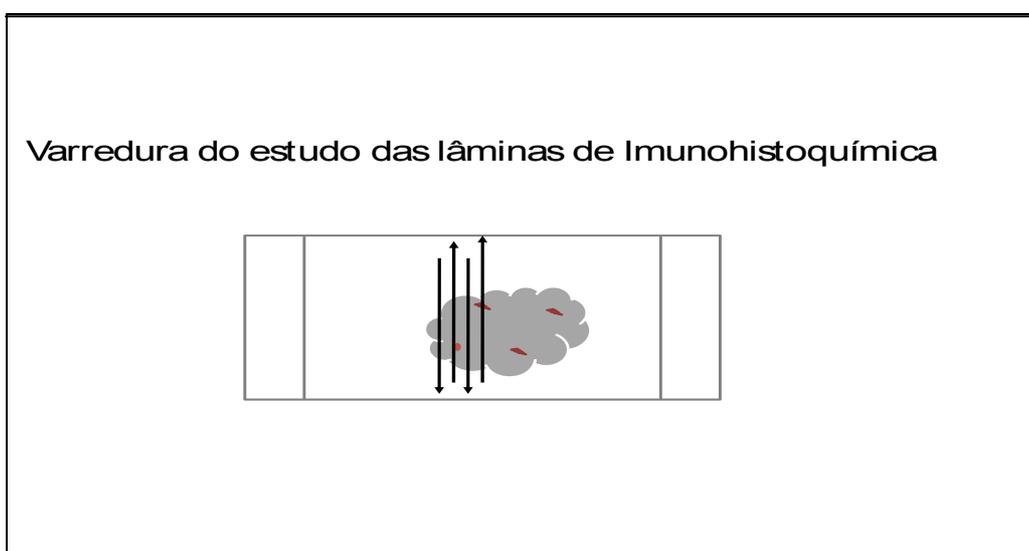


Figura 5 - Método utilizado na avaliação das lâminas de imunohistoquímica por varredura

3.1.4 Análise estatística

A frequência de tireoidites da série atual foi comparada à frequência da série anterior com o uso de teste de chi-quadrado. A homogeneidade da

freqüência de tireoidites nos anos em que as autópsias da série atual foram feitas foi avaliada também por teste de chi-quadrado. A comparação dos escores de imunohistoquímica para CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ e CD68⁺ foi feita pelo teste t de Student e ajuste de modelo de regressão logística.

3.2 Estudo experimental

3.2.1 Camundongos

Matrizes de camundongos NOD (não obesos diabéticos) foram adquiridas do CEDEME (Centro de desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia) da Universidade Federal de São Paulo, procriados e mantidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Foram utilizadas 64 fêmeas de 4 a 6 semanas de vida, divididas em dois grupos iguais (Grupo Experimental e Grupo Controle).

O Grupo Experimental (GE) recebeu a quantidade média de 0,2 mg/animal/dia de iodo sob a forma de iodeto de potássio na água de beber, estimado pelo volume de água ingerido diariamente pelos animais.

O Grupo Controle (GC) recebeu água sem adição de iodo. Os grupos GE e GC foram divididos em dois novos grupos de 16 animais cada um, assim denominados: grupo GE60, grupo GE90, grupo GC60 e grupo GC90

de acordo com o tempo de exposição à água iodada isto é 60 ou 90 dias. Todos os animais foram alimentados com ração comercial *ad libitum*.

Após os períodos de observação os animais foram pesados, anestesiados com 100mg/Kg de Ketamina e 10mg/Kg de xilazina via intraperitoneal e antes da retirada da tireóide em bloco com a traquéia, foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical.

3.2.2 Microscopia óptica

A tireóide retirada em bloco foi fixada em formalina a 10% e emblocada em parafina. Cortes de 3 μ foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e montados com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e posteriormente analisados à microscopia óptica. Tireoidite foi definida como infiltrado mononuclear independente de sua intensidade.

3.2.3 Microscopia Eletrônica(ME)

Os fragmentos de tireóide para a ME foram fixados em solução tampão de fosfato de glutaraldeído a 2% (0,1M, pH=7,4) e dissecados

imersos nessa solução em lupa (4X). A primeira pós-fixação foi feita com tetraóxido de ósmio e a segunda com uranila por 12 horas. A desidratação do material foi feita com acetona em séries graduadas de 30 a 100% antes de serem emblocadas em resina araldite. Cortes de 70nm foram examinados no microscópio eletrônico Jeol 1010 TEM (Japão).

3.2.4 Análise estatística

O teste Chi-quadrado (χ^2) foi utilizado para estudar a associação entre o tratamento com iodo e frequência de tireoidites e o teste do extrato de Fisher foi usado quando $n < 5$. O risco relativo da tireoidite no grupo experimental foi calculado usando o pacote *Epítapos* escrito para o ambiente estatístico R. Com o intuito de evitar o problema de divisão por zero no cálculo de risco relativo, todos os valores foram acrescidos de 0,5 quando uma das células apresenta o valor zero. Foram considerados significantes os valores de $p \leq 0,05$.

3.2.5 Comissão de ética

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados – Estudo das Necropsias



Das 126 autópsias em cujos laudos constavam diagnósticos de tireoidites auto-imunes pudemos revisar 106. Nestas, a nossa revisão identificou infiltrados mononucleares que, conforme os nossos critérios puderam ser classificados como infiltrado linfocitário (Figura 6) ou infiltrado linfoplasmocitário (Figura 7). O infiltrado linfocitário foi mais freqüente (57,6%) que o infiltrado linfoplasmocitário (42,5%) como demonstrado na Tabela 5. A média de idade dos indivíduos arrolados neste estudo foi de $59,64 \pm 16$ anos para as mulheres e $60,9 \pm 14,78$ para os homens, tendo sido excluída na análise das médias de idade uma criança de 32 dias.

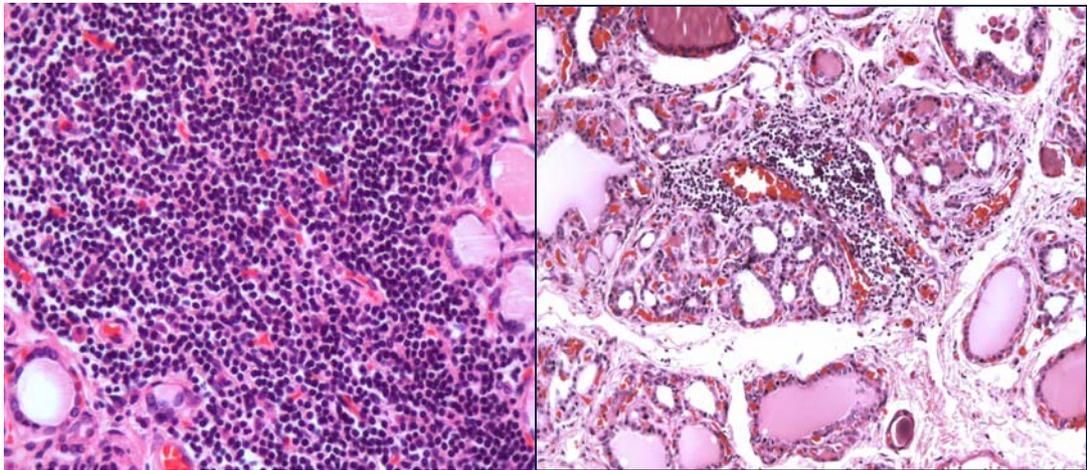


Figura 6 - Infiltrado linfocitário (IL)

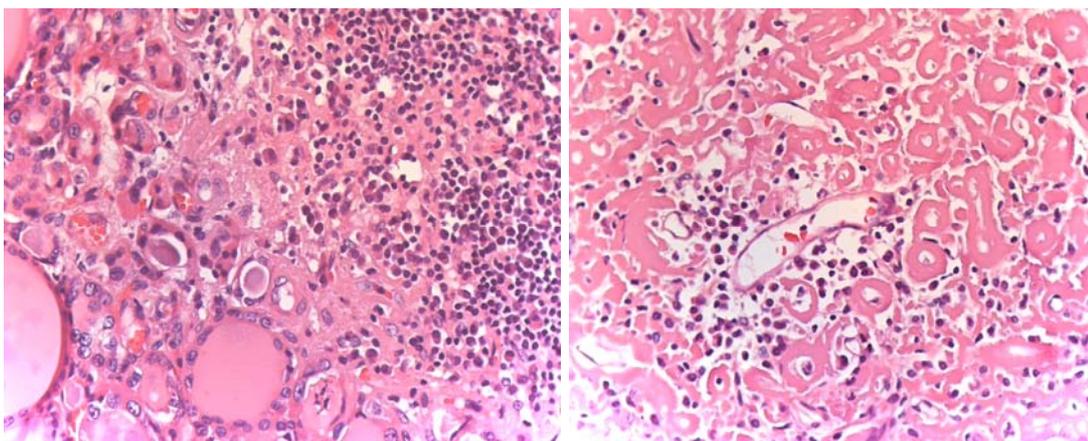


Figura 7 - Infiltrado linfoplasmocitário (ILP) (400X)

Tabela 5 - Prevalência de tireoidite em 4613 casos de necropsias estudados

Classificação do Infiltrado	Total N	% Total Tireoidite	% Total Necropsias
Infiltrado Linfoplasmocitário	45	42,5	0,975
Infiltrado Linfocitário	61	57,6	1,322
Total	106		2,297

A maior frequência (72,6%) dos infiltrados mononucleares tireoidianos foi encontrada no sexo feminino. A prevalência anual esteve em torno de 2,3% não variando ano a ano significativamente nos cinco anos (Tabela 6)

Tabela 6 - Prevalência Anual de tireoidites nas 4613 necropsias estudadas

	2003	2004	2005	2006	2007	total
Número de casos	1076	1066	835	876	760	4613
Infiltrado Linfoplasmocitário	3	11	8	14	9	45
Infiltrado Linfocitário	22	15	10	9	5	61
Total	25	26	18	23	14	106
Total %*	2,32	2,43	2,15	2,62	1,84	2,29

*Sem diferença estatística na prevalência anual.

