

LIREDA MENESES SILVA

**SUBCLASSIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE AVIDEZ
DE IgG ANTI-TPO E PESQUISA DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS EM SOROS DE PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO – COMPARAÇÃO
COM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
ESTABELECIDO**

**FLORIANÓPOLIS, SC
2001**

LIREDA MENESES SILVA

**SUBCLASSIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE AVIDEZ
DE IgG ANTI-TPO E PESQUISA DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS EM SOROS DE PACIENTES COM
HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO – COMPARAÇÃO
COM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO
ESTABELECIDO**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para a obtenção do título de mestre.**

**Coordenador do Curso: Prof. Dr. Armando José d'Acampora
Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Co-orientadora: Profa. Maria Heloisa Busi da Silva Canalli**

**FLORIANÓPOLIS, SC
2001**

Silva, Lireda Meneses.

Subclassificação e determinação de avidéz de IgG anti-TPO e pesquisa de citocinas inflamatórias em soros de pacientes com hipotireoidismo subclínico – comparação com pacientes com hipotireoidismo estabelecido. / Lireda Meneses Silva – Florianópolis, 2001.

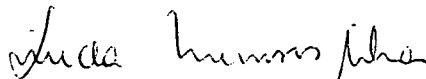
93 p.

**Orientador: Carlos Roberto Zanetti
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas.**

1. hipotireoidismo subclínico. 2. anti-TPO. 3. autoimunidade

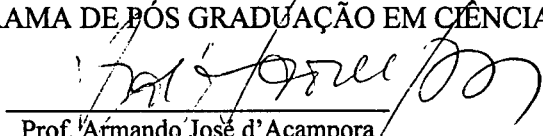


Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Mestrado em Ciências Médicas


LIREDA MENESES SILVA

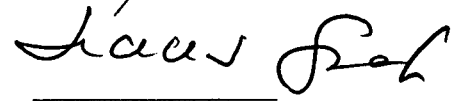
ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E APROVADA EM SUA
FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

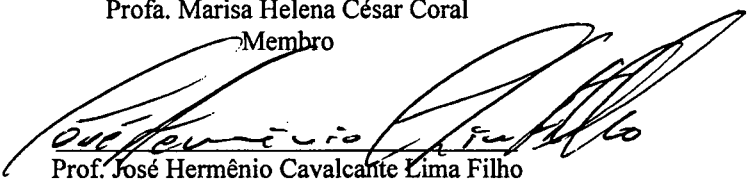

Prof. Armando José d'Acampora
Coordenador do Curso

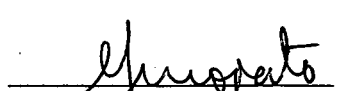
Banca Examinadora:


Prof. Carlos Roberto Zanetti
Orientador


Prof. Hans Graf
Membro


Prof. Marisa Helena César Coral
Membro


Prof. José Hermênio Cavalcante Lima Filho
Membro


Prof. Edelson Flávio Morato
Membro

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2001.





Universidade Federal de Santa Catarina
 Centro de Ciências da Saúde
 Mestrado em Ciências Médicas

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

CANDIDATA: LIREDA MENESES SILVA

A partir das oito horas e trinta minutos do dia vinte e dois de fevereiro de dois mil e um, na sala de aulas do Curso de Mestrado em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, a Comissão Examinadora, constituída pelos Professores Carlos Roberto Zanetti, Hans Graf, Marisa Helena César Coral, José Hermênio Cavalcante Lima Filho e Edelton Flávio Morato, procedeu ao exame da Dissertação de Mestrado apresentada pela **Dra. LIREDA MENESES SILVA**, intitulada "**CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DO HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO**". Após explanação feita pela candidata, a mesma foi argüida pela Comissão Examinadora, sendo aprovada com os seguintes conceitos, nos termos da Resolução 010/CUn/97 e Regimento Interno do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

NOME:	ASSINATURA	CONCEITO
Prof. Carlos Roberto Zanetti		A
Prof. Hans Graf		A
Prof. Marisa Helena César Coral		A
Prof. José Hermênio Cavalcante Lima Filho		A
Prof. Edelton Flávio Morato		A

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2001.

Prof. Carlos Roberto Zanetti
 Presidente da Comissão Examinadora



Dedico esta Dissertação

*Às minhas filhas, Aliana e
Amanda, e ao meu marido, Renor,
sempre presentes, amigos e
companheiros, fontes inesgotáveis de
prazer, estímulo e força ao longo de
todas as caminhadas.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti, pela sua amizade, confiança e incentivo à pesquisa. Seus ensinamentos foram além da execução deste estudo, com estímulo à busca constante – um exemplo a ser seguido pela sua postura de professor, suas qualidades profissionais e especialmente humanas.

À Dra. Maria Heloísa Busi da Silva Canalli, pela amizade, incentivo e a grande disponibilidade no desenvolvimento deste estudo, sempre companheira.

À Dra. Vânia Beatrice Tomazoni Ramos e sua equipe, pela amizade, estímulo e participação na coleta e preparo das amostras de soro.

À Enf. Tânia Westphal, pela amizade e auxílio no atendimento às pacientes.

À Dra. Cláudia Dutra Bernhardt, pela amizade, companheirismo e incentivo.

À Dra. Mara Eda Kowalski, pela sua amizade e participação na realização desta pesquisa.

À acadêmica Juliana Chaves, pela sua disponibilidade e dedicação na execução das análises laboratoriais.

Aos companheiros e professores do Curso de Mestrado pelos conhecimentos adquiridos e trocas de experiências, com crescente estímulo ao aprendizado do ensino.

À secretária Tânia Regina Tavares Fernandes, pela alegria e dedicação às atividades relativas ao nosso Curso de Mestrado.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo carinho, presença, estímulo e cooperação constantes ao longo de toda a minha vida, também profissional.

Às pacientes participantes deste estudo, sem as quais ele não teria sido possível, bem como o aprendizado a ele associado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Hipotireoidismo subclínico	12
1.2 Prevalência e evolução do hipotireoidismo subclínico	13
1.3 Repercussões clínicas do hipotireoidismo subclínico	14
1.4 Hipotireoidismo subclínico e autoimunidade	18
1.5 Papel das subclasses de IgG anti-TPO na tireoidite autoimune	23
1.6 Avidéz de Anticorpos	24
1.7 Hipotireoidismo e marcadores inflamatórios	25
2. OBJETIVOS	32
3. PACIENTES E MÉTODO	33
3.1 Considerações gerais - éticas	33
3.2 Desenho do estudo	33
3.3 População de estudo	33
3.4 Critérios de exclusão	34
3.5 Coleta de dados	35
3.6 Preparo das amostras de soro	35
3.6.1 Dosagem de TSH e T4 livre	36
3.6.2 Dosagem de colesterol	36
3.6.3 Dosagem de anticorpo anti-TPO	36
3.6.4 Caracterização das subclasses de anticorpos anti-TPO	36
3.6.5 Determinação da avidéz de anti-TPO	38
3.6.6 Dosagem dos marcadores inflamatórios	39
3.7 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Características da população submetida ao estudo	41
4.2 Características da anamnese e exame físico	42
4.3 Dosagem de colesterol	45
4.4 Dosagem de TSH e T4 livre	46
4.5 Anticorpos anti-TPO	48
4.6 Avidéz de anticorpos anti-TPO	49
4.7 Subclassificação de anticorpos IgG anti-TPO	50
4.8 Marcadores inflamatórios	55
4.9 Correlações	57
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC = "antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity"
anti-TPO = anti-tireoperoxidase
B7-1 = molécula de adesão celular envolvida na apresentação antigênica
c = controle
CD8 = linfócito T citotóxico
CD4 == linfócito T auxiliar
CK = creatina quinase
D.O. = densidade óptica
ELISA = "enzyme-linked immunosorbent assay"
Fas = receptor celular de apoptose
he = hipotireoidismo estabelecido
HLA = "human leukocyte antigens"
hs = hipotireoidismo subclínico
I = índice
IFN = interferon
Ig = imunoglobulina
IL = interleucina
K = "killer"
LDL = "low density lipoprotein"
MAb = anticorpo monoclonal
MHC = "major histocompatibility complex"
NK = "natural killer"
PAM = Programa de Atendimento Médico
RT-PCR = "reverse transcription-polymerase chain reaction"
SUS = Serviço Único de Saúde
T3 = triiodotironina
T4 = tiroxina
Th1 = T helper 1
Th2 = T helper 2
TNF = "tumoral necrosis factor"
TPO = tireoperoxidase
TSH = hormônio tireo-estimulante

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Distribuição das pacientes submetidas ao estudo, por faixa etária.....	42
Tabela II – Características da anamnese das pacientes dos grupos hs e he	43
Tabela III – Características do exame físico das pacientes dos grupos hs e he	43
Tabela IV – Comparação das variáveis da anamnese e exame físico entre os grupos hs e he	44
Tabela V – Descrição da análise dos níveis de colesterol nos três grupos de estudo	45
Tabela VI – Descrição da análise dos níveis de TSH nos três grupos avaliados.....	46
Tabela VII – Descrição da análise dos níveis de T4 livre nos grupos avaliados.....	47
Tabela VIII – Descrição da análise dos níveis de anti-TPO nos grupos de estudo.....	48
Tabela IX – Descrição da análise da medida da avidéz de IgG anti-TPO.....	49
Tabela X – Níveis médios dos subtipos de IgG anti-TPO	50
Tabela XI – Frequência da presença de citocinas séricas nos três grupos de estudo.....	56
Tabela XII - Níveis de citocinas nos grupos de estudo.	56
Tabela XIII – Descrição da análise dos níveis de neopterinina nos três grupos estudados..	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Níveis de colesterol nos grupos hs , he e c , com valores de $p < 0,001$ entre o grupo c e os demais e $p = 0,347$ entre os grupos hs e he	45
Figura 2 - Distribuição dos níveis de TSH nos grupos hs , he e c , em $\mu\text{U/ml}$. valor de $p = 0,033$ entre os grupos hs e he , e $p < 0,001$ entre o grupo c e os demais.....	46
Figura 3 - Distribuição dos níveis de T4 livre nos grupos hs , he e c em ng/dl ; com valores de $p = 0,003$ entre os grupos hs e he e $p < 0,001$ entre o grupo c e os demais.....	47
Figura 4 - Distribuição dos níveis de anti-TPO nos grupos c , hs e he , em U/ml . Valor de $p = 0,6$ entre os grupos hs e he	48
Figura 5 - Distribuição da medida de avidéz, em %, dos anticorpos encontrados nos grupos hs e he	49
Figura 6 - Distribuição dos níveis de IgG1 nos grupos hs e he , em D.O; $p = 0,749$	51
Figura 7 - Distribuição dos níveis de IgG2 nos grupos hs e he , em D.O; $p = 0,975$	51
Figura 8 - Distribuição dos níveis de IgG3 nos grupos hs e he , em D.O; $p = 0,104$	52
Figura 9 - Distribuição dos níveis de IgG4 nos grupos hs e he , em D.O; $p = 0,087$	52
Figura 10 - Percentual de positividade de subtipos de IgG anti-TPO nos grupos hs e he	53
Figura 11 -Distribuição dos índices atribuídos para os subtipo de IgG anti-TPO nos grupos he e hs	54
Figura 12 - Quadro comparativo da relação IgG1/IgG4 pelo I para os grupos de he e hs ; valor de $p = 0,008$	55
Figura 13 - Distribuição dos níveis de neopterina nos grupos c , hs e he	57

RESUMO

O hipotireoidismo subclínico é definido pela presença de nível aumentado de TSH e níveis normais de hormônios tireoideanos. Podem ocorrer repercussões clínicas, com alterações cardíaco-vasculares, músculo-esqueléticas, de perfil lipídico e estado de humor. É questionável ainda se este quadro corresponde a um hipotireoidismo "verdadeiro" em evolução, ou se é uma anormalidade bioquímica, sem disfunção de órgão alvo. Em 80% dos casos de hipotireoidismo subclínico, há alteração de função tireoideana por anticorpos IgG autoimunes, dirigidos principalmente contra a tireoperoxidase (TPO). O objetivo deste estudo foi avaliar a subclassificação de IgG anti-TPO, a medida da sua avidéz (força de ligação entre anticorpos e seus epítomos específicos) e a detectabilidade e níveis de marcadores inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e neopterin) em pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico (hs), comparando tais achados aos de pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido (he) e grupo controle (c). Foram avaliadas amostras de soros de 95 pacientes do sexo feminino, 34 com hs, 33 com he e 28 pacientes com função tireoideana normal, de acordo com os níveis de TSH e T4 livre. As dosagens de TSH, T4 livre, a subclassificação de anti-TPO e as dosagens de marcadores inflamatórios foram realizadas por método imunoenzimático (ELISA), enquanto que a dosagem de anti-TPO foi feita por quimioluminescência. A comparação da distribuição das variáveis nos três grupos foi realizada através de testes não paramétricos e as análises de correlação pelo coeficiente de Spearman. Os níveis de TSH foram diferentes entre os pacientes com hs e he ($p=0,03$), apesar de ambos elevados. Os níveis de T4 livre foram diferentes entre os pacientes com hs e c ($p<0,001$), ainda que ambos dentro da faixa normal. Os níveis de anti-TPO e a medida da sua avidéz não diferiram entre os grupos hs e he. A subclassificação de IgG anti-TPO nos grupos de pacientes portadores de hs e he mostrou maior percentual de positividade para IgG1 e IgG4, com positividade de IgG1 de 71% no grupo hs e 67% no grupo he, enquanto que a positividade de IgG4 foi de 97% no grupo hs e 79% no grupo he. A relação IgG1/IgG4 foi significativamente maior no grupo de pacientes portadoras de he ($p=0,008$) IgG1 é capaz de fixar complemento levando a lesão tecidual, enquanto que IgG4 não o faz. Desta forma, o predomínio de IgG1 sobre IgG4 através da medida de sua relação, pode estar associado ao potencial de lesão tecidual em pacientes portadores de hs. A dosagem de marcadores inflamatórios mostrou-se positiva em pequeno número de pacientes, com detectabilidade de TNF- α em 8,8%, IL-6 em 14,7% e IL-10 em 3% dos pacientes com hs. O acompanhamento das pacientes portadoras de hs permitirá a correlação destes dados (positividade e níveis de IgG1 e IgG4, bem como a sua relação) com a evolução clínica.

SUMMARY

Subclinical hypothyroidism is defined by laboratory findings of an elevated basal TSH concentration in the presence of normal thyroid hormones concentrations. Several studies suggest that it may be associated with cardiovascular abnormalities, alterations in muscle structure and function and psychiatric and neurological dysfunction. It still remains controversial if it is a "true hypothyroidism" in evolution or if it is just a biochemical abnormality. About 80% of the patients with subclinical hypothyroidism presents autoimmune disease, with the presence of anti-TPO antibodies (IgG) in their serum. The purpose of this study was to evaluate immunoglobulin G subclasses of anti-TPO, its avidity and the presence of inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, Interferon- γ , Tumoral Necrosis Factor- α and neopterin) in patients with subclinical hypothyroidism. Results were compared with findings in patients with overt hypothyroidism and control group. We evaluated serum of 95 female patients, 34 with subclinical hypothyroidism, 33 with overt hypothyroidism e 28 with normal thyroid function, according to the TSH and free T4 levels. TSH, free T4, IgG subclasses and cytokines levels were determined by immunoenzymometric assays. Anti-TPO levels were determined by chemoluminometric assay. Data were analyzed and compared by non-parametrical tests and Spearman's rank correlation. TSH levels were different in patients with subclinical and overt hypothyroidism, in spite of the elevated levels in both. Free T4 levels were different in subclinical hypothyroidism and control group, in spite of the normal levels in both. Anti-TPO levels and its avidity were similar in subclinical and overt hypothyroidism. Anti-TPO IgG subclasses were predominantly IgG1 and IgG4 in subclinical and overt hypothyroidism. IgG1 was detected in 71% of patients with subclinical hypothyroidism and 67% of patients with overt hypothyroidism. IgG4 was detected in 97% of patientes in the first group and 79% in the second. IgG1/IgG4 relation was different in the subclinical and overt groups, it was significantly greater in patients with overt hypothyroidism. Cytokines were detected in a very small number of patients. TNF- α was detected in 8,8% of the patients with subclinical hypothyroidism, IL-6 in 14,7% and IL-10 in 3%. Patients with subclinical hypothyroidism will be followed, and, then, the descriptive date presented here, will be evaluated according to their evolution.

1. INTRODUÇÃO

O hipotireoidismo* é a síndrome clínica e bioquímica que resulta da produção diminuída de hormônios tireoideanos, T3 (triiodotironina) e T4 (tetraiodotironina), com concentração sérica subnormal destes hormônios e que responde ao tratamento com a sua reposição. Raramente é devida a resistência generalizada ao hormônio tireoideano.^{1,2}

O Hormônio Tireoestimulante, TSH, é o regulador fisiológico mais importante da secreção de hormônio tireoideano. Esta regulação se faz por um sistema de retroalimentação bidirecional, de vez que níveis anormalmente elevados de T3 e T4 suprimem a secreção de TSH e níveis baixos produzem aumento na sua secreção. Este aumento na secreção de TSH é a anormalidade laboratorial mais precocemente detectada em pacientes com hipotireoidismo primário. Quando o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide está intacto e o sistema está em equilíbrio, há uma relação inversa log-linear entre a concentração sérica de TSH e T4 livre, de tal forma que reduções lineares pequenas na concentração de T4 livre são associadas com aumentos exponenciais na concentração de TSH.³ A Associação Americana de Tireóide define que uma diminuição no nível de T4 livre e um aumento no nível de TSH séricos estabelecem o diagnóstico de hipotireoidismo causado por insuficiência da glândula tireóide.^{4,5}

A severidade do hipotireoidismo varia amplamente. Alguns pacientes não têm sintomas ou sinais (ou mínimos) e têm concentração sérica de T4 livre normal, mas elevada concentração de TSH. Tal situação é definida como hipotireoidismo subclínico. Em outros pacientes o hipotireoidismo é bem estabelecido, com sintomas e sinais indicativos de função anormal de um ou mais sistemas orgânicos, com concentrações subnormais de T4 livre, além do aumento de TSH.⁶ Zulewski⁷, avaliando os sintomas e sinais de pacientes com vários graus de hipotireoidismo, tentaram estabelecer um escore clínico que demonstrasse correlação com o grau de comprometimento tireoideano. Tal classificação, no entanto, não se mostrou eficaz para efeito de diagnóstico, uma vez que

*Em dicionários de termos médicos e de língua portuguesa e em artigos médicos nacionais observamos várias formas gráficas para a palavra tireóide e suas correlatas, como: tireóide, tiróide; tireoideano, tireoidiano, tiroideano, tiroidiano, tiróideo. Estudos de etimologia da palavra são controversos quanto à grafia correta. Assim, optamos pela utilização da grafia tireóide e, para suas correlatas, tireoideano (a, os, as).

houve significativa superposição e variabilidade dos achados clínicos no hipotireoidismo subclínico e estabelecido. Assim, as dosagens de T4 livre e TSH permanecem como os indicadores mais confiáveis no estabelecimento do hipotireoidismo.^{2,4-6} Os métodos laboratoriais atuais, de alta sensibilidade, permitem a detecção de pequenas alterações nos níveis de TSH muito precocemente, ainda na forma subclínica da doença tireoideana, com alto grau de acurácia.⁸

O hipotireoidismo ocorre em todas as idades, sendo que sua frequência varia dependendo da população avaliada. Alguns estudos definem taxa de prevalência de 2 a 3%, sendo dez vezes mais frequente em mulheres.⁹ Um dos maiores estudos de prevalência, demonstrou que o hipotireoidismo foi encontrado em 2,6% da população feminina acima de 18 anos, aumentando esta frequência com a idade e chegando a 6 a 8% em mulheres com mais de 60 anos.¹⁰

A autoimunidade é a principal causa de hipotireoidismo, definida através da presença de anticorpos antitireoideanos, mais especificamente anticorpos anti-tireoperoxidase.

Considerando a prevalência relativamente alta e a já comentada superposição e variabilidade de achados clínicos no hipotireoidismo subclínico, algumas questões vêm sendo discutidas. Tais questões se referem à justificativa para que sejam instituídos programas de triagem, sua evolução, repercussões clínicas com conseqüências adversas e tratamento com reposição hormonal ou não.¹¹⁻¹⁹ Uma vez que os níveis de hormônios tireoideanos estão dentro da taxa normal, é questionável a decisão quanto ao tratamento. Esta decisão é habitualmente definida pela avaliação individual do médico assistente, a partir de possíveis sintomas referidos pelo paciente e a correlação destes sintomas com disfunção tireoideana, além de parâmetros laboratoriais que nem sempre são definitivos na orientação da conduta.

Neste estudo foram analisados parâmetros laboratoriais do hipotireoidismo subclínico no que se refere a autoimunidade, na expectativa de se obter mais informações sobre a sua fisiopatologia e possíveis indicadores de evolução.

