

Luis Henrique Barbosa Boechat

**Efeito do Iodo Sobre a Expressão de RNA mensageiro de Fas, Fas-ligante,
BCL-w, TNF- α e Citocinas Características das Respostas Th1 e Th2 em
Tiróides de Camundongos NOD Pré-Tratados com Metimazole**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de doutor em Clínica Médica, na área de Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

CAMPINAS

2001

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	B2
Nº CHAMADA	T1 UNICAMP
	B633e
V	
TOMBO BCI	48304
PROC.	16-837/02
C	☐ ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/04/02
Nº CPD	

BIBID.238355

CM00165623-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B633e

Boechat, Luis Henrique Barbosa

Efeito do iodo sobre a expressão de RNA mensageiro de Faz, Faz – ligante, BCL – w, TNF - δ e citocinas características das respostas Th1 e Th2 em tiróides de camundongos NOD pré – tratados com Metimazole / Luis Henrique Barbosa Boechat. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

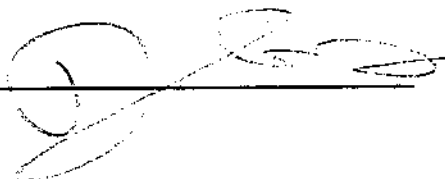
Orientador : Ricardo de Lima Zollner

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tireóide. 2. Tireóidite. 3. Doenças auto - imunes. 4. Apoptose. I. Ricardo de Lima Zollner. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

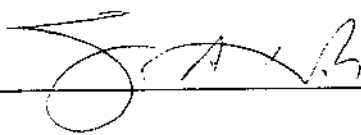
Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof.Dr. Ricardo de Lima Zollner



Membros:

1. Professor Doutor Sérgio Dib



2. Professora Doutora Walkyria de Paula Pimenta

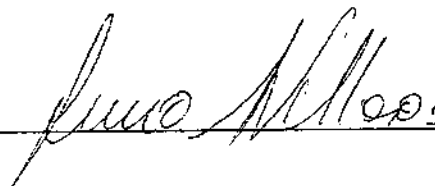


3. Professora Doutora Denise Engelbrecht Zantut

WITTMANN



4. Professor Doutor Lício Augusto Velloso



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/07/01

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMO	7
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
4. RESULTADOS	44
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
DMID	Diabetes mellitus insulino-dependente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAS-L	Fas-ligante
HE	Hematoxilina e eosina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p35	Cadeia p35 da Interleucina 12
IL-12p40	Cadeia p40 da Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4

LICA	Laboratório de Imunologia Clínica
MHC II	Antígeno de classe II do complexo principal histocompatibilidade
NOD	<i>Non Obese Diabetic</i> , linhagem de camundongos diabéticos não obesos
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
SPF	<i>specific pathogen free</i> , livre de patógenos específicos
T ₃	Triiodotironina
TCR	Receptores de célula T
Th	Linfócito T auxiliar
Th1	Linfócito T auxiliar com fenótipo 1 (resposta Celular)

Th2	Linfócito T auxiliar com fenótipo 2 (resposta humoral)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UA	Unidades arbitrárias de densidade óptica

RESUMO

Os camundongos NOD (*non obese diabetic*) representam modelo experimental estabelecido para o estudo de *diabetes mellitus* tipo 1, onde permitem o acompanhamento detalhado da evolução dos processos imunológicos que antecedem a expressão clínica da doença. Entretanto, estes animais desenvolvem outras manifestações auto-imunes como adenosialite, anemia hemolítica, paratiroideite e tireoidite espontâneas.

Resultados publicados a partir da década de 1990 demonstraram que os camundongos NOD, quando submetidos a excesso de iodo após período de baixa oferta dietética deste elemento em associação com drogas antitiroídicas, desenvolvem forma de tireoidite auto-imune similar à tireoidite de Hashimoto em humanos. Este processo, dependente da oferta excessiva de iodo, é acompanhado do aumento dos níveis séricos de auto-anticorpos antitiroídicos e se mantém indefinidamente, ao contrário do que se observa nos modelos clássicos de tireoidite experimental induzida em outras linhagens.

Há várias décadas, o iodo tem sido correlacionado com o aumento da expressão de tireoidite de Hashimoto em regiões com programa de suplementação deste mineral. Paralelamente, resultados oriundos de diversos grupos de pesquisa apontam este elemento como um possível indutor de morte celular programada (apoptose), embora o mecanismo envolvido ainda esteja em discussão.

Neste trabalho, submetemos camundongos NOD machos à sobrecarga de iodo (20 µg/animal/dia) após tratamento com metimazole. A expressão dos genes responsáveis pela síntese de Fas, Fas-ligante, BCL-w, TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, IL-10

e IL-12 (cadeias p35 e p40), 24h após a retirada do iodo e na 32ª semana de vida foi avaliada por abordagem semi-quantitativa. Adicionalmente, realizamos a observação morfológica e marcação das subpopulações de linfócitos T envolvidas no infiltrado linfo-plasmocitário.

Observamos que todos os animais submetidos a este protocolo apresentavam na 32ª semana de vida infiltrado inflamatório englobando folículos tiroidianos em desestruturação. Entretanto, a extensão do infiltrado variava entre os animais deste grupo, sendo mais intenso em 2/5 dos animais estudados.

A avaliação semi-quantitativa da expressão de RNA mensageiro de Fas-ligante, BCL-w e TNF- α evidenciou aumento da sinalização destes componentes de apoptose nos animais submetidos à sobrecarga de iodo 24 horas após a administração da última dose.

A expressão de IL-12p40 e p35 foi detectada em todos os grupos experimentais e, embora não houvesse diferenças estatísticas, apresentou tendência à elevação nos animais com 32 semanas. IFN- γ estava presente de forma isolada em 2/5 dos animais do grupo controle com 32 semanas e em 1/5 do grupo controle com metimazole em 10 semanas. O produto do gene para IL-2 expressou-se em 3/5 dos animais do grupo controle com 32 semanas. Por outro lado, não observamos expressão do RNA mensageiro para IL-4, enquanto a presença de IL-10 foi constatada em baixa intensidade apenas em animais com 32 semanas. Estes dados, tomados em conjunto, sugerem a predominância de resposta com fenótipo Th1 nas tiróides destes animais.

A análise das respostas individuais dos camundongos NOD estudados evidencia níveis distintos de resposta para sinalização de Fas-L, BCL-w, TNF- α e IL-12 no grupo de animais submetidos à sobrecarga de iodo e sacrificados após 24 horas (grupo MI44D). O mesmo padrão de resposta foi observado no grupo controle de 32 semanas (grupo C32) tardio em relação à expressão de IL-12.

Concluimos que o iodeto de potássio, nas condições experimentais aqui utilizadas, é capaz de promover a intensificação da tiroidite auto-imune nos camundongos NOD, favorecendo o surgimento de processo inflamatório que resulta em destruição folicular. Este padrão, é precedido por aumento na sinalização de Fas-L e BCL-w e tendência de elevação na expressão de TNF- α . nos animais sacrificados imediatamente após a retirada do iodo. A IL-12, citocina característica da resposta Th1, esteve presente em todos os grupos experimentais, com tendência à elevação nos animais mais velhos que apresentam processo inflamatório organizado. Nossos resultados sugerem que os camundongos NOD de nossa colônia têm dois padrões de resposta a este modelo experimental, havendo maior sinalização da expressão de componentes de apoptose (Fas-L, BCL-w e TNF- α) e IL-12 em alguns indivíduos.

Desta forma, estes padrões permitirão iniciar processo de detecção de subgrupo de camundongos NOD capaz de responder à sobrecarga de iodo com apoptose e desencadeamento de tiroidite análoga à tiroidite de Hashimoto.

ABSTRACT

NOD (*non obese diabetic*) mice is an established experimental model for diabetes, allowing detailed observation of immune processes that are developed before the onset of clinical expression of the disease. However, these animals also present other spontaneous autoimmune manifestations such as sialitis, hemolytic anemia, parathyroiditis and thyroiditis.

Studies published during the last decade showed that NOD mice, when submitted to iodine excess after a goitrogenic period induced by low iodine diet in association with anti-thyroid drugs, develop autoimmune thyroiditis that resembles human Hashimoto's thyroiditis. This process is dependent on the excessive offer of iodine, is accompanied by the rise of serum levels of anti-thyroid antibodies and is maintained indefinitely, in contrary with what is observed in classic models of experimental thyroiditis induced in other mice strains.

Iodine has been correlated for many decades with the rise in prevalence of Hashimoto's thyroiditis in regions where its supplementation has been introduced. By the other side, results presented by many research groups have pointed to this element as a possible inducer of apoptosis.

In this study we have evaluated thyroid response in male NOD mice to iodine overload after treatment with methimazole during 6 weeks, focusing the expression of Fas, Fas-ligand, BCL-w, TNF, γ -IFN, IL-2, IL-4, IL-10 and p35 and p40 chains of IL-12 24h after iodine overload and at 32nd week of life. We have also observed the subpopulations of T helper lymphocytes present in inflammatory infiltrate.

We have observed that all animals submitted to the protocol above have presented organized inflammatory infiltrate in week 32 with thyroid follicles being destroyed. Nevertheless, the extension of infiltrate varied among animals in this group, being more intense in 2/5 animals.

Semi-quantitative analysis of expression of messenger RNA for Fas-ligand, BCL-w and TNF have shown the rise in signalization in NOD mice that received iodine overload (24 hours after), suggesting that this element is involved apoptosis induction.

Expression of IL12p40 and IL12p35 was detect in all experimental groups and, although we have not observed statistical differences, this expression presented a tendency of elevation in animals with 32 weeks of life. γ -IFN was present in only 2/5 in controls at 32nd week and 1/5 in controls receiving methimazole at 10th week. The product of the gene for IL-2 was expressed in 3/5 animals in control group with 32 weeks. By the other side, messenger RNA for IL-4 was not observed in animals studied herein, while IL-10 have been expressed with low intensity in animals with 32 weeks of life. These data suggest the predominance of Th1 response in these animals.

Analysis of individual responses in NOD mice studied have evidenced distinct levels of signalization for Fas-ligand, BCL-w, TNF and IL-12 in those submitted to iodine overload and sacrificed after 24 hours (group MI44D). The same pattern of response was detected in control group with 32 weeks of life (group C32) in relation to the expression of IL-12.

We suggest that potassium iodide, used in the conditions detailed above, can intensify thyroiditis in NOD mice, favoring the inflammatory process that leads to follicular destruction. This is preceded by the rise in expression of Fas-ligand and BCL-w and probably by TNF. IL-12, a cytokine characteristic of Th1 response, was present in all thyroid specimens studied, with tendency to elevation in older animals, that also present organized inflammatory infiltrate.

NOD mice in our colony have two different patterns of response in this experimental model, with higher levels of signalization of apoptosis and IL-12 in some animals. These results will allow the detection of this subgroup of NOD mice that can respond more appropriately to iodine overload and are, probably, more prone to the development of autoimmune thyroiditis.

INTRODUÇÃO

LINHAGEM DE CAMUNDONGOS NOD (*NON OBESE DIABETIC*)

A linhagem de camundongos NOD (*non-obese diabetic*) foi desenvolvida no Japão (MAKINO *et al.*, 1980) e representa modelo experimental amplamente estudado de *diabetes mellitus* tipo 1. No Brasil, a primeira colônia de camundongos NOD foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas em 1994 (PAVIN *et al.*, 1994) a partir de matrizes provenientes do Hospital Necker (Paris, INSERM U-25).

As características imunopatológicas do *diabetes mellitus* em camundongos NOD são muito semelhantes àsquelas observadas entre seres humanos, com comprometimento progressivo das ilhotas pancreáticas envolvendo especificamente as células β (WONG *et al.*, 1999). A infiltração de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas inicia-se com cerca de um mês de vida, sendo esta fase considerada como pré-diabética. Verifica-se já no período pré-clínico a presença de anticorpos séricos anti-ilhota pancreática e anti-insulina endógena, além de alterações metabólicas como deterioração da fase rápida de secreção insulínica (TOCHINO, 1987).

Nestes animais, o quadro clínico de diabetes se estabelece entre a 16^a e 24^a semana de vida, mais freqüentemente nas fêmeas. A prevalência da doença varia nas diversas colônias, situando-se entre 5% e 90% nas fêmeas e 0 e 50% nos machos. A colônia NOD estabelecida no Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) tem mantido, em condições *germ free*, prevalência de diabetes de 90% entre as fêmeas e

até 20% entre os machos (dados atualizados por controle interno de expressão de diabetes, LICA, 1999-2001).

CAMUNDONGOS NOD COMO MODELO DE TIROIDITE EXPERIMENTAL

Os camundongos NOD apresentam outras manifestações auto-imunes como adenosialite (NOORCHASHM *et al.*, 1997), anemia hemolítica (BAXTER *et al.*, 1991), paratiroidite (KRUG *et al.*, 1991) e tiroidite (BERNARD *et al.*, 1992a).

Apesar da relevância deste modelo, estudos direcionados à tiroidite nos camundongos NOD são pouco freqüentes na literatura. BERNARD, ERTUG, MARGOLESE (1992) observaram prevalência de tiroidite espontânea acima de 70%, quando avaliaram tiróides de camundongos NOD de 10 a 180 dias. O desenvolvimento de tiroidite mostrou-se menos grave em animais abaixo de 30 dias de vida em comparação àqueles com mais de 180 dias. O grau de infiltração tiroidiana por células inflamatórias não diferiu entre os grupos etários, não havendo ainda diferenças entre grupos de animais com ou sem diabetes. Os mesmos autores (BERNARD *et al.*, 1992b) verificaram que 28% dos camundongos NOD apresentavam anticorpos séricos reativos a antígenos de membrana tiroidiana murina e 30% destes reagem com preparação antigênica de membrana tiroidiana humana.

Em nosso meio, os camundongos NOD apresentam, com grande freqüência, linfócitos posicionados de modo esparsos no espaço interfolicular (ZOLLNER *et al.*,

submitted). A prevalência de infiltrado inflamatório organizado, levando à destruição de folículos, se acentua com a idade nestes animais, havendo elevação significativa a partir de 25 semanas de vida. Diferenças na prevalência entre machos e fêmeas ou relação estatística com a presença de diabetes não foram observadas (ZANTUT-WITTMANN *et al.*, 1996). O comportamento da membrana basal folicular tireoidiana nestes casos é caracterizado por interrupção e destruição localizadas em áreas de íntima relação com o infiltrado inflamatório, provavelmente favorecendo a exposição antigênica e podendo contribuir para o desenvolvimento da tiroidite (ZANTUT-WITTMANN *et al.*, 1999).

Assim como ocorre com o *diabetes mellitus*, a tiroidite auto-imune em camundongos NOD tem características semelhantes àquela observada em humanos. A expressão de antígenos de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II) ocorre nesta linhagem, assim como em humanos, em consequência da presença de infiltrado inflamatório, não sendo observadas em controles da linhagem BALB/C (MARGOLESE *et al.*, 1994). Algumas isoformas características da região variável da cadeia β dos receptores de célula T (TCR) são mais freqüentemente associadas com a presença de infiltrados inflamatórios nas tiróides de camundongos NOD (MATSUOKA *et al.*, 1993 ; DAVIES, 1995).

Em 1995, Many *et al.* publicaram resultados de tiroidite experimental em camundongos NOD utilizando a estratégia de sobrecarga de iodo após indução de bócio por dieta pobre em iodo e doses baixas de propiltiouracil (MANY *et al.*, 1995). Neste experimento, mantiveram dieta com elevado teor de iodo (10 μ g/dia),

observando, ao final de 96 dias, tiroidite cujo padrão se assemelhava ao classicamente observado em humanos portadores de tiroidite de Hashimoto. Estes autores consideraram o camundongo NOD como modelo de estudo da tiroidite de Hashimoto, uma vez que o padrão de infiltrado inflamatório com características destrutivas se mantinha a longo prazo, contrapondo-se à tiroidite experimental obtida em outras linhagens que tem resolução espontânea após cerca de 4 semanas (MANY *et al.*, 1996).