Quando comparamos a freqüência das tireoidites auto-imunes da série atual à série anteriormente realizada neste mesmo departamento por Bisi et al.⁵⁶ encontramos uma inversão das faixas etárias prevalentes (Figura 8). No período de 1931 a 1989, a tireoidite foi mais freqüentemente vista em indivíduos jovens e o pico de prevalência ocorreu na 4ª década de vida enquanto na série atual a prevalência subiu abruptamente após a 4ª década, tendo seu pico ao redor da 7ª década de vida (Figura 8 e Tabela 7).

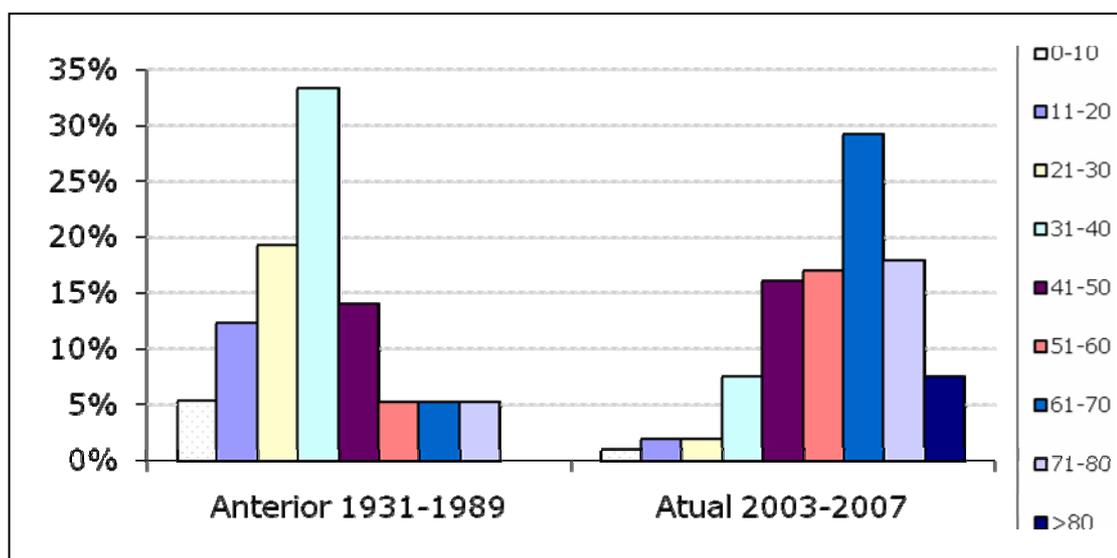


Figura 8 - Distribuição da prevalência de idade. Comparação da série atual e anterior

Tabela 7 - Distribuição das Tireoidites nas faixas etárias em anos, nos dois estudos.

Faixa etária	Estudo	
	Anterior	Atual*
0-10	3 (5,26%)	1 (0,94%)
11-20	7 (12,28%)	2 (1,89%)
21-30	11 (19,3%)	2 (1,89%)
31-40	19 (33,33%)	8 (7,55%)
41-50	8 (14,04%)	17 (16,04%)
51-60	3 (5,26%)	18 (16,98%)
61-70	3 (5,26%)	31 (29,25%)
71-80	3 (5,26%)	19 (17,92%)
>80	0 (0%)	8 (7,55%)
Total	57	106

*p < 0,001

É interessante observar que na série atual encontramos uma prevalência 58 vezes maior que na série anterior (106 em 4613 necropsias e 57 em 145.043 necropsias respectivamente (Tabela 8)).

Tabela 8- Prevalência comparativa de tireoidites encontradas em estudos anteriores de Bisi et al. e na série atual

Séries	Necrópsias (n)	Tireoidite(n)	%
Atual	4.613	106	2,2978
Anterior³	145.043	57	0,0392

No exame histopatológico encontramos folículos dilatados difusamente com epitélio chato em praticamente todos os casos (94,4%,) (Figura 9). Este achado não estava presente em uma tireóide que apresentava infiltrado linfoplasmocitário e em 5 casos em que encontramos uma extensa fibrose.

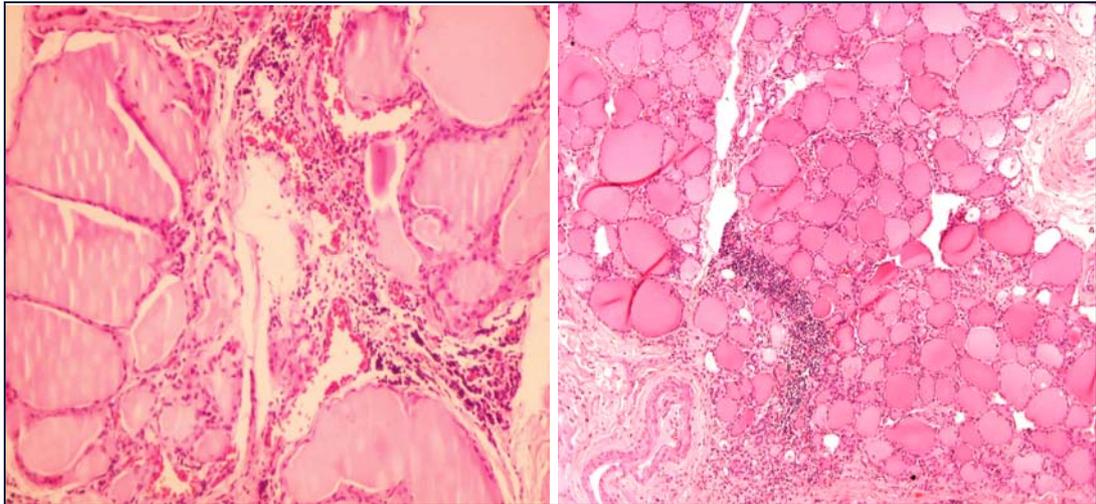


Figura 9 - Folículos dilatados com epitélio achatado. Imagem persistente em 94,4% de nossa revisão (50X)

A marcação para linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ (Figura 10) e $CD20^+$ (Figura 11) foi positiva difusamente ao longo dos infiltrados e $CD68^+$, utilizado para a marcação de macrófagos foi encontrado difusa e esparsamente positivo (raras células por campo) ao redor de folículos e do infiltrado linfocitário em todos os casos estudados (Figura 12).

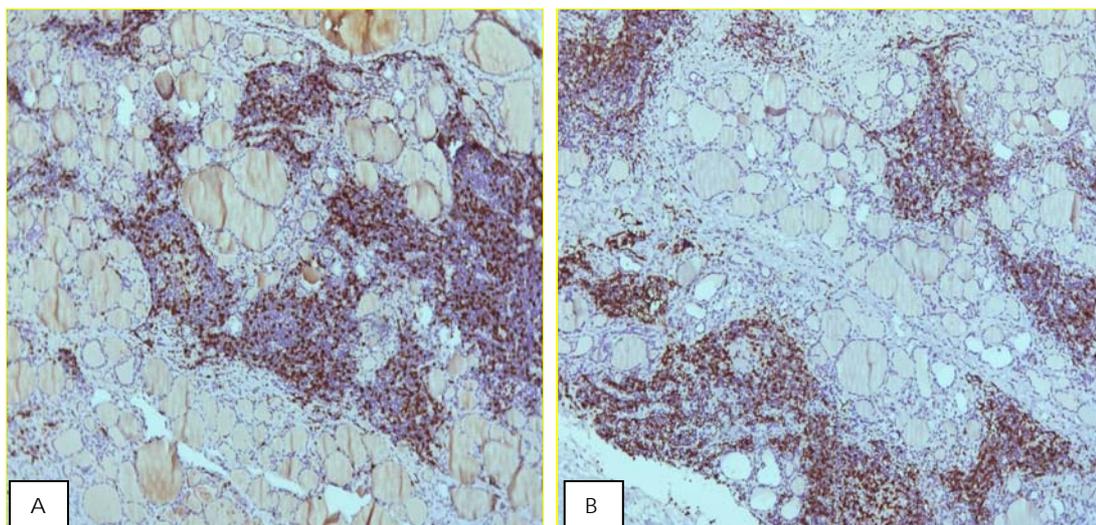


Figura 10 - Imunohistoquímica para $CD8^+$ (A) e $CD4^+$ (B) (50X)