1.1 Hipotireoidismo Subclínico

O hipotireoidismo subclínico é definido pelo achado de nível aumentado de TSH com níveis normais de hormônio tireoideano em paciente assintomático ou minimamente sintomático. A extrema sensibilidade do sistema de feedback negativo faz elevação do TSH mesmo antes de o T4 livre ter seus níveis reduzidos para abaixo do normal.³

É válido fazer a ressalva para a questão da nomenclatura, uma vez que o termo subclínico se refere, em princípio, a ausência de sintomas. Uma parcela significativa dos pacientes apresenta queixas que podem estar associadas ao hipotireoidismo, muitas vezes o que leva a solicitação do exame. Outros termos para definir o quadro têm sido propostos, tais como insuficiência tireoideana mínima, baixa reserva tireoideana, hipotireoidismo minimamente sintomático ou hipotireoidismo compensado^{**}.^{16,20-22} Na sua descrição inicial, por Bastenie, em 1967, na revista Lancet, foi denominado mixedema pré-clínico. Esta nomenclatura variada, de certa forma reflete a controvérsia de se a alteração representa uma forma discreta de hipotireoidismo, ou é meramente uma anormalidade bioquímica.¹⁶

Ainda que a investigação desta entidade sob a forma de *screening* seja questionável, o hipotireoidismo subclínico é a condição mais comum encontrada em testes de função tireoideana. Este dado foi descrito por Helfand¹¹, a partir de meta-análise em que avaliou 18 estudos de *screening* para disfunção tireoideana publicados a partir de 1989.

As causas do hipotireoidismo subclínico são as mesmas do hipotireoidismo estabelecido, estando especialmente vinculado à tireoidite autoimune, como parte da história natural da Tireoidite de Hashimoto, em que os pacientes apresentam anticorpos antitireoideanos.¹⁸ O hipotireoidismo subclínico pode ocorrer ainda após tratamento de hipertireoidismo (com iodo radioativo ou cirurgia) e menos comumente por irradiação de cabeça e pescoço, uso de amiodarona, iodo, lítio,²³ interferon- α ,²⁴ interleucina-2.²⁵

^{**}Apesar das divergências, neste estudo será mantido o termo subclínico, considerando que é como ainda vem sendo referida a entidade nas publicações mais recentes.

1.2 Prevalência e Evolução do Hipotireoidismo Subclínico

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de estabelecer a prevalência e acompanhar a evolução do hipotireoidismo subclínico.

Em estudo clássico, realizado no noroeste da Inglaterra (*Whickham Survey*) foi pesquisada disfunção tireoideana em 2779 indivíduos adultos entre 1972 e 1974, sendo que além da dosagem de hormônios tireoidianos foi pesquisada a presença de anticorpos antitireoideanos. Foi encontrada prevalência de hipotireoidismo subclínico de 7,5 a 18% entre mulheres com mais de 18 anos (correspondendo os menores valores percentuais às mais jovens, com prevalência progressivamente maior com o aumento da idade) e 1,8% dos homens.¹⁰ A partir daí, foram acompanhados 163 pacientes com aumento de TSH (entre 6 e 10 mU/l) e/ou anticorpos antitireoideanos positivos, sem doença tireoideana estabelecida ou tratada, e reavaliados 2 e 4 anos após. A incidência anual de hipotireoidismo estabelecido foi de 2,5% para homens que apresentavam anticorpos antitireoideanos e TSH elevado na primeira avaliação. Para mulheres, a evolução foi de 0,4% dentre as que apresentavam anticorpos antitireoideanos e níveis normais de TSH, e 5% para aquelas com anticorpos antitireoideanos e níveis aumentados de TSH. Foi observado que todos os pacientes que evoluíram para hipotireoidismo estabelecido tinham anticorpos antitireoideanos positivos, mas nem todos que tinham anticorpos positivos evoluíram para hipotireoidismo.²⁶ No acompanhamento da *Whickham Survey*, em publicações de seguimento por 10 e 20 anos de 1096 pacientes, a progressão para hipotireoidismo estabelecido ocorreu à taxa de 4,3% anualmente em indivíduos com anticorpos antitireoideanos positivos e 2,6% em pessoas sem estes auto-anticorpos.²⁷

Em estudo semelhante, de acompanhamento de 22 pacientes com autoimunidade tireoideana, foi observada incidência anual de hipotireoidismo estabelecido de 26% em indivíduos com níveis de TSH aumentados e anticorpos antitireoideanos e 7,3% com somente anticorpos presentes.³⁰

Em outro estudo, realizado no Colorado, em que 25862 adultos foram avaliados para a pesquisa de disfunção tireoideana, foi encontrada prevalência de 9,5% de TSH elevado, considerando a população total, homens e mulheres. Houve aumento desta prevalência para 19% quando se consideravam indivíduos com idade acima de 74 anos.^{28,29}

Rosenthal³¹ acompanhou 26 pacientes idosos com níveis de TSH > 4 mU/l por 4 anos e observou evolução para hipotireoidismo estabelecido em um terço deles, sendo que

tal evolução ocorreu em todos os que tinham níveis iniciais TSH maior do que 20 mU/l e em 80% daqueles com títulos mais altos de anticorpos antitireoideanos.

Em um outro estudo de acompanhamento, por 16 anos, de pacientes com hipotireoidismo subclínico, foi proposto haver duas evoluções distintas, uma para hipotireoidismo estabelecido e outra na qual há manutenção do padrão bioquímico de hipotireoidismo subclínico. Os autores tentaram explicar este segundo padrão de evolução como resultante de possíveis alterações no controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A concentração dos hormônios no momento do diagnóstico do hipotireoidismo subclínico falhou em prever tal evolução.³²

Samuels³³ realizou um estudo de meta-análise em que avaliou estudos de seguimento de 2956 pacientes por 6, 10 e 20 anos, com ocorrência de hipotireoidismo estabelecido à taxa de 2,1% a 3,8% por ano em pacientes com anticorpos antitireoideanos positivos e 0,3% em indivíduos sem anticorpos.

Segundo Adlin,³⁴ o hipotireoidismo subclínico seria mais comumente um estágio precoce do hipotireoidismo estabelecido, sendo que a possibilidade desta evolução ocorrer seria tanto maior quanto maior o valor de TSH e a detecção de anticorpos antitireoideanos.

Desta forma, o curso natural do hipotireoidismo subclínico tem demonstrado duas evoluções distintas. Em publicação mais recente, Kabadi³⁵ descreveu estas duas evoluções. Uma para hipotireoidismo estabelecido, que o autor chamou de "hipotireoidismo subclínico verdadeiro", com fatores etiológicos bem definidos. A outra, com manutenção do quadro laboratorial de hipotireoidismo subclínico, assintomático, definido como eutireoidismo com "reset thyrostat" – um estado permanente sem progressão para hipotireoidismo estabelecido, provavelmente secundário a danos sutis à glândula tireóide.

1.3 Repercussões clínicas do Hipotireoidismo Subclínico

Vários estudos descreveram alterações cardiológicas no hipotireoidismo subclínico. Di Bello³⁶ demonstrou alterações estruturais no miocárdio, através da avaliação por videodensitometria ultrasônica, nem sempre detectadas por ecocardiografia convencional. Estas alterações foram quantitativamente relacionadas à perda de função tireoideana, podendo representar um sinal precoce de dano ao miocárdio. O comprometimento do miocárdio e disfunção diastólica do ventrículo esquerdo também foram descritos por

Biondi.³⁷ O autor avaliou vinte e seis pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico, sendo que dez deles foram reavaliados após seis meses de reposição com L-tiroxina. Foi observado que a função diastólica apresentou melhora significativa, com reversão à normalidade pela terapia de reposição. Vários estudos também demonstraram alteração na função sistólica em repouso e pós-exercício, com melhora após a normalização dos níveis de TSH através da reposição com L-tiroxina.³⁸⁻⁴⁰ Outros estudos, porém, não reproduziram os achados de repercussões do hipotireoidismo subclínico na função cardíaca ou de melhora com reposição hormonal.^{8,41} A evolução de pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico após angioplastia coronariana não foi diferente da evolução de grupo controle, sugerindo não ser esta entidade fator de risco para morbidade ou mortalidade após o procedimento.⁴²

Além da alteração miocárdica propriamente dita já referida, a presença de disfunção endotelial também foi demonstrada em grupo de pacientes com hipotireoidismo subclínico.⁴³ Este achado, associado às alterações descritas no perfil lipídico, sugere ser o hipotireoidismo subclínico fator de risco para doença coronariana, e provavelmente também para doença arterial periférica, conforme descrito inicialmente por Bastenie,²² e confirmado por estudos mais recentes.^{8,44,45}

Vários estudos demonstraram associação do hipotireoidismo subclínico com alterações no perfil lipídico. Através da avaliação de função tireoideana em grupo de pacientes portadores de dislipidemia, foi descrita a ocorrência de 10% de hipotireoidismo subclínico em um grupo de mulheres.⁴⁶ Tsimihodimos,⁴⁷ em estudo semelhante, encontrou prevalência de 4,4% de hipotireoidismo subclínico, com melhora nos parâmetros bioquímicos da dislipidemia após reposição hormonal, em pacientes com níveis de TSH > 12 mU/l, pré-tratamento. Em ambos os casos, foi demonstrada associação entre os achados. Ayala²¹ demonstrou correlação entre as alterações do perfil lipídico e os níveis de TSH, ficando mais evidentes quando os níveis de TSH foram maiores que 12 mU/l. Alterações pequenas, mas significativas nos níveis de LDL-colesterol em pacientes que apresentavam níveis de TSH entre 5 e 10 mU/l também já foram descritas.²⁸ Segundo alguns autores, níveis elevados de LDL-colesterol e lipoproteínas evoluíram com melhora com a reposição com L-tiroxina.^{8,44,48}

Apesar destes dados, a relação entre hipotireoidismo e dislipidemia foi contestada por alguns autores. Pirich,⁴⁹ através da avaliação de 1922 indivíduos submetidos a *screening* para dislipidemia, encontrou 1,1% de prevalência de hipotireoidismo subclínico,

com 0,8% de ocorrência em pacientes normocolesterolêmicos e 1,4% em hipercolesterolêmicos. Não foi observada associação do hipotireoidismo subclínico com efeitos adversos no que diz respeito a fator de risco cardiovascular. Assim como a associação entre hipotireoidismo subclínico e dislipidemia, a reposição com L-tiroxina em hipotireoidismo subclínico visando tratamento de dislipidemia é questionada quanto ao seu benefício. Bogner,⁵⁰ analisando a prevalência de dislipidemia em pacientes com hipotireoidismo subclínico e grupo controle, encontrou prevalência semelhante nos dois grupos. Com relação a resposta ao tratamento, observou melhora no perfil lipídico, mas normalização somente em 50% dos pacientes. Em outro estudo de intervenção com reposição hormonal para pacientes portadores de dislipidemia e hipotireoidismo subclínico, Tanis⁵¹ descreveu a redução dos níveis de colesterol total, embora estes continuassem acima do normal.

Estado de humor, componentes afetivo e cognitivo, e memória mostraram-se alterados em pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico.⁵² A associação observada entre hipotireoidismo subclínico e depressão, faz com que seja considerado como fator de risco para esta condição.⁵³ Melhora significativa do quadro depressivo com a reposição com L-tiroxina foi observada.^{52,54}

Alterações músculo-esqueléticas também foram relacionadas ao hipotireoidismo subclínico. Beyer⁵⁵ determinou os níveis séricos de creatina quinase (CK) em pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico e estabelecido, observando níveis aumentados também no hipotireoidismo subclínico, sugerindo haver algum grau de disfunção no metabolismo músculo-esquelético nesta condição. Disfunção muscular com achados clínicos e bioquímicos foi descrita por Monzani.⁵⁶ O autor avaliou os níveis de lactato e piruvato em repouso e após exercício, em pacientes portadores de hipotireoidismo e grupo controle. Foram descritos níveis mais altos de lactato após exercício no primeiro grupo. Este achado sugere disfunção oxidativa mitocondrial, já reconhecida no hipotireoidismo estabelecido. O autor observou que quanto maior o tempo de evolução da insuficiência tireoideana, maior o grau de disfunção muscular demonstrado. Isto poderia explicar a capacidade reduzida ao exercício e a queixa freqüente de fadiga.

Outros efeitos periféricos anormais têm sido relatados, como a lentificação de relaxamento do reflexo Aquileu, de forma semelhante ao que ocorre no hipotireoidismo estabelecido, sugerindo o comprometimento neuromuscular, inclusive com níveis elevados de mioglobina, retornando aos padrões normais com a reposição hormonal.⁵⁷ O

comprometimento da velocidade de condução e de parâmetros eletrofisiológicos não foram encontrados em grupos de pacientes com hipotireoidismo subclínico.^{58,59}

O hipotireoidismo subclínico também foi associado a distúrbio de função ovariana, com a presença de menorragia e infertilidade.⁶⁰ Também foi descrito aumento nos níveis de prolactina, que pôde ser revertido com a terapia de reposição.^{39,61} Este achado referente a prolactina não foi confirmado por Bals-Pratsch,⁶² que não encontrou diferenças entre pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico, estabelecido e grupo controle na avaliação de infertilidade através dos parâmetros prolactina, LH e cortisol em mulheres inférteis. Baseado neste estudo, o autor sugeriu que não se justificaria o uso de L-tiroxina em hipotireoidismo subclínico visando manejo da infertilidade.

Há divergências com relação à conduta frente ao hipotireoidismo subclínico, tanto no que diz respeito à investigação, quanto ao tratamento.^{11-15,17,19,20,34,63} Helfand e Redfern,¹¹ a partir de meta-análise de estudos de prevalência e seguimento de pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico, sugeriram que programas de *screening* não seriam, em princípio, justificados. Segundo os autores, tal procedimento deve estar vinculado ao fato de que resultados alterados em testes estariam associados a futuras complicações, de forma que seguimento e tratamento precoce melhorariam a evolução, reduzindo o risco de complicações. Os benefícios do tratamento deveriam se sobrepor aos efeitos adversos e aos riscos do tratamento a longo prazo. No hipotireoidismo subclínico estas questões não estão ainda bem definidas, uma vez que estudos randomizados de tratamento em pacientes sintomáticos são inconclusivos e pessoas assintomáticas não têm demonstrado benefício com a terapêutica.¹⁴

De um modo geral, foi proposto *screening* para mulheres acima de 50 anos, sugerindo que sejam feitas avaliações periódicas em pacientes com fatores de risco para disfunção tireoideana, como sexo feminino, uso de drogas que comprometem a função tireoideana por longo tempo, história familiar ou pessoal de doença tireoideana, hipercolesterolemia, depressão e história de doença autoimune.^{6,11} Esta proposta foi feita em consenso com as recomendações do American College of Physycian,¹⁹ American Thyroid Association, Royal College of Physician e American Association of Clinical Endocrinologists.⁶ Da mesma forma que o *screening*, a intervenção com reposição hormonal também vem sendo discutida, sugerindo que sejam considerados os fatores de risco já citados e o quadro clínico individualmente.^{34,64} Não têm sido observados efeitos

adversos com a reposição hormonal no que diz respeito a comprometimento ósseo ou cardiovascular, desde que não haja indução de hipertireoidismo.^{13,19,34}

1.4 Hipotireoidismo Subclínico e Autoimunidade

O hipotireoidismo subclínico tem, assim como o hipotireoidismo estabelecido, a autoimunidade como a sua principal causa de ocorrência espontânea. A etiologia autoimune da doença tireoideana é evidenciada pela presença dos autoanticorpos antitireoideanos, marcadores do processo autoimune na tireóide, conforme definido pela correlação observada por Baker⁶⁵ entre a presença de anticorpos, mais especificamente anti-TPO, e achados citológicos de tireoidite.

No que diz respeito à presença de autoanticorpos e hipotireoidismo, foi descrita correlação entre a positividade de anticorpos e o nível de TSH, sendo observado que quanto mais alto o nível de TSH, mais prevalente a presença de anticorpos.¹⁰ Aproximadamente 80 a 90% das mulheres com níveis de TSH > 12 mU/l apresentaram autoanticorpos antitireoideanos, aumentando a incidência com a idade.³¹ Com níveis de TSH entre 5 e 10mU/l, 60% dos pacientes apresentaram autoanticorpos antitireoideanos.¹⁰

O papel dos anticorpos na patogênese de doenças autoimunes não está de todo esclarecido, apesar de mais de 40 anos de estudo. Enquanto certos anticorpos são causadores bem definidos da lesão tecidual, alguns parecem não ter efeito nocivo, mesmo sendo classicamente detectados no soro de pacientes com doença autoimune, e tendo assim, importância diagnóstica. A maioria dos anticorpos "nocivos" causam a morte da célula-alvo por lise, enquanto que outros, particularmente aqueles dirigidos contra receptores hormonais na superfície de células endócrinas, podem ter uma ação tanto estimuladora quanto bloqueadora destes receptores, causando anormalidades funcionais.⁶⁶

O dano tecidual na doença autoimune é mediado tanto por eventos de resposta imune celular como humoral, com envolvimento de linfócitos T e B, processamento de antígenos por macrófagos e células teciduais e secreção de um grande número de fatores solúveis. No que diz respeito aos autoanticorpos e doença autoimune endócrina mais especificamente, o dano à célula-alvo e tecidual pode ocorrer por: 1) formação de complexos com o antígeno que podem fixar complemento e portanto iniciar processo

inflamatório; 2) efeito citotóxico na célula-alvo em uma reação envolvendo células "killer" (K), conhecida como citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); 3) estimulação ou bloqueio de receptores hormonais, levando a hipo ou hiperfunção celular; 4) estimulação ou bloqueio do crescimento celular.⁶⁶

No estudo da patogênese da autoimunidade tireoideana, três antígenos específicos clássicos foram bem caracterizados: a tireoglobulina, a tireoperoxidase^{***} e o receptor de TSH.⁶⁷

A tireoperoxidase (TPO) é a enzima essencial na biossíntese de hormônios tireoideanos, expressa na superfície celular quando as vesículas exocíticas que carregam tireoglobulina se fundem com a membrana plasmática apical para a liberação do colóide. Peptídeos da tireoglobulina e TPO são expressos na superfície das células foliculares tireoideanas. Tal achado adquire particular relevância em vista da descoberta de que moléculas de classe II HLA (DR) estão anormalmente presentes na superfície de células tireoideanas de pacientes com Tireoidite de Hashimoto.⁶⁸ A expressão simultânea de autoantígenos tireoideanos e moléculas DR em células foliculares foi proposta como desencadeadora da autoimunidade tireoideana e responsável pela perpetuação do fenômeno imune dirigido contra a glândula tireóide.⁶⁷

O anticorpo anti-tireoglobulina é um marcador de autoimunidade tireoideana, mas não tem um papel patogênico definido, por não ter efeito citotóxico.⁶⁷ No estudo já citado, realizado por Baker,⁶⁵ foi descrita a correlação entre anticorpos antitireoideanos e achados citológicos de doença tireoideana autoimune. Dos 65 pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto, documentada citologicamente por punção aspirativa com agulha fina, 15 (23%) apresentaram anticorpos anti-tireoglobulina, enquanto que 61 (94%) apresentaram positividade para anticorpo anti-TPO. Outros estudos descreveram esta menor frequência de anticorpos anti-tireoglobulina do que anti-TPO, estando presentes em 14 a 23% dos pacientes com Tireoidite de Hashimoto, em geral associados a anticorpos anti-TPO.^{67,69} Pinchera⁶⁷ sugeriu que estes anticorpos não sejam normalmente fixadores de complemento

^{***}Até a década de 80, era feita referência ao antígeno microssomal e seu respectivo anticorpo (anti-microssomal), cuja natureza permaneceu desconhecida até sua caracterização, quando foi então definido como sendo a tireoperoxidase.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Considerando que está bem estabelecida a relação antigêncica entre o antígeno microssomal e a tireoperoxidase, neste estudo será utilizada a denominação tireoperoxidase, mesmo quando citada referência anterior à sua caracterização.

e, portanto, não causam dano celular direto. Este achado sugere que, na maioria dos casos, a autoimunidade tireoideana pode ser diagnosticada somente pela medida de anti-TPO. A dosagem de anticorpos anti-tireoglobulina, mesmo quando feita por método muito sensível, não forneceu informações diagnósticas adicionais à medida isolada de anti-TPO.⁷⁰ Sua medida é apenas justificada em situações especiais, como tireoidite pós-parto e no acompanhamento do câncer diferenciado da glândula tireóide.^{71,72}

Anticorpos dirigidos contra o receptor de TSH (TRAb) podem ser do tipo estimulador ou bloqueador da produção de AMPc dependente de TSH nas células tireoideanas, tendo este último sido descrito em tireoidite autoimune. Na tireoidite autoimune, anticorpos bloqueadores do receptor de TSH são detectáveis quase que exclusivamente em pacientes hipotireoideos, sendo sua prevalência maior em hipotireoidismo estabelecido (descrito em 10 a 20% dos casos) do que em insuficiência tireoideana subclínica.⁷³ Sua prevalência e níveis médios foram mais altos em hipotireoideos com Tireoidite de Hashimoto sem bócio do que naqueles com Tireoidite de Hashimoto com bócio, estando, assim, sua presença relacionada ao desenvolvimento de hipotireoidismo e atrofia tireoideana.⁷⁴

Com relação ao anticorpo anti-tireoperoxidase, Mariotti⁷⁵ estudou sua presença em 715 indivíduos, 119 controles e os demais portadores de doenças tireoideanas, considerando positivos níveis de anti-TPO acima de 10 U/ml. Foi encontrada positividade de 99,3% nos portadores de Tireoidite de Hashimoto, 8,4% no grupo controle e 11,1% em portadores de doença tireoideana não autoimune, sendo observados títulos mais altos em pacientes hipotireoideos não tratados, e redução progressiva com o tratamento em 12 a 18 meses. Em outro estudo, Doullay⁷⁶ definiu 88% de positividade de anti-TPO em portadores de disfunção tireoideana autoimune.