A partir da caracterização do camundongo NOD como modelo relevante para o estudo dos processos auto-imunes que levam à tiroidite, linhagens derivadas deste animal foram desenvolvidas. A linhagem NOD H²^{h4}, obtida através de cruzamento da linhagem NOD tradicional com camundongos B10.A(4R), apresenta tiroidite auto-imune do forma espontânea, embora não desenvolva *diabetes mellitus* (RASOOLY *et al.*, 1996). Camundongos NOD-H-2^{h4}, quando submetidos a ingestão *ad libitum* de água contendo iodo na concentração de 0,05%, desenvolvem lesões tiroidianas em cerca de 100% dos animais (BRALEY-MULLEN *et al.*, 1999). Camundongos NOD H-2^k também apresentam lesões tiroidianas semelhantes àsquelas observadas na tiroidite de Hashimoto em 19,6% dos casos (DAMOTTE *et al.*, 1997).

A modificação da prevalência de tiroidite espontânea resultante da fixação de haplótipos específicos do complexo principal de histocompatibilidade sugere que estes genes desempenhem papel importante no controle da tiroidite em camundongos NOD (DAMOTTE *et al.*, 1997), como já descrito para outras linhagens murinas e seres humanos (TANEJA *et al.*, 1999).

Portanto, os camundongos NOD e linhagens deles derivadas representam modelo de estudo estabelecido para a tiroidite auto-imune (tiroidite de Hashimoto) e, por extensão, para as demais doenças auto-imunes órgão específicas.

ODO E TIROIDITE AUTO-IMUNE

O excesso de iodo era proposto, já na década de 70, como capaz de contribuir para o desenvolvimento de tiroidite de Hashimoto (WEAVER *et al.*, 1976). Alguns autores têm relatado modificações na prevalência de doenças tiroidianas auto-imunes (tiroidite de Hashimoto e doença de Basedow-Graves) após a suplementação deste elemento em áreas deficientes (HEDINGER, 1981), embora estes fatos tenham sido questionados recentemente (MARWAHA *et al.*, 2000). Aumento no número de casos de tiroidite pós-parto, presumivelmente em decorrência do início da suplementação de iodo, foi descrita de modo isolado na literatura (BECH, 1989).

A administração de solução oleosa contendo iodo a pacientes eutiroidianos portadores de bócio em uma região com suprimento normal deste elemento resultou no surgimento de anticorpos anti-tiroglobulina e de evidências citológicas de infiltrado linfo-plasmocitário em cerca de 75% dos indivíduos (PAPANASTASIOU *et al.*, 2000).

Os modelos de tiroidite experimental têm sido classicamente baseados na administração de tiroglobulina intacta (STAFFORD *et al.*, 2000) ou seus fragmentos peptídicos (WAN *et al.*, 1998), associados ou não a adjuvantes. Em ambos casos, a iodinação das tirosinas, seu acoplamento e eventual modificação da estrutura

especial da tiroglobulina têm sido considerados fundamentais (CHAMPION *et al.*, 1987).

A exposição crônica à ingestão elevada de iodo é capaz de aumentar a prevalência de infiltrados inflamatórios em tiróide de diversos modelos experimentais como o rato BB/W (ALLEN *et al.*, 1986), gatos (SCHUMM-DRAEGER *et al.*, 1996) e linhagem de galinhas obesas (FOLEY, 1992), bem como nos camundongos NOD, conforme exposto anteriormente. Dietas ricas em iodo são capazes de acentuar o processo de tiroidite espontânea que ocorre no rato da linhagem *Buffalo* (COHEN & WEETMAN, 1988), mesmo na ausência de depleção prévia deste elemento.

APOPTOSE E IODO

Programas de saúde pública objetivando a suplementação de iodo em regiões carentes deste elemento têm sido realizados há várias décadas, promovendo a redução do volume tiroidiano (LINDBERG *et al.*, 1989). Frequentemente, o preparo de pacientes portadores de doença de Basedow-Graves com indicação de tratamento cirúrgico é feito pela administração de solução de Lugol que resulta em involução do volume glandular e do fluxo sanguíneo medido por ultrassonografia *doppler* (RODIER *et al.*, 1998). Solução oleosa contendo iodo, quando injetada em indivíduos portadores de bócio difuso atóxico, leva à redução do volume tiroidiano após 3 a 12 meses (PAPANASTASIOU *et al.*, 2000).

Em 1986, MAHMOUD *et al.* relataram que tiróides murinas, tornadas hiperplásicas por propiltiouracil e dieta com baixo teor de iodo, apresentavam sinais de necrose e inflamação a partir de 6 horas após o estabelecimento de dieta com altos teores de iodo, tornando-se máximos após 48 horas. Este efeito era bloqueado pela manutenção do propiltiouracil, que impede a oxidação e organificação do iodo, não surgindo ainda quando a involução do bócio era feita por dieta com níveis moderados de iodo ou mesmo pela reposição de triiodotironina (T₃). Desta forma, sugeriram que o iodo, nestas condições, fosse diretamente tóxico para tirócitos.

O iodo tem sido associado à indução de apoptose em órgãos e tecidos não endócrinos. Algumas preparações de contraste radiográfico iodado foram capazes de induzir, de modo dose e tempo-dependente, apoptose de endotélio vascular em modelos experimentais *in vitro* (ZHANG *et al.*, 2000). A alga marinha *wakame* (*Undaria pinnatifida*) tem sido avaliada *in vivo* e *in vitro* por sua capacidade de reduzir tumores mamários de ratos, onde é capaz de induzir apoptose das células malignas, mesmo após administração oral. Entre os mecanismos propostos para sua ação, a grande concentração de iodo desta alga tem sido destacada (FUNAHASHI *et al.*, 1999 ; FUNAHASHI *et al.*, 2001).

Ratos mantidos sob dieta com níveis insuficientes de zinco ou selênio apresentam alterações intensas na arquitetura folicular tiroidiana, incluindo evidências histológicas de apoptose. Estas alterações parecem sofrer influência do iodo, uma vez que a deficiência associada deste mineral, reduz significativamente o comprometimento glandular (RUZ *et al.*, 1999).

Os achados acima são corroborados pela observação de que excesso de iodo, na forma de iodeto de potássio (13mg/kg/dia), é capaz de induzir apoptose em tirócitos de animais pré-tratados com propiltiouracil ou metimazole. A fragmentação do DNA e evidências morfológicas e histoquímicas de apoptose são observáveis após 3 horas da administração do iodeto de potássio e se acentuam até 12 horas (BURIKHANOV *et al.*, 2000). Os efeitos indutores de apoptose do iodeto de potássio são bloqueados pela administração de perclorato, enquanto outros compostos iodados, como amiodarona e ácido iopanóico, são menos eficazes na indução de apoptose. Resultados comparáveis foram obtidos em experimento utilizando iodo ligado à lecitina, uma formulação capaz de reduzir bócio (MATSUZAKI *et al.*, 2000).

Os mecanismos intracelulares envolvidos na indução de apoptose pelo iodo não foram ainda definidos. A amiodarona, por exemplo, parece induzir apoptose em tirócitos através da liberação de citocromo c da mitocôndria de modo não relacionado ao iodo, por mecanismo independente de p53, BCL-xl ou Bax e não relacionado à geração de radicais livres (DI MATOLA *et al.*, 2000). Por outro lado, a linhagem TAD-2 de células tiroidianas mantidas em cultura é sensível à indução de apoptose pelo excesso de iodeto de potássio, havendo fortes evidências de que o principal mecanismo envolva a formação de radicais livres com ativação intra-celular da cascata de morte programada (VITALE *et al.*, 2000).

Evidências de que a apoptose induzida por iodo esteja relacionada ao sistema Fas-Fas-ligante também existem. Neste contexto, TAMURA *et al.* (1998) publicaram resultados que confirmam a existência de processo intenso de apoptose nas fases

iniciais da involução do bócio induzido por propiltiouracil e demonstram o aumento concomitante de tirócitos Fas-positivos na glândula.

As condições momentâneas da tiróide e a dose de iodo administrada parecem influenciar eventual resposta apoptótica. FELDKAMP *et al.* (1999) observaram que o TSH é capaz de inibir a apoptose induzida por iodo e, presumivelmente, mediada por Fas em cultura de tirócitos. Por outro lado, embora doses elevadas de iodo levem à morte celular, baixas concentrações são capazes de inibi-la.

APOPTOSE E TIROIDITE AUTO-IMUNE

As primeiras observações de que a apoptose pudesse estar envolvida na fisiopatologia da tiroidite auto-imune surgiram ao longo da década de 1990 quando se demonstrou que a quase totalidade dos tirócitos em folículos englobados por infiltrado linfo-plasmocitário apresentava evidência histoquímica de apoptose (KOTANI *et al.*, 1995). Desde então, tem-se tentado compreender as relações entre apoptose, doença tiroidiana auto-imune (tiroidite de Hashimoto e doença de Basedow-Graves) e mecanismos reguladores e efetores do sistema imunológico (WILLIAMS, 1997).

A presença de níveis detectáveis de anticorpos antitiroidianos não é manifestação exclusiva de indivíduos doentes e nenhum mecanismo efetor de destruição celular foi, até o presente, caracterizado de modo inequívoco como responsável pelo dano tecidual. A citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ é vista como a principal

forma de destruição tiroidiana e parece, pelo menos em parte, efetuar-se através de apoptose induzida por estas células através do sistema Fas (ARSCOTT *et al.*, 1998).

Inicialmente, evidências sugeriam que o receptor Fas estivesse expresso apenas em células tiroidianas cujas glândulas apresentassem tiroidopatia auto-imune, não se observando sua presença em tecidos originários de glândulas normais ou com doenças de origem não auto-imune (GIORDANO *et al.*, 1997). Posteriormente, sua expressão foi caracterizada como constitutiva, sugerindo-se que a presença de Fas-ligante fosse responsável pela indução de apoptose .

Persistem dúvidas relativas à participação direta das células citotóxicas no processo de indução de apoptose na tiroidite auto-imune. Há evidências de que isto ocorra em decorrência da expressão de Fas-ligante no próprio tecido tiroidiano que seria capaz de desencadear morte celular mediada pela ativação Fas de modo fratricida, associada à redução da expressão de BCL-2 (MITSIADES *et al.*, 1998).

Recentemente, GIORDANO *et al.* (2001) propuseram, a partir de análise detalhada da distribuição de expressão das principais moléculas envolvidas no controle de apoptose (Fas, Fas-ligante e BCL-2), que em tiróides de pacientes com doença de Basedow-Graves o processo de apoptose favorece a morte de linfócitos T citotóxicos infiltrantes, possivelmente limitando sua capacidade de lesão tissular. Por outro lado, nos casos de tiroidite de Hashimoto, a ampla expressão de Fas e Fas-ligante no tecido tiroidiano e a maior presença de BCL-2 nos linfócitos infiltrantes, sugerem que a indução de apoptose no parênquima glandular seja desencadeada por linfócitos T e, de modo fratricida, pelos tirócitos vizinhos. Portanto, estes resultados dão suporte

à idéia de que as células foliculares tiroidianas tenham papel ativo na indução de apoptose ao longo do desenvolvimento da tiroidite de Hashimoto (GIORDANO *et al.*, 2001b).

IMUNORREGULAÇÃO E TIROIDITE AUTO-IMUNE

A resposta imune é coordenada por linfócitos T auxiliares (*T helper, Th*) cujo comportamento parece diferir de acordo com o estímulo antigênico e condições do micro-ambiente no qual se dá tal resposta. Assim, os linfócitos Th são subdivididos nos fenótipos de resposta Th1 (caracterizada pelo direcionamento à resposta celular), Th2 (direcionada à resposta humoral) e Th3 (caracterizada pelo surgimento de tolerância e marcada pela expressão de TGF- β).

Estes padrões de resposta são definidos pela expressão local de grupos de citocinas específicos. Assim, a resposta Th1, predominante nos casos de doenças auto-imunes que envolvem lesão tecidual, é acompanhada pela elevação local de Interleucinas 2, 12 e Interferon- γ enquanto no fenótipo Th2 observa-se o predomínio da expressão de Interleucinas 4 e 10 (ROMAGNANI, 1996).

Deste modo, a resposta imunológica observada em pacientes com tiroidite de Hashimoto é marcada pelo predomínio de citocinas características do fenótipo resposta Th1 (DRUGARIN *et al.*, 2000) assim como ocorre em modelos experimentais de tiroidite auto-imune (BLUHER *et al.*, 1999a).

Grande atenção tem sido dada ao papel desempenhado pela interleucina-12 no desenvolvimento de tiroidite experimental. Expressão do RNA mensageiro para esta citocina é detectada na tiróide de ratos BB/W previamente ao estabelecimento da lesão tiroidiana, aumentada na senilidade destes animais (ZIPRIS *et al.*, 1996). Linfócitos sensibilizados para tiroglobulina murina, quando tratados em cultura com IL-12, são capazes de amplificar a resposta granulomatosa em camundongos CBA/J, sugerindo efeitos modulatórios intensos desta citocina na tiroidite experimental (BRALEY-MULLEN *et al.*, 1998). Paralelamente, a administração de IL-12 previne a indução de tolerância pela tiroglobulina nesta linhagem, mesmo em animais que apresentam *knockout* do gene de IFN- γ (ZHANG *et al.*, 2001). Esta citocina está elevada tanto localmente quanto periféricamente em pacientes com tiroidite de Hashimoto e doença de Basedow-Graves (AJJAN *et al.*, 1997).

Os efeitos da IL-12 parecem ser diferentes ao longo do estabelecimento da tiroidite experimental auto-imune. A administração de anticorpo anti-IL-12 no início do desenvolvimento da lesão reduz significativamente a intensidade do processo e os níveis de auto-anticorpos antitiroglobulina, embora intensifique o processo quando injetada após o início do estabelecimento da lesão (ZHANG *et al.*, 2001).

Tentativas de modulação da evolução da tiroidite experimental têm sido baseadas no bloqueio de expressão (*knockout*) ou ação (auto-anticorpos bloqueadores) de citocinas pró Th1 ou na administração de interleucinas pró Th2 (MIGNON-GODEFROY *et al.*, 1995; TANG *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1998). Os resultados obtidos neste tipo de experimento demonstram que o controle da resposta é múltiplo

e, provavelmente, dependa do somatório de efeitos de várias citocinas que formam um micro-ambiente propício ou não para tais eventos.

OBJETIVOS

1. Verificar a capacidade do iodeto de potássio induzir/acelerar a tiroidite em camundongos NOD pré-tratados com metimazole;
2. Verificar as subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) predominantemente envolvidas nas lesões tiroidianas estabelecidas;
3. Verificar a expressão RNA mensageiro de BCL-w em tiróides de camundongos NOD;
4. Semi-quantificar a expressão de RNA mensageiro de Fas, Fas-ligante, TNF- α e BCL-w em tiróides de animais NOD submetidos à sobrecarga de iodo após tratamento com metimazole ;
5. Semi-quantificar a expressão de RNA mensageiro de IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40 , IL-12p35 e INF- γ em camundongos NOD submetidos à sobrecarga de iodo após tratamento com metimazole.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os camundongos NOD utilizados eram provenientes da colônia NOD-Uni, mantida pelo Centro de Bioterismo da UNCAMP, em condições *germ free* até a quarta semana de vida. Foram utilizados animais do sexo masculino que, a partir da 4ª semana de vida, eram colocados sob condições sanitárias livres de patógenos conhecidos (sala *SPF*), com controle de luz e temperatura, recebendo ração e água *ad libitum*. Cada grupo experimental era composto de 10 animais, sendo metade destinada à avaliação morfológica e metade ao estudo da expressão de RNA mensageiro de citocinas e componentes de apoptose.

2. PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE TIROIDITE E DEFINIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

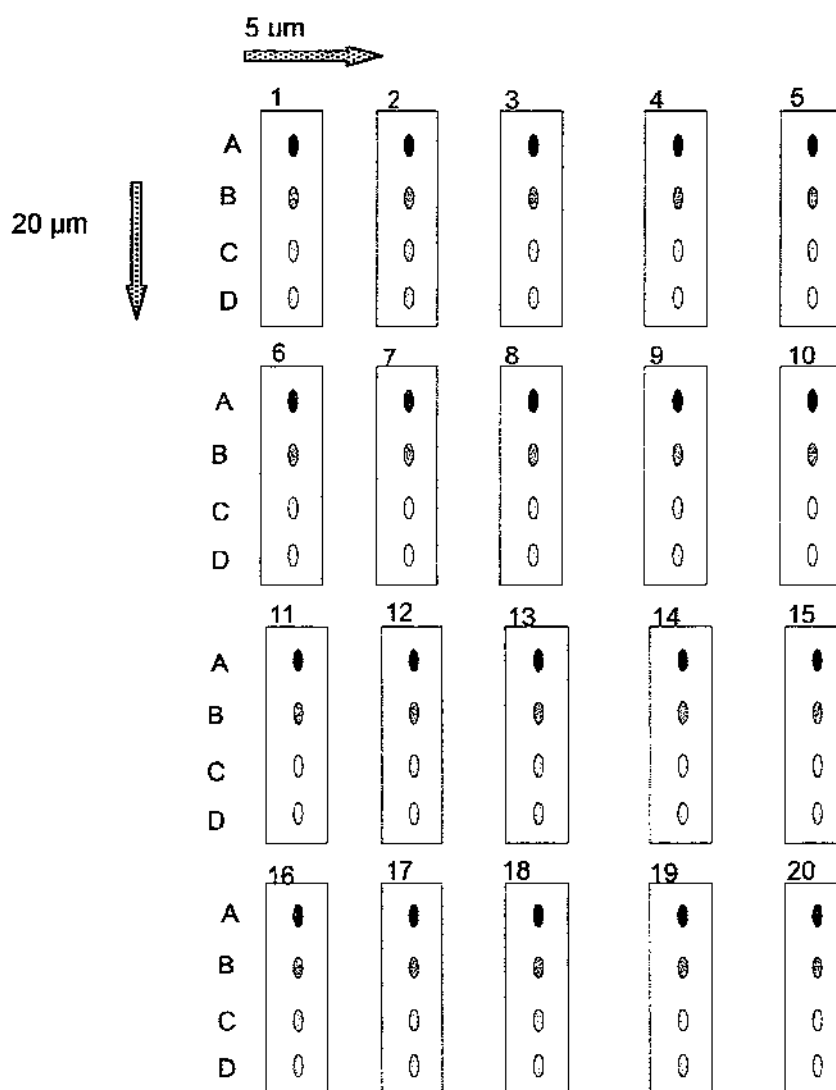
Os camundongos NOD recebiam água *ad libitum* contendo metimazole (Tapazol®, Lilly) na concentração de 1mg/ml por seis semanas. Após este período, a administração de metimazole era descontinuada e os animais submetidos à sobrecarga de iodo por via intra-peritoneal (20 ug/dia) durante 4 dias. Desta forma, foi possível estabelecer os grupos de estudo definidos abaixo:

tiróides destinadas à avaliação morfológica eram retiradas e imediatamente embebidas em meio específico para congelamento rápido (Tissue Tek O.C.T. Compound, Miles, EUA) que era realizado em nitrogênio líquido.

Os tecidos destinados à análise semi-quantitativa da expressão de RNA mensageiro eram manipulados com material estéril e colocados imediatamente em tubos plásticos de 1,5 ml, livres de RNase e contendo solução de guanidina em volume aproximadamente três vezes superior ao do tecido. Estes tubos eram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até a extração de RNA total

4. PROCESSAMENTO DAS TIRÓIDES PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

As tiróides destinadas a avaliação morfológica e caracterização de infiltrado inflamatório eram submetidas a secção em criostato (LEICA, CM 1850, Alemanha), sendo o bloco congelado posicionado de forma a obter cortes longitudinais. Séries de cinco cortes consecutivos de $5\mu\text{m}$ de espessura eram posicionados nas lâminas previamente silanizadas (γ -methacryl-oxipropil-methoxysilane, Sigma, EUA). A seguir, o órgão era desbastado $20\mu\text{m}$, quando nova série de cortes era iniciada. Este procedimento, esquematizado abaixo, era realizado até o esgotamento do material e permitia que lâminas adjacentes representassem uma mesma região do órgão.



As lâminas 1, 6, 11 e 16 de cada uma das tiróides estudadas eram coradas por hematoxilina e eosina, observadas em microscópio óptico (Zeiss Axioscope, Alemanha), permitindo detectar a eventual presença de infiltrado linfo-plasmocitário em toda a extensão da glândula analisada. Os cortes nos quais se evidenciava a presença de infiltrado inflamatório eram selecionados e as lâminas imediatamente antecedentes e subjacentes utilizadas para a caracterização das subpopulações

linfocitárias.

5. CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NO INFILTRADO TIROIDIANO

Objetivando caracterizar o infiltrado inflamatório nos cortes tiroidianos previamente selecionados, realizava-se sua fenotipagem para linfócitos expressando marcadores CD3 (linfócitos T), CD4 (subpopulação T auxiliar) e CD8 (subpopulação T citotóxica/supressora).

A técnica empregada era a de imunohistoquímica na qual o anticorpo secundário acoplado à biotina, ao permitir a fixação de várias moléculas de estreptoavidina-peroxidase, amplificava o sinal.

As lâminas eram fixadas em acetona por 10 minutos, lavadas em solução salina tamponada (PBS pH 7,3) e, em seguida, os cortes eram incubados durante 30 minutos em solução de H₂O₂ (3%) com o objetivo de bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após três ciclos de lavagem em PBS, os cortes eram cobertos com solução de bloqueio contendo 2,5% albumina bovina fração V; (Gibco BRL, Life Technologies, EUA); 2%; leite em pó desnatado e 8% soro fetal bovino (HyClone, EUA), visando bloquear os sítios de ligação não específica.

O anticorpo primário (diluição de 1:100), era adicionado a cada corte em volume de 80 µl e incubado *overnight*, a 8.C, em câmara úmida protegida contra luminosidade. Eram utilizados nesta etapa os anticorpos anti-CD3 (sc 1129), anti-CD4 (sc 1140) e

anti-CD8 (sc 1141) produzidos pela empresa Santa Cruz Biotechnology, EUA.

As lâminas eram então lavadas por seis vezes, durante 5 minutos, em solução salina tamponada (PBS pH 7,3) e tratadas novamente com solução bloqueio durante 45 minutos. A seguir, 80µl da diluição 1:200 do anticorpo secundário biotinilado (sc-2347, Santa Cruz Biotechnology, EUA), era adicionado e incubado por duas horas nas mesmas condições anteriores. Seguia-se novo ciclo de lavagem em solução salina tamponada (3 vezes, por 5 minutos) após o qual 80 µl da solução de amplificação eram depositados sobre os cortes por 30 minutos. Após nova lavagem em PBS (3 vezes por 5 minutos) os cortes eram cobertos com solução de diaminobenzidine contendo 3% de H₂O₂, sendo a reação acompanhada ao microscópio óptico e bloqueada com água destilada. Era realizada então a contra-coloração com a hematoxilina de Harris, sendo os cortes desidratados em sequência de álcoois e xilol para que se procedesse a montagem. A documentação era feita em fotomicroscópio (Zeiss, Alemanha).

6. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

As amostras de RNA total eram extraídas de tecido tiroidiano através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol Clorofórmio (CHOMCZYNSKI *et al.*, 1987) com adaptações realizadas no Laboratório de Imunologia Clínica – Unicamp.

O tecido era homogeneizado em solução de extração de RNA contendo 4M guanidina tiocianato (Gibco BRL, Life Technologies, EUA), 0,1 M 2-

mercaptoetanol, 25 mM citrato de sódio pH 7,0 e 0,5% sarcosyl (Sigma, EUA), pH 7,0.

Para a separação das proteínas dos ácidos nucleicos, adicionava-se volume igual de solução Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1) e, a seguir, a mistura era agitada vigorosamente formando emulsão. A preparação era centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente a 10,000 x g, recuperando-se a fase aquosa (superior). Repetia-se a extração com Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico até que não houvesse proteínas na interfase.

O excesso de Fenol era extraído com Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1). O RNA na fase aquosa era precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto e acetato de sódio pH 5,2, na concentração final de 0,3M. Esta preparação era mantida a - 80.C *overnight*.

Posteriormente, o RNA era precipitado por centrifugação a 10,000 x g durante 20 minutos a 4.C. Adicionava-se então 40µl de água ultrapura preparada com dietil pirocarbamato (DEPC, Sigma, EUA) ao precipitado que era armazenando a - 80.C.

7. ANÁLISE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO

A qualidade do RNA total extraído era analisada pela relação de suas leituras em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA) nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Eram consideradas adequadas amostras com relação

entre 1.6 e 1.8.

A quantificação do RNA total era feita através da fórmula: (densidade óptica a 260nm/0.025) x diluição de leitura/1000 = RNA (µg/µl).

8. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A síntese do cDNA era realizada a partir de 5µg de RNA total. Para a realização do PCR de transcrição reversa (RT-PCR), adicionava-se à amostra 0,5µl de Oligo d(pt) e água ultrapura em quantidade suficiente para 31µl. Aqueciam-se os tubos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65.C, resfriando-se para 4.C por 5 minutos.

Para permitir a ligação complementar dos *primers* ao RNA, adicionava-se 18µl de solução de reação (10µl de tampão Super RT, 2µl de dNTP mix 0,5mM, 5µl de DTT 0,1M e 1µl de RNAsin) seguida de incubação por 2 minutos a 42.C. Após adição de 1µl de enzima Super Transcriptase Reversa (500U), a reação processava-se em termocicladora programada para as condições abaixo:

1. 42.C por 50 minutos
2. 70.C por 15 minutos
3. Resfriamento da amostra até 4.C.

Após a última etapa as amostras, com volume de 50µl, eram armazenadas a -20.C como DNA complementar (cDNA).

9. AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (RT-PCR)

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação, 2µl de amostra de cDNA, 100ng de *primer 5' sense*, 100ng de *primer 3' anti-sense*, 45µl de solução de reação (5µl de tampão Taq polimerase, 2µl de dNTP mix 0,5nM, 1,5µl de MgCl₂ 50mM e 36.5µl de água ultra pura) e 20µl de óleo mineral. Em seguida os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidas para termocicladora (GeneAmp 9700, Perkin Ellmer, EUA) programada para as seguintes condições:

1. Desnaturação a 94.C por 2 minutos
2. 80.C por 5 minutos para aplicação de 1µl da enzima Taq polimerase
3. Anelamento 58.C por 45 segundos
4. Extensão dos *primers* a 72.C por 90 segundos
5. Desnaturação da cadeia molde de DNA a 95.C por 45 segundos
6. Repetição dos passos 3 a 5 por 40 ciclos
7. Extensão final 72.C por 10 minutos
8. Temperatura de espera 4.C

Os produtos de PCR eram armazenados a -20.C.

Os *primers* utilizados, obedecendo à estratégia *sense* e *anti-sense*, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos *primers* utilizados para amplificação de cDNA por reação de polimerase em cadeia (RT-PCR).

Primer	Sense	Ant-Sense
Ciclofilina	5' GAC AGC AGA AAA CTT TCG TGC 3'	5' GGT TGT GAC TCA CCG ACC T 3'
IL- 2	5' GTCT CTOG TCAC TGAC GCAC AGAG CTAT TG	3' CATG ATGC TCTT TAGG CTTT CCAG GAAG TC
IL- 4	5' GTCT CTOG TCAC TGAC GCAC AGAG CTAT TG	3' CATG ATGC TCTT TAGG CTTT CCAG GAAG TC
IL-10	5' AGCT GGAC AACA TACT GCTA ACC	3' TCAT TCAT GGCC TTGT AGAC AC
IL-12 ₄₀	5' AGCT TTTG TGAC AACC AATA AGAA C	3' CAAA CTCA CAGA GATC TGCC TG
IL-12 ₃₅	5' GATg CAGT CTCT CTGA ATCA TAAT GG	3' GGCA CAAA AACA ATAG CTTA TCAG T
IFN- γ	5' CGCT ACAC ACTG CATC TTGG	3' GGCT GGAT TCCGG GCAA CA
TNF- α	5' CTT AGA CTT TGC GGA GTC CG 3'	5' CCC TGT CAC TGG ACC TGA CA 3'
Fas	5' GGC GAT TTC TGG GAC TTT GTT TCC T 3'	5' GCA CAG AAG GGA AGG AGT A 3'
Fas-ligante	5' CTA GAG GGC CGG ACC AAA GGA GAC C 3'	5' AGG TGG AAG AGC TGA TAC ATT CCT AAT CCC 3'
BCL-w	5' GAG TTT GAG ACC CGT TTC CGC CGC ACC TTC 3'	5' CCA CCA TCC AAT CCT GCA CTT GTC CCA CCA 3'

10. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As amplificações dos cDNA através de *primers* específicos para citocinas e produtos relacionados à apoptose eram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparada em tampão TBE (ácido bórico, Tris EDTA) e contendo 2µl de brometo de etídio para cada 50 ml.

As amostras a serem analisadas continham 8µl de cDNA, 1,5µl de Tampão GBX (PCR *loading buffer*) e 5,5µl de água ultrapura. Utilizava-se para o desenvolvimento da eletroforese (70 volts, 150 mAmp, 45 minutos) o tampão TBE contendo brometo de etídio (2µl/100ml).

Os géis eram revelados por excitação do brometo de etídio em luz ultravioleta e registrados de modo digital em sistema de documentação de imagens NucleoVision® (NucleoTech, USA). O peso molecular e a intensidade das bandas eram analisados através do programa GelExpert® (NucleoTech, USA). Em caso de não amplificação, as amostras eram submetidas a novo procedimento de PCR, objetivando excluir falsos negativos resultantes de erros de procedimento.

11. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DO RNA MENSAGEIRO

A semi-quantificação do RNA mensageiro era obtida pela relação entre as áreas de pixel determinadas para as bandas correspondentes ao RNA mensageiro em

questão e aquelas observadas para a ciclofilina (gene estrutural). Os valores foram normatizados e transformados em unidades arbitrárias (pixel index) através da fórmula:

Expressão semi-quantitativa (Unidades Arbitrárias) = (área de pixel do RNA mensageiro a ser avaliado/ área de pixel da ciclofilina) x 100.

12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Comparações da expressão semi-quantitativa foram feitas através de análise de variância (ANOVA) ou pelo teste t de *student* quando apropriado.

RESULTADOS

1. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E FENOTIPIIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS PRESENTES NAS TIRÓIDES

As glândulas avaliadas apresentaram padrões histológicos compatíveis com o esperado para cortes de congelação. As características de cada grupo experimental estão descritas abaixo e resumidas na Tabela 2 e fotomicrografias representativas dos grupos experimentais são demonstradas nas Pranchas I, II e III.

Grupo C10 (controle de 10 semanas)

A análise morfológica das tiróides mostrou folículos íntegros e a presença linfócitos predominantemente CD4⁺ distribuídos de forma esparsa, sem a caracterização de infiltrado inflamatório, em quatro das cinco tiróides observadas. Apenas em um dos camundongos NOD estudados foi possível observar pequena área de infiltrado inflamatório organizado de forma nodular.

Grupo CM10

As glândulas dos animais deste grupo estavam aumentadas de tamanho e com tecido mais firme à observação macroscópica. As tiróides dos animais componentes deste grupo apresentavam folículos de tamanho variado, muitos deles aumentados e formados por células elevadas, contendo núcleos com cromatina pouco densa. Apenas um dos cinco animais apresentava pequeno agrupamento de células inflamatórias de localização perivascular. A presença de linfócitos distribuídos de forma esparsa era semelhante ao grupo C10.

Grupo MI44D

As tiróides estudadas no grupo MI44D apresentaram folículos formados por tirócitos normais. As técnicas empregadas não permitiram a avaliação da presença de células em processo de apoptose. O infiltrado linfo-plasmocitário foi observado em apenas 01 dos cinco casos estudados, embora estivesse presente de modo incipiente, sem que se observasse a destruição de folículos. A presença de linfócitos posicionados de forma esparsa era observada, com predomínio daqueles positivos para CD4.