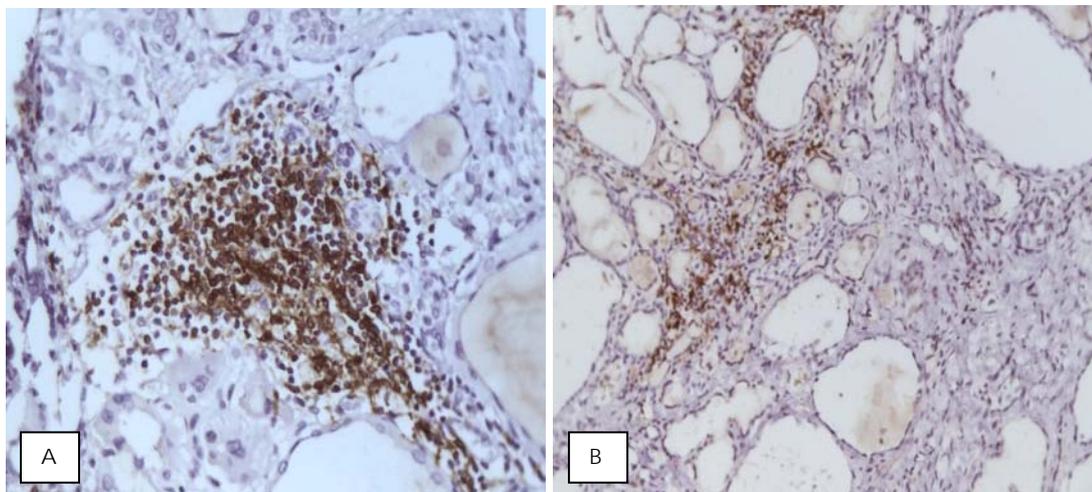


Figura 11- Imunohistoquímica para CD20⁺ (400X e 100X)

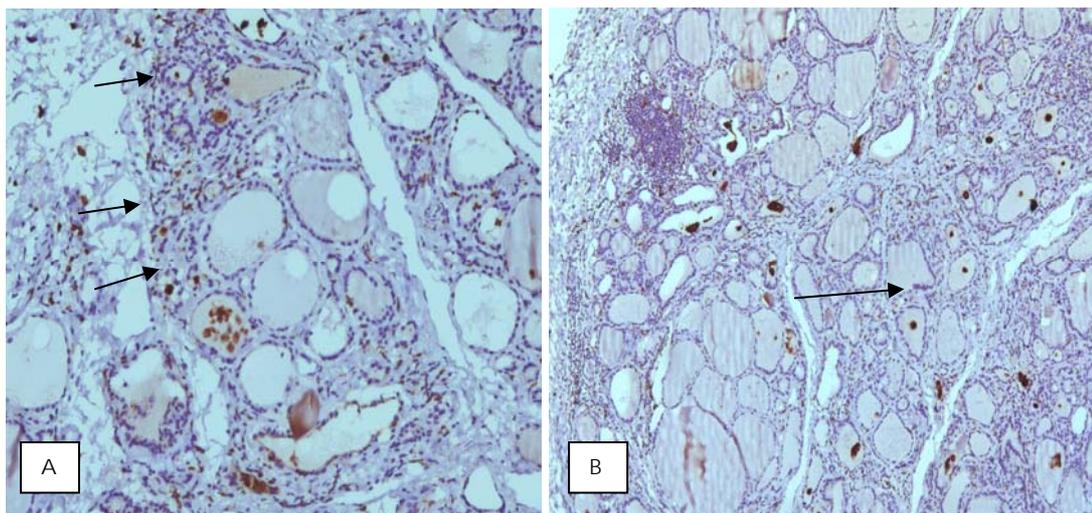


Figura 12 - Imunohistoquímica para CD68⁺ (100X e 50X)

A estimativa da quantidade de infiltrados positivos para CD4, CD8 e CD68, representados pelos escores de semi-quantificação, demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo das tireóides que apresentavam infiltrado linfocitário e o grupo que apresentavam infiltrado linfoplasmocitário (Tabela 9). Em comparação, estes grupos não

apresentaram diferenças significantes na quantidade de infiltrados CD20 positivos (Tabela 9).

Tabela 9 - Média dos escores encontrados para os marcadores de Imunohistoquímica

Marcação	Média dos escores		
	IL	ILP	P*
CD4 ⁺	1,702	2,110	0,01520
CD8 ⁺	1,421	1,847	0,000984
CD20 ⁺	1,617	1,908	0,05288
CD68 ⁺	1,052	1	0,03315
Casp3	1,4855	2,127	0,01708
TUNNEL	1,478	2,070	0,005471

*Todos os parâmetros analisados apresentam diferença significativa quando o tipo de infiltrado é considerado. A exceção é a marcação para CD20 e o ensaio de TUNEL cuja diferença foi marginal.

A marcação tanto para caspase-3 (Figura 13) quanto à técnica do TUNEL (Figura 14) foram positivas em todos os casos e negativa em nosso controle. Estes marcadores para apoptose foram mais intensos nas tireóides que apresentavam infiltrado linfoplasmocitário (Tabela 9).

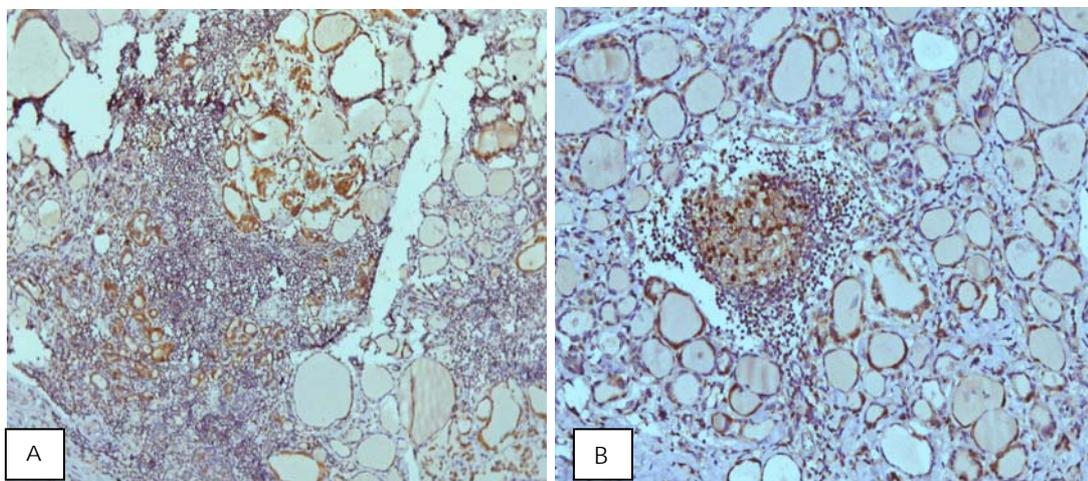


Figura 13 - Imunohistoquímica: caspase-3 (50X)

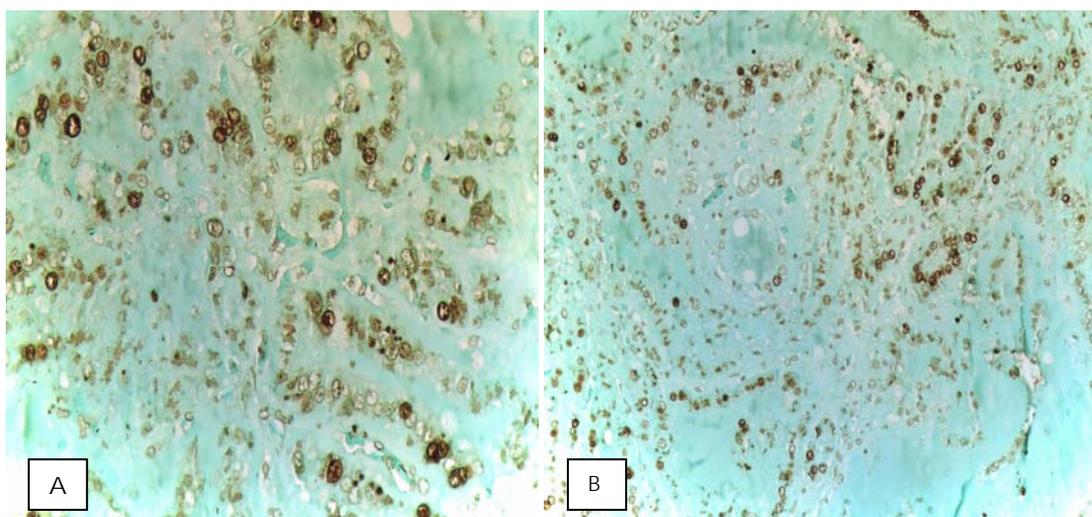


Figura 14 - Ensaio do TUNEL (400X e 100x)

Diante destes resultados, decidimos verificar se era possível diferenciar o tipo de infiltrado (linfocitário ou linfoplasmocitário) a partir da positividade dos marcadores utilizados (marcadores de células T, B e de apoptose). O ajuste de modelo de regressão encontrou associação entre o tipo de infiltrado e a positividade para $CD8^+$ e TUNEL (Tabela 10). A análise de variância indicou que escores de $CD4^+$, $CD8^+$ e TUNEL são os que mais contribuem para a diferenciação dos tipos de infiltrado (Tabela 11).