De um modo geral, considerando que a frequência de anticorpos anti-TPO é mais elevada que anticorpos anti-tireoglobulina, e que seu papel imunopatológico está melhor estabelecido, com correlação direta com achados histológicos em casos de tireoidite,⁶⁵ considera-se que sua detecção seja o parâmetro mais fidedigno para o diagnóstico de Tireoidite de Hashimoto.^{69,70,72,75} Além disso, níveis elevados de anti-TPO apareceram com maior frequência em pacientes que apresentam também elevação anormal de TSH.⁶⁹

Altos títulos de anticorpos anti-TPO estão presentes em torno de 90% dos pacientes com tireoidite autoimune. Anticorpos anti-TPO são capazes de fixar complemento e iniciar reação inflamatória e, portanto, podem ser citotóxicos às células tireoideanas.⁷⁸ Além deste

mecanismo, a lesão tireoideana pode ser também decorrente de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo.⁶⁸

O mecanismo pelo qual a TPO entra em contato com o sistema imunológico e a partir daí desencadeia a resposta imune ainda é discutido. Em princípio, a TPO estaria restrita à membrana apical dos tirócitos, sem contato com as células imunocompetentes. O contato dos tirócitos com estas células seria mediado pela membrana baso-lateral. Desta forma, haveria necessidade de ruptura da estrutura folicular para a ocorrência desta apresentação, quando na verdade, isto parece ser mais consequência, do que mecanismo inicial do processo autoimune. Zimmer⁷⁷ através do estudo da localização ultra-estrutural de TPO e anti-TPO, observando suas presenças em estruturas intracelulares (retículo endoplasmático, vesículas transportadoras e aparelho de Golgi, bem como na própria membrana basolateral), reforçou a afirmativa de que tirócitos expressam moléculas HLA de classe II, atuando como células apresentadoras de antígenos. Assim, complexos formados por peptídeos de TPO e moléculas HLA de classe II na membrana basolateral podem iniciar a apresentação de TPO para linfócitos e a consequente formação de anticorpos anti-TPO.

Quanto a forma de início da lesão, o envolvimento de citotoxicidade mediada por complemento foi estudada por Chiovato,⁷⁸ que mediu o efeito citotóxico através de um "percentual de lise específica" em pacientes portadores de tireoidite autoimune (Tireoidite Atrófica e Tireoidite de Hashimoto), doença não tireoideana e saudáveis, demonstrando atividade lítica maior de anti-TPO em indivíduos portadores de hipotireoidismo subclínico e estabelecido, quando comparados a indivíduos portadores de tireoidite autoimune, porém eutireoideanos. Na Tireoidite Atrófica observou-se comprometimento da função tireoideana com a presença de anticorpos bloqueadores do receptor de TSH.⁷⁴ No grupo de portadores de hipotireoidismo (subclínico e estabelecido), observou-se uma prevalência significativamente maior da atividade lítica de anti-TPO em portadores de Tireoidite de Hashimoto, quando comparado a portadores de Tireoidite Atrófica. Parkes⁷⁹ verificou que anticorpos presentes em soros de portadores de doença tireoideana autoimune tinham elevada capacidade de fixação do complemento, quando comparados aos soros de portadores de doença tireoideana não autoimune e indivíduos saudáveis. Em trabalho posterior, Parkes⁸⁰ demonstrou também que anticorpos anti-TPO com capacidade de fixar complemento estavam envolvidos na patogênese da tireoidite pós-parto, relacionando a sua presença com a apresentação e progressão da doença.

A citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) é definida como um dos mecanismos citotóxicos envolvendo ambos, imunidade celular e humoral, dependendo de interações complexas entre células-alvo, anticorpos e células K efetoras. Este mecanismo e o envolvimento de anti-TPO foi definido em doença tireoideana autoimune em estudo de Rodien,⁸¹ em que anticorpos anti-TPO mediaram ADCC de maneira dose-dependente, enquanto que anticorpos anti-tireoglobulina não o fizeram. No entanto, dos 34 pacientes avaliados, três deles não apresentaram concordância anti-TPO/ADCC, sendo anti-TPO positivos, mas ADCC negativos. A imunidade mediada por célula dependente de anticorpo em pacientes portadoras de disfunção tireoideana pós-parto foi estudada por Kuijpers⁸² que observou que mulheres com anticorpos anti-TPO apresentavam anormalidades da imunidade celular distintas daquelas vistas em gestantes normais, com percentual de células NK persistentemente mais baixo e percentual aumentado de células T ativadas. Desta forma, testes de imunidade celular ou humoral poderiam ser fator preditivo para a evolução de disfunção tireoideana pós-parto.

Alguns autores discutiram o possível efeito inibidor da atividade da tireoperoxidase pelo anticorpo anti-TPO, comprometendo a síntese hormonal e conseqüentemente a função tireoideana, além de causar a inflamação da tireóide. Okamoto⁸³ sugeriu que anti-TPO não somente liga TPO, mas também inibe diretamente sua atividade, embora seus dados tenham sido obtidos em experimento *in vitro*. Kohno⁹⁵ além de estabelecer prevalência de 6,4% de anti-TPO positivo em indivíduos saudáveis, também comparou a capacidade de inibição da atividade da TPO por anticorpos anti-TPO nestes indivíduos com a de portadores de tireoidite crônica, estabelecido por achados citológicos. Foram encontradas diferenças de especificidade de anti-TPO nos dois grupos, o que sugere que anti-TPO de indivíduos saudáveis não se liga aos epítomos relacionados aos sítios de combinação com o substrato, não interferindo com a função da enzima. Saller⁸⁴ definiu a natureza heterogênea dos Ac anti-TPO, estabelecendo que os Ac reagem com ao menos dois determinantes antigênicos da molécula de TPO. Entretanto a avaliação direta da sua influência na atividade da TPO não mostrou inibição significativa da atividade enzimática pelos soros de portadores de doença tireoideana. Segundo o autor, a não confirmação do efeito inibitório na atividade da TPO é um indício de que não há ligação direta de auto-anticorpos aos sítios enzimáticos de TPO, indicando que não são fatores importantes na produção de disfunção na doença tireoideana autoimune.

1.5 Papel das Subclasses de IgG Anti-TPO na Tireoidite Autoimune

Os anticorpos são moléculas proteicas referidas como imunoglobulinas (Ig), compreendendo uma população heterogênea de proteínas. Em humanos, há cinco classes principais de Ig: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que diferem na composição das suas cadeias pesadas, mas não nas suas cadeias leves.

A maioria dos autoanticorpos são das classes IgG e IgM.⁶⁶ As subclasses de IgG humanas são definidas por diferenças estruturais nas suas cadeias pesadas e sua distribuição no soro normal é 60,3-71,5% do total de IgG para IgG1, 19,4-31% para IgG2, 5,0-8,4% para IgG3 e 0,7-4,2% para IgG4.⁸⁵ As diferenças nas suas estruturas também refletem diferenças nos seus papéis biológicos. Desta forma, foi definido que IgG3 tem maior capacidade de fixar complemento, sendo que esta capacidade diminui na ordem IgG3>IgG1>IgG2>IgG4.¹⁵⁰ Anticorpos IgG1 e IgG3 são mais eficientes do que IgG2 ou IgG4, da mesma especificidade, para lisar eritrócitos, por exemplo, por ADCC.^{86,87}

Os métodos laboratoriais correntemente disponíveis para a medida de anticorpos anti-TPO não discriminam entre os isotipos de anticorpos que interagem com o sistema complemento e aqueles que não o fazem.

Anticorpos anti-TPO foram predominantemente da classe IgG em estudo de Kotani.⁸⁸ Vários estudos demonstraram que os anticorpos anti-TPO são predominantemente das subclasses IgG1 e IgG4. A participação de IgG2 e IgG3 foi demonstrada de forma muito discreta em poucos estudos.⁸⁹⁻⁹⁴

O achado de que certo percentual de indivíduos saudáveis (6,4%) apresentaram anticorpos antitireoperoxidase, não desenvolvendo, entretanto, comprometimento de função tireoideana, sugeriu que as especificidades de autoanticorpos anti-TPO em indivíduos saudáveis são diferentes daquelas de pacientes com tireoidite autoimune, sendo o papel de anti-TPO no soro de pacientes portadores de tireoidite diferente dos saudáveis.⁹⁵

A comparação da subclassificação de IgG anti-TPO de pacientes portadores de tireoidite e saudáveis foi realizada por Kohno,⁹⁶ que observou predomínio de IgG1 no primeiro grupo e predomínio de IgG4 no segundo grupo.

Guo⁹⁴ também demonstrou, em estudo *in vitro*, que IgG1 anti-TPO, mas não IgG4, pode mediar efeitos citotóxicos em células tireoideanas através de ADCC, reforçando a

importância da subclassificação de anticorpos anti-TPO e enfatizando que, mais do que simples marcador de dano tireoideano, esses anticorpos desempenham um papel na indução de disfunção tireoideana *in vivo*.

Briones-Urbina,⁹⁸ estudou grupos de gestantes estabelecendo que o desenvolvimento de tireoidite pós-parto com hipotireoidismo coincidiu com títulos significativamente mais altos de IgG1, discreto aumento de IgG2 e nenhuma alteração de IgG3, quando comparado às gestantes eutireoideanas que apresentaram níveis mais baixos de IgG1 e mais altos de IgG4. Neste estudo não foi observada correlação entre a subclassificação de IgG com o tamanho do bócio, quando presente, ou severidade da doença clínica. Jansson⁹⁰ também observou a presença de IgG1 e IgG4 na subclassificação de anti-TPO em gestantes com tireoidite autoimune pós-parto, e demonstrou o predomínio da subclasse IgG1 nas pacientes que desenvolveram hipotireoidismo.

A presença de anticorpos anti-TPO da classe IgE foi descrita por Guo,⁹⁷ que sugeriu que pela sua baixa concentração, provavelmente não desempenham algum papel *in vivo* – sua presença, no entanto, sugeriu uma ligação entre doença tireoideana autoimune e resposta imune envolvendo células TH2.

1.6 Avidéz de Anticorpos

Antígenos naturais, exceto pequenos haptenos, normalmente contém mais de um determinante antigênico e portanto, ligam-se a mais de uma molécula de anticorpo. Um único anticorpo, em condições normais, pode se ligar a um antígeno multivalente em vários sítios de ligação. Para IgG, essa ligação pode envolver até dois sítios de ligação, porque há somente duas regiões de combinação por molécula de anticorpo. Essa intensidade total de ligação é chamada de avidéz e geralmente é muito mais forte que a afinidade, termo referente à força de ligação de um dado anticorpo a um único epítipo. Matematicamente, a intensidade da avidéz aumenta quase que geometricamente com o aumento do número de sítios de ligação. Assim, uma molécula de Ac de baixa afinidade pode ligar-se muito fortemente a Ag multivalentes pois a somatória de interações de baixa afinidade pode gerar uma interação de alta avidéz.⁹⁹

Todas as funções biológicas exercidas pelos anticorpos são realizadas com maior eficiência quando eles têm alta avidéz. A determinação da avidéz de anticorpos tem se

mostrado como um instrumento importante no diagnóstico de doenças de origem infecciosa, permitindo distinguir uma infecção primária recente de uma infecção passada ou reinfecção, como no caso da rubéola, toxoplasmose e sarampo.¹⁰⁰ Os níveis e a avidéz de anticorpos anti-TPO foram pesquisados por Wilson,¹⁰¹ na investigação de possível associação destes achados com abortamentos de repetição. A avidéz dos anticorpos anti-TPO das pacientes do grupo de estudo foi significativamente maior do que no grupo controle.

Estes achados levam à hipótese de que em doenças autoimunes, além dos isotipos de IgG, também a avidéz destes autoanticorpos possa estar relacionada com o quadro clínico, sendo válido pesquisar se sua determinação tem um interesse prático.

1.7 Hipotireoidismo e Marcadores Inflamatórios

1.7.1 Citocinas

Estudos caso-controle e clínico-epidemiológicos têm demonstrado elevação da concentração sérica de marcadores inflamatórios, indicando que mecanismos imunes e inflamatórios são ativados na vigência das formas clínicas de disfunção tireoideana.¹⁰²⁻¹⁰⁴

A indução de uma resposta inflamatória é mediada através de processos complexos, iniciados pela liberação de proteínas solúveis, conhecidas como citocinas. Elas possuem algumas características em comum como ação autócrina, parácrina e endócrina; efeito redundante (citocinas diferentes tendo o mesmo efeito na mesma célula), sinergismo (uma citocina pode aumentar o efeito de outra em determinada célula) e efeito pleiotrópico (a mesma citocina pode ter diferentes efeitos em diferentes células). Essas proteínas participam de eventos que incluem a apresentação antigênica, diferenciação na medula óssea, quimiotaxia, ativação celular, expressão de moléculas de adesão e indução e manutenção das respostas de fase aguda e crônica. A natureza das citocinas secretadas determina o tipo de resposta imunológica que pode ser humoral, celular ou alérgica.

Além das características citadas acima, essas proteínas são produzidas por um curto período de tempo após a ativação celular e possuem atividade em concentrações muito baixas (picomolar); algumas formas são expressas na membrana plasmática e outras secretadas para a circulação. Além destes, outros fatores, tais como subprodutos

decorrentes da ativação do sistema complemento, radicais oxidantes e proteinases são produzidos no início dos processos inflamatórios.¹⁰⁵

A síntese destes mediadores leva a um aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície de células vasculares endoteliais no sítio de inflamação.¹⁰⁶ Em condições normais há uma forte regulação da expressão de moléculas de adesão e de seus contra-receptores. Uma falha deste controle contribui para o desenvolvimento de reações inflamatórias. Desta forma, a produção de citocinas inicia, mantém e regula a resposta inflamatória e são responsáveis pela intensidade da reação.

As citocinas mais precocemente produzidas, TNF- α , IL-1 e IL-6, têm um papel central na indução de processos inflamatórios, pois além de provocarem um aumento das moléculas de adesão, necessárias para o extravasamento de leucócitos nos tecidos, podem desencadear a formação em cascata de outras citocinas, como IL-4, IL-10, Interferon- γ (IFN- γ) e quimiocinas.¹⁰⁷

Alguns estudos recentes têm demonstrado a ativação de mecanismos imunes e inflamatórios em síndromes clínicas tireoideanas.¹⁰⁸ A expressão gênica de citocinas e receptores solúveis de citocinas foram detectados em níveis elevados nestas situações e podem ter um papel importante na evolução das mesmas.¹⁰⁴

Além da produção de auto-anticorpos, a Tireoidite de Hashimoto é uma doença autoimune caracterizada por infiltrado linfocítico da glândula tireóide. Na doença tireoideana autoimune há aumento na densidade de moléculas MHC classe I e expressão anormal de antígenos de classe II.¹¹² Esta expressão é essencial para a apresentação do antígeno para as células T autorreativas, relevante para o início e/ou perpetuação das reações. Existem evidências de que as doenças autoimunes órgão-específicas sejam caracterizadas pela presença, no órgão-alvo, de células T helper 1 (Th1) e células T citotóxicas, específicas para os auto-antígenos. As células foliculares tireoideanas expressam abundantemente uma variedade de moléculas de superfície relevantes imunologicamente na Tireoidite de Hashimoto, como antígenos MHC e moléculas de adesão. Citocinas produzidas por células Th1 e células T citotóxicas estão envolvidas de forma importante na expressão destas moléculas.¹¹³ Linfócitos infiltrando a tireóide nesta condição têm capacidade de secretar citocinas que por sua vez exercem ambos os efeitos, direto e indireto sobre as células foliculares tireoideanas. A doença tireoideana autoimune destrutiva é uma condição autoimune principalmente Th1-dependente, onde uma produção

aumentada de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6) tem sido demonstrada por células epiteliais tireoideanas e/ou por linfócitos infiltrados na tireóide.¹¹⁴ Na autoimunidade clinicamente estabelecida, há evidência de que a atividade Th1-dependente coexiste com produção de citocinas relacionadas a resposta Th2, mas, especialmente na Tireoidite de Hashimoto, a resposta Th1 se superpõe aos efeitos anti-inflamatórios dependentes de citocinas Th2, como IL-10.¹³²

Outras citocinas também já foram relacionadas ao processo de autoimunidade tireoideana. O interferon-gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), ambos produzidos pelas próprias células tireoideanas na Tireoidite de Hashimoto, induzem a expressão de moléculas MHC de classe II em tirócitos^{114,116} e aumentam a expressão de moléculas de adesão em células foliculares tireoideanas. IL-1 e IL-6 inibem a expressão do gene da TPO e acúmulo de AMPc em células tireoideanas humanas.^{109,117} Além dos linfócitos, as próprias células foliculares tireoideanas expressam IL-1, IL-6 e IL-8 *in vitro*, e TNF é secretada por estas células *in vivo*.^{117,118} Observa-se que a própria célula tireoideana tem potencial papel imunológico na doença autoimune, uma vez que expressa moléculas de adesão e citocinas, participando ativamente do processo de lesão.¹¹⁹

Ajjan¹¹¹ analisou a expressão gênica de citocinas em amostras de tecido tireoideano de 4 pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto através de RT-PCR e o fracionamento dos linfócitos em subgrupos CD4+ e CD8+. Foi encontrada expressão de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α na maioria das amostras estudadas. A expressão gênica de citocinas em doença tireoideana autoimune também foi estudada por Heuer,¹²⁰ comparando com a expressão em doença tireoideana não-autoimune, demonstrando expressão significativamente maior na doença autoimune. A comparação, neste estudo, da expressão de citocinas de pacientes com Doença de Graves e Tireoidite de Hashimoto, demonstrou maior expressão de resposta Th2 no primeiro grupo e Th1 no segundo grupo. Com relação às citocinas de um modo geral, observou-se uma frequência mais baixa de expressão gênica em Doença de Graves do que na Tireoidite de Hashimoto, sugerindo que a diferença de quadro clínico e patológico destas duas situações de autoimunidade, se deve, ao menos em parte, a diferenças no perfil de citocinas intra-tireoideanas.¹²¹

A IL-1 promove resposta de células T e a expressão de moléculas de adesão intercelulares nas células foliculares tireoideanas. Paolieri¹¹³ definiu o papel chave desta citocina, mais especificamente IL-1 β , na autoimunidade órgão-específica "destrutiva" pela

perpetuação da reação autoimune através da apresentação eficiente do antígeno pelas células foliculares tireoideanas, via moléculas co-estimuladoras (B7.1) e na indução de dano tecidual via molécula de superfície (Fas), importante no processo de apoptose, ambas presentes em tirócitos. Rasmussen¹²² descreveu um modelo de ação bifásico de IL-1 sobre a célula tireoideana, através do qual, IL-1 em concentrações moderadas e altas inibiu a função de células tireoideanas e em concentrações baixas, estimulou sua função. Desta forma, haveria um papel de regulação fisiológica da função celular e a IL-1 também atuaria em condições fisiopatológicas, contribuindo na síndrome da doença não-tireoideana e desenvolvimento de autoimunidade.