Grupo MI32S

Todos os animais observados neste grupo apresentaram infiltrado linfo-plasmocitário organizado, contendo folículos em destruição. Entretanto, a área do parênquima glandular envolvida era nitidamente superior em dois dos cinco casos avaliados. Neste grupo, o infiltrado inflamatório apresentava predominantemente linfócitos CD8⁺. A marcação de linfócitos CD4⁺ evidenciou a presença destas células em número reduzido, posicionadas de modo esperso no interior do infiltrado inflamatório.

Grupo C32

Apenas dois dos cinco casos estudados apresentaram infiltrado linfo-plasmocitário, com características semelhantes àsquelas observadas para o grupo MI32S, porém com envolvimento de menor extensão do parênquima.

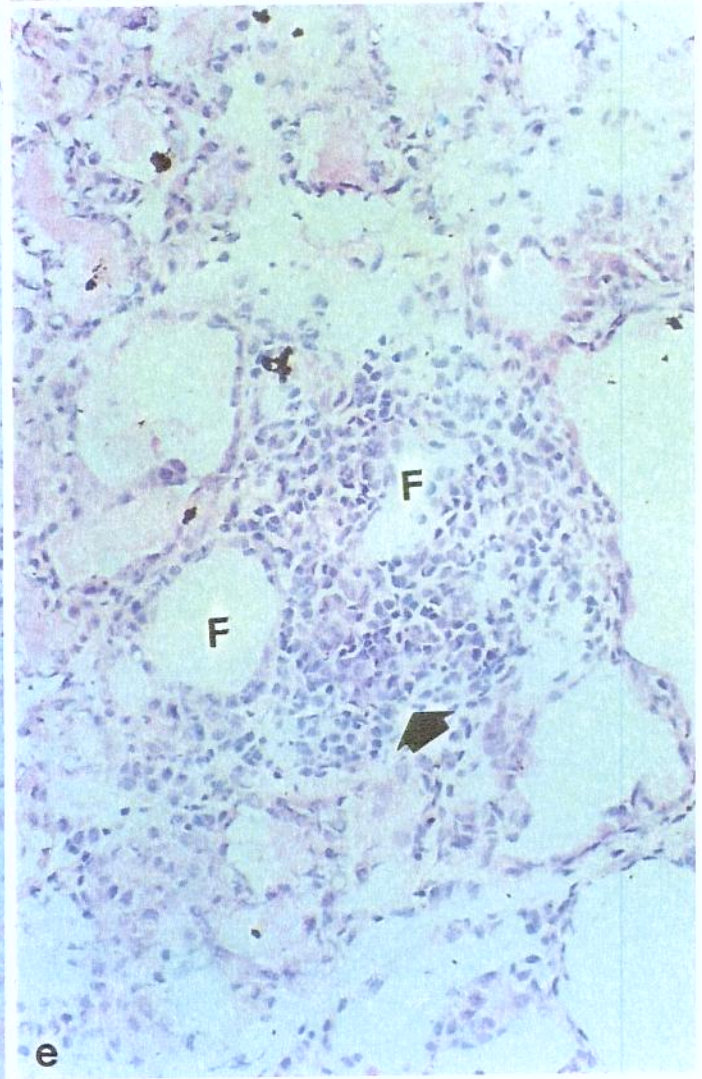
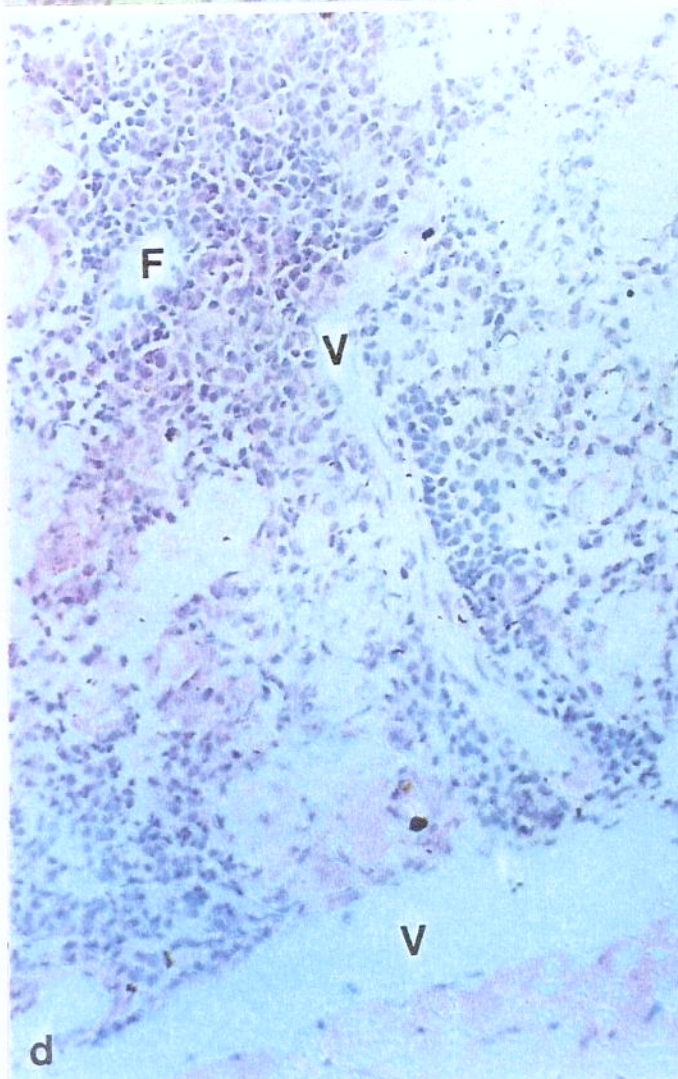
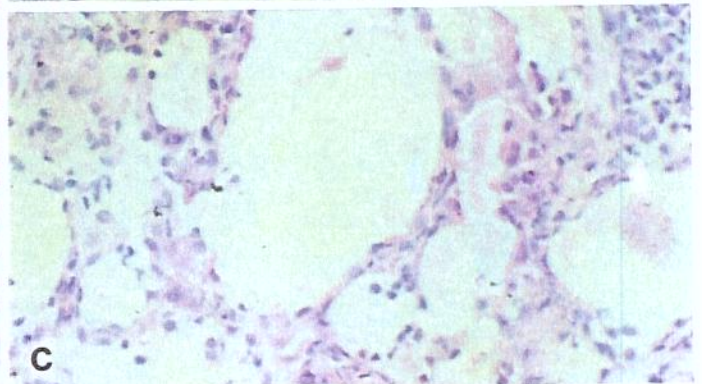
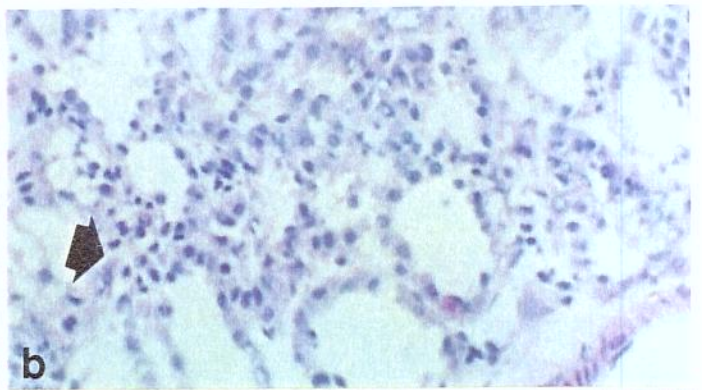
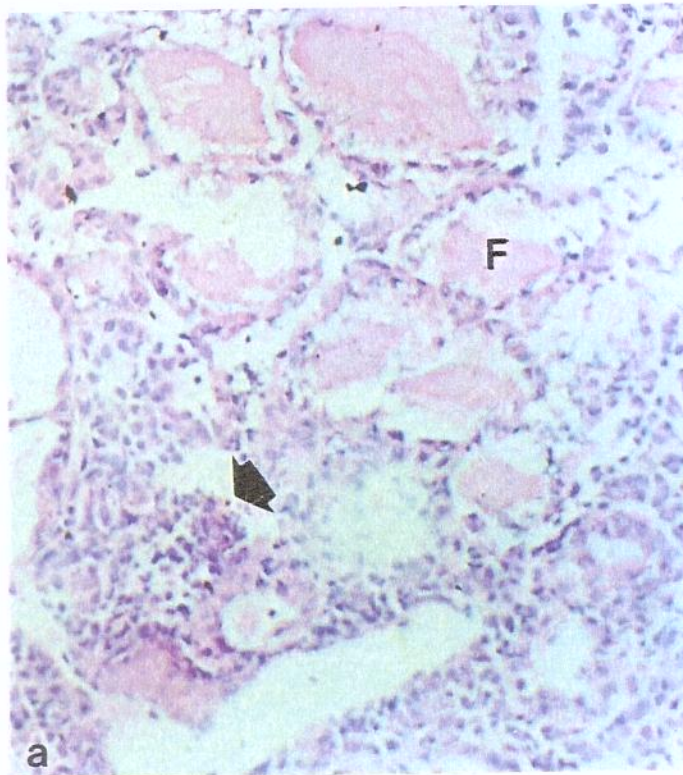
Tabela 2. Características histológicas de tiróides de camundongos NOD controle e submetidos a sobrecarga de iodeto de potássio após tratamento com metimazole.

Grupo Experimental	Presença de Linfócitos Distribuídos Forma Esparsa	Presença de Infiltrado Inflamatório
C10	4/5	1/5
CM10	5/5	1/5
MI44D	5/5	1/5
MI32S	5/5	5/5
C32	5/5	2/5

PRANCHAS

Prancha I

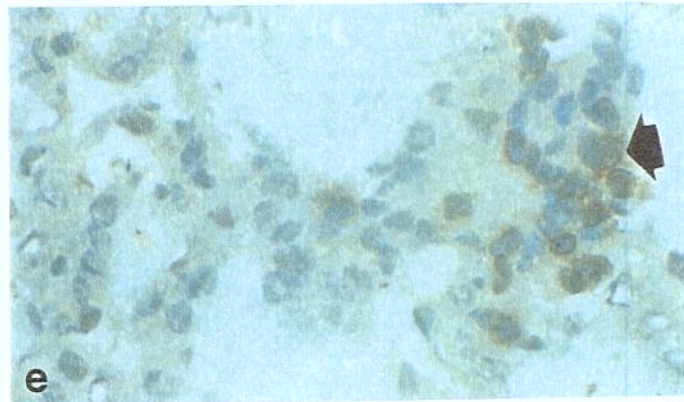
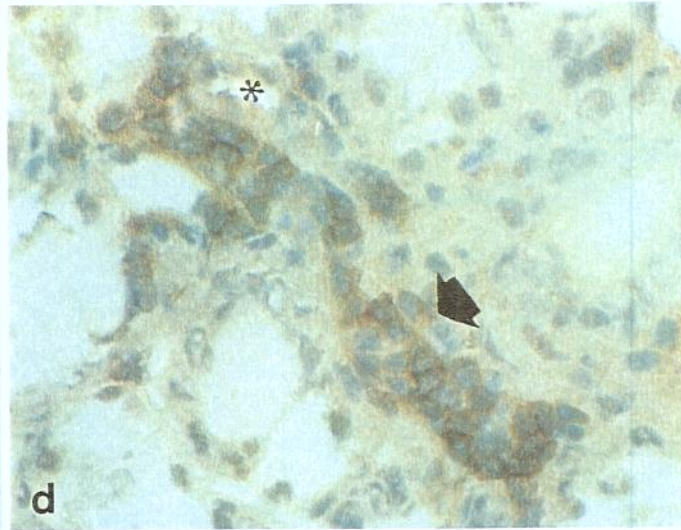
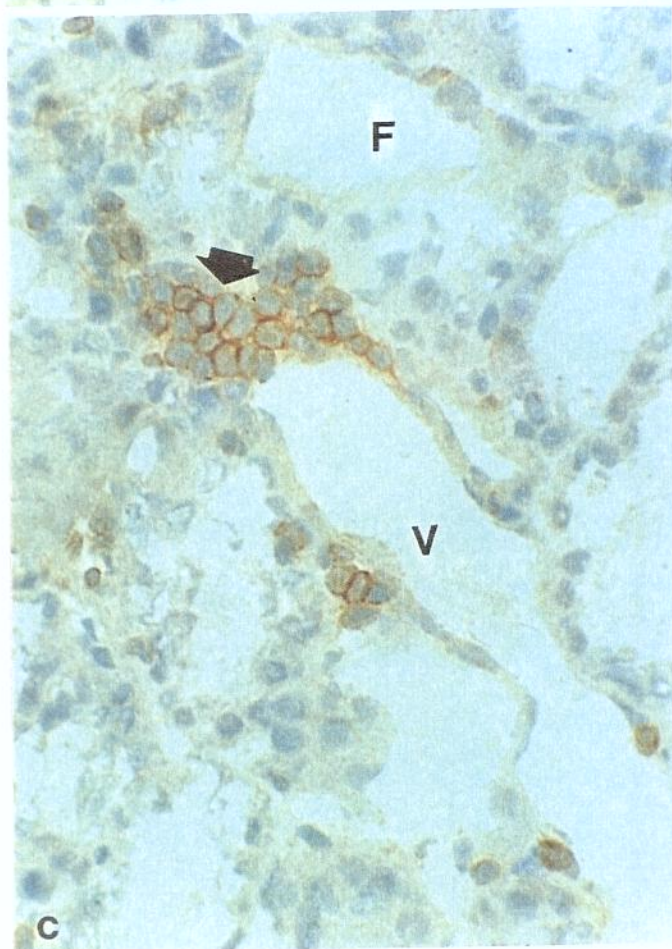
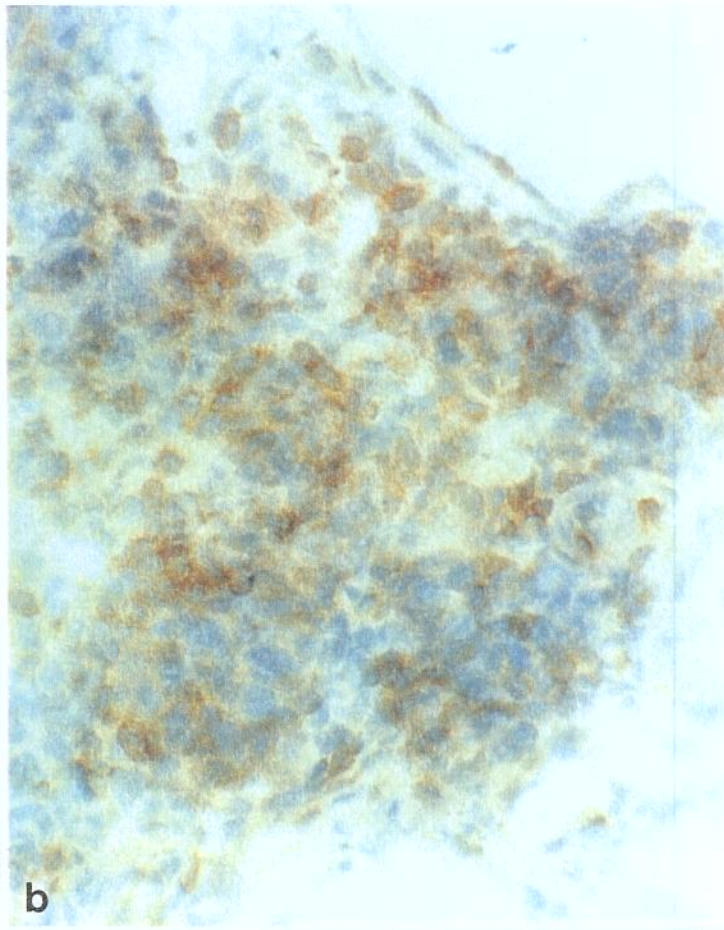
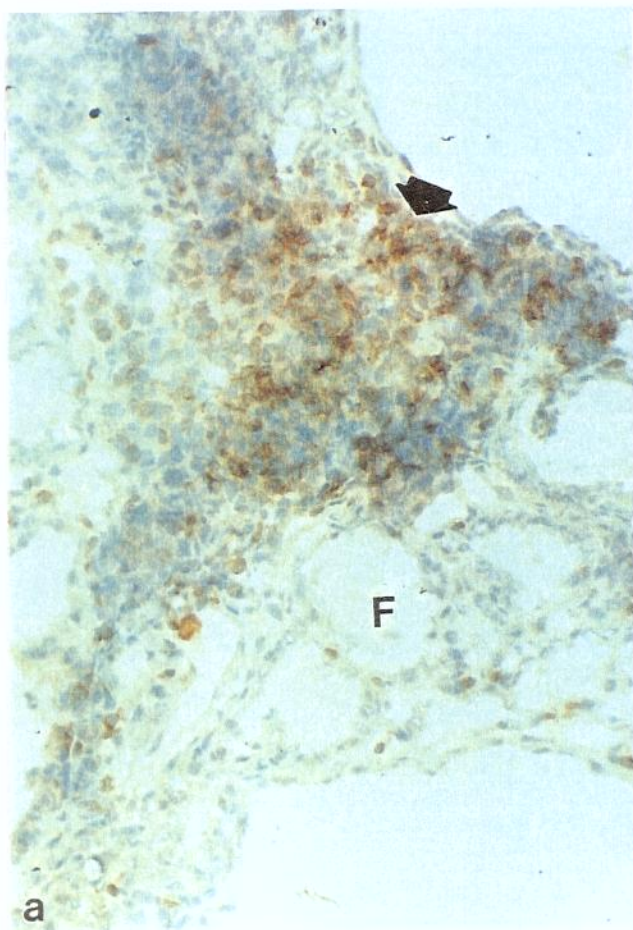
- a. Área de infiltrado inflamatório de localização interfolicular (seta) em camundongo NOD do grupo MI32S. Observa-se folículos (F) íntegros (HE, 320 X).
- b. Linfócitos posicionados em espaço interfolicular em tiróide de camundongos NOD controle do grupo MI44D (seta). Verifica-se manutenção da estrutura do tecido glandular (HE, 320 X)
- c. Representação de tiróide do grupo CM10 evidenciando heterogeneidade do tamanho dos folículos (HE, 640 X).
- d. Grande área de infiltrado inflamatório observada em camundongo NOD do grupo MI32S. É possível identificar restos foliculares envolvidos pelo processo inflamatório, conforme exemplificado em F, e a distribuição das células inflamatórias ao redor de vasos sanguíneos (V). (HE, 160 X).
- e. Infiltrado nodular (seta) envolvendo folículos tiroídianos (F) em camundongo NOD do grupo MI32S (HE, 320 X).