Tabela 10 - Regressão do Tipo de tireoidite sobre os parâmetros $CD4^+$, $CD8^+$, $CD20^+$, Caspase 3 e TUNEL

Coefficientes			
	Estimativa	Erro padrão	p
Constante	0.30538	0.29771	0.3122
$CD4^+$	-0.13163	0.23264	0.5752
$CD8^+$	0.79683	0.32615	0.0199
$CD20^+$	-0.25171	0.22316	0.2672
Caspase 3	0.05966	0.09663	0.541
TUNNEL	0.27044	0.0996	0.0103

*Este teste mede a associação do parâmetro “tipo de infiltrado” com os escores de imunohistoquímica das células mononucleares e os ensaios para apoptose. Em outras palavras: “qual marcação caracteriza o tipo de infiltrado?”

Tabela 11 - Análise de variância de cada um dos componentes utilizados na regressão

Tipo Resposta	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor F	p
CD4 ⁺	1	1.4607	1.4607	8.4303	0.006439
CD8 ⁺	1	1.1186	1.1186	6.4561	0.01579
CD20 ⁺	1	0.112	0.112	0.6463	0.427032
Casp 3	1	0.1405	0.1405	0.8108	0.374215
TUNNEL	1	1.2774	1.2774	7.3724	0.010331
Residuais	34	5.8909	0.1733		

Esta tabela apresenta a contribuição relativa de cada marcador de infiltrado ou de apoptose na diferenciação do tipo de infiltrado. O tipo de infiltrado está associado à marcação para CD8 e para TUNNEL. As variáveis que mais contribuem na diferenciação de TL e TH são CD4, CD8 e TUNNEL (GL: grau de liberdade).

4.2 Resultados

Estudo Experimental



Não houve diferença no peso médio (25g) dos animais dos grupos experimental e grupo controle ao final do tempo de estudo dos diferentes grupos, não evidenciando sinais de processo catabólico.

O uso de água iodada no grupo experimental de 60 dias foi associado ao desenvolvimento de tireoidite nos camundongos NOD de nosso grupo. Com a sobrecarga de iodo, 8 de 16 animais do grupo GE60 apresentaram infiltrado linfocitário compatível com tireoidite. Esse achado se contrapõe ao fato de que nenhum animal do grupo controle GC60 apresentou infiltrado na tireóide (Tabela 12). Essa diferença de frequência entre esses grupos foi estatisticamente significativa ($p = 0,0012$) pelo teste do exato de Fisher.

Tabela 12 - Resultados dos grupos experimental (GE) e controle (GC)

Grupo	Período de exposição	N	Tireoidite	Necrose	Risco relativo
GE60	60 dias	16	8	5	17,00 (1,06-271,78)
GE90	90 dias	15*	7	1	2,49 (0,78-7,89)
GC60	60 dias	16	0	0	
GC90	90 dias	16	3	0	

*um camundongo morreu durante o experimento sem causa definida

Não houve incremento da frequência de tireoidites nos camundongos do grupo experimental observados por 90 dias (grupo GE90), tendo sido

observado infiltrado em 7 dos 15 animais. No grupo controle de 90 dias (grupo GE90) foi observado infiltrado em apenas 3 animais (Tabela 1). Um animal do grupo GE90 morreu de causa indeterminada.

A comparação das freqüências dos grupos GE90 e GC90, porém não foi estatisticamente significativa ($p = 0,0812$).

À microscopia óptica, a tireoidite iodo-induzida foi caracterizada pelo infiltrado linfocitário que variou de pequenos focos de linfócitos invadindo o interstício de três ou quatro folículos (Figura 15A) à extensa infiltração de substancial porção do lobo tireoidiano (Figura 15B). A intensidade da infiltração correlacionou-se, aparentemente, ao tempo de exposição ao iodo.

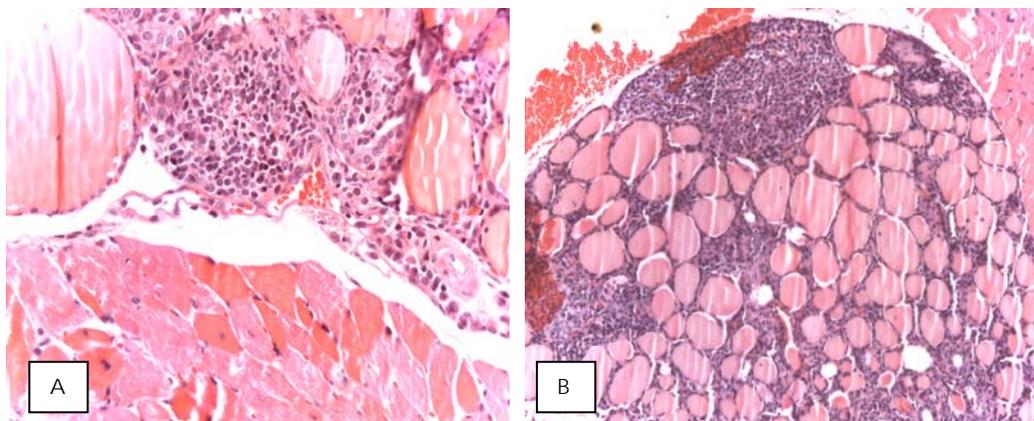


Figura 15 - Microscopia Óptica: infiltração linfocítica focal ou extensa em tireóides do GE. Notar paratireóide na região superior da Figura B (100 X e 50X)

Essas infiltrações estiveram freqüentemente ao redor de grandes folículos ou cistos formados por folículos coalescentes (Figura 16) e algumas vezes foram encontradas necrose de folículos e quebra da arquitetura tireoidiana (Figura 17). Folículos atróficos com diminuição de seus diâmetros foram encontrados envoltos pelo ou na periferia dos infiltrados (Figura 18).

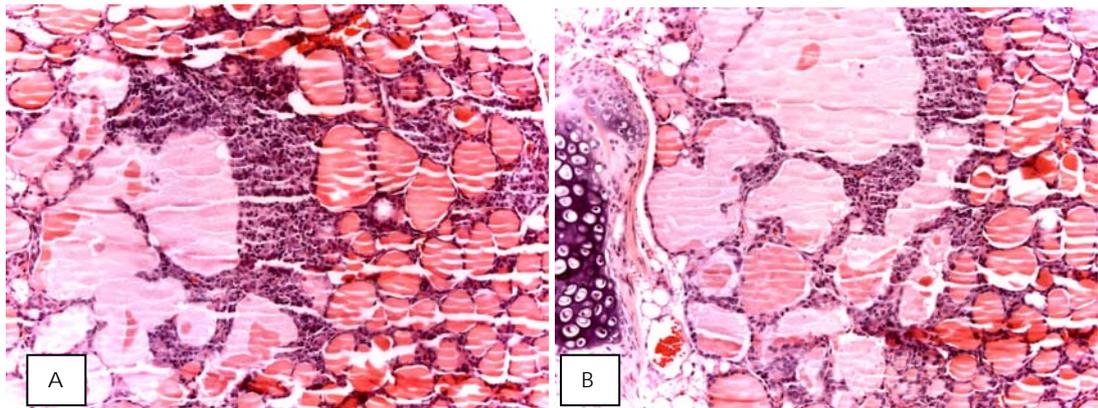


Figura 16 - Microscopia Óptica: Infiltração linfocitária ao redor de folículos coalescentes e/ou cistos (100X)

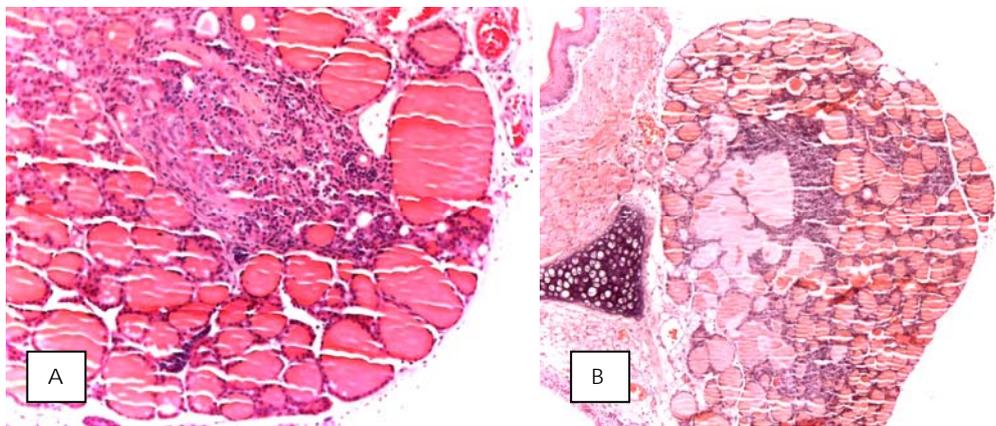


Figura 17 - Microscopia óptica com necrose e infiltração linfocítica (A) e grandes folículos com ruptura da membrana basal (B) (50X)