Com relação a IL-2, uma resposta imunológica que leva a sua produção, leva a proliferação e ativação de células NK que pode ser o mecanismo de destruição tireoideana, já que células NK autólogas ativadas por IL-2 lisam células foliculares tireoideanas *in vitro*.¹²³ O comprometimento de função tireoideana por IL-2 pode ainda ser devido a liberação de outras citocinas, como IFN- γ e TNF- α .¹²⁴ Vários estudos relacionam IL-2 à disfunção tireoideana mas, em geral, referem-se ao uso terapêutico desta citocina em pacientes com neoplasia maligna. Nestes estudos foi descrita a ocorrência de hipotireoidismo em 35% dos casos.^{25,125} O nível sérico de IL-2 foi avaliado por Komorowski¹⁰³ em pacientes com hipotireoidismo primário demonstrando níveis mais elevados no grupo hipotireoideo quando comparado a um grupo controle. Além da associação descrita de IL-2 com o desenvolvimento de tireoidite, foi demonstrada maior correlação desta evolução em pacientes com autoanticorpos antitireoideanos presentes pré-tratamento.¹²⁶

A IL-10 é uma citocina que suprime a imunidade mediada por célula e estimula a resposta imune humoral.¹²⁷ O primeiro efeito ocorre por diversos mecanismos: inibição da secreção de IFN- γ pelas células T na presença de macrófagos/monócitos,¹²⁸ inibe a síntese de citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8,^{129,130} além de suprimir a expressão espontânea e induzida por IFN- γ de moléculas MHC de classe II em células apresentadoras de antígeno.¹³¹ Quanto ao efeito de estímulo à imunidade humoral, ocorre por aumento da expressão de moléculas MHC de classe II em linfócitos B e estímulo à proliferação destas células. La Vega¹³² avaliou a expressão de IL-10 em tireóides saudáveis, com doença "não-autoimune" e doença autoimune, encontrando significativo aumento desta citocina em pacientes com a última condição em comparação aos demais. Foram observados níveis particularmente mais altos em duas situações: Doença de Graves e

Tireoidite de Hashimoto com eutireoidismo. Na Tireoidite de Hashimoto com hipotireoidismo, com "estágio final de destruição" dos tirócitos, pouca expressão de IL-10 foi encontrada, mesmo na presença de intenso infiltrado de linfócitos T e B. Isto sugere que, se IL-10 desempenha um papel na doença tireoideana autoimune, sua participação seria relevante em estágios mais precoces do processo de doença – quando o processo autoimune está estabelecido, a expressão de IL-10 diminui progressivamente, mesmo na presença do infiltrado linfomononuclear, permanecendo a ser explicado porque esta citocina, potente inibidora de resposta Th1, não evitaria autoimunidade. Watson¹²¹ também descreveu a presença de IL-10 em pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto e Doença de Graves, mas não em Bócio Multinodular, sugerindo seu papel na autoimunidade tireoideana possivelmente através dos seus efeitos imunoestimuladores nas células B, e portanto iniciando uma resposta humoral destrutiva. Se IL-10 desempenha um papel funcional contra citocinas Th1 nos estágios iniciais do processo de autoimunidade tireoideana, ou se esta citocina está envolvida no estímulo à produção de anticorpos pelas células B, ainda permanece a ser esclarecido. Os atuais achados apontam para esse último ponto, já que pacientes com níveis mais altos de anti-TPO também mostraram níveis mais altos de IL-10.¹³²

O TNF- α exerce várias ações nas células foliculares tireoideanas, como a facilitação da apresentação de antígeno pelas células foliculares através do aumento da expressão de moléculas MHC de classe II induzida por INF- γ , bem como aumento na expressão de moléculas de adesão.¹³³ TNF- α tem, ainda, efeito inibitório na função tireoideana, bem como efeito citotóxico direto nos tirócitos *in vitro*.¹³⁴

A expressão de IFN- γ foi detectada em linfócitos intratireoideanos e células foliculares tireoideanas em Tireoidite de Hashimoto e Doença de Graves, sugerindo um papel desta citocina na doença tireoideana autoimune.^{120,134} A maior parte dos estudos refere-se à associação de IFN- α (que tem propriedades distintas de IFN- γ) à disfunção tireoideana quando do seu uso terapêutico em hepatite C, descrevendo um quadro transitório e autolimitado, habitualmente sem necessidade de interrupção do tratamento.²⁴

Embora existam diversos trabalhos correlacionando citocinas inflamatórias e doenças tireoideanas, no que diz respeito ao nível sérico, a maioria deles referiram-se ao estudo de IL-6.^{102,135} IL-6 é ativadora de células B e T, e sua expressão está associada com o desenvolvimento de autoanticorpos;¹³⁶ também pode afetar diretamente os tirócitos inibindo sua função.¹¹⁷ Os dados, porém, são ainda inconclusivos, já que muitos resultados

são contraditórios.^{102,110,135,137} Acredita-se que a IL-6 presente em tecido tireoideano está relacionada às células foliculares tanto em tecidos associados à doença autoimune como "não-autoimune".¹¹⁸ Sua secreção pelas células foliculares parece estar sob controle de várias substâncias, especialmente TSH e IL-1. Esta citocina induz a maturação de células B para produção de anticorpos, com aumento da síntese de IgG, IgM e IgA; também atua nas células T, estimulando seu crescimento e induzindo não somente sua proliferação, mas também diferenciação de células T citotóxicas. Parece pouco provável que IL-6 tenha participação relevante no desencadeamento de reações intratireoideanas autoimunes. Contudo, a IL-6 secretada pelas células foliculares, bem como pelos macrófagos e células T, pode contribuir, através mecanismos parácrinos e/ou autócrinos, para manter a ativação e estimulação de células T autoreativas, possivelmente em sinergismo com IL-1.¹³⁸ A demonstração de que IL-6 é sintetizada constitutivamente por células tireoideanas, faz com que sua determinação sérica possa ser um marcador útil do processo destrutivo tireoideano, ao menos em pacientes sem doença sistêmica concomitante.¹³⁹

1.7.2 Neopterin

A neopterin é um marcador da atividade de macrófagos, células que têm um importante papel em todos os estágios da inflamação. É derivada da degradação da guanosina trifosfato em macrófagos ativados por IFN- γ e está aumentada em várias inflamações sistêmicas, doenças infecciosas e em pacientes com aterosclerose.¹⁴⁰ A relação neopterin/disfunção tireoideana tem sido estudada principalmente com relação à Doença de Graves, observando-se que seus níveis avaliados pré-dose terapêutica de Iodo-131 foram mais altos nos pacientes que evoluíram com eutireoidismo do que naqueles cuja evolução foi para hiper ou hipotireoidismo, acreditando-se que poderia ter valor prognóstico.¹⁴¹ A avaliação dos níveis de neopterin em portadores de disfunção tireoideana comparados a grupo controle, mostrou não haver diferença entre pacientes com tireoidite e indivíduos normais.¹⁴² A correlação entre os níveis de neopterin e níveis de anticorpos antitireoideanos, não foi demonstrada, sendo descritos níveis mais altos de neopterin em pacientes com dosagem negativa para os anticorpos.¹⁴³

Esta revisão descreve alterações referentes a autoimunidade em pacientes portadores de hipotireoidismo estabelecido e hipotireoidismo por tireoidite pós-parto, bem como alterações nos níveis de marcadores inflamatórios em pacientes com hipotireoidismo

estabelecido. Não foram encontrados estudos referentes a estes marcadores no hipotireoidismo subclínico – situação relativamente freqüente e polêmica no que diz respeito à conduta. No presente trabalho serão avaliados os níveis séricos de diferentes marcadores inflamatórios e a subclassificação de IgG anti-TPO em pacientes com hipotireoidismo subclínico, comparando os achados com os de pacientes portadores de hipotireoidismo estabelecido e grupo controle.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar a presença e quantificar os níveis de marcadores imunológicos e inflamatórios no Hipotireoidismo Subclínico

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os subtipos de IgG anti-TPO presentes em amostras de soro de pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico por tireoidite autoimune
- Determinar a presença e níveis de marcadores inflamatórios (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-10, neopterin) em amostras de soro de pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico por tireoidite autoimune
- Determinar a relação IgG1 / IgG4 e a avidéz de IgG anti-TPO em pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico por tireoidite autoimune e estimar a magnitude da associação entre estes achados com os níveis de TSH
- Comparar os dados obtidos dos pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico por tireoidite autoimune com os de pacientes portadores de hipotireoidismo estabelecido por tireoidite autoimune e grupo controle

Em caráter complementar, descrevem-se:

- As características da avaliação clínica das pacientes submetidas ao estudo
- Dosagem de colesterol das pacientes submetidas ao estudo

3. PACIENTES E MÉTODO

3.1 Considerações gerais - éticas

Esta pesquisa foi submetida a avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, obtendo a aprovação deste Comitê em junho de 1999 (anexo 1). Participaram do estudo pacientes que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, atendidas no Ambulatório de Endocrinologia Geral do PAM – SUS, em Itajaí – SC (anexo 2). Houve concordância da coordenação deste ambulatório, bem como autorização da Secretaria da Saúde da Prefeitura Municipal de Itajaí.

3.2 Desenho do estudo

Estudo transversal descritivo com componente analítico.

3.3 População de estudo

Participaram do estudo 95 pacientes do sexo feminino com mais de 20 anos de idade, atendidas no Ambulatório de Endocrinologia Geral do PAM - SUS, em Itajaí - SC. Com base nas dosagens de TSH, T4 livre e anticorpos anti-TPO e critérios de exclusão, foram distribuídas em um dos seguintes grupos:

- Grupo hipotireoidismo subclínico (**hs**): 34 pacientes com níveis séricos de TSH elevado, T4 livre normal e positividade na dosagem sérica de anticorpos anti-TPO
- Grupo hipotireoidismo estabelecido (**he**): 33 pacientes com diagnóstico definido (com base em níveis séricos de TSH elevado e T4 livre subnormal) e positividade na dosagem sérica de anticorpos anti-TPO
- Grupo Controle (**c**): 28 pacientes com níveis séricos de TSH e T4 livre normais.

No período de junho de 1999 a maio de 2000 foram atendidas no Ambulatório de Endocrinologia Geral do PAM – SUS, em Itajaí-SC, 52 pacientes do sexo feminino portadoras de hipotireoidismo subclínico (apresentando à avaliação laboratorial níveis

elevados de TSH e níveis normais de T4 livre) e 44 pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido (com diagnóstico definido a partir de níveis elevados de TSH e níveis subnormais de T4 livre). Dezoito das 52 pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico, não participaram do estudo em função dos critérios de exclusão:

- a) 3 pacientes tinham antecedente de tireoidectomia por Bócio Multinodular (por questão estética em 1 caso e sintomas compressivos em 2 casos);
- b) 1 paciente tinha antecedente de dose terapêutica de Iodo radioativo por Doença de Graves;
- c) 1 paciente fazia uso de Amiodarona;
- d) 3 pacientes apresentavam quadro infeccioso associado quando do atendimento;
- e) 10 pacientes não apresentavam anticorpos anti-TPO.

As pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico definido em avaliação inicial foram submetidas a nova dosagem de TSH e T4 livre 30 dias após, antes da sua inclusão no estudo, com o objetivo de se afastar possível flutuação que pode ocorrer na secreção de TSH com valor elevado isoladamente. Em somente uma paciente foi observado nível normal de TSH na segunda dosagem.

Das 44 pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido, 11 foram excluídas pelos seguintes achados:

- a) antecedente de cirurgia tireoideana (2 casos);
- b) antecedente de dose terapêutica de Iodo radioativo (2 casos);
- c) presença de neoplasia maligna de mama (1 caso);
- d) quadro infeccioso associado quando do atendimento (4 casos)
- e) duas pacientes não apresentavam anticorpos anti-TPO.

Vinte e sete das 33 pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido incluídas no estudo eram recém-diagnosticadas. Seis pacientes tinham hipotireoidismo diagnosticado há menos de 60 dias, em reposição hormonal.

3.4 Critérios de exclusão

- antecedente de doença tireoideana ou qualquer alteração da glândula tireóide presente, exceto pelos achados laboratoriais citados ou bócio difuso à palpação
- uso recente (90 dias) de drogas que podem interferir com a secreção de TSH, levando ao seu aumento, a saber agentes contendo Iodo (xaropes, contrastes iodados,

amiodarona) ou antagonistas dopaminérgicos (metoclopramida, domperidone, clorpromazina, clomifene, haloperidol, cimetidina, espironolactona), bem como agentes anti-depressivos (Li)

- presença de doenças crônicas
- presença de infecções recentes (sintomas até há 15 dias da coleta do sangue)
- presença de neoplasias malignas

3.5 Coleta de dados

Os dados de anamnese e exame físico das pacientes foram coletados pelo pesquisador, obtidos através de questionário após validação; e exame clínico, em consulta médica, sem a utilização de instrumentos ou exames complementares (anexo 3). Aos sintomas e sinais de hipotireoidismo questionados e avaliados (adaptados do estudo de Zulewski⁷) foram relacionadas as categorias **0** e **1**, sendo assim determinado, conforme a resposta e observação negativa ou afirmativa:

0 - não

1 – sim

Após a consulta médica, as pacientes foram encaminhadas ao laboratório para coleta de sangue.

3.6 Preparo das amostras de soro

Foi coletada uma amostra de 10 ml de sangue de cada paciente, com *vacutainer*. Após coagulação, as amostras de soro foram separadas por centrifugação a 1500 rpm, durante 10 minutos. De cada amostra, foram separadas alíquotas que foram imediatamente congeladas a -83°C , permanecendo assim até o momento de utilização. As coletas foram feitas no Laboratório da Unimed Litoral, em Itajaí – SC, onde foram realizadas as dosagens de TSH, T4 livre e colesterol. A dosagem de anti-TPO foi realizada no Laboratório Santa Luzia, em Florianópolis. A subclassificação de anti-TPO, determinação da avidéz de anticorpos anti-TPO e dosagem de marcadores inflamatórios foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Parasitologia / MIP da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.6.1 Dosagem de TSH e T4 livre:

As dosagens de TSH e T4 livre foram feitas por ensaios imunoenzimáticos (Microparticles Enzyme Immunoassay), através de *kit* comercial (AxSYM[®] - Abbott). Como parâmetro de normalidade foram utilizados os valores de 0,47 – 5,0 µU/ml para o TSH e de 0,71 – 1,85 ng/dl para o T4 livre.

3.6.2 Dosagem de colesterol

As dosagens de colesterol foram feitas por determinação enzimática, através de *kit* comercial – Colesterol Enzimático PAP (Biolab[®]). Como parâmetro de referência foram utilizados os valores de 140 a 270 mg/dl.

3.6.3 Dosagem de anticorpos anti-TPO:

As dosagens foram realizadas através de ensaio imunométrico por quimioluminescência, através de *kit* comercial (IMMULITE[®]). Como parâmetro de normalidade foi utilizado o valor de até 35 U/ml (*cut-off* obtido em estudo no qual 92% dos indivíduos normais avaliados apresentavam valores inferiores ao referido).

3.6.4 Caracterização das subclasses de anticorpos anti-TPO:

Ensaio imunoenzimático indireto - ELISA

A caracterização dos subtipos de IgG anti-TPO foi realizada com base no teste padronizado por Piza et al.¹¹⁵ Placas de 96 orifícios (NUNC-Immuno Plate MaxiSorp Surface cod. 442404) foram sensibilizadas com 100µl de Tireoperoxidase Humana (Advanced ImmunoChemical Inc., USA – Cat. # TPOh1), diluída em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,05M, pH 9,6, na concentração de 10µg/ml de TPO. O bloqueio foi feito com 200µl de tampão Tris-NaCl com 0,5% de gelatina durante 30 minutos a 37°C. Após o bloqueio as placas foram lavadas em tampão PBS-Tween. Os soros foram diluídos em tampão PBS-Tween 0,5% de gelatina. A diluição do soro variou para cada conjugado conforme estabelecido por titulação prévia. Cem microlitros de soro diluído foram adicionados nos orifícios, cada amostra foi feita em duplicata. As placas foram incubadas durante uma hora a 37°C e em seguida lavadas em tampão PBS-Tween. Foram adicionados 100µl do conjugado em cada orifício, diluídos em tampão PBS-Tween-BSA

pH 7,0 conforme a titulação previamente estabelecida. As placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C e em seguida lavadas em tampão PBS-Tween .

A adição do substrato-cromógeno foi feita com 100µl de orto-fenilenodiamina (OPD) diluída em tampão citrato pH 5,6 contendo 0,1% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes. As placas foram mantidas em temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 25 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µl de solução de ácido sulfúrico 4N. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA Titertek Multiskan MCC/340, com comprimento de onda de 492nm. Os resultados foram expressos em absorbância (DO).

Os níveis normais para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-TPO foram determinados a partir da dosagem no soro das pacientes do grupo controle (25 pacientes do sexo feminino sem a presença de anticorpos anti-TPO). Baseado nos valores de D.O. deste grupo, para cada subtipo de IgG anti-TPO foram estabelecidos arbitrariamente pontos de corte (*cut-off*). Os cálculos foram feitos pelos valores de $p_{25-1,5}(p_{75-p_{25}})$ e $p_{75+1,5}(p_{75-p_{25}})$, que correspondem a 95% dos valores, tal qual a média \pm 2DP. Assim, para IgG1, os limites foram 0,0025 a 0,2265; para IgG2 de 0,0000 até 0,1038; para IgG3, de 0,000 até 0,1353 e para IgG4 de 0,000 até 0,0666. Foram considerados positivos os soros com dosagens acima deste valor superior.

Apesar das avaliações dos subtipos de IgG anti-TPO terem sido realizadas sempre com método imunoenzimático, cada subtipagem exigiu uma padronização individualizada. Foram utilizadas diferentes diluições do soro e anticorpos anti-subtipos de IgG. Desta forma, para que os valores absolutos de D.O. pudessem ser comparáveis, foi definido um índice (I) em que ao maior valor de D.O. obtido para cada subtipo, foi atribuído o valor 1,0. Todos os demais valores foram, então, calculados como a porcentagem correspondente. Assim, a relação IgG1/IgG4 pôde ser estabelecida a partir deste índice.

Titulação de IgG1 anti-TPO

A sensibilização e o bloqueio foram feitos como descritos anteriormente. As amostras de soro foram diluídas 1:400 em PBS-Tween-gelatina. Nesse ensaio foi utilizado um anticorpo monoclonal (mAb), de fluido ascítico de camundongo, clone 8c/6-39 (SIGMA I-2513) . O mAb anti-IgG1 humana também foi diluído a 1:400 em tampão PBS-Tween 0,5% de gelatina. Foram adicionados 100µl do anticorpo nos orifícios, as placas foram incubadas 1 hora a 37°C e em seguida lavadas em tampão PBS-Tween. Em seguida foi adicionado o conjugado polivalente anti-imunoglobulina de camundongo (G,A,M),

marcado com peroxidase, produzido em cabra (SIGMA A-0412). Este conjugado foi diluído a 1:5000 em PBS-Tween-BSA. A revelação e leitura foram feitas como já descritas anteriormente.

Titulação de IgG2 anti-TPO

O ensaio foi feito do mesmo modo que para a titulação de IgG1, com os soros testados na diluição de 1:400 exceto que como anti-soro, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-IgG₂ Humana, de fluido ascítico, clone SH-21. (SIGMA I-7010) diluído a 1:2.500 em PBS-Tween-gelatina.

Titulação de IgG3 e IgG4 anti-TPO

O ensaio foi feito do mesmo modo que para a titulação de IgG1 e IgG2, sendo utilizados os anti-soros monoclonais anti-IgG3 humana, de fluido ascítico, clone HP-6050. (SIGMA I-7260) e anti-IgG4 humana, também de fluido ascítico, clone HP-6025 (SIGMA I-7385) ambos diluídos a 1:2.500, em PBS-Tween-gelatina.

3.6.5 Determinação da avidéz de IgG (Tratamento com uréia 8M)

A sensibilização, bloqueio e adição das amostras de soro foram feitos como já descrito no item 3.6.4. A avaliação de avidéz de IgG foi feita conforme descrito por Hedman¹⁰⁰ com algumas modificações. Após a incubação do soro durante uma hora, o conteúdo das placas foi desprezado e as mesmas foram incubadas por 5 minutos a 37°C com 200µl de PBS-Tween contendo Uréia 8M. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida as placas foram lavadas com PBS-Tween e prosseguiu-se o ensaio, incubando-se as placas por mais uma hora com uma mistura dos anti-soros anti-IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, nas mesmas diluições especificadas anteriormente, quando utilizados individualmente. A fase final foi realizada de maneira idêntica aos ensaios anteriores. Como controle, simultaneamente foram feitos ensaios com os mesmos soros, mas ao invés de incubação com Uréia 8M utilizou-se tampão de lavagem.

O índice de avidéz (IA.) foi calculado segundo a equação:

$$\text{IA. (\%)} = \frac{\text{DO COM URÉIA}}{\text{DO SEM URÉIA}} \times 100$$

3.6.6 Dosagem dos marcadores inflamatórios:

A dosagem de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-10) foi realizada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) através de kits comerciais, com resultados expressos em pg/ml. Foram utilizados kits comerciais da marca R&D Systems (EUA) para IL-1 α (cat. n $^{\circ}$. DLA50, lote 9918173), IL-6 (cat. N $^{\circ}$. D6050, lote 991041), IL-10 (cat. N $^{\circ}$. D1000, lote 200220), TNF- α (cat. n $^{\circ}$ DTA50, lote 991026) e IFN- γ (cat. n $^{\circ}$. DIF00, lote 9919405).

O procedimento foi rigorosamente realizado seguindo as instruções descritas no manual de cada kit e os soros foram testados em duplicatas.