Prancha II

Fotomicrografias representativas da marcação por técnica de imunohistoquímica para população total de linfócitos T (CD3⁺) em camundongos NOD.

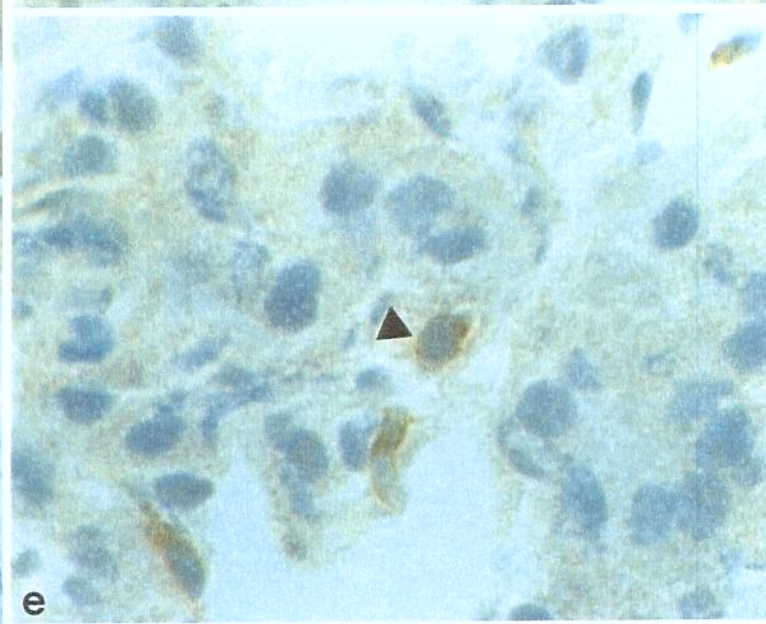
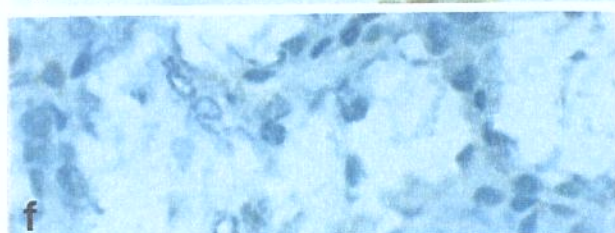
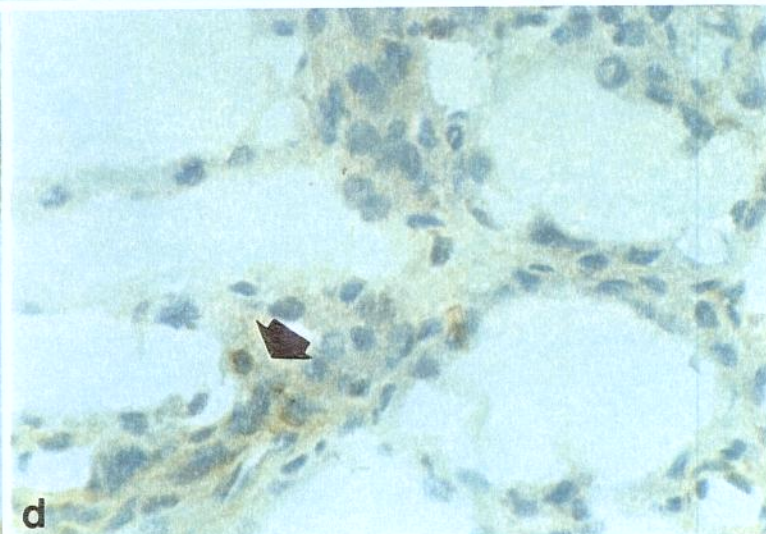
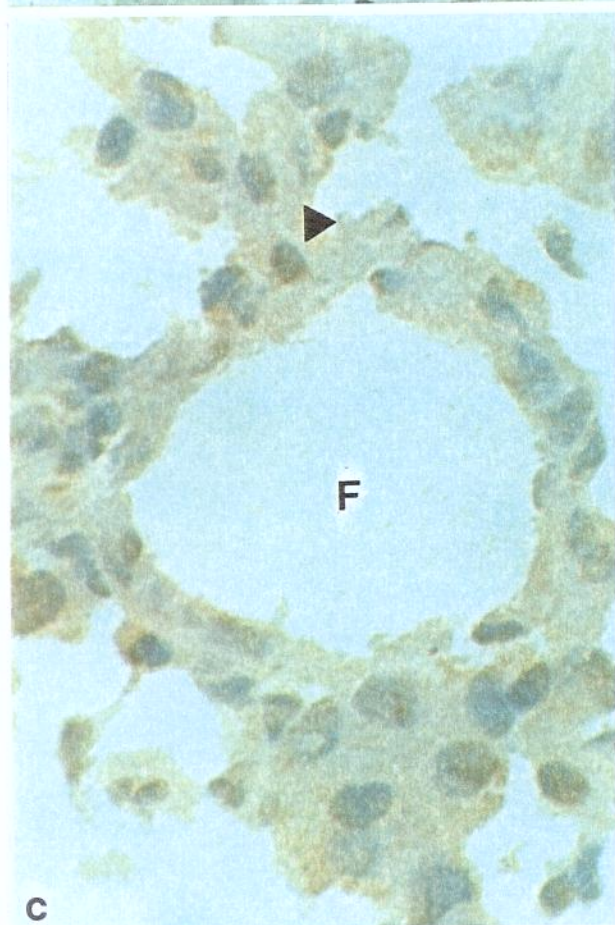
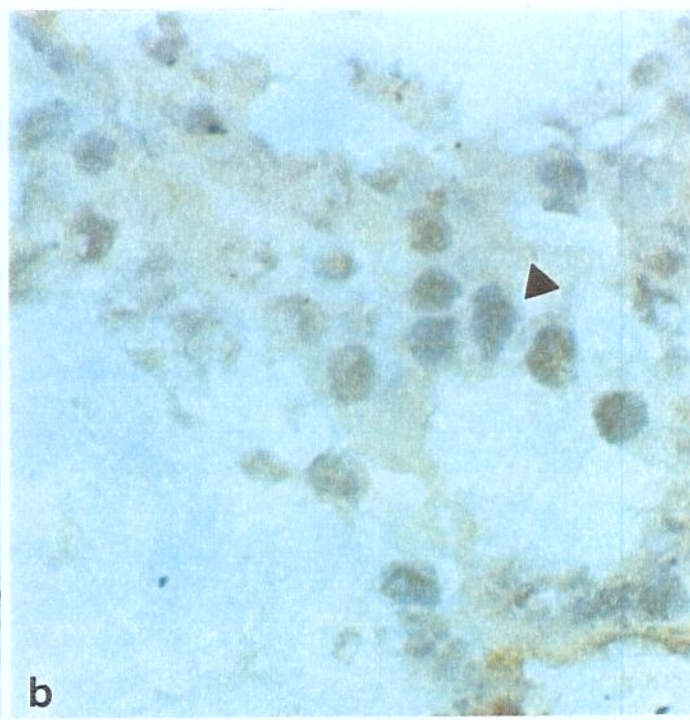
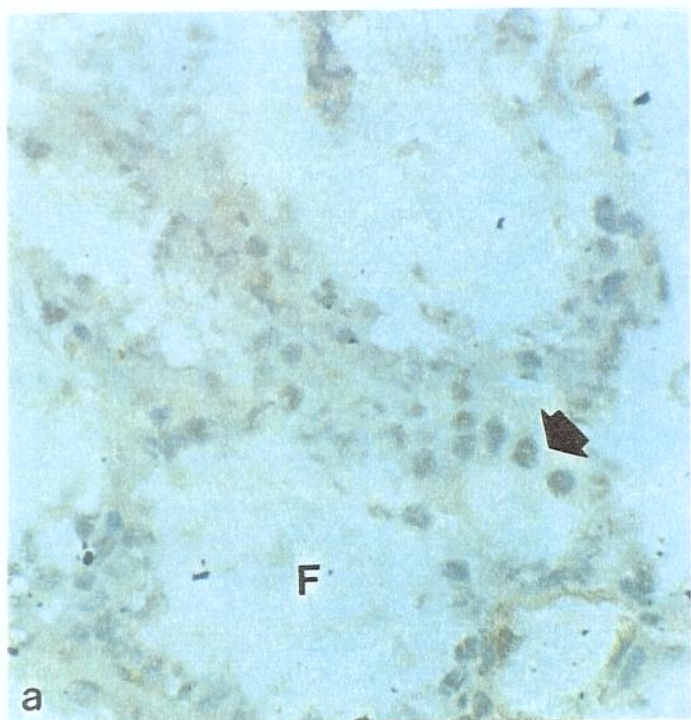
- a. Infiltrado inflamatório (seta) em animal do grupo MI32S. Observa-se folículo íntegro (F) na periferia do infiltrado (160 X)
- b. Detalhe do campo observado em (a). Observa-se, além de linfócitos T, a presença de outras células inflamatórias (640 X).
- c. Infiltrado linfocitário perivascular (seta), localizado no espaço interfolicular, em camundongo NOD do grupo MI32S. V: vaso; F: folículo. (320 X).
- d. Pequeno infiltrado inflamatório interfolicular (seta), porém já envolvendo restos foliculares (*). (640 X).
- e. Agrupamento de linfócitos T em localização interfolicular (640 X).



Prancha III

Fotomicrografias representativas da marcação por técnica de imunohistoquímica para subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ (auxiliar) e $CD8^+$ (citotóxica/supressora) em camundongos NOD.

- f. Linfócito T auxiliar ($CD4^+$) isolado e localizado em espaço interfolicular na tiróide de camundongo NOD do grupo MI44D. (320 X)
- g. Detalhe do campo observado em (a). (640 X).
- h. Fotomicrografia em imersão demonstrando folículo tireoidiano íntegro (F) e linfócito T $CD4^+$ em sua periferia. (1280 X).
- i. Linfócitos T $CD8^+$ localizados em espaço interfolicular (640 X).
- j. Detalhe em imersão do campo observado em d. (1280 X).
- k. Controle negativo (160 X)



2. EXPRESSÃO DE GENE ESTRUTURAL (CICLOFILINA) NAS AMOSTRAS DE RNA MENSAGEIRO

Todas as amostras de cDNA utilizadas para o estudo tiveram o produto do gene para ciclofilina (276 pares de bases) amplificado através da reação de polimerase em cadeia, confirmando sua qualificação para uso nas análises propostas

3. EXPRESSÃO DOS GENES PARA COMPONENTES DE APOPTOSE E INTERLEUCINAS

3.1 Frequência de Expressão dos Genes para Componentes de Apoptose e Interleucinas

A expressão de Fas foi observada em todos os animais dos grupos C10 e C32, em 4 dentre 5 animais dos grupos CM10 e MI44D e em 3 dentre 4 animais do grupo MI32S. Observou-se amplificação de fragmentos correspondentes ao RNA mensageiro de FAS-ligante e de BCL-w em todas as amostras estudadas.

Não foi possível observar amplificação de RNA mensageiro correspondente à Interleucina 4 (IL-4) em nenhuma das amostras estudadas.

A expressão de Interleucina 2 (IL-2) ocorreu de modo intenso (111,74 unidades arbitrárias) em um animal do grupo MI44D (camundongo 6) e com baixo sinal em três dos cinco animais que compunham o grupo controle de 32 semanas (C32). As

demais amostras não apresentavam amplificação do produto esperado.

A expressão do produto gênico para interleucina 10 (IL-10) foi de baixa intensidade em um animal do grupo MI32S e em quatro dos cinco animais do grupo C32. Os demais grupos, compostos por animais de 10 semanas não apresentaram expressão desta interleucina.

O produto do gene para Interferon- γ (IFN- γ) expressou-se de modo isolado em uma das cinco amostras do grupo CM10 e em dois dos cinco casos do grupo C32.

O gene para o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) estava expresso em todas as amostras dos grupos C10 e MI32S, em quatro das cinco amostras do grupo MI44D e três das cinco amostras dos grupos CM10 e C32.

O RNA mensageiro referente às cadeias p35 e p40 de interleucina 12 (IL12p35 e IL12p40) estava expresso em todas as amostras estudadas.

A frequência de expressão dos componentes de apoptose e interleucinas estudadas, bem como os pesos moleculares dos produtos observados estão compilados na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de expressão dos produtos de genes para Interleucinas e componentes de apoptose em camundongos NOD controle ou submetidos à indução de tiroidite experimental.

	Frequência de Expressão					Fragmento (pares de base)
	C10	CM10	MI44D	C32	MI32S	
Fas	5/5	4/5	4/5	5/5	3/4	267
Fas-ligante	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4	206
BCL-w	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4	213
TNF- α	5/5	3/5	4/5	3/5	4/4	254
Interferon- γ	0	1/5	0	2/5	0	428
Interleucina-2	0	0	1/5	3/5	0	366
Interleucina-4	0	0	0	0	0	337
Interleucina-10	0	0	0	4/5	1/4	366
Interleucina-12 (p35)	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4	488
Interleucina-12 (p40)	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4	297

3.2 Análise Semi-quantitativa da Expressão dos Genes para Componentes de Apoptose e Interleucinas

Fas, Fas-ligante e BCL-w

Os níveis médios de expressão de Fas foram significativamente superiores ($p=0,01$) no grupo controle de 32 semanas (C32), em comparação com os controles de 10 semanas (C10), não sendo possível observar elevação nos níveis de expressão deste componente de apoptose nos animais controles tratados com metimazole (CM10) em comparação com controles de 10 semanas (C10), conforme demonstrado na Figura 1. Análise da expressão do RNA mensageiro de Fas em animais que compõem o grupo C32 permitiu observar que 3 dentre 5 animais tinham níveis de sinalização para esta proteína nitidamente superiores aos outros 2 que integravam o grupo experimental (Figura 2). O produto do gene de Fas expressou-se de forma intensa em um animal do grupo MI44D (camundongo 6) e um animal do grupo CM10 (camundongo 2), resultados confirmados após a repetição da reação de PCR.