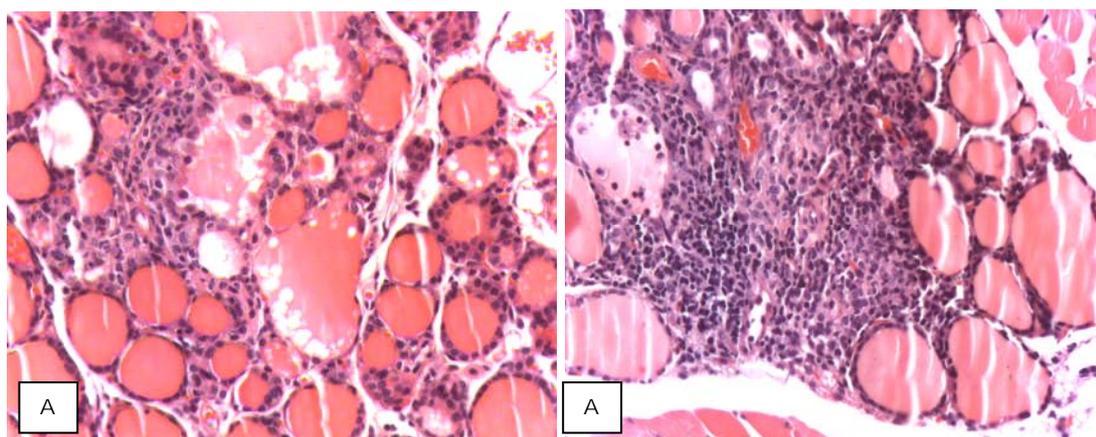


Figura 18 - Microscopia Óptica: Célula plasmocitóide dentro do folículo (A) e macrófago dentro da luz do folículo (B) (400X)

Áreas focais de necrose foram encontradas em alguns animais do GE60 (Tabela 12) e em 3 deles foi vista tireoidite concomitante. Um animal do GE90 desenvolveu necrose sem que tenha sido visto infiltrado linfocitário. Em nenhum animal dos grupos controle GC60 e GC90 foi encontrada necrose (Tabela 12)

Tireóides de 2 animais expostos por 60 dias ao iodo e de 2 animais controles de idade equivalente foram examinadas à microscopia eletrônica. Nas primeiras encontramos células apresentando retículos endoplasmáticos rugosos distendidos, mitocôndrias degeneradas e edemaciadas com perda de suas cristas (Figura 19). Outros achados incluíram “*debris*” sub-celulares (Figura 20) e imagens que designamos “espaços amorfos” devido a sua natureza desconhecida que são espaços claros, mal definidos nos quais não é possível visualizar no seu interior núcleos ou organelas que pudessem ser identificadas com certeza (Figura 21). Estas alterações ultraestruturais não foram observadas nas tireóides de animais controles (Figura 22).

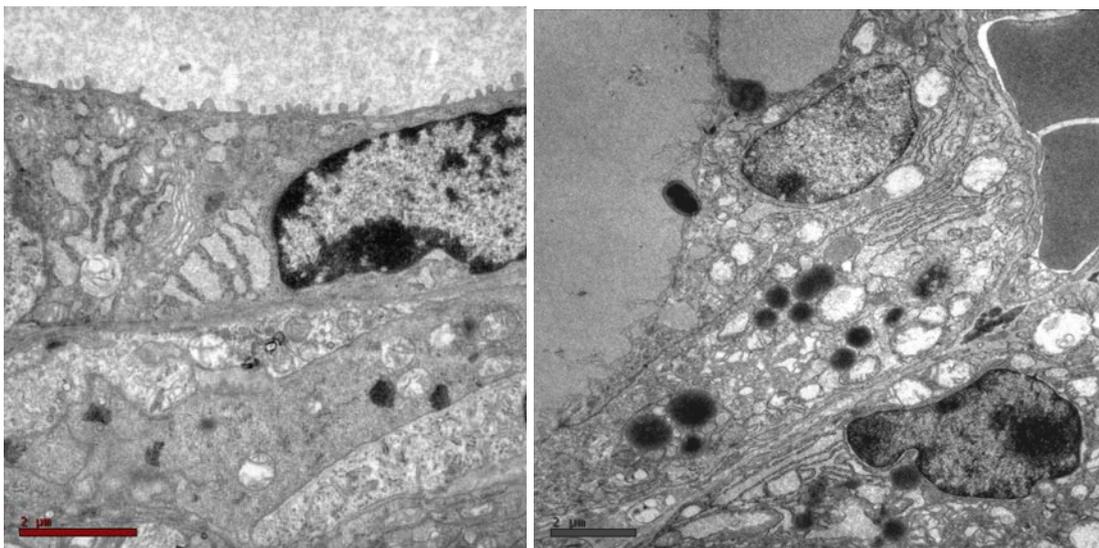


Figura 19 - Microscopia Eletrônica do grupo experimental GE60: retículo rugoso dilatado e mitocôndrias edemaciadas, degeneradas com perda de suas cristas

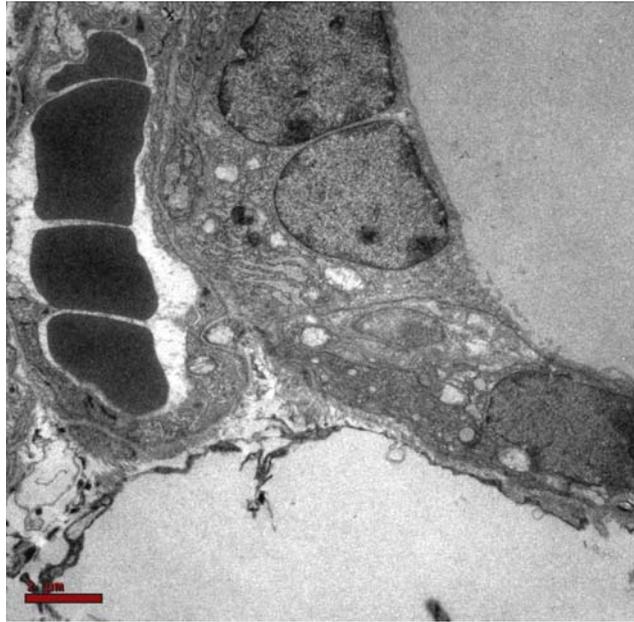


Figura 20 - Microscopia Eletrônica do grupo experimental: *debris* e mitocôndrias edemaciadas

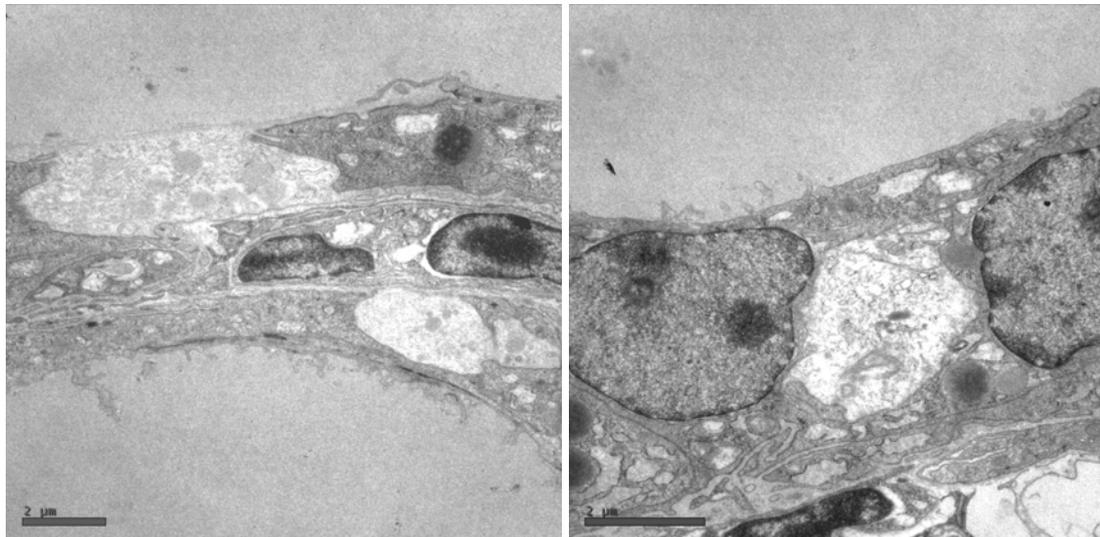


Figura 21 - Microscopia eletrônica do grupo experimental mostrando mitocôndrias edemaciadas e espaços amorfs

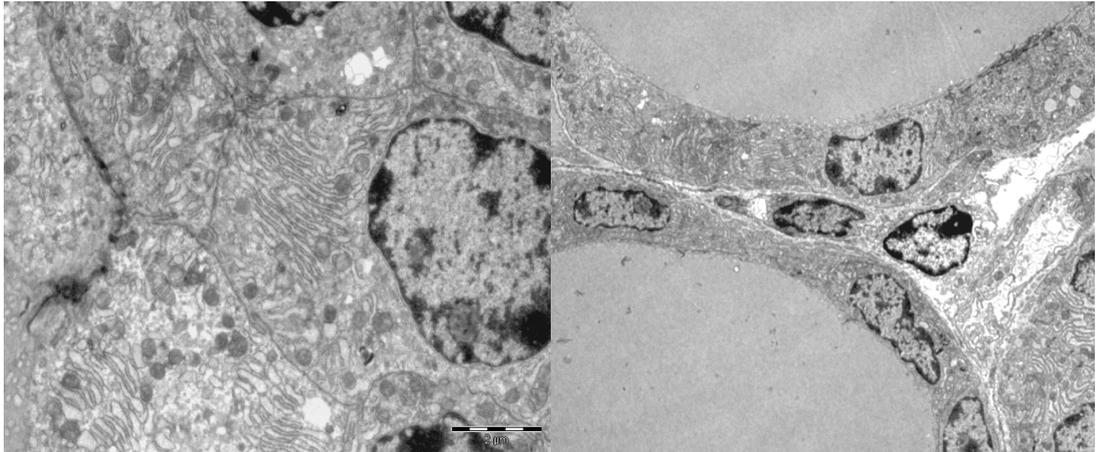


Figura 22 - Microscopia eletrônica de camundongos normais

Ao examinar os cortes semi-finos desses casos bem como os emblocados de restos do material encaminhados para a microscopia eletrônica não foi encontrado infiltrado linfocitário (dados não apresentados).