As placas foram previamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais contra as citocinas específicas. Após reidratação, foram acrescentadas as amostras de soro e os padrões de citocinas, em volumes de 200 μ l. Em seguida as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após incubação, o conteúdo foi desprezado e as placas lavadas quatro vezes com tampão de lavagem. Foram então acrescentados 200 μ l de conjugado em cada orifício, que consistiu de anticorpo monoclonal contra a citocina pesquisada, marcado enzimaticamente. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente, o conjugado foi desprezado e as placas lavadas novamente mais 4 vezes com tampão de lavagem. Em seguida foram adicionados 200 μ l da solução de substrato/cromógeno em cada orifício. Nesta fase foi observada a formação de cor, nos soros positivos e nos controles; após 20 minutos a reação foi interrompida com solução ácida (ácido sulfúrico 4N). A leitura da absorbância (DO) das placas foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments inc. mod. Elx800 U.S.A.), com comprimento de onda de 450nm e com correção de comprimento a 570 nm.

Cálculo das concentrações: Após estabelecimento das médias das leituras de DO das duplicatas de cada amostra de soro e dos padrões, e subtração dos valores do “branco”, foram criadas através de computador curvas-padrão, utilizando *software* para cálculo de regressão linear. Nas abscissas foram colocados os valores de concentração das citocinas e nas ordenadas, os valores de absorbância. Os valores de cada amostra foram obtidos por extrapolação direta. Os resultados são expressos em pg/ml.

Os níveis de neopterina também foram determinados por método imunoenzimático ELISA, através de kit comercial da marca Immuno Biological Laboratories - IBL (Alemanha-Hamburgo - N $^{\circ}$ cat. RE59321, N $^{\circ}$ lote ENO139). As placas vieram previamente sensibilizadas com neopterina. Foram então pipetados 10 μ l dos padrões, das

amostras e dos controles. Em seguida foram adicionados 100µl de conjugado-enzimático e 50µl de soro anti-neopterina. As placas foram então mantidas a temperatura ambiente, durante 90 minutos, sob agitação. O anti-soro liga-se a neopterina que está no fundo da placa e na que eventualmente está presente na amostra (ensaio de competição). O conjugado enzimático liga-se no anticorpo que está ligado à neopterina do fundo da placa ou à presente na amostra, durante o tempo de incubação de 90 minutos. Junto com a lavagem da placa, os anticorpos que não se ligaram à neopterina adsorvida ao fundo dos orifícios da placa são desprezados. Foram finalmente acrescentados 200 µl da solução com substrato e procedeu-se nova incubação por 10 minutos. Em seguida as placas foram lidas em comprimento de onda de 450 nm, e a concentração das amostras foram calculadas conforme descrito para os ensaios com citocinas.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram processados em planilhas do Excel 2000 e a análise estatística executada nos programas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) e *Statistica 98*.

Os dados descritivos foram apresentados como média \pm desvio-padrão (DP), mediana e amplitude de variação.

A comparação da distribuição das variáveis nos três grupos de estudo foi realizada através de teste não paramétrico (*Kruskal-Wallis*), seguido da comparação da distribuição das variáveis a cada dois grupos, através de teste também não paramétrico (*Mann-Whitney test*). A busca de correlações entre as variáveis nos grupos portadores de hipotireoidismo subclínico e hipotireoidismo estabelecido foi realizada através de análises não paramétricas, expressas pelo coeficiente de correlação de Spearman.

As variáveis relacionadas aos sintomas e sinais das pacientes foram categorizadas e a diferença entre os grupos foram analisadas através de teste de qui-quadrado - X^2 (Pearson).

Os valores de **p** menores do que 0,05 (nível de significância = 5%) foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

Os resultados serão representados graficamente através de *boxplots* e histogramas. Os *boxplots* apresentam a distribuição dos valores tomando a mediana como referência. A mediana é representada pela linha ou quadrado no interior da “caixa”, a qual representa os valores do intervalo inter-quartil. Este intervalo, por sua vez, refere-se aos valores compreendidos entre os percentis 25 e 75. As “cercas” representam os limites superior e inferior. O limite superior é calculado pela soma do valor do percentil 75 com uma vez e meia o valor do intervalo inter-quartil, sendo traçado somente até o valor máximo existente no banco de dados, que se encontra neste limite. O limite inferior, por analogia, é calculado segundo a subtração de uma vez e meia o intervalo inter-quartil do percentil 25, sendo traçado até o valor mínimo existente no banco de dados. Os valores fora dos limites superior e inferior são representados por círculos, que representam um “outlier” (valor distante da mediana, e portanto, raro).

Na descrição dos resultados, tanto no texto, como em figuras e tabelas, os grupos de estudo foram designados através das siglas **hs**, **he** e **c**, referindo-se aos grupos de pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico, hipotireoidismo estabelecido e grupo controle, respectivamente.

4.1 Características da população submetida ao estudo

Na tabela I são apresentadas as distribuições das idades das pacientes incluídas neste estudo. A média de idade em anos não diferiu no grupo controle ($43,43 \pm 11,45$) das encontradas no grupo portador de hipotireoidismo subclínico ($42,68 \pm 10,64$) e hipotireoidismo estabelecido ($38,67 \pm 11,03$), com $p > 0,05$. Todas as pessoas dos três grupos foram do sexo feminino.

Tabela I – Distribuição das pacientes submetidas ao estudo, por faixa etária

IDADE (anos)	hs		he		c	
	N	%	N	%	N	%
21 a 30	3	8,82	10	30,30	3	10,71
31 a 40	11	32,35	7	21,21	10	35,71
41 a 50	11	32,35	12	36,36	5	17,85
51 a 60	8	23,52	4	12,12	8	28,57
61 a 70	1	2,94			2	7,14
TOTAL	34	100	33	100	28	100

4.2 Características da anamnese e exame físico

As características da anamnese das pacientes são apresentadas na tabela II. Todas as pacientes dos grupos **hs** apresentaram algum dos sintomas investigados. Os sintomas referidos com maior frequência foram fadiga (82,35%) e obstipação (82,35%). Todas as pacientes do grupo **he** também apresentaram algum dos sintomas investigados, sendo os mais frequentes também fadiga (51,51%) e obstipação (45,45%). O achado de exame físico encontrado com maior frequência no grupo **hs** foi pele seca (81,81%). No grupo **he** a pele seca também foi o achado mais frequente (51,51%), seguida de alteração no relaxamento do reflexo Aquileu (45,45%). A frequência de ocorrência de achados de exame físico está apresentada na tabela III. No grupo **c**, exceto pelos sintomas fadiga e sonolência (com ocorrência em 39,28% e 32,14%, respectivamente), os demais dados de anamnese e exame físico foram detectados com frequência inferior a 22%.

Tabela II – Características da anamnese das pacientes dos grupos **hs** e **he**

SINTOMAS	hs		he	
	N*	%	N*	%
Fadiga	28	82,35	17	51,51
Sonolência	21	61,76	13	39,39
Intolerância ao frio	23	67,64	13	39,39
Queda de cabelo	12	35,29	14	42,42
Sintomas depressivos	15	44,11	9	27,27
Ganho de peso	20	58,82	8	24,24
Obstipação	28	82,35	15	45,45
Dores generalizadas	20	58,82	11	33,33
Alteração de voz	0	0	2	6,06

*N corresponde ao número de pacientes com resposta afirmativa aos sintomas questionados.

Tabela III – Características do exame físico das pacientes dos grupos **hs** e **he**

CARACTERÍSTICAS DO EXAME FÍSICO	hs		he	
	N*	%	N*	%
Pele seca	27	79,41	17	51,51
Extremidades frias	26	76,47	16	48,48
Edema	7	20,58	88	24,24
Bradipsiquismo	13	38,23	12	36,36
Bócio	27	79,41	12	36,36
Alt. Reflexo Aquileu	14	41,17	15	45,45

*N corresponde ao número de pacientes com achados clínicos positivos.

A análise comparativa da ocorrência dos sintomas entre os grupos **hs** e **he**, mostrou diferenças estatisticamente significantes de frequência para os sintomas fadiga, intolerância ao frio, ganho de peso, obstipação e dores generalizadas. Com relação aos achados de exame físico, houve diferença quanto à presença de pele seca, extremidades frias e bócio. A comparação das variáveis de anamnese e exame físico está apresentada na tabela IV.

Tabela IV – Comparação das variáveis da anamnese e exame físico entre os grupos hs e he

VARIÁVEIS	hs		he		X ² *	P**
	sim	não	sim	não		
Fadiga	28	6	17	16	7,67	0,0055
Sonolência	21	13	13	20	3,44	0,0633
Intolerância ao frio	23	11	13	20	5,55	0,0184
Queda de cabelo	12	22	14	19	0,36	0,5433
Sintomas depressivos	15	19	9	24	2,09	0,1477
Ganho de peso	20	14	8	25	8,39	0,0037
Obstipação	28	6	15	18	10,46	0,0012
Dores generalizadas	20	14	11	22	4,48	0,0342
Alteração de voz	0	34	2	31	2,12	0,1446
Pele seca	27	7	17	16	6,11	0,0133
Extremidades frias	26	8	16	17	5,88	0,0152
Edema	7	27	8	25	0,13	0,717
Bradipsiquismo	13	21	12	21	0,02	0,8753
Bócio	27	7	12	21	13,29	0,0002
Alt. Reflexo Aquileu	14	20	15	18	0,13	0,7181

* X² (Pearson)

** Valores de $p < 0,05$ estão representados em negrito.

Nas pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico foi observada correlação positiva entre a presença de alteração do reflexo Aquileu com os níveis de TSH e anti-TPO ($r=0,38$ e $r=0,43$, respectivamente).

No grupo de pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido, a correlação positiva entre a presença de sintomas e níveis de TSH foi observada com relação à fadiga e intolerância ao frio ($r=0,36$ e $r=0,46$, respectivamente). Para os níveis de T4 livre foi observada correlação negativa com os sintomas fadiga ($r=-0,53$), sonolência ($r=-0,52$), intolerância ao frio ($r=-0,42$), sintomas depressivos ($r=-0,51$), dores generalizadas ($r=-0,45$), edema ($r=-0,49$), bradipsiquismo ($r=-0,51$), bócio ($r=-0,47$) e alteração do reflexo Aquileu ($r=-0,75$). No que diz respeito aos níveis de anti-TPO, foi observada correlação positiva com a presença de bradipsiquismo ($r=0,42$).

4.3 Dosagem de colesterol

Os níveis de colesterol foram diferentes entre os grupos **hs** e **c** (médias de 226,5 mg/dl \pm 35,69, e 203,86 \pm 39,99, respectivamente com $p < 0,001$) e entre os grupos **he** e **c** (média de 251,12 mg/dl \pm 81,65 para o grupo **he**, com $p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de colesterol nos grupo **hs** e **he**. Os valores médios de colesterol estão descritos na tabela V. A figura 1 representa a distribuição das dosagens de colesterol nos três grupos estudados.

Tabela V – Descrição da análise dos níveis de colesterol nos três grupos de estudo

	COLESTEROL (mg/dl)		
	hs	he	c
média	226,5	251,12	203,86
dp	35,69	81,65	39,99
mín	155	137	121
máx	318	565	304
mediana	228,5	241	206
N	34	33	28

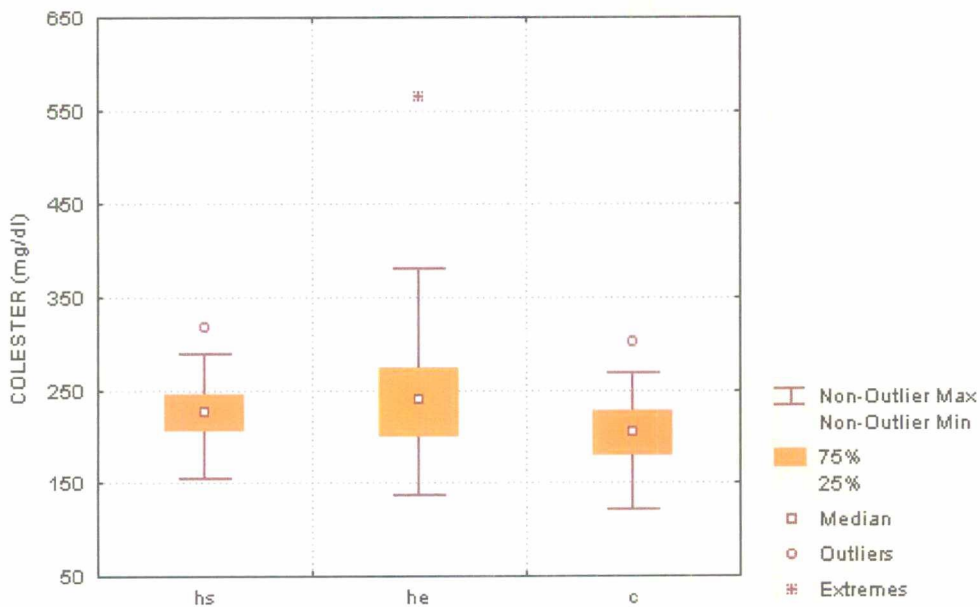


Figura 1- Níveis de colesterol nos grupos **hs**, **he** e **c**, com valores de $p < 0,001$ entre o grupo **c** e os demais e $p = 0,347$ entre os grupos **hs** e **he**

4.4 Caracterização de hipotireoidismo subclínico e estabelecido – dosagem de TSH e T4 livre

4.4.1 TSH

Os níveis médios de TSH encontrados nos três grupos estudados estão representados na tabela VI. Os níveis mais elevados foram vistos no grupo **he** (29,66 μ U/ml \pm 34,20), seguido do grupo **hs** (10,05 μ U/ml \pm 6,05) e grupo **c** (1,5 μ U/ml \pm 1,03). Foram encontradas diferenças entre os três grupos, com $p=0,033$ entre **hs** e **he** e $p<0,001$ entre **c** e os demais. A figura 2 representa a distribuição das dosagens de TSH.

Tabela VI – Descrição da análise dos níveis de TSH nos três grupos avaliados

	TSH (μ U/ml)		
	hs	he	c
média	10,0577	29,662	1,5225
dp	6,0509	34,202	1,0309
mín	5,21	0,06	0,56
máx	28,38	100	4,81
mediana	8,156	12,84	1,2385
N	34	33	28

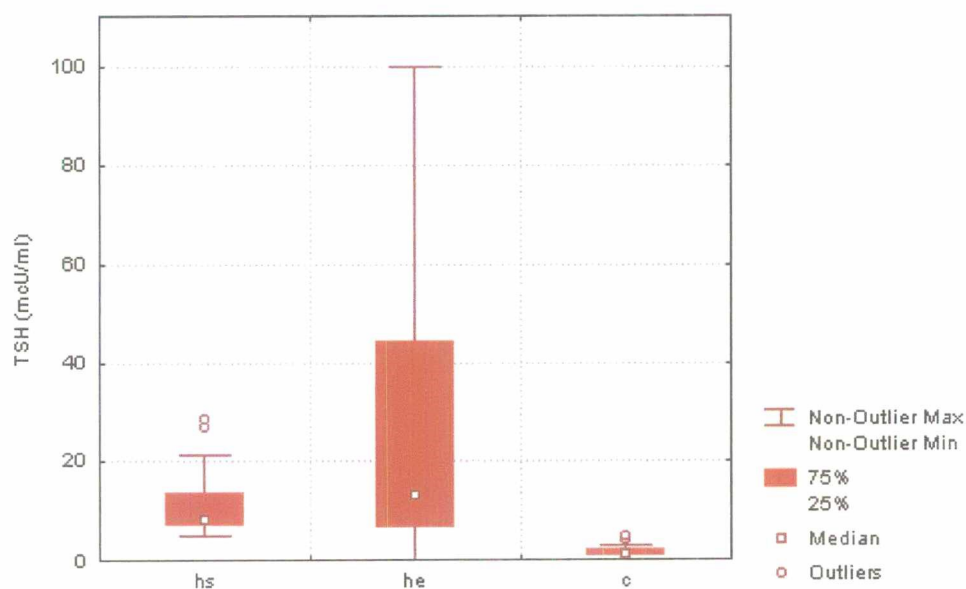


Figura 2 - Distribuição dos níveis de TSH nos grupos **hs**, **he** e **c**, em μ U/ml. Valor de $p=0,033$ entre os grupos **hs** e **he**, e $p<0,001$ entre o grupo **c** e os demais.

4.4.2 T4 livre

Com relação ao T4 livre (FT4), também foram observados níveis significativamente diferentes nos três grupos. Os menores valores foram observados no grupo **he** (0,72 ng/dl \pm 0,36), seguido do grupo **hs** (0,92 ng/dl \pm 0,15) e grupo **c** (1,12 ng/dl \pm 0,20), com $p=0,003$ entre os grupos **hs** e **he** e $p<0,001$ entre **c** e os demais. A tabela VII apresenta os níveis médios de T4 livre nos três grupos estudados. A distribuição dos níveis de T4 livre está representada na figura 3.

Tabela VII – Descrição da análise dos níveis de T4 livre nos grupos avaliados

	T4 LIVRE (ng/dl)		
	hs	he	c
média	0,9265	0,7258	1,1224
dp	0,1513	0,367	0,2088
mín	0,74	0,07	0,8
máx	1,41	1,5	1,8
mediana	0,89	0,62	1,108
N	34	33	28

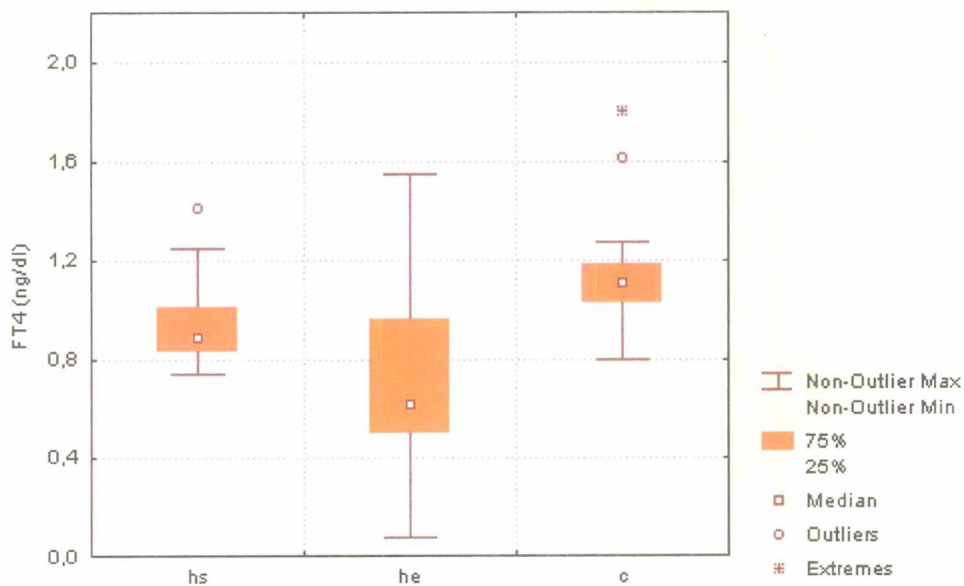


Figura 3 - Distribuição dos níveis de T4 livre nos grupos **hs**, **he** e **c** em ng/dl; com valores de $p=0,003$ entre os grupos **hs** e **he** e $p<0,001$ entre o grupo **c** e os demais.

4.5 Anticorpos anti-TPO

A análise dos níveis de anti-TPO mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos **hs** (600,28 U/ml \pm 347,75) e **he** (645,46 U/ml \pm 369,49). Os valores médios das dosagens de anti-TPO estão descritos na tabela VIII. Para as três pacientes do grupo **c** que apresentaram positividade na dosagem de anti-TPO, o valor médio foi de 290,66 U/ml, significativamente mais baixo do que a média nos demais grupos. A distribuição dos valores de anti-TPO nos três grupos estudados está representada na figura 4.

Tabela VIII – Descrição da análise dos níveis de anti-TPO nos grupos de estudo

	ANTI-TPO (U/ml)		
	hs	he	c
média	600,28	645,46	42,64
dp	347,75	369,49	99,53
mín	41,6	66,2	10
máx	1000	1000	438
mediana	590,5	813	10,6
N	34	33	28

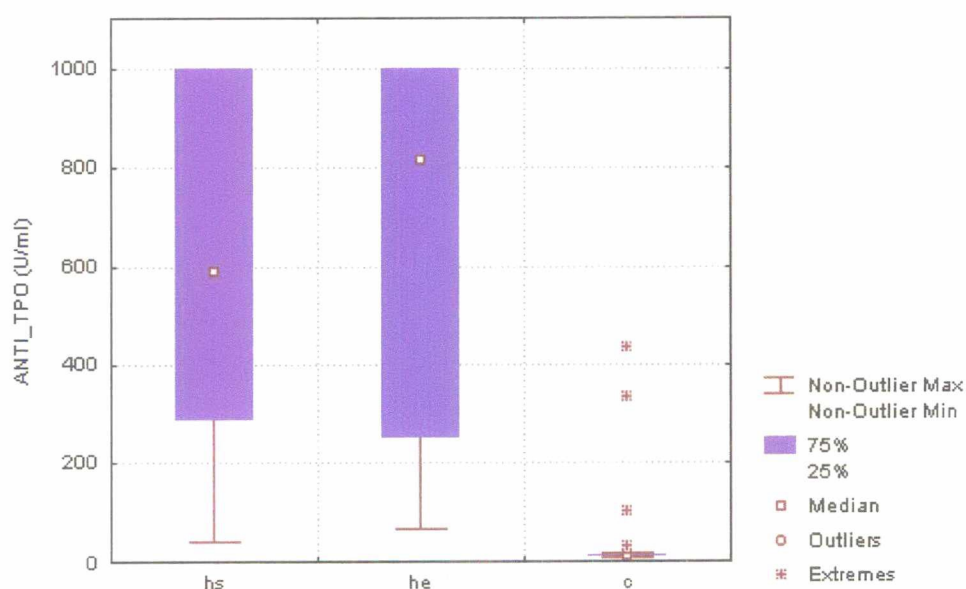


Figura 4 - Distribuição dos níveis de anti-TPO nos grupos **c**, **hs** e **he**, em U/ml. Valor de $p=0,6$ entre os grupos **hs** e **he**.