A semi-quantificação da expressão de RNA mensageiro permitiu caracterizar maior sinalização no grupo MI44D para Fas-ligante ($p=0.0054$, ANOVA) e BCL-w ($p=0.0048$, ANOVA). O desvio padrão, observado neste grupo, estava elevado tanto para as avaliações da expressão de Fas-ligante (40,69 % da média) quanto para as de BCL-w (40,68% da média), refletindo a presença valores dispersos em relação à sinalização para ambos componentes (Figura 1).

A sinalização para o produto do gene do fator de necrose tumoral α (TNF- α) apresentou tendência à elevação no grupo MI44D ($p=0.05$, ANOVA), embora os valores calculados para sua expressão tenham sido dispersos (109,53 a 425,58 unidades arbitrárias), conforme refletido no valor do desvio padrão que correspondeu a 55,84% da média (Figura 1).

Interleucina 12

Foram avaliados os produtos de RT-PCR correspondentes à sinalização para as cadeias p35 e p40 da interleucina 12. A Figura 3 resume os dados médios de expressão desta citocina nos cinco grupos experimentais.

Os valores médios de expressão do gene para a cadeia p40 da interleucina 12 (IL-12p40) não diferiram entre os grupos estudados, sendo uniformes, exceto no grupo MI44D. Neste, dois animais sinalizaram este produto em níveis nitidamente superiores (265,85 e 275,99 unidades arbitrárias) àqueles observados pelos outros três (108,28; 122,76 e 141,42 unidades arbitrárias).

A semi-quantificação da expressão do gene referente à cadeia p35 da interleucina 12 (IL-12p35) permitiu verificar tendência de elevação nos grupos MI44D, MI32S e C32. Diferença estatisticamente significativa ($p=0.03$) foi observada ao se comparar os grupos C10 ($62,96 \pm 19,63$ UA) e C32 ($116,05 \pm 44,01$ UA). Novamente, expressão em nível nitidamente superior foi observada em dois animais do grupo MI44D e um do grupo MI32S.

Figura 1

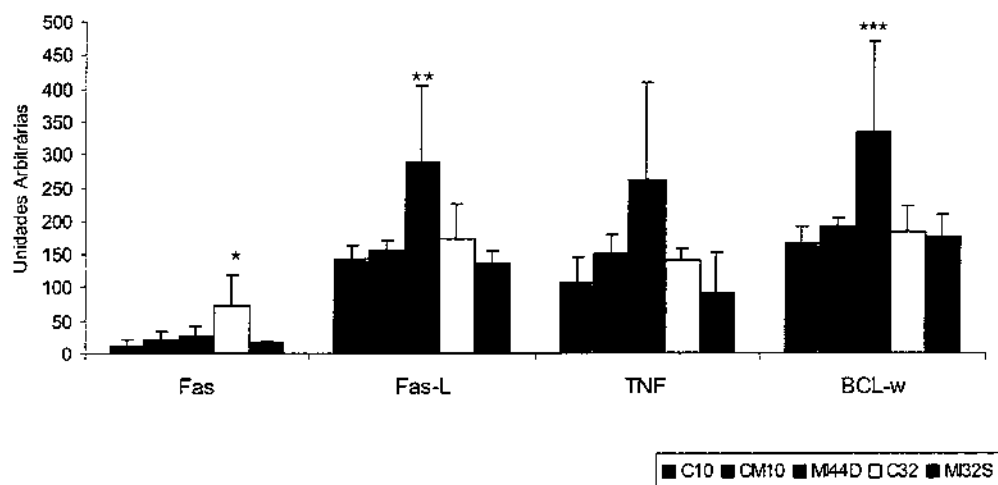
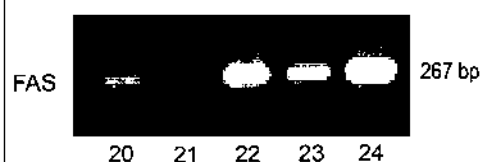
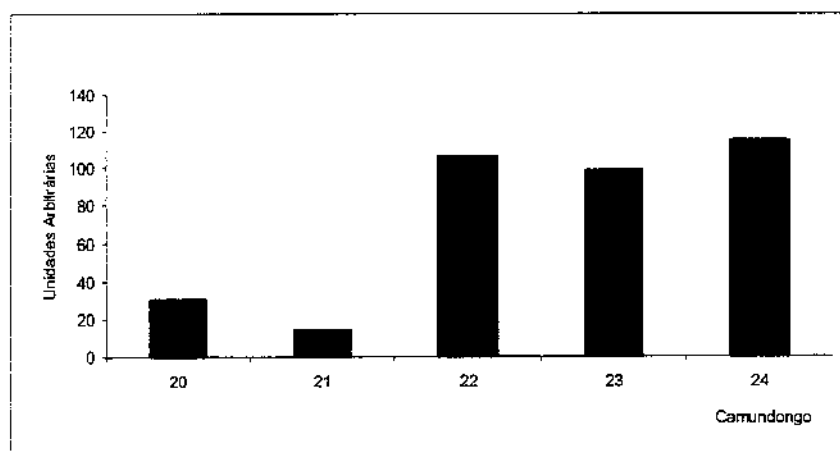


Figura 2



A

B

Figura 1. Semi-quantificação da expressão de Fas, Fas-ligante, TNF- α e BCL-w em camundongos NOD controles ou submetidos à indução de sobrecarga de iodo após tratamento com metimazole.

* $p=0,01$ em relação ao grupo C10;

** $p=0,0054$, ANOVA;

*** $p=0,0048$, ANOVA

Figura 2. A: Semi-quantificação da expressão de Fas em camundongos NOD controles com 32 semanas de vida (valores individuais de cada indivíduo); B: RT-PCR evidenciando a diferença de expressão do produto do gene de Fas.

Análise do Grupo MI44 D

Os valores de desvio padrão referentes às medidas de semiquantificação da expressão dos produtos de Fas-ligante, BCL-w, TNF- α e frações p35 e p40 de interleucina 12 foram elevados, sempre acima de 40% da média, refletindo a dispersão dos valores observados.

Desta forma, a observação mais detalhada deste grupo, conforme demonstrado na Figura 4 (Prancha IV), permite observar a existência de dois padrões de resposta à administração de iodeto de potássio. Os animais 6, 8 e 9 expressaram Fas-ligante e BCL-w em patamares superiores aos demais componentes do grupo, enquanto valores mais acentuados de sinalização para Fas, TNF- α , IL-12p40 e IL-12p35 eram observados nos animais 6 e 8 apenas. O animal 9 não expressou o produto de TNF- α , fato confirmado por repetição dos PCR.

Neste contexto, cabe ressaltar que o animal 6, que apresentou os maiores níveis de expressão de todas os produtos citados acima, foi o único deste grupo de cujo cDNA foi possível amplificar o sinal de IL-2.

Figura 3

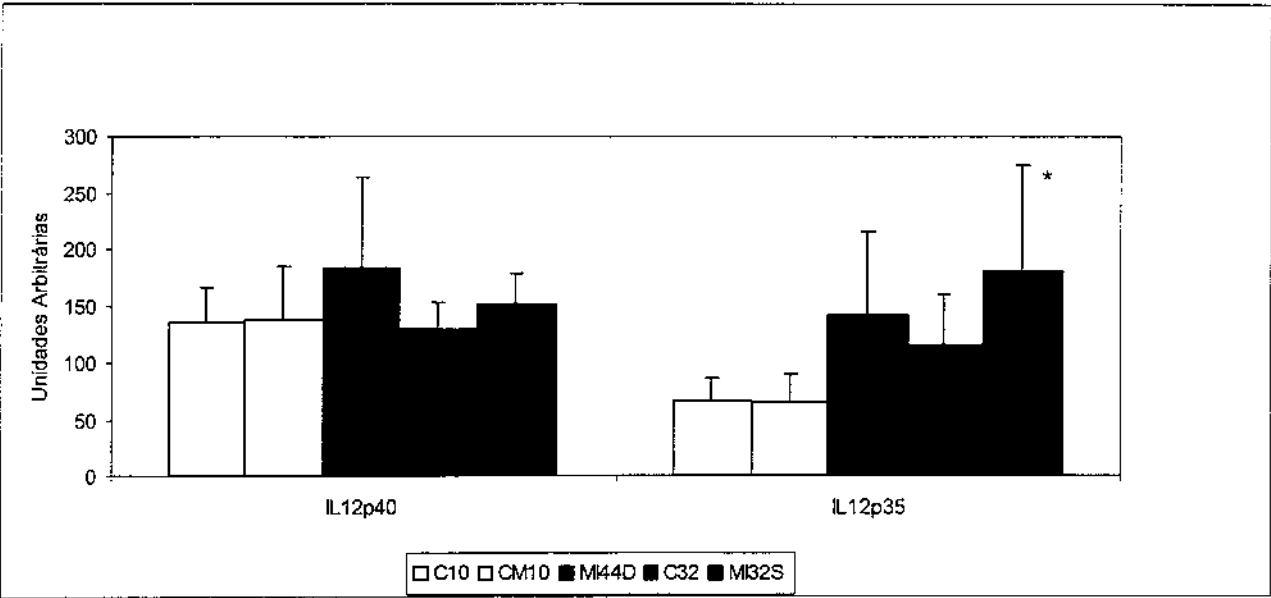


Figura 4

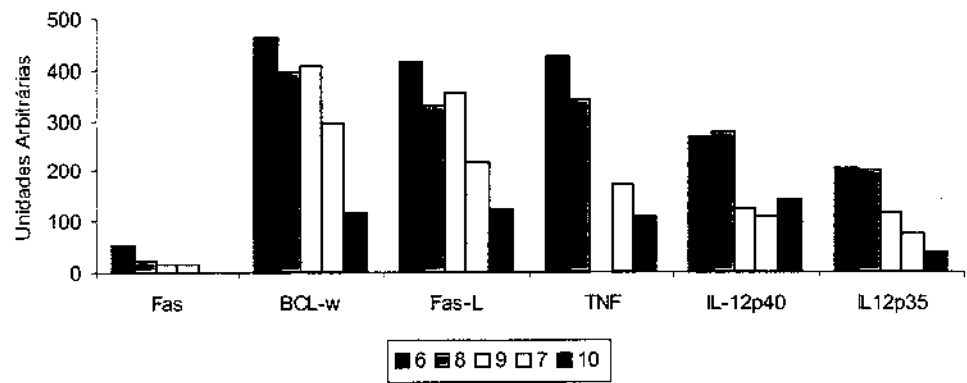


Figura 3. Expressão dos produtos dos genes para cadeias p40 d p35 de interleucina 12 em camundongos NOD controle ou submetidos a sobrecarga de iodo após uso de metimazole. *P=0.03 em relação ao grupo C10.

Figura 4. Expressão de componentes de apoptose e interleucina 12 (p35 e p40) em camundons NOD submetidos à sobrecarga de iodo após 6 semanas de exposição a metimazole.

DISCUSSÃO

1. INDUÇÃO DE TIROIDITE AUTO-IMUNE

O camundongo NOD, como modelo experimental de *diabetes mellitus* de etiologia auto-imune tem sido estudado amplamente, havendo maior prevalência desta doença entre as fêmeas que, mesmo nas colônias mantidas em condições *germ free*, não ultrapassa 90% dos indivíduos (POZZILLI *et al.*, 1993). Estratégias para acelerar e elevar a frequência de aparecimento do diabetes têm sido propostas, entre as quais se destaca a utilização da ciclofosfamida que parece acentuar a expressão de interferon- γ (ABLAMUNITIS *et al.*, 1999) .

A tiroidite auto-imune em camundongos NOD vem sendo objeto crescente de estudo de grupos interessados na fisiopatologia das doenças tiroidianas auto-imunes, sobretudo na forma de tiroidite de Hashimoto. Em 1992, BERNARD *et al.* relataram prevalência elevada de tiroidite auto-imune na colônia de camundongos NOD por eles acompanhada, fato que não foi repetido por outros grupos de pesquisa que caracterizavam frequência de infiltrado linfo-plasmocitário em torno de 16% (DAMOTTE *et al.*, 1997). Em 1995, MANY *et al.* descreveram o modelo de tiroidite experimental auto-imune em camundongos NOD, no qual a administração de iodo resultou na indução de infiltrado inflamatório em todos os animais estudados, com características morfológicas semelhantes às da tiroidite de Hashimoto e acompanhada de aumento nos níveis de auto-anticorpos antitiroidianos.

A colônia NOD estabelecida no Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) foi avaliada, preliminarmente, quanto à presença de infiltrado inflamatório e os resultados sugerem que a prevalência seja menor que aquela observada pelo grupo de MANY *et al.*, embora, como descrito por aqueles autores, não haja predileção entre os sexos. Estes dados sugerem ainda que a prevalência do infiltrado inflamatório nas tiróides de camundongos NOD aumente significativamente a partir da 25ª semana (ZANTUT-WITTMANN *et al.*, 1996).

Baseados nos resultados acima, desenhamos o protocolo utilizado neste trabalho, visando submeter os animais à sobrecarga de iodo antes do período crítico de estabelecimento da tiroidite e estendendo o acompanhamento até a 32ª semana de vida, período correspondente à máxima expressão do infiltrado inflamatório. A opção pela utilização de animais do sexo masculino se fez, fundamentada em dados preliminares (ZANTUT-WITTMANN *et al.*, 1996), pela aparente semelhança de comportamento desta manifestação em ambos os sexos e pela menor prevalência de *diabetes mellitus* que impediria o acompanhamento de longo prazo sem a inserção de novos fatores exógenos.

O pré-tratamento com metimazole é utilizado com o objetivo de promover período “bociogênico” antes da sobrecarga de iodo. Os animais tratados com esta droga (grupo CM10) apresentavam glândulas macroscopicamente aumentadas e células foliculares elevadas e com cromatina pouco densa, sugerindo o comportamento de síntese protéica.

Todos os animais submetidos à sobrecarga de iodo apresentaram tiroidite quando avaliados na 32ª semana de vida (grupo MI32S), embora a extensão do infiltrado área fosse nitidamente superior em dois dentre cinco animais. O infiltrado linfocitário apresentava predomínio de células CD8⁺, o que está de acordo com o observado na literatura para o infiltrado inflamatório (MACKENZIE *et al.*, 1987).

Nossos resultados são compatíveis com aqueles descritos por outros autores para a tiroidite experimental no camundongo NOD (MANY *et al.*, 1996) ou para as linhagens dele derivadas (BRALEY-MULLEN *et al.*, 1999), havendo aumento da prevalência de lesão tiroidiana no grupo experimental em relação ao controle. Entretanto, a diferença de intensidade de expressão da tiroidite deve ser alvo de investigações mais detalhadas, preferencialmente com abordagem morfométrica, para que se possa caracterizar a duplicidade de resposta histopatológica neste modelo.

Cabe ressaltar que todos animais avaliados na 10ª semana de vida (grupos C10, CM10 e MI44D) não apresentaram lesões tiroidianas que envolvessem folículos ou sugerissem desestruturação dos mesmos, exceto em minoria dos casos. Ao contrário, a presença de linfócitos distribuídos de forma esparsa entre os folículos foi detectada em todos os grupos experimentais nesta idade. Este aspecto, anteriormente observado por nosso grupo de pesquisa (ZOLLNER *et al.*, Submitted) pode representar, no ambiente tiroidiano, elemento análogo às fases pré-invasivas da insulite do camundongo NOD, exercendo o iodo o papel de acelerador da lesão. Esta interpretação, se confirmada, pode enaltecer a

importância do modelo NOD no estudo da tiroidite experimental, uma vez que o aproxima do observado em humanos onde a exposição ao iodo tem sido apontada como uma das prováveis causas de tiroidopatias auto-imunes em parte da população (PAPANASTASIOU *et al.*, 2000).

2. EXPRESSÃO DE BCL-w EM TECIDO TIROIDIANO DE CAMUNDONGOS NOD

O protótipo de proteína reguladora do processo de apoptose é a BCL-2, cuja expressão reduz a morte celular induzida por diversos estímulos. Esta proteína faz parte de uma ampla família entre as quais se destacam o BCL-xL, BCL-s, Bax e Bad. Algumas destas proteínas apresentam efeitos pró-apoptóticos, enquanto outras são capazes de proteger a célula da morte programada.