5 DISCUSSÃO

Revisões de material de necropsia têm papel definido no estudo da história natural das doenças e na determinação de suas freqüências. Por serem capazes de detectar as doenças em estágios ainda incipientes, estudos de necropsias, proporcionam ao investigador a possibilidade de analisar todos os possíveis estágios morfológicos de uma doença e podem definir com precisão a prevalência de entidades nosológicas. Apesar desta vantagem clara dos estudos de autópsias, diferentes protocolos de representação tecidual e critérios de inclusão são utilizados por vários investigadores criando obstáculos à comparação direta dos resultados de diferentes centros. Por exemplo, Fleishmann et al.⁵⁸ relataram que, quando a amostragem de tecidos foi feita apenas na presença de lesões macroscópicas suspeitas, o padrão inflamatório tireoidiano na microscopia óptica foi encontrado em 0,95% dos casos contrastando a freqüência de 6,6% obtida quando pelo menos um exemplar de cada lobo foi amostrado. Resultados semelhantes foram encontrados por Bisi et al.⁵⁹ no estudo em que representaram sistemática e minuciosamente 300 tireóides consecutivas, independentemente de dados clínicos e achados macroscópicos. Vale ressaltar que o objetivo das necropsias é a busca da *causa-mortis* e seria inviável, por causa do custo financeiro e de mão de obra envolvidos, a busca detalhada de condições não diretamente relacionadas à causa principal do óbito^{57,59}. Finalmente a comparação da freqüência de tireoidites obtidas por diferentes estudos é problemática tendo em vista a inexistência de uma classificação validada e mundialmente aceita de tireoidites¹³.

Neste estudo examinamos a interação entre a ingestão oral de iodo e a auto-imunidade tireoidiana em duas frentes. Numa delas, avaliamos a frequência de infiltração mononuclear intratireoidiana – alteração histológica característica das tireoidites auto-imunes – em material de necropsias realizadas entre 2003 e 2007. O intervalo de amostragem escolhido sucedeu um período em que houve aumento do teor de iodo utilizado na fortificação do sal para consumo humano (ver a Introdução). Portanto, a prevalência de tireoidite observada nesta revisão reflete, ao menos em parte, esta variação no teor de iodo no sal de cozinha. Na segunda frente os efeitos do iodo foram avaliados pela alteração estrutural nas tireóides de camundongos NOD. Comparamos os dados da nossa revisão de necropsia com um estudo realizado no século passado⁵⁶ que avaliou a prevalência das patologias tireoidianas em necropsias feitas consecutivamente durante 5 décadas⁵⁶. Considerando estes dois estudos foram realizados no mesmo departamento com a participação de um mesmo examinador e que as populações examinadas nos dois estudos vem da mesma área geográfica, podemos estar certos de que ocorreu um aumento da prevalência de tireoidites nesse período de 5 anos por nós estudados.

A comparação das duas séries revelou um desvio da distribuição etária da prevalência das tireoidites. No presente estudo a maioria das tireoidites auto-imunes foi encontrada em indivíduos com idade superior a 40 anos. Isso está em contraste à concentração de tireoidites nos indivíduos que se encontravam entre a 2ª e 5ª décadas de vida do estudo anterior. Possivelmente o declínio, dependente de idade, da função imune como

proposto por Kurashima et al.⁶⁰, contribuiu para este desvio do pico de frequência de tireoidites em nossa série. É possível que a iodação plena de sal, introduzida apenas no final do período analisado pelo estudo anterior, tenha também uma contribuição significativa. Infelizmente, não é possível testar esta hipótese com base nos dados disponíveis.

No lugar de adotar critérios histológicos para classificar as inflamações tireoidianas não específicas em TH e TL preferimos, neste estudo, classificar os infiltrados pela presença ou ausência de plasmócitos (marcador de produção intratireoidiana de anticorpos) e por padrão de distribuição dos infiltrados. Com essa opção evitamos o ônus de categorizar as tireoidites usando critérios não plenamente aceitos e abrimos a possibilidade de examinar se esses infiltrados representam processos inflamatórios de severidades diferentes. O uso de imunohistoquímica para averiguar a composição desses infiltrados permitiu detectar diferenças fundamentais entre esses dois tipos de infiltrados. A avaliação semi-quantitativa da marcação imunohistoquímica demonstrou que IL e ILP são diferentes quanto à quantidade de células CD4⁺, CD8⁺ e CD68⁺ (Tabela 4). A maior pontuação média dos ILP para células CD4⁺ e CD8⁺ pode indicar que ILP represente, em relação ao IL, uma inflamação de maior intensidade ou que IL e ILP retratem momentos diferentes de um mesmo processo inflamatório. Compatível com essa interpretação é a maior frequência de apoptose nas tireóides que apresentam ILP demonstrada pela maior pontuação da caspase-3 e do ensaio do TUNNEL. É interessante notar que a marcação para CD20 (que identifica linfócito B não diferenciado em

plasmócito) não apresentou diferença estatisticamente significativa o que mostra que a intensidade da inflamação crônica tireoidiana é regida principalmente pela imunidade celular.

Nosso modelo de regressão identificou que o tipo de infiltrado estava associado ao escore de CD8⁺ e TUNNEL e que, apesar de também contribuir para variabilidade dos nossos dados, o escore de CD4⁺ não estava associado estatisticamente a IL ou a ILP (Tabelas 5 e 6). Isso reforçar a hipótese de que IL e ILP sejam apresentações diferentes de um mesmo fenômeno e que o maior acúmulo de células CD8⁺ no ILP seja indicativo de que o mecanismo efetor imune está mais organizado e eficiente do que no IL. O mesmo raciocínio se aplica à observação de que a frequência da apoptose foi importante para diferenciar IL do ILP. A utilidade do TUNEL, e não da caspase-3, nessa diferenciação pode sugerir que apoptose independente de caspase (por exemplo, via AIF (*apoptosis-inducing factor*)) tenha participação significativa na morte das células foliculares nas tireoidites.

Neste estudo não vimos necrose folicular nas tireóides examinadas. Folículos dilatados delineados por epitélios achatados foram um achado quase que obrigatório (94,4%) em nossa revisão. Além disso, acompanhando os infiltrados, encontramos folículos atróficos freqüentemente envoltos por tecido fibrovascular, dando a impressão de pseudo-nódulos. Esse arranjo possivelmente está relacionado ao aspecto heterogêneo nodular detectado pelos exames de ultrassonografia que,

freqüentemente, mimetiza bócio multinodular ou nódulos tireoidianos, levando, não raras vezes, a investigações e intervenções desnecessárias.

Os resultados do ramo experimental deste estudo endossam a afirmação de que o iodo tem importante papel no desenvolvimento da tireoidite. Parte das evidências pode ser observada pela comparação do GC60, com nenhum dos animais afetados, contra o GE60, onde 50% dos animais exibiram tireoidite. Adicionalmente nós também observamos elevada incidência de tireoidites no GE90. A etiopatogenia das tireoidites é ainda amplamente discutida e a iodação do sal (para consumo humano e animal) e elevado (elevados níveis de) iodo urinário são freqüentemente responsabilizados^{27,40,43}. Existem, porém ainda, controvérsias em diferentes publicações quanto ao incremento da prevalência de tireoidites e elevação dos níveis de iodo urinário em publicações de grupos brasileiros⁶¹. Nossos resultados corroboram fortemente com essa premissa porque os animais do grupo controle não desenvolveram tireoidite exceto para a incidência relatada para os camundongos NOD⁶².

Interessantemente, uma exposição mais prolongada não pareceu aumentar a freqüência de tireoidites. Isto indica que o iodo é um fator estocástico e não determinístico para o desenvolvimento da auto-imunidade tireoidiana. O fato de a freqüência de tireoidite no GE90 não ter sido maior do que no GE60 sugere que a sensibilização do sistema imune por auto-antígenos tireoidianos ocorre rapidamente após a exposição ao iodo. Uma lesão aguda induzida por iodo, com exposição de antígenos tireoidianos, poderia ser este evento inicial que expõe os auto-antígenos. Especulamos

que as alterações ultra-estruturais provocadas pelo tratamento com iodo são os primeiros sinais de lesões de células foliculares que de alguma forma contribuirão para a exposição ao sistema imune dos auto-antígenos tireoidianos sensibilizando assim as células imunes relevantes.

A incidência de 18,7% de infiltração no GC90 é quase similar ao relatado por Damotte et al.⁶² (14,3%) usando a mesma linhagem. Estes autores também observaram que as primeiras infiltrações linfocitárias em camundongos NOD tipo selvagem ocorreram em 14 a 15 semanas, mas com predomínio em colônia de machos.