4.6 Avidéz de anticorpos anti-TPO

Os índices de avidéz de anticorpos anti-TPO (IgG total) nos grupos **hs** e **he** não foram diferentes, com média de 50,30% ± 19 e 58,67% ± 23,39, respectivamente, como representado na figura 5. Das 34 pacientes do grupo **hs**, 21 (62%) apresentaram avidéz superior a 40%, enquanto que no grupo **he**, 24 (76%) apresentaram avidéz superior a 40%. As 3 pacientes do grupo **c** apresentando anticorpos anti-TPO apresentaram avidéz inferior a 40%. Na tabela IX estão demonstrados os valores médios da medida de avidéz.

Tabela IX – Descrição da análise da medida da avidéz de IgG anti-TPO

	AVIDEZ (%)		
	hs	he	c*
média	50,3	58,67	34,53
dp	19,06	23,39	26,78
mín	17,81	24,89	31
máx	93,55	100	38,07
mediana	48,05	59,39	34,53
N	34	33	28

*Valores obtidos a partir das 3 pacientes com dosagem positiva de anti-TPO

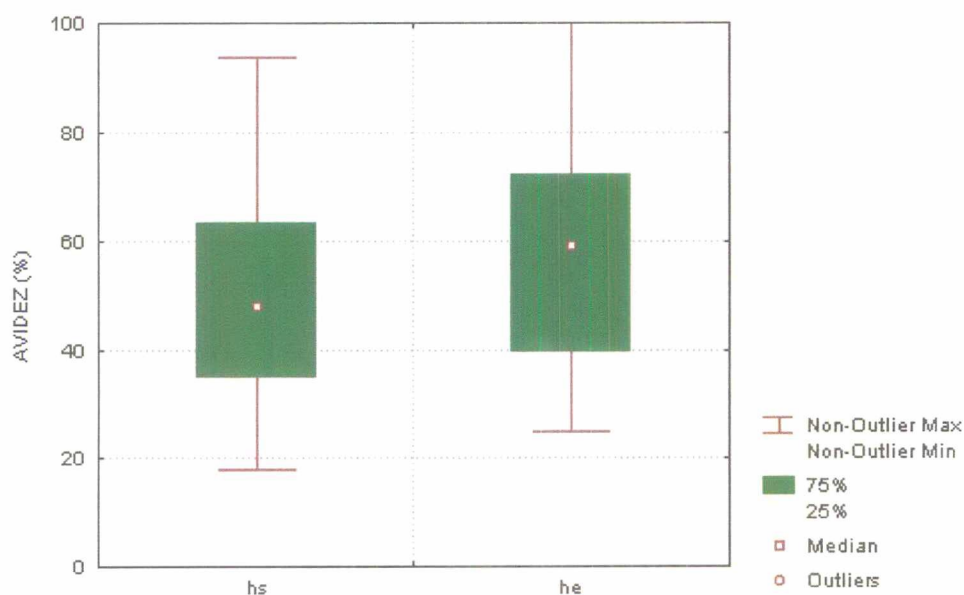


Figura 5 - Distribuição da medida de avidéz, em %, dos anticorpos encontrados nos grupos **hs** e **he**.

4.7 Subclassificação de anticorpos IgG Anti-TPO

As médias das dosagens de cada subtipo de IgG anti-TPO são apresentados na tabela X. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de subtipos das IgG anti-TPO entre os grupos **hs** e **he**. A média para IgG1 foi de $0,3642 \pm 0,2156$ no grupo **hs** e $0,3818 \pm 0,2228$ no grupo **he**. A média para IgG4 foi de $0,5738 \pm 0,3448$ no grupo **hs** e $0,4297 \pm 0,3554$ no grupo **he**. As figuras 6, 7, 8 e 9 mostram a distribuição dos níveis de cada subtipo de IgG anti-TPO nos três grupos estudados.

Tabela X – Níveis médios dos subtipos de IgG anti-TPO

Subclasses de IgG anti-TPO		GRUPOS	
		hs	he
IgG1	média	0,3648	0,3818
	dp	0,2156	0,2228
	mediana	0,293	0,291
IgG2	média	0,0878	0,0845
	dp	0,036	0,0303
	mediana	0,076	0,081
IgG3	média	0,1745	0,1575
	dp	0,0969	0,1385
	mediana	0,162	0,116
IgG4	média	0,5738	0,4296
	dp	0,344	0,3554
	mediana	0,596	0,374

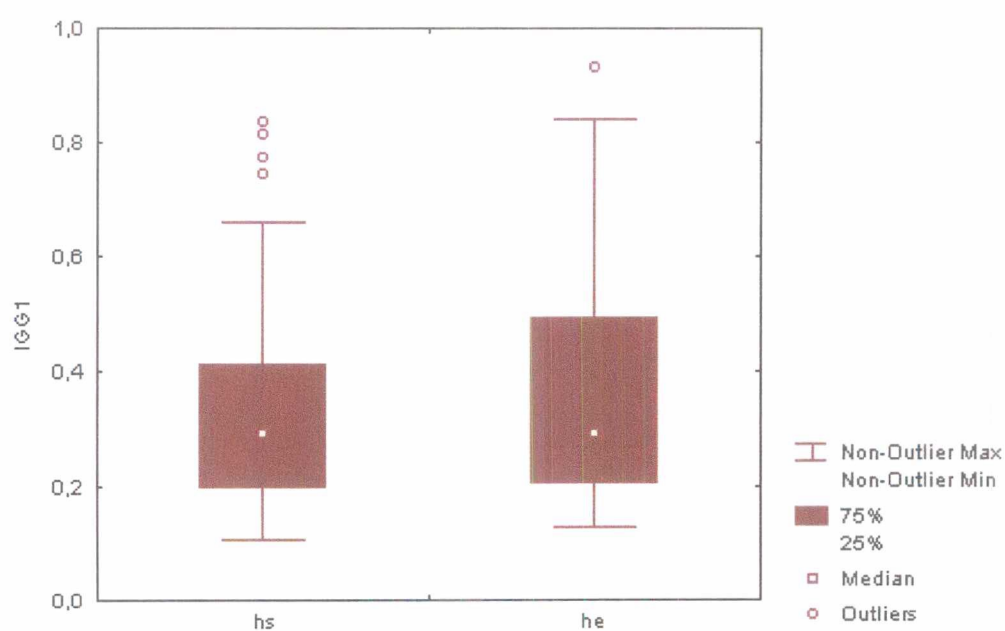


Figura 6 - Distribuição dos níveis de IgG1 nos grupos **hs** e **he**, em D.O. ; $p=0,749$

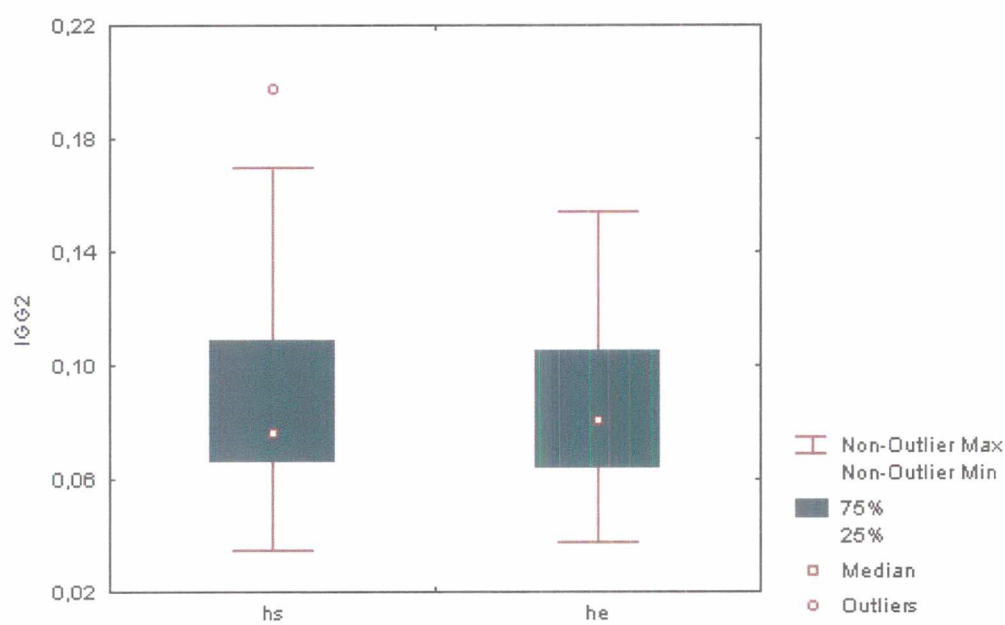


Figura 7 - Distribuição dos níveis de IgG2 nos grupos **hs** e **he**, em D.O.; $p=0,975$

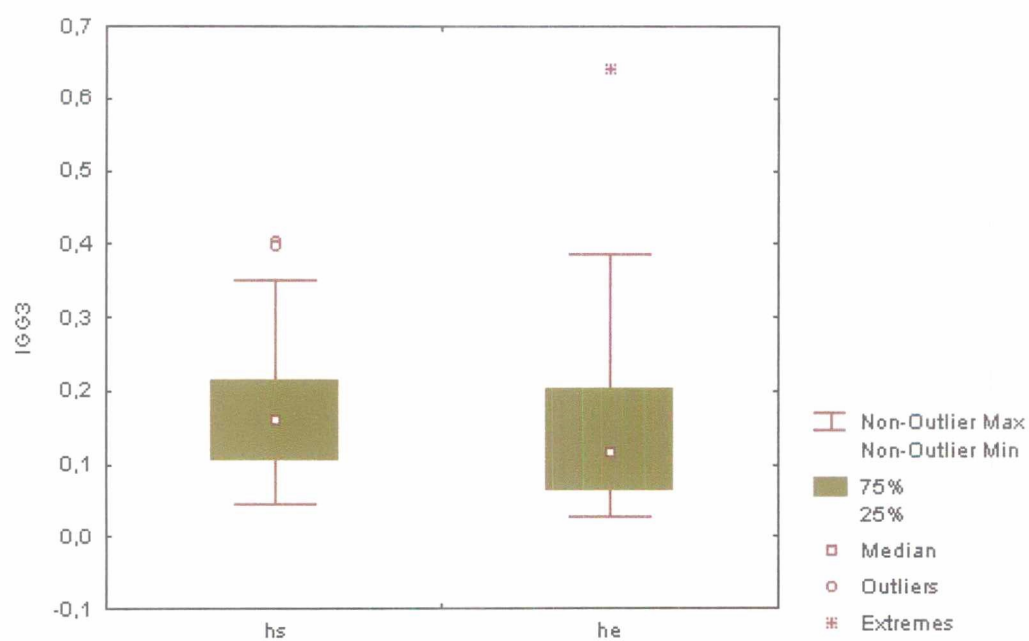


Figura 8 - Distribuição dos níveis de IgG3 nos grupos **hs** e **he**, em D.O. ; $p=0,104$

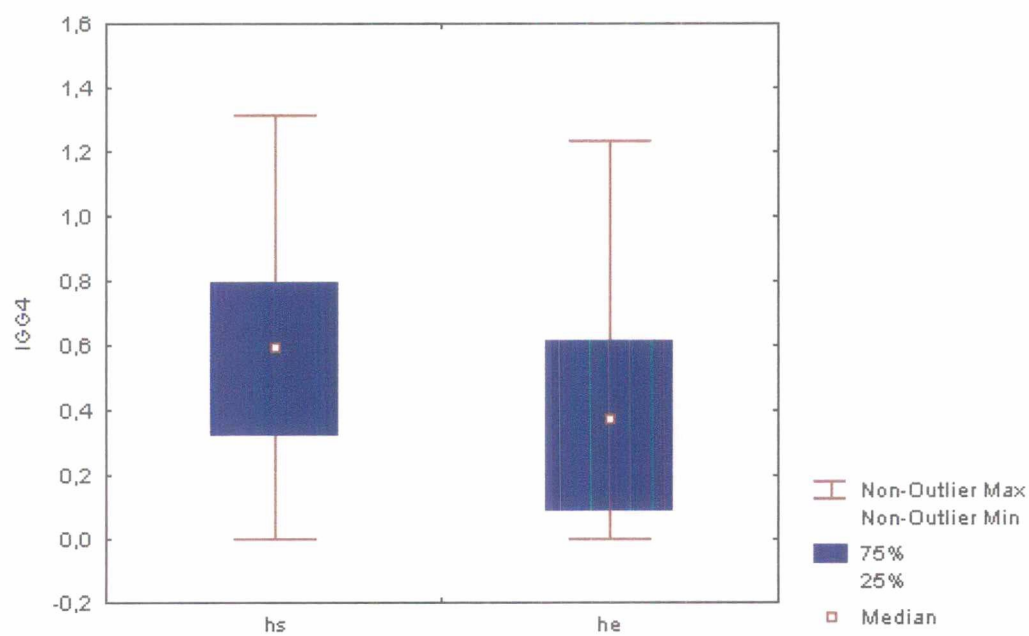


Figura 9 - Distribuição dos níveis de IgG4 nos grupos **hs** e **he**, em D.O.; $p=0,087$

Os percentuais de positividade para cada subtipo de IgG, a partir dos valores normais obtidos através do grupo controle, estão representados na figura 10. Os subtipos mais freqüentemente observados foram IgG1 e IgG4. No grupo **hs** IgG1 foi positiva em 24 pacientes (71%) e IgG4 em 33 pacientes (97%). No grupo **he** IgG1 foi positiva em 22 pacientes (67%) e IgG4 em 26 pacientes (79%). O percentual de positividade para IgG3 foi de 59% no grupo **hs** e 39% no grupo **he**. IgG2 foi positiva em menos de 30% dos pacientes dos dois grupos.

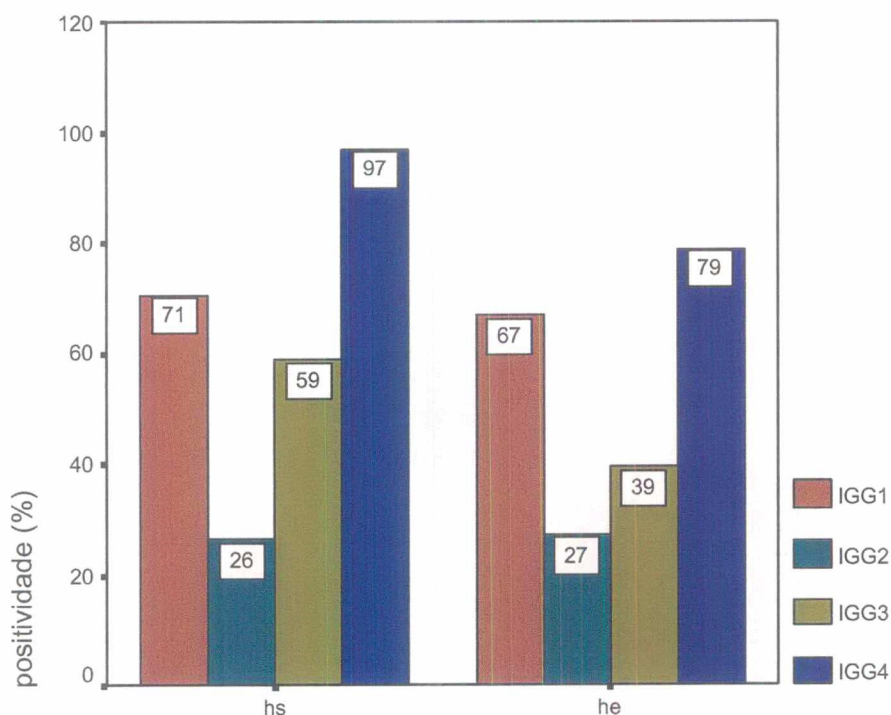


Figura 10 - Percentual de positividade de subtipos de IgG anti-TPO nos grupos **hs** e **he**

Como descrito na metodologia, para que os valores absolutos de D.O. pudessem ser comparáveis, foi definido um índice (I). A distribuição dos valores dos índices para cada subtipo de IgG anti-TPO nos grupos **hs** e **he** está representada na figura 11.

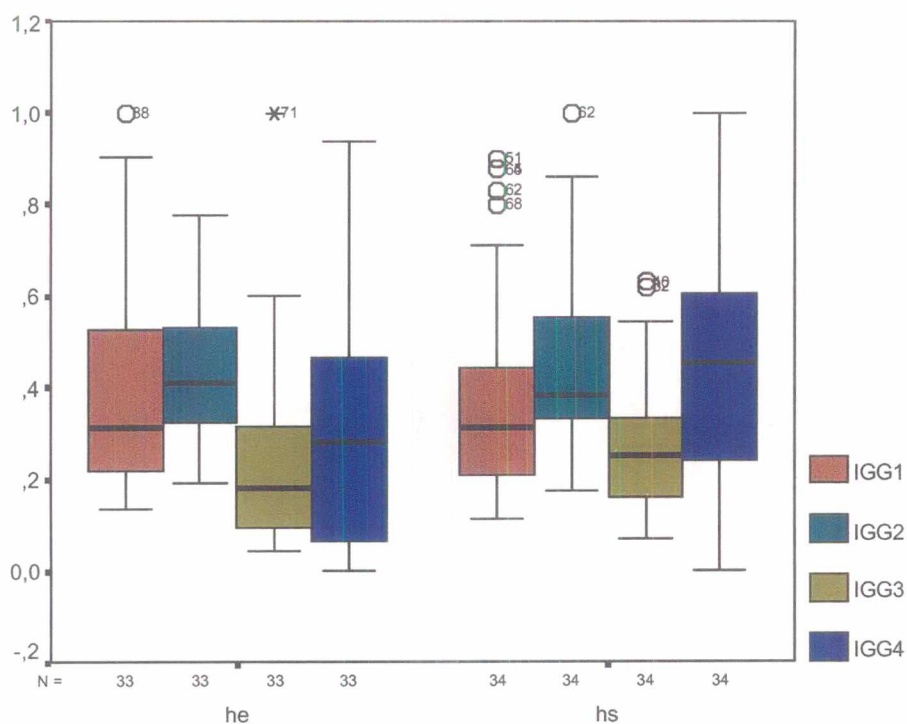


Figura 11 - Distribuição dos índices atribuídos para os subtipo de IgG anti-TPO nos grupos **he** e **hs**

A partir do I calculado, foi estabelecida a relação IgG1/IgG4 para os grupos **hs** e **he**, sendo obtidos os dados representados na figura 12. O valor médio da relação IgG1/IgG4 pelo I foi de $8,46 \pm 37,79$ para o grupo **hs** e $12,42 \pm 47,09$ para o grupo **he**, tendo esta diferença siginificância estatística com $p = 0,008$. Houve dois valores extremos (extremos altos), um em cada grupo de estudo (**hs** e **he**), que foram excluídos somente na representação gráfica.

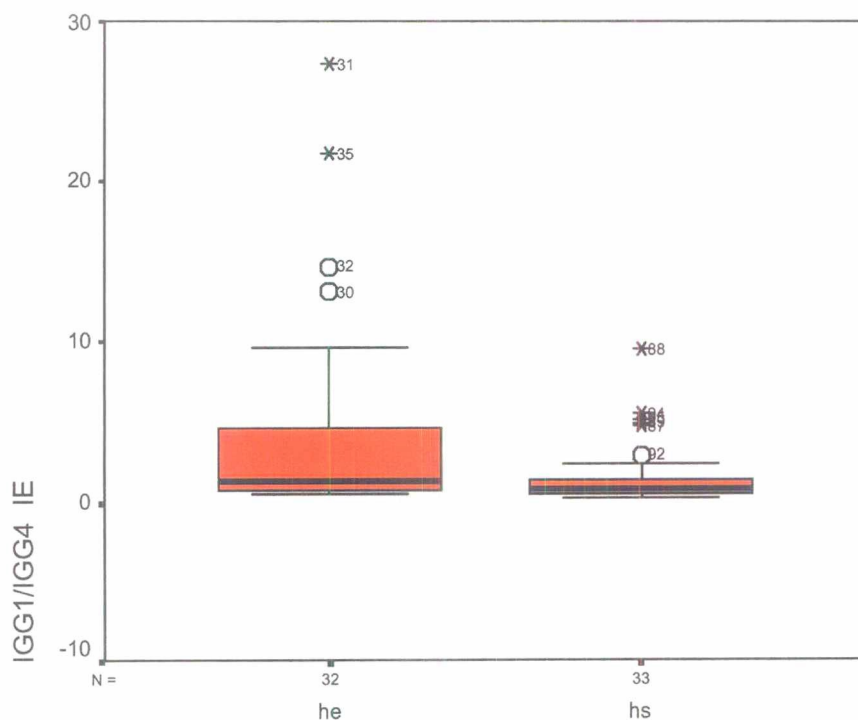


Figura 12 - Quadro comparativo da relação IgG1/IgG4 pelo I para os grupos **he** e **hs**; valor de $p=0,008$.