BCL-w é um dos membros da família BCL-2, cuja sequência foi descrita em 1996, e que parece compartilhar com estas proteínas a capacidade de se contrapor à apoptose (GIBSON *et al.*, 1996). Sua estrutura é amplamente conservada entre camundongos e humanos, estando expresso em vários tipos celulares e sendo essencial para o desenvolvimento adequado da espermatogênese (PRINT *et al.*, 1998).

Até o presente, nenhuma publicação havia constatado ou quantificado a expressão de BCL-w em tiróides de animais ou humanos na vigência de tiroidite auto-imune. Nossos achados, inéditos, apontam para expressão constitutiva

deste componente da família BCL-2, cuja intensidade se eleva na vigência do estímulo apoptótico desencadeado pelo iodo após condições “bociogênicas”.

Avaliação da expressão de BCL-2 em casos de tiroidite auto-imune em humanos sugere que haja redução da expressão desta proteína nos casos de tiroidite de Hashimoto quando comparadas a controles sadios, tanto em observações imunohistoquímicas quanto em determinações de expressão gênica por RT-PCR (HAMMOND *et al.*, 1997 ; GIORDANO *et al.*, 2001a).

O aumento da expressão de BCL-w neste grupo experimental sugere mecanismo protetor após a submissão ao estímulo apoptótico.

3. SEMIQUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FAS, FAS-LIGANTE E TNF- α

Nossos resultados não demonstraram modificação na intensidade de expressão do gene de Fas-ligante nos animais tratados exclusivamente com metimazole por 6 semanas (grupo CM10) quando comparados ao controle da linhagem (grupo C10). Estes dados, embora obtidos em modelo animal e com baixas doses deste antitiroídiano, não são comparáveis àqueles observados por MITSIADES *et al.* (2000) que relataram aumento desta proteína em tiróides de pacientes tratados com metimazole para controle da doença de Graves.

Por outro lado, a expressão de Fas-ligante elevou-se no grupo submetido à sobrecarga de iodo (grupo MI44D) em relação aos demais. A avaliação do padrão

morfológico deste grupo aponta pequena presença de linfócitos, predominantemente CD4⁺, raramente formando infiltrado inflamatório organizado. Desta forma, o sinal detectado pela técnica de RT-PCR parece ser oriundo de células foliculares. O aumento da expressão de Fas-ligante neste grupo de células é descrito em modelos experimentais (BLUHER *et al.*, 1999b) e em humanos (GIORDANO *et al.*, 2001a), aparentemente sendo capaz de desencadear apoptose através da ativação de Fas em células vizinhas.

A expressão de Fas tem sido considerada constitutiva em tecido tiroídiano (VLAEMINCK-GUILLEM *et al.*, 2001), ao contrário do observado para seu ligante. Os animais estudados neste experimento apresentaram expressão de Fas na grande maioria dos casos. Os animais com expressão negativa de Fas foram avaliados pela repetição do procedimento de PCR, descartando a possibilidade de falsos negativos.

A expressão do produto do gene Fas foi mais intensa nos animais controles com 32 semanas, em comparação com aqueles com 10 semanas de vida, não sendo detectadas outras diferenças entre os grupos experimentais e, provavelmente, refletindo o processo de envelhecimento. Resultados comparáveis foram observados em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD e avaliadas por RT-PCR no LICA (VENTURA, comunicação pessoal).

A média de expressão de TNF- α também apresentou tendência a elevação no grupo MI44D ($p=0.05$), embora um dos animais não o expressasse. O TNF- α é

considerado indutor de apoptose sinalizando através de seu receptor específico na superfície celular, ativando vias comuns de morte celular. O TNF- α tem origem principal em células imunes (AGGARWAL, 2000). Deste modo, a ausência de expressão em um dos camundongos NOD, pode refletir diferença na presença e comportamento do infiltrado inflamatório frente ao estímulo representado pela sobrecarga de iodo. Esta hipótese é reforçada pelos achados de BLUHER *et al.* (1999) no rato BB/W que propõem correlação positiva entre a presença de infiltrado e os níveis de expressão de TNF- α .

A ausência de modulação de expressão de Fas no grupo experimental MI44D, juntamente com a hipótese de sua expressão constitutiva na tireóide, sugere que este modelo possa promover a apoptose através do aumento de expressão de Fas-ligante tireoidiano, juntamente com a presença de TNF- α de provável origem a partir de células imunes. Estes dados estão parcialmente de acordo com o observado por BLUHER *et al.* (1999) que descrevem importante participação da via mediada por Fas na tireoidite de ratos BB/W, embora não tenham conseguido correlacionar esta expressão com o TNF- α .

Ampliação da compreensão destes resultados poderá advir de detalhamento temporal do estabelecimento do processo de apoptose neste modelo, associado à marcação específica das células envolvidas, permitindo caracterizar definitivamente a origem do sinal detectado pela técnica de RT-PCR.

4. SEMI-QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE INTERLEUCINAS

Os camundongos NOD foram amplamente estudados no que se refere à regulação da resposta imunológica nas ilhotas pancreáticas, onde o padrão de expressão de citocinas é caracteristicamente Th1. Abordagens especificamente tiroidianas desta expressão em camundongos NOD ou na sub-linhagem NOD H-2^{h4} não estão disponíveis na literatura, havendo maior interesse até o presente para a determinação das subpopulações de células T envolvidas (DAMOTTE *et al.*, 1997 ; BRALEY-MULLEN *et al.*, 1998 ; HUTCHINGS *et al.*, 1999 ; YU *et al.*, 2001). Neste contexto, os dados aqui apresentados são de extrema relevância, uma vez que trazem novos subsídios para a compreensão do modelo de tiroidite experimental induzida por excesso de iodo.

Estudos objetivando a análise de expressão de citocinas que caracterizam a resposta Th1 em modelos de tiroidite em outros modelos como o rato BB/w, sugerem que estas predominem nos órgãos acometidos (BLUHER *et al.*, 1999a), com grande ênfase sendo dada à expressão de IFN- γ e interleucina 12. Neste mesmo modelo, a expressão de interleucina 2 parece representar fenômeno transitório, característico do início do estabelecimento do processo infiltrativo. Resultados obtidos em ratos BB/W demonstram que a expressão de IFN- γ está presente em animais com tiroidite auto-imune e apresentando infiltrado linfoplasmocitário (BLUHER *et al.*, 1999a). Assim, seria esperado que nos grupos C32 e MI32S, onde foi detectada a presença de infiltrado inflamatório com

características de destruição folicular, houvesse a expressão desta citocina, fato observado apenas no primeiro grupo, mesmo após a repetição do procedimento de RT-PCR modificando-se as condições de reação. Isto poderia estar relacionado ao momento em que as amostras de RNA total foram extraídas, uma vez que o processo infiltrativo nas tiróides do grupo MI32S era mais pronunciado. Paralelamente, a produção local de IFN- γ é oriunda predominantemente de linfócitos T CD4⁺ que eram menos abundantes nos infiltrados observados.

A expressão do sinal para síntese das cadeias p40 e p35 de IL-12 foi detectada em todos os animais estudados, havendo aumento da expressão de IL-12p35 nos animais de 32 semanas. Estes dados refletem o conceito atualmente em desenvolvimento para o papel desta citocina na tiroidite auto-imune experimental e na sua forma humana (tiroidite de Hashimoto). A expressão de IL-12 tem sido observada em tecido tireoidiano proveniente de pacientes portadores de tiroidite de Hashimoto (AJJAN *et al.*, 1997) bem como no soro de indivíduos com doença de Basedow-Graves e tiroidite silenciosa (HIDAKA *et al.*, 1999 ; TAMARU *et al.*, 1999).

A participação da IL-12 na regulação da resposta imune na tiroidite parece ser fundamental, pois sua adição a cultura de linfócitos sensibilizados pela tiroglobulina e posteriormente transferidos para camundongos sensíveis à indução de tiroidite experimental resulta em intensificação das lesões observadas (BRALEY-MULLEN *et al.*, 1998). De modo análogo, a IL-12 foi capaz de prevenir a tolerância induzida pela tiroglobulina em camundongos CBA/J (ZHANG *et al.*,

2001).

A expressão constitutiva de IL-12 nas tiróides de camundongos NOD representa achado importante neste modelo, podendo estar relacionada à susceptibilidade deste animal à indução de tiroidite, sobretudo com características semelhantes às aquelas observadas em humanos. Desta forma, seria interessante desenvolver protocolo de estudo experimental visando o bloqueio da IL-12 e verificando o comportamento do infiltrado inflamatório tiroidiano neste modelo.

5. HETEROGENEIDADE DE RESPOSTA FRENTE À SOBRECARGA DE IODO

Os animais aqui estudados apresentaram respostas na expressão de Fas-L, IL-12, TNF- α e BCL-w que diferiam individualmente, sobretudo no grupo avaliado imediatamente após a administração de iodo (MI44D). Expressão mais intensa de Fas também foi observada em três animais do grupo controle de 32 semanas.

Os poucos trabalhos disponíveis na literatura referentes à expressão destas citocinas em outros modelos experimentais de tiroidite não descrevem a existência de padrões distintos de resposta dentro das linhagens avaliadas (ZIPRIS *et al*, 1996; BLUHER *et al*, 1999). Entretanto, os resultados aqui encontrados, reforçados pela reprodução de RT-PCR nos casos de baixa expressão dos produtos analisados, sugerem a existência de dois padrões distintos de sinalização para os componentes de apoptose e citocinas avaliadas.

Assim, dois dentre cinco animais do grupo M144D (animais 6 e 8) apresentaram respostas consistentemente elevadas para Fas-ligante, TNF- α e IL-12. Paralelamente, a resposta morfológica tardia foi heterogênea no que se refere à intensidade do processo inflamatório. O conjunto destes resultados permite construir a hipótese de que os camundongos NOD apresentem níveis distintos de susceptibilidade à indução de tiroidite experimental. O aprofundamento deste conceito, permitirá, em futuro próximo, a caracterização destes dois subgrupos, possivelmente permitindo o estabelecimento de sub-linhagem com maior propensão à tiroidite experimental.

CONCLUSÕES

- O iodeto de potássio utilizado na dose de 20µg/animal, por via intra-peritoneal, durante 4 dias, foi capaz de induzir a tiroidite em todos os camundongos NOD pré-tratados com metimazole (1mg/ml em água destilada, *ad libitum*). O padrão deste infiltrado se aproxima daquele observado na tiroidite de Hashimoto, contendo folículos em destruição, embora a intensidade do processo variasse entre os animais estudados.
- O infiltrado inflamatório observado tinha predominância de linfócitos CD8⁺, embora células CD4⁺ fossem também observadas nos animais com 32 semanas. Linfócitos T predominantemente CD4⁺ eram observados de modo esparsos, com localização interfolicular, nas tiróides de camundongos NOD com 10 semanas de vida, sem caracterizar processo inflamatório.
- As tiróides de camundongos NOD expressaram o produto do gene BCL-w de forma constitutiva, elevando seus níveis quando submetidos à sobrecarga de iodo.
- Os camundongos NOD estudados apresentaram elevação na sinalização de Fas ligante e TNF- α imediatamente após a sobrecarga de iodo, sugerindo que vias mediadas por Fas-L e TNF- α estejam envolvidas na apoptose induzida pelo excesso de iodo.
- A expressão de IL-12 foi observada em todos os animais estudados, havendo tendência de sua elevação em animais com 32 semanas, sugerindo que esta interleucina desempenhe neste modelo, papel central na regulação da

resposta imune.

- A expressão de Fas-ligante, TNF- α e IL-12 se deu em dois padrões distintos de resposta à sobrecarga de iodo, sugerindo a existência de sub-grupo dentro da linhagem NOD caracterizado pela maior tendência ao desenvolvimento de tiroidite e apoptose induzida por iodo. Estes padrões de sinalização são compatíveis com a observação de intensidade e extensão variável do infiltrado inflamatório.
- Os resultados obtidos permitirão o desenvolvimento de estudos para caracterização de grupo de camundongos NOD susceptível à indução de tiroidite experimental e apoptose pela sobrecarga de iodo.
- A caracterização definitiva deste grupo seria de grande relevância pois, ao contrário dos camundongos NOD H-2^{h4}, nossa sub-linhagem susceptível à tiroidite teria origem interna na colônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLAMUNITIS, V.; QUINTANA, F.; RESHEF, T.; ELIAS, D. and COHEN, I.

R. Acceleration of autoimmune diabetes by cyclophosphamide is associated with an enhanced IFN-gamma secretion pathway. **J Autoimmun**, **13** (4): 383-92, 1999.

AGGARWAL, B. B. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. **Ann Rheum Dis**, **59 Suppl 1**: i6-16, 2000.

AJJAN, R. A.; WATSON, P. F. and WEETMAN, A. P. Detection of IL-12, IL-13, and IL-15 messenger ribonucleic acid in the thyroid of patients with autoimmune thyroid disease. **J Clin Endocrinol Metab**, **82** (2): 666-9, 1997.

ALLEN, E. M.; APPEL, M. C. and BRAVERMAN, L. E. The effect of iodide ingestion on the development of spontaneous lymphocytic thyroiditis in the diabetes-prone BB/W rat. **Endocrinology**, **118** (5): 1977-81, 1986.

ARSCOTT, P. L. and BAKER, J. R, JR. Apoptosis and thyroiditis. **Clin Immunol Immunopathol**, **87** (3): 207-17, 1998.

BAXTER, A. G. and MANDEL, T. E. Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice. **Eur J Immunol**, **21** (9): 2051-5, 1991.

- BECH, K. Importance of cytolytic activity and dietary iodine in the pathogenesis of postpartum thyroiditis. **Allergy**, **44** (3): 161-6, 1989.
- BERNARD, N. F.; ERTUG, F. and MARGOLESE, H. High incidence of thyroiditis and anti-thyroid autoantibodies in NOD mice. **Diabetes**, **41** (1): 40-6, 1992a.
- BERNARD, N. F.; ERTUG, F. and MARGOLESE, H. Studies of autoantibodies reactive with thyroid membrane antigens and insulin in non obese diabetic mice. **Autoimmunity**, **13** (2): 159-64, 1992b.
- BLUHER, M.; KROHN, K.; WALLASCHOFSKI, H.; BRAVERMAN, L. E. and PASCHKE, R. Cytokine gene expression in autoimmune thyroiditis in BioBreeding/Worcester rats. **Thyroid**, **9** (10): 1049-55, 1999a.
- BLUHER, M.; KROHN, K.; WALLASCHOFSKI, H.; BRAVERMAN, L. E. and PASCHKE, R. Fas and Fas ligand gene expression in autoimmune thyroiditis in BB/W rats. **Eur J Endocrinol**, **141** (5): 506-11, 1999b.
- BRALEY-MULLEN, H.; SHARP, G. C.; MEDLING, B. and TANG, H. Spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. **J Autoimmun**, **12** (3): 157-65, 1999.

- BRALEY-MULLEN, H.; SHARP, G. C.; TANG, H.; CHEN, K.; KYRIAKOS, M. and BICKEL, J. T. Interleukin-12 promotes activation of effector cells that induce a severe destructive granulomatous form of murine experimental autoimmune thyroiditis. **Am J Pathol**, **152** (5): 1347-58, 1998.
- BURIKHANOV, R. B. and MATSUZAKI, S. Excess iodine induces apoptosis in the thyroid of goitrogen-pretreated rats in vivo. **Thyroid**, **10** (2): 123-9, 2000.
- CHAMPION, B. R.; RAYNER, D. C.; BYFIELD, P. G.; PAGE, K. R.; CHAN, C. T. and ROITT, I. M. Critical role of iodination for T cell recognition of thyroglobulin in experimental murine thyroid autoimmunity. **J Immunol**, **139** (11): 3665-70, 1987.
- CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, **162** (1): 156-9, 1987.
- COHEN, S. B. and WEETMAN, A. P. The effect of iodide depletion and supplementation in the Buffalo strain rat. **J Endocrinol Invest**, **11** (8): 625-7, 1988.