Como na tireoidite humana, nossos animais apresentaram infiltração linfocitária como um achado proeminente. Embora nós tenhamos sido capazes de identificar algumas células semelhantes a plasmócitos (Figura 18A), em geral os infiltrados na tireoidite dos camundongos não foram ricos em plasmócitos como na tireoidite humana. A aparência geral do grupo GE90 pareceu exibir maior severidade da infiltração do que no grupo GE60, o que pode ser explicado, em parte, pela evolução do processo inflamatório.

A freqüência de necrose encontrada em 31,25% do grupo GE60, esta em acordo ao efeito tóxico do iodo aos tireócitos, como relatado por Bagchi et al.⁶³. Outros investigadores têm descrito a necrose como o primeiro passo da exposição do antígeno no processo auto-imune da tireoidite^{28,63,64}. Interessantemente, a freqüência da necrose diminuiu no grupo GE90. É possível que o efeito tóxico do iodo possa não ser sustentado por período prolongado de tempo ou que a tireóide seja capaz de evocar uma resposta, possivelmente associada ao escape do efeito de Wolff-Chaikoff, de

dessensibilização após a exposição repetida. A curta duração do efeito tóxico do iodo poderia explicar porque a necrose foi menos freqüente nos 90 dias de tratamento. A necrose inicial poderia ainda estar relacionada à isquemia relativa da microcirculação tireoidiana determinada por aumento do diâmetro de folículos tireoidianos ocasionado por bloqueio da síntese e liberação de hormônios iodo-induzidos.

Sabendo que a exposição ao iodo hiporregula a expressão de genes que codificam fatores angiogênicos, conjecturamos que a limitação aguda do fluxo sanguíneo causada pelo iodo poderia contribuir para a necrose das células foliculares e o processo inflamatório subsequente liberaria antígenos para as células imunes.

A microscopia eletrônica mostrou alterações compatíveis com degeneração celular. Retículo endoplasmático distendido e lesão mitocondrial com perda de suas cristas foram descritas por Nakazawa et al.²² em humanos (em tireóide humana de uma paciente que morreu e foi submetida a necropsia) após o uso de amiodarona por 19 dias e Bagchi et al.⁶³ 12 horas (a relatou) após administração de iodo em OSC (*Obese Strain Chicken*). Já que nenhuma lesão sub-celular foi vista nos grupos controle (GC60 e GC90) é bastante provável que a degeneração ultra-estrutural tenha sido iodo induzida.

Os espaços amorfos que vimos no grupo experimental não foram previamente documentados. Nós não temos até o presente nenhum indício de sua natureza e nenhuma explicação razoável para sua presença pode ser

oferecida neste momento. Entretanto seu padrão de distribuição sugere que essas estruturas não pareçam ser artefatos.

A aparência geral dessas estruturas mimetiza as células claras habitualmente vistas em tecidos normais e patológicos, mas diferente das células claras nós não identificamos núcleos nessas estruturas.

Mais estudos devem ser considerados para testar a reprodutibilidade desses achados e sua significância. Os “*debris*” (restos) celulares e a lesão mitocondrial mesmo sem infiltração linfocitária, embora inespecífica, parece estar relacionados ao iodo e ao início desse processo auto-imune.

6 CONCLUSÕES

A prevalência de tireoidites, definida pela infiltração tireoidiana por células linfomononucleares, aumentou no período de 2003 a 2007 quando comparado a cinco décadas do estudo anterior (2,2978 e 0,0392% respectivamente). Observou-se também a distribuição etária das tireoidites no presente estudo estava desviada para pessoas com idades mais avançadas.

Os infiltrados linfocitários e linfoplasmocitários puderam ser diferenciados pela semi-quantificação de subpopulações de linfócitos e por marcadores de apoptose. A diferença entre estes dois infiltrados pode indicar que IL e ILP representem intensidades diferentes de inflamação ou que sejam momentos diferentes de um mesmo processo.

Em relação à tireóide controle, a presença de infiltrados mononucleares nas tireóides estudadas esteve associada a maior frequência de apoptose. Apoptose mais intensa foi encontrada nas tireóides que apresentaram infiltrado linfoplasmocitário.

O iodo teve um papel claro como fator desencadeante da tireoidite em camundongos NOD. A exposição destes animais ao iodo foi responsável pela maior frequência e precocidade da tireoidite.

O iodo exerceu um efeito tóxico direto na viabilidade e na ultraestrutura das células tireoidianas. Este efeito pareceu não se estender para além de 60 dias.

Pela similaridade com a tireoidite humana, este modelo animal mostrou-se útil para estudar a fisiopatologia da tireoidite.

9 ANEXOS

Anexo 1 - CAPEPesq

Anexo 2 – Submissão do artigo

ScholarOne Manuscripts Page 1 of 1



[Exit Account](#) | [Instructions for Authors](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)



[Main Menu](#) » [Author Dashboard](#) » Submission Confirmation

You are logged in as Chin Lin

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *International Journal of Experimental Pathology*.

Manuscript ID: IJEP-2009-09-0928

Title: Iodine increases and anticipates incidence of thyroiditis in NOD mice: histopathological and ultra-structural study.

Authors: Vecchiatti, Stella
Guzzo, Maria Luisa
Caldini, Elia
Longatto-Filho, Adhemar
Lin, Chin
Bisi, Helio

Date Submitted: 08-Sep-2009

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

http://mc.manuscriptcentral.com/ijep 9/8/2009

8 REFERÊNCIAS

1. Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):195-204.
2. Melo M. Autoimmune thyroiditis. *Acta Med Port*. 2006;19(5):387-94.
3. Duntas LH. Environmental factors and autoimmune thyroiditis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(8):454-60.
4. Kronenberg HN, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
5. Bindra A, Braunstein GD. Thyroiditis. *Am Fam Physician*. 2006;73(10):1769-76.
6. Andersson M, Takkouche B, Egli I, Allen HE, de Benoist B. Current global iodine status and progress over the last decade towards the elimination of iodine deficiency. *Bull World Health Organ*. 2005;83(7):518-25.
7. Burek CL, Rose NR. Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmun Rev*. 2008;7(7):530-7.
8. Burek CL, Talor MV. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun*. 2009. [in press]
9. Hamburger J I. The various presentations of thyroiditis. Diagnostic considerations. *Ann Intern Med*. 1986;104(2):219-24.
10. Slatosky J, Shipton B, Wahba H. Thyroiditis: differential diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2000;61(4):1047-52,54.
11. McGrogan A, Seaman HE, Wright JW, de Vries CS. The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(5):687-96.
12. Rose NR, Bonita R, Burek CL. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev*. 2002;1(1-2):97-103.
13. Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med*. 1996;335(2):99-107.

14. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins and Cotran: pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 1999.
15. Marazuela M, Garcia-Lopez MA, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sanchez B, Monsivais-Urenda A, et al. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3639-46.
16. Costa A, Torchio B, Zoppetti G, Feyless E. What is meant today by Hashimoto's thyroiditis? *J Endocrinol Invest*. 1989;12(5):355-6.
17. Monaco F. Classification of thyroid diseases: suggestions for a revision. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1428-32.
18. Harris M. The cellular infiltrate in Hashimoto's disease and focal lymphocytic thyroiditis. *J Clin Pathol*. 1969;22(3):326-33.
19. Dittmar M, Kahaly GJ. Immunoregulatory and susceptibility genes in thyroid and polyglandular autoimmunity. *Thyroid*. 2005;15(3):239-50.
20. Caturegli P, Kimura H, Rocchi R, Rose NR. Autoimmune thyroid diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(1):44-8.
21. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2646-55.
22. Nakazawa T, Murata S, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, et al. Histopathology of the thyroid in amiodarone-induced hypothyroidism. *Pathol Int*. 2008;58(1):55-8.
23. Kontozoglou T, Mambo N. The histopathologic features of lithium-associated thyroiditis. *Hum Pathol*. 1983;14(8):737-9.
24. Imaizumi M, Pritsker A, Unger P, Davies TF. Intrathyroidal fetal microchimerism in pregnancy and postpartum. *Endocrinology*. 2002;143(1):247-53.

25. Klintschar M, Schwaiger P, Mannweiler S, Regauer S, Kleiber M. Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2494-8.
26. Chahal HS, Drake WM. The endocrine system and ageing. *J Pathol.* 2007;211(2):173-80.
27. Harach HR, Ceballos GA. Thyroid cancer, thyroiditis and dietary iodine: a review based on the Salta, Argentina model. *Endocr Pathol.* 2008;19(4):209-20.
28. Many MC, Mestdagh C, van den Hove MF, Denef JF. In vitro study of acute toxic effects of high iodide doses in human thyroid follicles. *Endocrinology.* 1992;131(2):621-30.
29. Poncin S, Gerard AC, Boucquey M, Senou M, Calderon PB, Knoop B, et al. Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content. *Endocrinology.* 2008;149(1):424-33.
30. Many MC, Maniratunga S, Varis I, Dardenne M, Drexhage HA, Denef JF. Two-step development of Hashimoto-like thyroiditis in genetically autoimmune prone non-obese diabetic mice: effects of iodine-induced cell necrosis. *J Endocrinol.* 1995;147(2):311-20.
31. White S, Rosen A. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(5):557-62.
32. Ruwhof C, Drexhage HA. Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. *Thyroid.* 2001;11(5):427-36.
33. Male D, Brostoff J, Roitt DB. *Immunology.* 7th ed. Canada: Mosley; 2006.
34. Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev.* 2007;28(5):492-520.