4.8 Marcadores inflamatórios

Os níveis de citocinas não diferiram entre os três grupos. IL-1 e IFN- γ não foram detectadas nos soros testados. Vinte das 95 pacientes apresentaram dosagem positiva para marcadores inflamatórios. Em 9 pacientes foi detectada a presença de TNF- α , 3 pacientes eram do grupo **hs**, 2 pacientes do grupo **he** e 4 pacientes do grupo **c**. Treze pacientes apresentaram dosagem positiva para IL-6, 6 delas do grupo **hs**, 2 do grupo **he** e 5 pacientes do grupo **c**. Uma paciente em cada grupo apresentou dosagem positiva para IL-10. A prevalência da presença de citocinas séricas nos grupos estudados está descrita na tabela XI. Os dados referentes às dosagens de marcadores inflamatórios estão descritos na tabela XII. A positividade para mais de uma citocina em um mesmo paciente foi observada em somente uma paciente do grupo **hs** (positividade para TNF- α e IL-6), uma paciente do grupo **he** (positividade para TNF- α e IL-6) e três pacientes do grupo controle (positividade para TNF- α e IL-6). As médias dos níveis de citocinas nas pacientes que apresentaram dosagens positivas, não foram diferentes de forma significativa entre os três grupos.

Tabela XI – Frequência da presença de citocinas séricas nos três grupos de estudo

GRUPO	N	CITOCINAS		
		TNF-alfa	IL-6	IL-10
hs	34	3 (8,8%)	5 (14,7%)	1 (3%)
he	33	2 (6%)	2 (6%)	1 (3%)
c	28	4 (14,3%)	5 (17,8%)	1 (3,6%)
TOTAL	95	9 (9,47%)	12 (12,6%)	3 (3,15%)

Tabela XII - Níveis de citocinas nos grupos de estudo.

GRUPOS	CITOCINAS (pg/ml)		
	TNF- α	IL-6	IL-10
	2.457* 1.878	371,4	
	43.562		11.318
hs		65,3 49,4 70,6 11,3 322,6	
	0, 1.467	6,5	
he		8,3	5.669
	1.478 0,852 34.959 4.002	194 388,6 30,71	
c		30,22	2.943
		50,39	

* Valores em negrito representam positividade de mais de uma citocina em uma mesma paciente

Os níveis médios de neoptertina não foram diferentes entre os três grupos de estudo com média de $9,445 \pm 3,119$ no grupo **hs**, $9,719 \pm 2,659$ no grupo **he** e $9,826 \pm 3,231$ no

grupo c. Estes dados estão representados na figura 13. Na tabela XIII estão descritos os valores médios de neopterina nos três grupos de estudo.

Tabela XIII – Descrição da análise dos níveis de neopterina nos três grupos estudados

NEOPTERINA			
	hs	he	c
média	9,445	9,719	9,826
dp	3,119	2,659	3,231
mín	2,7	5,2	2,8
máx	17,8	7,9	20,2
mediana	9,4	9,3	9,5
N	34	33	28

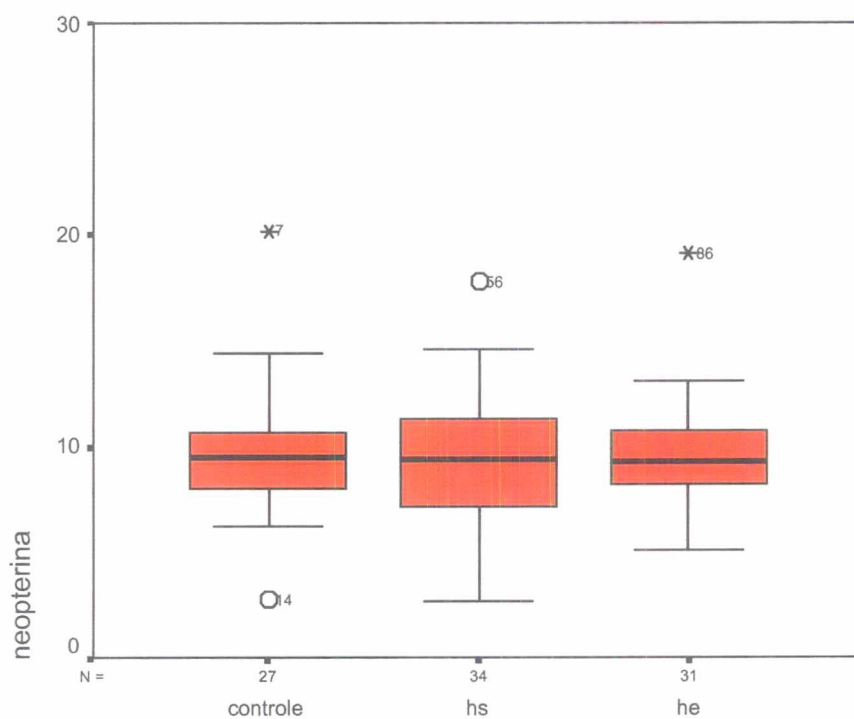


Figura 13 - Distribuição dos níveis de neopterina nos grupos c, hs e he

4.9 Correlações

Através de análises não paramétricas, expressas pelo coeficiente de correlação de Spearman foi pesquisada a correlação entre as variáveis estudadas. Nos pacientes

portadores de hipotireoidismo subclínico foi observada correlação positiva entre os níveis de TSH tanto com os níveis de anticorpos anti-TPO ($r=0,352$; $p=0,041$), como com a medida da sua avidéz ($r=0,610$; $p<0,001$). Foi observada também correlação positiva entre os níveis de anti-TPO e a medida da avidéz ($r=0,444$; $p=0,008$). Houve correlação negativa entre os níveis de T4 livre e os níveis de anticorpos anti-TPO ($r=-0,533$; $p<0,001$), bem como com a medida da sua avidéz ($r=-0,410$; $p=0,012$) e correlação positiva entre os níveis de T4 livre e os níveis de TNF- α ($r=0,555$; $p<0,001$). Não houve correlação entre os níveis de TSH ou anti-TPO com a relação IgG1/IgG4, definida pelo I, ou com os níveis de citocinas. No grupo de pacientes portadores de hipotireoidismo estabelecido não foi observada correlação entre os níveis de TSH, anticorpos anti-TPO e avidéz. Neste grupo observou-se correlação negativa entre os níveis de T4 livre e TSH ($r=-0,666$; $p<0,007$) e correlação positiva entre os níveis de T4 livre e TNF- α ($r=0,430$; $p=0,013$). Houve correlação negativa também entre os níveis de TSH e TNF- α ($r=-0,368$; $p=0,042$). Ainda neste grupo **he**, entre as citocinas, houve correlação positiva entre os níveis de TNF- α e IL-6 ($r=0,431$; $p=0,015$) e entre os níveis de TNF- α e neopterina ($r=0,369$; $p=0,041$).

Os gráficos referentes às correlações descritas para o grupo **hs** estão disponíveis no anexo 3.

5. DISCUSSÃO

Considerando a extrema sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide no que diz respeito à regulação da produção hormonal, e os métodos mais sensíveis de dosagens de TSH e T4 livre, o achado de doença tireoideana subclínica vem sendo cada vez mais freqüente. Como no hipotireoidismo subclínico tem-se níveis de hormônios tireoideanos dentro do normal, a decisão quanto a tratar ou não é habitualmente definida pela avaliação individual do médico assistente, a partir de possíveis sintomas referidos pelo paciente e os parâmetros laboratoriais atualmente disponíveis, que nem sempre definem a indicação ou não de tratamento.

Há divergências com relação ao manejo já que os parâmetros clínicos são subjetivos, como discutido por Zulewski.⁷ O autor observa que manifestações clínicas tidas como clássicas de hipotireoidismo ocorrem com menor freqüência em pacientes hipotireoideos (50-64%) do que descrito anteriormente, enquanto pacientes apresentando função tireoideana normal referem com relativa freqüência sintomas típicos de hipotireoidismo. Desta forma, a conduta frente ao achado de hipotireoidismo subclínico tem sido amplamente discutida.^{11-16,18,19,34,63,64} Assim, parâmetros laboratoriais que pudessem ser indicadores da evolução da doença, seriam de grande importância clínica.

Neste estudo, em função da maior prevalência de hipotireoidismo subclínico em mulheres, conforme referido em estudos prévios,^{10,144,145} só foram incluídas pacientes do sexo feminino.

Não houve diferença entre as médias de idade das pacientes dos grupos **hs**, **he** e **c**. Desta forma, este parâmetro não interferiu com os resultados encontrados. Observamos que as pacientes incluídas no estudo, portadoras de nível sérico de TSH acima do normal, atendidas seqüencialmente no ambulatório referido, tiveram idade média de 43 anos no grupo **hs** e valor ainda mais baixo, de 38 anos, no grupo **he**. Considerando os dados de literatura, em que se descreve a prevalência de TSH elevado significativamente maior a partir de 50 anos, e aumentando progressivamente com a idade,^{10,28,144-146} obtivemos uma faixa etária mais baixa atendida no período do estudo. Os estudos citados descrevem tal prevalência maior em idosos a partir de testes de *screening*, o que não ocorreu com todas

as pacientes do presente estudo. Algumas delas tiveram seus exames solicitados por suspeita de disfunção tireoideana a partir dos sintomas referidos. Estes dados estão de acordo com os de Samuels,³³ que em estudo de meta-análise, revisa os sintomas e sinais de hipotireoidismo em jovens e idosos, encontrando maior ocorrência dos sintomas sugestivos de hipotireoidismo em pacientes mais jovens (menos de 56 anos). É possível que no presente estudo, a população mais sintomática tenha sido mais investigada.

No que diz respeito à avaliação clínica, neste estudo foi observada maior prevalência de sintomas associados ao hipotireoidismo nas pacientes com quadro subclínico do que estabelecido, com diferença estatisticamente significativa para grande parte dos sintomas. Este grupo de sintomas compreende fadiga, intolerância ao frio, ganho de peso, obstipação, dores generalizadas, pele seca, extremidades frias e inclusive a presença de bócio.

Apesar da menor ocorrência de sintomas nas pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido, observou-se correlação entre a presença de fadiga, sonolência, intolerância ao frio, sintomas depressivos, dores generalizadas, edema, bradipsiquismo, bócio e alteração do reflexo Aquileu, com os parâmetros bioquímicos de avaliação de função tireoideana (correlação negativa com níveis de T4 livre).

Para as pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico, apesar da maior ocorrência de sintomas, da totalidade destes, só a alteração do reflexo Aquileu demonstrou correlação com parâmetros bioquímicos (níveis de TSH e anti-TPO).

Os sintomas e sinais de pacientes com vários graus de hipotireoidismo foram avaliados por Zulewski.⁷ O autor propõe um escore clínico a partir dos sintomas e sinais descritos por Billewicz¹⁴⁷ comparando a ocorrência dos achados em pacientes com hipotireoidismo e grupo controle. O estudo de Zulewski⁷ demonstrou que a prevalência de sintomas típicos de hipotireoidismo como pele seca, intolerância ao frio e edema, descritas anteriormente com frequência entre 90 e 97%, foi observada somente em 50 a 64% dos pacientes. Além disto, é feita referência ao fato de que alguns sintomas de hipotireoidismo podem ser comuns em eutireoideanos. Ainda neste estudo de Zulewski,⁷ foi observado que alguns pacientes com hipotireoidismo bioquímico severo, tinham sinais clínicos discretos, enquanto que pacientes com alterações bioquímicas mínimas, tinham manifestações clínicas severas. Estes dados sugerem que o hipotireoidismo tecidual, em órgãos-alvo periféricos deve ser diferente para cada paciente. Quando avaliada a associação, o escore clínico mostrou melhor correlação com os parâmetros que sugerem hipotireoidismo

tecidual, como tempo de relaxamento do reflexo Aquileu e colesterol total, do que com hormônios tireoideanos circulantes e TSH.

Doucet¹⁴⁸ descreveu que os achados típicos de hipotireoidismo são menos comuns em idosos (principalmente com relação a ganho de peso, intolerância ao frio e dores / parestesias). O fator idade, no presente estudo, não parece justificar a menor ocorrência de pacientes sintomáticas no grupo **he**, tendo em vista que as pacientes apresentavam faixa etária mais baixa.

Os níveis de TSH e T4 livre foram diferentes nos três grupos estudados, mesmo entre os grupos **hs** e **he**. No grupo **he**, seis pacientes eram pré-diagnosticadas, já em reposição hormonal, com níveis de TSH não elevados quando da coleta de sangue para este estudo. Os níveis de TSH e T4 livre nos grupos **hs** e **he** se mantiveram diferentes mesmo com a manutenção destas pacientes com TSH não elevado, no grupo **he**, na análise estatística. Níveis de TSH mais elevados foram observados, como seria de esperar, nas pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido. Com relação aos níveis de T4 livre, deve-se observar que apesar de, por definição, pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico apresentarem níveis normais,^{11,15,16,18,19} estes foram, no presente estudo, significativamente mais baixos do que no grupo controle, tendo-se a média de 0,9 ng/dl e 1,12 ng/dl, respectivamente ($p < 0,001$), sendo esta diferença maior do que entre os grupos **hs** e **he** ($p = 0,03$). É possível que níveis de T4 livre em pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico, apesar de estarem dentro da faixa normal, estejam diminuídos e reflitam uma redução significativa para aquele indivíduo – tal redução poderia justificar a sintomatologia apresentada por parte destes pacientes e as repercussões clínicas que vêm sendo demonstradas.

Entre as 52 pacientes que apresentavam hipotireoidismo subclínico, 18 não participaram do estudo: 8 delas apresentavam fatores de "agressão" à glândula tireóide, como definido pelos critérios de exclusão e 10 apresentavam dosagem negativa de anti-TPO. Neste estudo, a prevalência de anti-TPO em pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico foi de 77%. Por outro lado, no grupo das pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido, dentre as 35 pacientes, somente duas (6%) não apresentavam anticorpos anti-TPO. No grupo controle foram observadas 3 pacientes (10,7%) com positividade na dosagem de anti-TPO; a prevalência encontrada no presente estudo é semelhante a descrições prévias.^{65,95} O valor médio de anti-TPO nestes 3 casos foi de 290,66 U/ml, valor significativamente menor do que a média dos outros grupos.

Todas as pacientes deste estudo com TSH > 12 μ U/ml apresentaram anticorpos anti-TPO. Com níveis de TSH entre 5 e 12 μ U/ml, foi observada positividade em 74,35% das pacientes. Estes resultados são semelhantes aos de outros estudos. Rosenthal,³¹ observou 80% de positividade de anticorpos antitireoideanos em pacientes com níveis de TSH > 20mU/l. Tunbridge,¹⁰ faz referência a positividade de autoanticorpos relacionando ao nível de TSH, a partir de estudo em que há 60% de positividade para anticorpos antitireoideanos com níveis de TSH entre 5 e 10 mU/l e 80 a 90% com níveis de TSH > 12 mU/l. No presente estudo, além da positividade de anticorpos associada aos níveis de TSH foi observada também, correlação entre os níveis de TSH e os níveis de anti-TPO. Esta correlação positiva entre os níveis de TSH e anti-TPO foi observada somente no grupo **hs** (p=0,041). É possível que tal achado não tenha sido encontrado no grupo **he**, pelo fato dos níveis de TSH, neste grupo, serem homogeneamente mais altos.

Os níveis de TSH e presença de anticorpos anti-TPO têm sido associados à evolução da doença. Vários estudos descrevem correlação entre a progressão para hipotireoidismo e o valor inicial de TSH.^{27,30,31,145,149} Vanderpump²⁷ e Rosenthal³¹ fazem referência ao fato de que além do nível inicial de TSH, a presença de anticorpos antitireoideanos, mais especificamente anti-TPO, aumenta a taxa de progressão.

As taxas de progressão demonstradas do hipotireoidismo subclínico para hipotireoidismo estabelecido são variáveis, sendo descritas taxas de 2,5 a 26% ao ano.^{27,30,149} A partir destes estudos, pôde ser observado que pacientes apresentando anticorpos antitireoideanos não evoluem necessariamente para hipotireoidismo estabelecido. Além disto, é observada em 6 a 10% da população saudável, a presença de anticorpos anti-TPO sem comprometimento de função tireoideana.^{65,75,95} Pode-se supor, portanto, que há um subgrupo de portadores de anticorpos anti-TPO que não faz lesão da glândula tireóide. Desta forma, é mantida função tireoideana preservada sem achados bioquímicos anormais, ou é desenvolvido hipotireoidismo subclínico que não evolui para hipotireoidismo estabelecido. É possível que estas diferentes evoluções sejam determinadas por padrões funcionalmente diferentes de anticorpos anti-TPO, tais como diferenças na expressão dos isotipos, capacidade de fixar complemento ou desencadear ADCC.

A média da medida da avidéz de anti-TPO, definida como a intensidade de ligação do anticorpo ao antígeno, não foi diferente entre os grupos **hs** e **he**. Entretanto, no grupo **hs**, 13 pacientes (38%) apresentaram avidéz inferior a 40%, enquanto que no grupo **he** 8

pacientes (24%), apresentaram avidéz inferior a 40%. Todas as 3 pacientes do grupo **c** com anticorpos anti-TPO apresentaram avidéz inferior a 40%. Wilson¹⁰¹ pesquisou a avidéz de anticorpos anti-TPO em pacientes com abortamentos de repetição, encontrando avidéz significativamente maior nestas pacientes do que no grupo controle. No presente estudo, nas pacientes do grupo **hs** foi observada correlação positiva entre a medida da avidéz e os níveis de TSH ($r= 0,60$; $p<0,001$) e entre a medida da avidéz e níveis de anti-TPO ($r= 0,48$; $p= 0,008$), bem como correlação negativa com os níveis de T4 livre ($r=-0,41$; $p<0,001$). Apesar do número de pacientes avaliadas no presente estudo ser pequeno e não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, há indicação de que a menor avidéz observada em algumas pacientes, sugeriria menor componente de lesão.

A subclassificação de IgG anti-TPO no grupo portador de hipotireoidismo subclínico demonstrou maior percentual de positividade para IgG1 (71%) e IgG4 (97%), seguidos de IgG3 e IgG2. Não foram encontrados estudos avaliando a subclassificação de IgG anti-TPO na literatura em pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico. Em relação aos subtipos de IgG anti-TPO encontrados para os pacientes portadores de hipotireoidismo estabelecido, houve também maior positividade para IgG1 (67%) e IgG4 (79%). Embora com percentuais diferentes, outros autores encontraram distribuição de subclasses de IgG anti-TPO semelhantes em condições de Tireoidite de Hashimoto com hipotireoidismo estabelecido e em hipotireoidismo associado a tireoidite pós-parto. Em estudo realizado em 13 pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto, hipotireoideos, foram encontrados anticorpos anti-TPO das subclasses IgG1 (49%) e IgG4 (38%), sendo que em somente 1 paciente, foram encontrados anticorpos também IgG3.⁸⁹ McLachlan,⁹¹ avaliando 7 pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto em reposição hormonal (foram avaliados também 21 pacientes portadores de Doença de Graves) descreveu percentuais semelhantes de IgG1 e IgG4, com predomínio evidente de IgG1 (>80% de IgG1), exceto por 1 paciente que apresentou predomínio de IgG4 (52% de IgG4). Os autores fizeram o acompanhamento dos pacientes por período de 2 a 4 anos, observando que apesar de flutuações nos níveis de anticorpo, o padrão de distribuição das subclasses permaneceu relativamente constante para um determinado paciente, sugerindo uma "capacidade individual de reconhecimento de autoantígeno". Achados divergentes dos apresentados foram descritos por Weetman.⁹² Estudando 9 pacientes portadores de hipotireoidismo autoimune, foi observada a presença significativa de IgG2, em detrimento de IgG4. O autor supõe que o valor de IgG4 vinha sendo superestimado nos estudos

anteriores, sendo a diferença atribuída a limitações metodológicas específicas do teste de ELISA.