- DAMOTTE, D.; COLOMB, E.; CAILLEAU, C.; BROUSSE, N.; CHARREIRE, J. and CARNAUD, C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. **Eur J Immunol**, **27** (11): 2854-62, 1997.
- DAVIES, T. F. T-cell receptor gene expression in autoimmune thyroid disease: some observations and possible mechanisms. **Ann N Y Acad Sci**, **756**: 331-44, 1995.
- DI MATOLA, T.; D'ASCOLI, F.; FENZI, G.; ROSSI, G.; MARTINO, E.; BOGAZZI, F. and VITALE, M. Amiodarone induces cytochrome c release and apoptosis through an iodine- independent mechanism. **J Clin Endocrinol Metab**, **85** (11): 4323-30, 2000.
- DRUGARIN, D.; NEGRU, S.; KORECK, A.; ZOSIN, I. and CRISTEA, C. The pattern of a T(H)1 cytokine in autoimmune thyroiditis. **Immunol Lett**, **71** (2): 73-7, 2000.
- FELDKAMP, J.; PASCHER, E.; PERNIOK, A. and SCHERBAUM, W. A. Fas-Mediated apoptosis is inhibited by TSH and iodine in moderate concentrations in primary human thyrocytes in vitro. **Horm Metab Res**, **31** (6): 355-8, 1999.

FOLEY, T. P, JR. The relationship between autoimmune thyroid disease and iodine intake: a review. **Endokrynol Pol**, **43** (Suppl 1): 53-69, 1992.

FUNAHASHI, H.; IMAI, T.; MASE, T.; SEKIYA, M.; YOKOI, K.; HAYASHI, H.; SHIBATA, A.; HAYASHI, T.; NISHIKAWA, M.; SUDA, N.; HIBI, Y.; MIZUNO, Y.; TSUKAMURA, K.; HAYAKAWA, A. and TANUMA, S. Seaweed prevents breast cancer? **Jpn J Cancer Res**, **92** (5): 483-7, 2001.

FUNAHASHI, H.; IMAI, T.; TANAKA, Y.; TSUKAMURA, K.; HAYAKAWA, Y.; KIKUMORI, T.; MASE, T.; ITOH, T.; NISHIKAWA, M.; HAYASHI, H.; SHIBATA, A.; HIBI, Y.; TAKAHASHI, M. and NARITA, T. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors in rats. **Jpn J Cancer Res**, **90** (9): 922-7, 1999.

GIBSON, L.; HOLMGREEN, S. P.; HUANG, D. C.; BERNARD, O.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; SUTHERLAND, G. R.; BAKER, E.; ADAMS, J. M. and CORY, S. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. **Oncogene**, **13** (4): 665-75, 1996.

GIORDANO, C.; RICHIUSA, P.; BAGNASCO, M.; PIZZOLANTI, G.; DI BLASI, F.; SBRIGLIA, M. S.; MATTINA, A.; PESCE, G.; MONTAGNA, P.; CAPONE, F.; MISIANO, G.; SCORSONE, A.; PUGLIESE, A. and GALLUZZO, A. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease. **Thyroid**, **11** (3): 233-44, 2001a.

GIORDANO, C.; RICHIUSA, P.; BAGNASCO, M.; SALMASO, C.; PIZZOLANTI, G. and GALLUZZO, A. Thyrocytes—not innocent bystanders in autoimmune disease. **Nat Immunol**, **2** (3): 183, 2001b.

GIORDANO, C.; STASSI, G.; DE MARIA, R.; TODARO, M.; RICHIUSA, P.; PAPOFF, G.; RUBERTI, G.; BAGNASCO, M.; TESTI, R. and GALLUZZO, A. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. **Science**, **275** (5302): 960-3, 1997.

HAMMOND, L. J.; LOWDELL, M. W.; CERRANO, P. G.; GOODE, A. W.; BOTTAZZO, G. F. and MIRAKIAN, R. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. **J Pathol**, **182** (2): 138-44, 1997.

HEDINGER, C. Geographic pathology of thyroid diseases. **Pathol Res Pract**, **171** (3-4): 285-92, 1981.

HIDAKA, Y.; OKUMURA, M.; FUKATA, S.; SHIMAOKA, Y.; TAKEOKA, K.; TADA, H.; KUMA, K. and AMINO, N. Increased serum concentration of interleukin-12 in patients with silent thyroiditis and Graves' disease. **Thyroid**, **9** (2): 149-53, 1999.

HUTCHINGS, P. R.; VERMA, S.; PHILLIPS, J. M.; HARACH, S. Z.; HOWLETT, S. and COOKE, A. Both CD4(+) T cells and CD8(+) T cells are required for iodine accelerated thyroiditis in NOD mice. **Cell Immunol**, **192** (2): 113-21, 1999.

KOTANI, T.; ARATAKE, Y.; HIRAI, K.; FUKAZAWA, Y.; SATO, H. and OHTAKI, S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. **Autoimmunity**, **20** (4): 231-6, 1995.

KRUG, J.; WILLIAMS, A. J.; BEALES, P. E.; DONIACH, I.; GALE, E. A. and POZZILLI, P. Parathyroiditis in the non-obese diabetic mouse—a new finding. **J Endocrinol**, **131** (2): 193-6, 1991.

- LINDBERG, O.; ANDERSSON, L. C. and LAMBERG, B. A. The impact of 25 years of iodine prophylaxis on the adult thyroid weight in Finland. **J Endocrinol Invest**, **12** (11): 789-93, 1989.
- MACKENZIE, W. A.; SCHWARTZ, A. E.; FRIEDMAN, E. W. and DAVIES, T. F. Intrathyroidal T cell clones from patients with autoimmune thyroid disease. **J Clin Endocrinol Metab**, **64** (4): 818-24, 1987.
- MAHMOUD, I.; COLIN, I.; MANY, M. C. and DENEFF, J. F. Direct toxic effect of iodide in excess on iodine-deficient thyroid glands: epithelial necrosis and inflammation associated with lipofuscin accumulation. **Exp Mol Pathol**, **44** (3): 259-71, 1986.
- MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K. and TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**, **29** (1): 1-13, 1980.
- MANY, M. C.; MANIRATUNGA, S. and DENEFF, J. F. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, **104** (Suppl 3): 17-20, 1996.

- MANY, M. C.; MANIRATUNGA, S.; VARIS, I.; DARDENNE, M.; DREXHAGE, H. A. and DENEFF, J. F. Two-step development of Hashimoto-like thyroiditis in genetically autoimmune prone non-obese diabetic mice: effects of iodine-induced cell necrosis. **J Endocrinol**, **147** (2): 311-20, 1995.
- MARGOLESE, H.; O'KEEFE, C.; CHUNG, F.; ERTUG, F.; WALL, J. R. and BERNARD, N. F. Expression of major histocompatibility complex class II antigen in NOD mouse thyroid. **Autoimmunity**, **17** (1): 1-11, 1994.
- MARWAHA, R. K.; TANDON, N.; KARAK, A. K.; GUPTA, N.; VERMA, K. and KOCHUPILLAI, N. Hashimoto's thyroiditis: countrywide screening of goitrous healthy young girls in postiodization phase in India. **J Clin Endocrinol Metab**, **85** (10): 3798-802, 2000.
- MATSUOKA, N.; BERNARD, N.; CONCEPCION, E. S.; GRAVES, P. N.; BEN-NUN, A. and DAVIES, T. F. T-cell receptor V region beta-chain gene expression in the autoimmune thyroiditis of non-obese diabetic mice. **J Immunol**, **151** (3): 1691-701, 1993.
- MATSUZAKI, S.; MA, H. T. and BURIKHANOV, R. B. Anti-goitrous effect of lecithin-bound iodine in propylthiouracil treated rats. **Endocr Regul**, **34** (2): 57-63, 2000.

- MIGNON-GODEFROY, K.; BRAZILLET, M. P.; ROTT, O. and CHARREIRE, J. Distinctive modulation by IL-4 and IL-10 of the effector function of murine thyroglobulin-primed cells in "transfer-experimental autoimmune thyroiditis". **Cell Immunol**, **162** (2): 171-7, 1995.
- MITSIADES, N.; POULAKI, V.; KOTOULA, V.; MASTORAKOS, G.; TSELENI-BALAFOUTA, S.; KOUTRAS, D. A. and TSOKOS, M. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. **J Clin Endocrinol Metab**, **83** (6): 2199-203, 1998.
- MITSIADES, N.; POULAKI, V.; TSELENI-BALAFOUTA, S.; CHROUSOS, G. P. and KOUTRAS, D. A. Fas ligand expression in thyroid follicular cells from patients with thionamide-treated Graves' disease. **Thyroid**, **10** (7): 527-32, 2000.
- NOORCHASHM, H.; NOORCHASHM, N.; KERN, J.; ROSTAMI, S. Y.; BARKER, C. F. and NAJI, A. B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. **Diabetes**, **46** (6): 941-6, 1997.

- PAPANASTASIOU, L.; ALEVIZAKI, M.; PIPERINGOS, G.; MANTZOS, E.; TSELENI-BALAFOUTA, S. and KOUTRAS, D. A. The effect of iodine administration on the development of thyroid autoimmunity in patients with nontoxic goiter. **Thyroid**, **10** (6): 493-7, 2000.
- PAVIN, E. J. and ZOLLNER, R. L. Implantação da linhagem "nod-mice" no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do Diabetes Mellitus insulino-dependente e outras doenças auto-imunes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, **38**: 105, 1994.
- POZZILLI, P.; SIGNORE, A.; WILLIAMS, A. J. and BEALES, P. E. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. **Immunol Today**, **14** (5): 193-6, 1993.
- PRINT, C. G.; LOVELAND, K. L.; GIBSON, L.; MEEHAN, T.; STYLIANOU, A.; WREFORD, N.; DE KRETZER, D.; METCALF, D.; KONTGEN, F.; ADAMS, J. M. and CORY, S. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **95** (21): 12424-31, 1998.
- RASOOLY, L.; BUREK, C. L. and ROSE, N. R. Iodine-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H-2h4 mice. **Clin Immunol Immunopathol**, **81** (3): 287-92, 1996.

RODIER, J. F.; JANSER, J. C.; PETIT, H.; SCHNEEGANS, O.; OTT, G.; KAISLING, A.; GROB, J. C. and VELTEN, M. [Effect of preoperative administration of Lugol's solution on thyroid blood flow in hyperthyroidism]. **Ann Chir**, **52** (3): 229-33, 1998.

ROMAGNANI, S. Development of Th 1- or Th 2-dominated immune responses: what about the polarizing signals? **Int J Clin Lab Res**, **26** (2): 83-98, 1996.

RUZ, M.; CODOCEO, J.; GALGANI, J.; MUNOZ, L.; GRAS, N.; MUZZO, S.; LEIVA, L. and BOSCO, C. Single and multiple selenium-zinc-iodine deficiencies affect rat thyroid metabolism and ultrastructure. **J Nutr**, **129** (1): 174-80, 1999.

SCHUMM-DRAEGER, P. M.; LANGER, F.; CASPAR, G.; RIPPEGATHER, K.; HERRMANN, G.; FORTMEYER, H. P.; USADEL, K. H. and HUBNER, K. [Spontaneous Hashimoto-like thyroiditis in cats]. **Verh Dtsch Ges Pathol**, **80**: 297-301, 1996.

STAFFORD, E. A. and ROSE, N. R. Newer insights into the pathogenesis of experimental autoimmune thyroiditis. **Int Rev Immunol**, **19** (6): 501-33, 2000.

- TAMARU, M.; MATSUURA, B. and ONJI, M. Increased levels of serum interleukin-12 in Graves' disease. **Eur J Endocrinol**, **141** (2): 111-6, 1999.
- TAMURA, M.; KIMURA, H.; KOJI, T.; TOMINAGA, T.; ASHIZAWA, K.; KIRIYAMA, T.; YOKOYAMA, N.; YOSHIMURA, T.; EGUCHI, K.; NAKANE, P. K. and NAGATAKI, S. Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. **Endocrinology**, **139** (8): 3646-53, 1998.
- TANEJA, V. and DAVID, C. S. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. **Immunol Rev**, **169**: 67-79, 1999.
- TANG, H.; SHARP, G. C.; PETERSON, K. P. and BRALEY-MULLEN, H. IFN-gamma-deficient mice develop severe granulomatous experimental autoimmune thyroiditis with eosinophil infiltration in thyroids. **J Immunol**, **160** (10): 5105-12, 1998.
- TOCHINO, Y. The NOD mouse as a model of type I diabetes. **Crit Rev Immunol**, **8** (1): 49-81, 1987.

- VITALE, M.; DI MATOLA, T.; D'ASCOLI, F.; SALZANO, S.; BOGAZZI, F.; FENZI, G.; MARTINO, E. and ROSSI, G. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53- independent mechanism involving oxidative stress. **Endocrinology**, **141** (2): 598-605, 2000.
- VLAEMINCK-GUILLEM, V.; D'HERBOMEZ-BOIDEIN, M.; DECOULX, M. and WEMEAU, J. L. [Apoptosis and the thyroid: the Fas pathway]. **Presse Med**, **30** (2): 74-80, 2001.
- WAN, Q.; MCCORMICK, D. J.; DAVID, C. S. and KONG, Y. C. Thyroglobulin peptides of specific primary hormonogenic sites can generate cytotoxic T cells and serve as target autoantigens in experimental autoimmune thyroiditis. **Clin Immunol Immunopathol**, **86** (1): 110-4, 1998.
- WEAVER, D. K.; NISHIYAMA, R. H. and BATSAKIS, J. G. Iodine induced thyroid disease. **Ann Clin Lab Sci**, **6** (6): 545-50, 1976.
- WILLIAMS, N. Thyroid disease: a case of cell suicide? **Science**, **275** (5302): 926, 1997.
- WONG, F. S. and JANEWAY, C. A, JR. Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. **Curr Opin Immunol**, **11** (6): 643-7, 1999.

YU, S.; MEDLING, B.; YAGITA, H. and BRALEY-MULLEN, H. Characteristics of inflammatory cells in spontaneous autoimmune thyroiditis of nod.h-2h4 mice. **J Autoimmun**, **16** (1): 37-46, 2001.

ZANTUT-WITTMANN, D. E.; BOECHAT, L. H.; PINTO, G. A.; ZOLLNER, R. L.; TREVISAN, M. A. and VASSALLO, J. Alteration of the follicular basement membrane in non-obese diabetic mice with spontaneous autoimmune thyroiditis. **J Submicrosc Cytol Pathol**, **31** (4): 581-3, 1999.

ZANTUT-WITTMANN, D. E.; BOECHAT, L. H. B.; PINTO, G. A.; TREVISAN, M. A.; ZOLLNER, R. L. and VASSALLO, J. Preliminary characterization of thyroiditis in NOD (Non obese diabetic) mice. **10th International Congress of Endocrinology**, San Francisco, USA, P1-1023, 1996.

ZHANG, H.; HOLT, C. M.; MALIK, N.; SHEPHERD, L. and MORCOS, S. K. Effects of radiographic contrast media on proliferation and apoptosis of human vascular endothelial cells. **Br J Radiol**, **73** (874): 1034-41, 2000.

ZHANG, W.; FLYNN, J. C. and KONG, Y. C. IL-12 prevents tolerance induction with mouse thyroglobulin by priming pathogenic T cells in experimental autoimmune thyroiditis: role of IFN- gamma and the costimulatory molecules CD40I and CD28. **Cell Immunol**, **208** (1): 52-61, 2001.

ZHANG, W. and KONG, Y. C. Noninvolvement of IL-4 and IL-10 in tolerance induction to experimental autoimmune thyroiditis. **Cell Immunol**, **187** (2): 95-102, 1998.

ZIPRIS, D.; GREINER, D. L.; MALKANI, S.; WHALEN, B.; MORDES, J. P. and ROSSINI, A. A. Cytokine gene expression in islets and thyroids of BB rats. IFN-gamma and IL-12p40 mRNA increase with age in both diabetic and insulin- treated nondiabetic BB rats. **J Immunol**, **156** (3): 1315-21, 1996.

ZOLLNER, R. L.; VILLELA, C. A. and BOECHAT, L. H. Effect of Testosterone on Cytokine mRNA expression in the Thyroid of NOD mice. Submitted.