35. Papanastasiou L, Vatalas IA, Koutras DA, Mastorakos G. Thyroid autoimmunity in the current iodine environment. *Thyroid*. 2007;17(8):729-39.
36. Esteves RZ, Kasamatsu TS, Kunii IS, Furuzawa GK, Vieira JG, Maciel RM. Development of a semi-automated method for measuring urinary iodine and its application in epidemiological studies in Brazilian schoolchildren. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(9):1477-84.
37. de Benoist B, Andersson M, Egli I, Takkaouche B, Allen H. Iodine status worldwide. WHO global database on iodine deficiency. 2004. Available from: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241592001.pdf>
38. Camargo RY, Tomimori EK, Neves SC, Knobel M, Medeiros-Neto G. Prevalence of chronic autoimmune thyroiditis in the urban area neighboring a petrochemical complex and a control area in Sao Paulo, Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006;61(4):307-12.
39. Kahaly GJ, Dienes HP, Beyer J, Hommel G. Iodide induces thyroid autoimmunity in patients with endemic goitre: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Endocrinol*. 1998;139(3):290-7.
40. Fountoulakis S, Philippou G, Tsatsoulis A. The role of iodine in the evolution of thyroid disease in Greece: from endemic goiter to thyroid autoimmunity. *Hormones (Athens)*. 2007;6(1):25-35.
41. Pearce EN, Gerber AR, Gootnick DB, Khan LK, Li R, Pino S, et al. Effects of chronic iodine excess in a cohort of long-term American workers in West Africa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5499-502.
42. Teng W, Shan Z, Teng X, Guan H, Li Y, Teng D, et al. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. *N Engl J Med*. 2006;354(26):2783-93.
43. Camargo RY, Tomimori EK, Neves SC, I GSR, Galrao AL, Knobel M, et al. Thyroid and the environment: exposure to excessive nutritional iodine

- increases the prevalence of thyroid disorders in Sao Paulo, Brazil. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(3):293-9.
44. Bulow Pedersen I, Knudsen N, Jorgensen T, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P. Large differences in incidences of overt hyper- and hypothyroidism associated with a small difference in iodine intake: a prospective comparative register-based population survey. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4462-9.
 45. Linder N, Sela B, German B, Davidovitch N, Kuint J, Hegesh J, et al. Iodine and hypothyroidism in neonates with congenital heart disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997;77(3):F239-40.
 46. Grubeck-Loebenstien B, Kronik G, Mosslacher H, Waldhausl W. The effect of iodine containing contrast medium on thyroid function of patients undergoing coronary angiography. *Exp Clin Endocrinol.* 1983;81(1):59-64.
 47. Marin MJC, Ruiz AF, Guereta LG, Bartoloné FB, Burgueros M, Vidal DR, segura SA, Moreno F, Bouthelie RG. Alteraciones de la función tiroidea en niños con cardiopatía congénita tras la realización de cateterismo con contrastes iodados. *Rev Esp Cardiol.* 2000;53:517-24.
 48. Gartner W, Weissel M. Do iodine-containing contrast media induce clinically relevant changes in thyroid function parameters of euthyroid patients within the first week? *Thyroid.* 2004;14(7):521-4.
 49. Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, et al. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology.* 1999;140(8):3404-10.
 50. Yamada E, Yamazaki K, Takano K, Obara T, Sato K. Iodide inhibits vascular endothelial growth factor-A expression in cultured human

- thyroid follicles: a microarray search for effects of thyrotropin and iodide on angiogenesis factors. *Thyroid*. 2006;16(6):545-54.
51. Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, et al. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology*. 2000;141(2):598-605.
 52. Glatt CM, Ouyang M, Welsh W, Green JW, Connor JO, Frame SR, et al. Molecular characterization of thyroid toxicity: anchoring gene expression profiles to biochemical and pathologic end points. *Environ Health Perspect*. 2005;113(10):1354-61.
 53. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A guide for programme managers. 3th ed. [Cited 2009 Nov 20]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241595827_eng.pdf
 54. Pretell EA, Delange F, Hostalek U, Corigliano S, Barreda L, Higa AM, et al. Iodine nutrition improves in Latin America. *Thyroid*. 2004;14(8):590-9.
 55. Duarte GC, Tomimori EK, Boriolli RA, Ferreira JE, Catarino RM, Camargo RY, et al. Echographic evaluation of the thyroid gland and urinary iodine concentration in school children from various regions of the State of Sao Paulo, Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(6):842-8.
 56. Bisi H, Ruggeri GB, Longatto Filho A, de Camargo RY, Fernandes VS, Abdo AH. Neoplastic and non-neoplastic thyroid lesions in autopsy material: historical review of six decades in Sao Paulo, Brazil. *Tumori*. 1998;84(4):499-503.
 57. Bernardi FD, Saldiva PH, Mauad T. Histological examination has a major impact on macroscopic necropsy diagnoses. *J Clin Pathol*. 2005;58(12):1261-4.

58. Fleischmann A, Hardmeier T. The impact of methodology on the reported prevalence of thyroid pathology: comparison of two autopsy series from Switzerland performed with different methods. *Praxis (Bern)*. 2004;93(24):1037-43.
59. Bisi H, Fernandes VS, de Camargo RY, Koch L, Abdo AH, de Brito T. The prevalence of unsuspected thyroid pathology in 300 sequential autopsies, with special reference to the incidental carcinoma. *Cancer*. 1989;64(9):1888-93.
60. Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in thyroids of elderly people. Histopathological and immunohistochemical studies. *Surv Synth Pathol Res*. 1985;4(5-6):457-66.
61. Marino MA, Martins LC, Esteves RZ, Kasamatsu TS, Maciel RM. Urinary iodine in patients with auto-immune thyroid disorders in Santo Andre, SP, is comparable to normal controls and has been steady for the last 10 years. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(1):55-63.
62. Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. *Eur J Immunol*. 1997;27(11):2854-62.
63. Bagchi N, Brown TR, Sundick RS. Thyroid cell injury is an initial event in the induction of autoimmune thyroiditis by iodine in obese strain chickens. *Endocrinology*. 1995;136(11):5054-60.
64. Li HS, Verginis P, Carayanniotis G. Maturation of dendritic cells by necrotic thyrocytes facilitates induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(3):467-74.

8 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Allen EM, Appel MC, Braverman LE. Iodine-induced thyroiditis and hypothyroidism in the hemithyroidectomized BB/W rat. *Endocrinology*. 1987;121(2):481-5.

Arcsott PL, Baker JR, Jr. Apoptosis and thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;87(3):207-17.

Autelitano F, Santeusano G, Mauriello A, Autelitano M, Palmieri G, Orlandi A, et al. Latent pathology of the thyroid: an epidemiological and statistical study of thyroids sampled during 507 consecutive autopsies. *Ann Ital Chir*. 1992;63(6):761-81.

Bisi H. Incidência da metaplasia oxifílica no bócio e sua importância na correlação anatomopatológica e na punção-biópsia por agulha fina. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1989;33(3):51-4.

Carayanniotis G. Recognition of thyroglobulin by T cells: the role of iodine. *Thyroid*. 2007;17(10):963-73.

de Benoist B, McLean E, Andersson M, Rogers L. Iodine deficiency in 2007: global progress since 2003. *Food Nutr Bull*. 2008;29(3):195-202 [Cited 2009 Nov 20]. Available from: www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/FNBvol29N3sep08.pdf.

de Matos PS, Ferreira AP, Ward LS. Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series. *Endocr Pathol*. 2006;17(2):165-73.

Janas ML, Groves P, Kienzle N, Kelso A. IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol*. 2005;175(12):8003-10.

Komorowski RA, Hanson GA. Occult thyroid pathology in the young adult: an autopsy study of 138 patients without clinical thyroid disease. *Hum Pathol*. 1988;19(6):689-96.

Li HS, Carayanniotis G. Induction of goitrous hypothyroidism by dietary iodide in SJL mice. *Endocrinology*. 2007;148(6):2747-52.

Medeiros-Neto G, Knobel M. Iodine deficiency disorders. In: DeGroot LJ, Jameson JL, editors. *Endocrinology*. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2006. p.2129-45.

Medeiros-Neto G. The salt iodization program in Brazil: a medical and political conundrum. *IDD Newsletter*. 2000;16(2) [Cited 2009 Nov 20]. Available from: <http://iccidd.org/media/IDD%20Newsletter/1991-006/may2000.htm#a6>

Montone KT, Baloch ZW, LiVolsi VA. The thyroid Hurthle (oncocytic) cell and its associated pathologic conditions: a surgical pathology and cytopathology review. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(8):1241-50.

Pingitore R, Vignati S, Bigini D, Ciancia EM. Post-operative examination of 2930 thyroid glands: observations on primary carcinoma. Incidental carcinoma and the preoperative diagnostic assessment of thyroidectomy for cancer. *Pathologica*. 1993;85(1100):591-605.

Verdy M, Brosseau A, Brochu P, Cadotte M. The thyroid gland. II. Survey of 400 autopsies and examination of 400 diseased persons. *Union Med Can*. 1971;100(2):259-66.

Wang SH, Baker JR. The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. *Thyroid*. 2007;17(10):975-9.

Werner SC. Classification of thyroid disease. Report of the Committee on Nomenclature. The American Thyroid Association. I. *J Clin Endocrinol Metab*. 1969;29(6):860-2.

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](#)