A distribuição de subclasses de anti-TPO em 9 pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto também foi estudada por Kohno,⁹⁶ comparando com 6 indivíduos saudáveis, que observou predomínio de IgG1 no primeiro grupo e IgG4 no segundo. Também foi avaliada a subclassificação de IgG anti-TPO no acompanhamento de gestantes no período pós-parto. A mesma observação quanto às porcentagens de IgG1 e IgG4 são feitas e é estabelecida associação de desenvolvimento de hipotireoidismo com o predomínio de IgG1.^{90,98} Nestes estudos os autores propõem que, da mesma forma que na tireoidite autoimune pós-parto, a subclassificação de anti-TPO poderia ser usada para a predição de outras variantes de doença tireoideana autoimune.

Pode-se observar que as subclasses IgG1 e IgG4 são as habitualmente encontradas, e que em casos de hipotireoidismo por Tireoidite de Hashimoto e tireoidite pós-parto, situações com lesão tecidual tireoideana definida, há predomínio de IgG1 sobre IgG4. Considerando que os anticorpos anti-TPO sejam responsáveis pela destruição das células epiteliais tireoideanas, a subclasse IgG1 pode ser potencialmente mais destrutiva pela sua capacidade superior de fixar complemento comparada a IgG4¹⁵⁰ e também maior capacidade de induzir ADCC.^{86,94} Desta forma, caso seja possível estabelecer uma relação direta entre a subclasse de IgG e a capacidade do anticorpo mediar destruição da tireóide, a subclassificação de IgG anti-TPO poderia ser usada para ajudar a prever o desenvolvimento de doença estabelecida.

Não há referências a estes dados com relação ao hipotireoidismo subclínico. Os achados do presente estudo, com percentual de positividade maior para IgG4 no grupo **hs** do que **he**, e níveis discretamente mais elevados de IgG4 no grupo **hs**, podem estar associados ao menor componente de lesão tecidual e ao quadro não estabelecido de hipotireoidismo. A limitação do presente estudo quanto ao tempo de conclusão, só permitiu a descrição dos dados obtidos. As pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico serão acompanhadas com avaliações de função tireoideana periódicas para observação da evolução do quadro e a possível associação desta evolução com os achados aqui descritos. É possível, que com o acompanhamento destas pacientes, possa vir a ser feita associação da evolução para hipotireoidismo estabelecido com níveis mais altos de IgG1.

A adoção de um índice (I) para expressão dos resultados da subclassificação dos anticorpos anti-TPO, adaptado de Fukuma,⁹³ permitiu que fossem comparados os níveis

das diferentes subclasses destes anticorpos. No presente estudo, a relação IgG1 / IgG4, utilizada por diversos autores como parâmetro de avaliação, a partir do I, foi maior no grupo **he** do que **hs**, refletindo a presença proporcionalmente maior de IgG1 do que IgG4 no primeiro grupo. Resultados semelhantes foram descritos quando pacientes saudáveis foram comparados com portadores de tireoidite crônica, com relação IgG1 / IgG4 significativamente maior no segundo grupo.⁹⁶ Da mesma forma que inferido anteriormente, é possível que a evolução dos pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico possa estar associada ao seu perfil de isotipos de IgG anti-TPO, e que pacientes com relação IgG1 / IgG4 mais elevada possam ter mais chance de evolução para hipotireoidismo estabelecido.

Os mecanismos envolvidos na regulação da produção de subclasses de IgG autoimunes não estão completamente esclarecidos. Estudos da produção de anticorpos a antígenos exógenos indicam que a restrição de subclasse depende de vários fatores, tais como do padrão de resposta desencadeada (Th1 X Th2), das citocinas derivadas de células T, da forma como o antígeno é apresentado e da natureza do antígeno.

Com relação à avaliação de marcadores inflamatórios, no presente estudo, o percentual de positividade das dosagens de citocinas foi pequeno e semelhante nos três grupos estudados, dificultando comparações. De maneira geral, foram encontrados níveis mais baixos nos pacientes hipotireoideos, e níveis semelhantes entre os portadores de hipotireoidismo subclínico e controle.

Não foi detectada presença de IL-1 em nenhuma das pacientes estudadas. Apesar de estarem descritas suas interações com a célula folicular tireoideana e envolvimento no complexo de comunicação intercelular,¹²² não foram encontradas outras referências descrevendo níveis séricos de IL-1 e sua associação com disfunção da glândula tireóide. É possível que a baixa detectabilidade desta citocina se deva ao fato de ter sido dosada IL-1 α e não IL-1 β , uma vez que esta última é a forma predominantemente solúvel.¹⁵¹

O IFN- γ também não foi detectado em nenhuma das amostras testadas. Não foram encontradas na literatura referências aos níveis séricos endógenos de IFN- γ associados a disfunção tireoideana. Há, no entanto, relação descrita entre o uso terapêutico de IFN- α (com propriedades distintas de IFN- γ) e disfunção tireoideana, sendo observados níveis flutuantes de anticorpos antitireoideanos nesta condição.²⁴

Os níveis de TNF- α foram significativamente mais baixos em pacientes do grupo **he** do que nos grupo **hs** e **c**. O número de pacientes com níveis detectáveis de TNF- α foi bastante modesto, com 3 pacientes (8%) no grupo **hs**, 4 pacientes (14%) no grupo **c** e 2 pacientes (6%) no grupo **he**, o que dificulta associações com outros parâmetros avaliados. No entanto, foi observada correlação positiva entre os níveis de TNF- α e T4 livre, nos dois grupos de pacientes portadores de hipotireoidismo estudados. Conforme observado na figura 6 do anexo IV, esta correlação no grupo **hs** é devida a somente um ponto, o que a torna questionável. Chopra¹⁵² estudando os níveis de TNF- α em portadores de Doença Não Tireoideana (Síndrome do Eutireoideano Doente), também encontrou esta correlação positiva entre os níveis de TNF- α e os níveis de T4 livre. Nas pacientes do grupo **he** houve correlação negativa entre os níveis de TNF- α e TSH. Estes achados poderiam sugerir um efeito protetor de TNF- α , porém os mecanismos fisiopatológicos que pudessem justificar tal relação não são ainda conhecidos.

Em relação à dosagem de IL-6, 5 pacientes de cada grupo, **hs** e **c** (15% e 18% respectivamente) e 2 pacientes (6%) do grupo **he**, apresentaram níveis detectáveis, sendo que a média dos níveis dos dois pacientes do grupo **he**, foi significativamente mais baixa do que nos outros grupos. Foi observada correlação positiva entre os níveis de IL-6 e TNF- α nas pacientes do grupo **he**. O aumento dos níveis séricos de IL-6 em situações de tireoidite subaguda e tireoidite induzida por amiodarona, foi descrito como situações de ocorrência transitória¹⁵³ e a presença de IL-6 em tecido tireoideano, tanto em doença autoimune como “não-autoimune” também já foi demonstrada.^{118,135} Apesar de ter sido sugerido que a secreção de IL-6 pelas células foliculares está sob controle de TSH, não foram encontradas referências à associação de níveis séricos desta citocina com o TSH e no presente estudo não foi observada tal correlação.

IL-10 foi detectada em um paciente de cada grupo de estudo. O nível maior foi encontrado no grupo **hs**, seguido dos grupos **he** e **c**. La Vega¹³² descreveu menor expressão gênica de IL-10 em tirócitos nos quadros de Tireoidite de Hashimoto com hipotireoidismo estabelecido, a que se referiu como em "estágio final de destruição". Tal fato sugere que a participação de IL-10 na patogênese seria mais relevante em estágios mais precoces do processo de doença, com redução da expressão gênica em estágio mais avançado. Desta forma, poder-se-ia supor que os níveis séricos pudessem ter a mesma correlação, a partir da observação neste estudo, de nível mais baixo nos pacientes hipotireoideos. É possível que a detecção de IL-10 mais elevado em paciente do grupo **hs**, possa

corresponder a uma fase inicial de lesão. Não houve associação dos níveis de IL-10 com os níveis de anti-TPO em nenhum dos grupos, contrariamente ao que descreve La Vega.¹³² Deve-se salientar, porém, que a limitação de detectabilidade em somente 1 paciente e as diferentes técnicas de avaliação utilizadas (ELISA x RT-PCR) dificultam a comparação entre os estudos.

A presença de expressão de genes para citocinas / marcadores inflamatórios em células tireoideanas foi descrita em vários estudos.^{111,120,121} O baixo percentual de detecção de citocinas séricas no presente estudo talvez possa se dever à ação autócrina e parácrina destas substâncias, que podem exercer sua ação de forma local, sem necessariamente ter interferência com seus níveis séricos.

Não houve diferenças entre as dosagens de neopterinina nos três grupos de estudo. Estes dados estão em concordância com os achados de Wagner,¹⁴² que descreveu não haver diferença entre os níveis de neopterinina em pacientes com tireoidite e saudáveis. No presente estudo não foi observada correlação entre os níveis de neopterinina e os níveis de anti-TPO, como descrito por Kondera-Anasz,¹⁴³ que demonstrou haver correlação negativa entre eles.

O presente estudo descreve a medida da avidéz e a subclassificação de IgG anti-TPO, bem como os níveis séricos de marcadores inflamatórios em pacientes portadores de hipotireoidismo subclínico. Foi relevante a observação de predomínio de IgG1 e IgG4 neste grupo de pacientes com maior percentual de positividade para IgG4. Vale ressaltar a diferença observada na relação IgG1/IgG4 entre as pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico e estabelecido, com relação menor no primeiro grupo. Este estudo é essencialmente descritivo. O acompanhamento das pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico submetidas ao estudo tornará possível a análise destes dados à luz da sua evolução.

6. CONCLUSÕES

- A subclassificação de IgG anti-TPO nas amostras de soro das pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico demonstrou a presença de subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, com predomínio de IgG1 e IgG4, semelhante ao encontrado para o grupo de pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido. No hipotireoidismo subclínico foi observado maior percentual de positividade para IgG4.
- A relação IgG1/IgG4 de IgG anti-TPO foi significativamente menor no grupo de pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico do que no grupo de pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido.
- Não houve correlação entre a relação IgG1/IgG4 e os níveis de TSH.
- Não houve diferença entre as medidas de avidéz de anticorpos anti-TPO em pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico e pacientes portadoras de hipotireoidismo estabelecido.
- Os níveis séricos de marcadores inflamatórios foram de muito pequena ocorrência nas pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico, hipotireoidismo estabelecido e grupo controle, com detectabilidade de IL-6 em 14,7% das pacientes, TNF- α em 8,8% e IL-10 em 3% das pacientes portadoras de hipotireoidismo subclínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ingbar SH. Thyroid. In: Williams Textbook of Endocrinology, W.B. Saunders Company, 1985. p.701
2. DeGroot LJ. Adult Hypothyroidism 2000.
<http://www.thyroidmanager.org/thyroidbook.htm> ou <http://www.thyroidmanager.org/chapter9/9-frame.htm>
3. Spencer CA, LoPresti JS, Paatel A et al. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:453-460.
4. Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN, et al. American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. *JAMA* 1990; 263:1529-1532.
5. Becker DV, Bigos ST, Gaitan E et al. Optimal use of blood tests for assesment of thyroid function. *JAMA* 1993; 269:2736-2737.
6. Arbelle JE, Porath A. Practice guidelines for the detection and management of thyroid disfunction. A comparative review of the recommendations *Clin Endocrinol* 1999; 51:11-8
7. Zulewski H, Müller B, Exer P, Miserez A, Staub JJ. Estimation of tissue hypothyroidism by a new clinical score: evaluation of patients with various grades of hypothyroidism and controls. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82 (3):771-776.
8. Staub JJ, Althaus BU, Engler H, Ryff AS, Trabucco P, Marquardt K, Burckhardt D, Girardi J, Weintraul BD. Spectrum of subclinical and overt hypothyroidism: effect on thyrotropin, prolactin and thyroid reserve and metabolic impact on peripheral target tissues. *Am J Med* 1992; 92 (6):631-42.
9. Riniker M, Tieche M, Lupi GA et al. Prevalence of various degrees of hypothyroidism among patients of a general medical department. *Clin Endocrinol* 1981; 14:69-74.
10. Tunbridge WMG, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Grimley Evans J, Young E, Bird T, Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham Survey *Clin Endocrinol* 1977; 7:481-93.
11. Helfand M, Redfern CC. Screening for thyroid disease: an update. *Ann Int Med* 1998; 129:144-158.
12. Wallace K, Hofmann MT. Thyroid disfunction: how to manage overt and subclinical disease in older patients. *Geriatrics* 1998;53 (4): 32-8.
13. Braverman LE. Subclinical hypothyroidism and hyperthyroidism in elderly subjects: Should they be treated? *J Endocrinol Invest* 1999; 22(Suppl 10):1-3.
14. Jaechske R, Guyatt G, Gerstein H, Patterson C, Molloy W, Cook D, Harper S, Griffith L, Carbotte R. Does treatment with L-thyroxine influence healthy status in middle-aged and older adults with subclinical hypothyroidism? *Journal of General Intern Med* 1996; 11(12):744-749.

15. Smallridge RC. Disclosing subclinical thyroid disease. An approach to mild laboratory abnormalities and vague or absent symptoms. *Postgrad Med J* 2000; 107(1):143-6.
16. Elte JW, Mudde AH, Nieuwenhvijsen Kruseman AC. Subclinical thyroid disease *Postgrad Med J* 1996; 72(845):141-6.
17. Danese MD, Powe NR, Sawin CT, Laadenson PW. Screening for mild thyroid failure at the periodic health examination: a decision and cost-effectiveness analysis. *JAMA* 1996; 276:285-92.
18. Surks MI, Ocampo E. Subclinical thyroid disease. *Amer J Med* 1996; 100:217-223.
19. Cooper DS. Subclinical Thyroid Disease: a clinician's perspective. *Ann Int Med* 1998; 129:135-138.
20. Benediktsson R, Toft AD. Management of the unexpected result: compensated hypothyroidism. *Postgrad Med J* 1999; 74(878): 729-32.
21. Ayala AR, Wartofsky L. Minimally Symptomatic (subclinical) hypothyroidism *Endocrinologist* 1997; 7:44-50.
22. Bastenie PA, Vanhaelst L, Neve P. Coronary arterial disease in hypothyroidism: observations in preclinical Myxedema *Lancet* 1967; ii:1221-2
23. Surks MI, Sievert R. Drugs and thyroid function. *New Engl J Med* 1995; 333:1688-1694.
24. Koh LKH, Greenspan FS, Yeo PPB 1997 Interferon-alpha induced thyroid dysfunction: three clinical presentations and a review of the literature. *Thyroid* 7:891-896
25. Krouse RS; Royal RE; Heywood G; Weintraub BD. Thyroid dysfunction in 281 patients with metastatic melanoma or renal carcinoma treated with interleukin-2 alone. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995 Nov;18(4):2-8
26. Tunbridge WMG, Brewis M, French JM et al. Natural history of autoimmune thyroiditis. *Br Med J* 1981; 1:258-262.
27. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, Grimley Evans J, Hasan DM, Rodgers H, Tunbridge F, Toung ET. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clin Endocrinol* 1995; 43:55-68.
28. Canaris GJ, Manowitz N, Ridgeway EC. Prevalence of abnormal TSH, lipid abnormalities, and symptoms of thyroid disease a large observational cohort. [abstract] *American Thyroid Association* 1997; 244 (S-123).
29. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgeway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000; 28;160(4):526-34
30. Gordin A, Lamberg BA. Spontaneous hypothyroidism in symptomless autoimmune thyroiditis: A long-term follow-up study. *Clin Endocrinol* 1981; 15:537-543.
31. Rosenthal MJ, Hunt WC, Garry PJ, Goodwin JS. Thyroid Failure in the Elderly. Microsomal antibodies as discriminant for therapy *JAMA* 1987; 258: 209-13.
32. Kabadi UM. "Subclinical Hypothyroidism": natural course of the syndrome during a prolonged follow-up study. *Arch Int Med* 1993; 26;153(8):957-961.
33. Samuels MH. Subclinical thyroid disease in the elderly *Thyroid* 1998; 8(9):803-13.

34. Adlin V. Subclinical Hypothyroidism: deciding when to treat. *Am Fam Physician* 1998; 57(4):776-780.
35. Kabadi UM, Cech K. Normal thyroxine and elevated thyrotropin concentrations: evolving hypothyroidism or persistent euthyroidism with reset thyrostat. *J Endocrinol Invest* 1997; 20:319-326.
36. Di Bello V, Monzani F, Giorgi D, Bertini A, Caraccio N, Valenti G, Talini E, Paterni M, Ferrannini E, Giusti C. Ultrasonic myocardial textural analysis in subclinical hypothyroidism. *J Am Soc Echocardiogr* 2000 Sep; 13(9):832-40.
37. Biondi B, Fazio S, Palmieri EA, Carella C, Panza N, Cittaadani A, Bone F, Lombardi G, Sacca L. Left ventricular diastolic dysfunction in patients with subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(6): 2064-7.
38. Ridgway EC, Cooper DS, Walker H, Rodbard D, Maloof F. Peripheral responses to thyroid hormone before and after L-thyroxine therapy in patients with subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53(6):1238-42.
39. Cooper DS, Halpern R, Wood LC, Levin AA, Ridgway EC. L-thyroxine therapy in subclinical hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1984; 101:18-24.
40. Arem R, Rokey R, Kiefe C, Escalante DA, Rodriguez A. Cardiac systolic and diastolic function at rest and exercise in subclinical hypothyroidism: effect of thyroid hormone therapy. *Thyroid* 1996; 6(5): 397-402.
41. Maciel LMZ, Del Corso C, Schmidit A, Iazigi N, Tavares G, Almeida Filho OC, Maciel BC. Systolic and diastolic function in patients with subclinical hypothyroidism: effects of thyroid therapy. [Abstract] *American Thyroid Association* 1997; 64 (S-32).
42. Mantzoros CS, Evagelopoulou K, Moses AC. Outcome of percutaneous transluminal coronary angioplasty in patients with subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 1995; 5(5):383-7.
43. Lekakis J, Papamichael C, Alevizak M, Pipingos G, Marafelia P, Mantzos J, Stamatelooulos S, Koutras DA. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in subjects with hypothyroidism, borderline hypothyroidism, and high-normal serum thyrotropin. *Thyroid* 1997; 7(3):411-4.
44. Althaus BU, Staub JJ, Ryff A, Oberhänsli A, Stähelin HB. LDL/HDL-changes in subclinical hypothyroidism: possible risk factors for coronary heart disease. *Clin Endocrinol* 1988; 28:157-163.
45. Hak AE, Pols HA, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JC. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med* 2000; 132(4): 270-8.
46. Bindels JG, Westendorp RG, Frolich M, Seidells J, Blocksstrat A, Smelt AHM. The prevalence of subclinical hypothyroidism at different total plasma cholesterol levels in middle aged men and women: a need for case-finding? *Clin Endocrinol* 1999; 50:217-20.
47. Tsimihodimos V, Bairaktari E, Tzallas C, Miltiadus G, Liberopoulos E, Elisaf M. The incidence of thyroid function abnormalities in patients attending an outpatient lipid clinic. *Thyroid* 1999; 9(4):365-8.
48. Kung AW, Pang RW, Janus ED. Elevated serum lipoprotein(a) in subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:445-449.

49. Pirich C, Mullner M, Sinzinger H. Prevalence and relevance of thyroid dysfunction in 1922 cholesterol screening participants. *J Clin Epidemiol* 2000; 53(6):623-9.
50. Bogner U, Arntz HR, Peters H, Schleusener H. Subclinical Hypothyroidism and hyperlipoproteinaemia: indiscriminate L-thyroxine treatment not justified *Acta Endocrinol* 1993; 128: 202-6.
51. Tanis BC, Westendorp GJ, Smelt HM. Effect of thyroid substitution on hypercholesterolaemia in patients with subclinical hypothyroidism: a reanalysis of intervention studies *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44(6):643-9.
52. Monzani F, Del Guerra P, Caraccio N, Pruneti CA, Pucci E, Luisi M et al. Subclinical Hypothyroidism: neurobehavioral features and beneficial effect of L-thyroxine treatment. *Clin Investig* 1993; 71:367-371.
53. Haggerty JJJ, Stern RA, Mason GA, Beckwith J, Morey C, Prange AJ. Subclinical hypothyroidism: a modifiable risk factor for depression? *Am J Psychiatry* 1993; 150(3):508-10.
54. Baldini IM, Vita A, Mauri MC, Amodei V, Carrisi M, Bravin S, Cantalamessa L. Psychopathological and cognitive features in subclinical hypothyroidism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1997; 21 (Issue 6):925-35.
55. Beyer IW; Karmali R; Demeester-Mirkin N; Cogan E; Fuss MJ Serum creatine kinase levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 1998; 8 (Issue 11):1029-31.
56. Monzani F, Caraccio N, Siciliano G, Manca L, Muni L, Ferrannini E. Clinical and biochemical features of muscle dysfunction in subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3315-3318.
57. Goulis DG, Tsimpiris N, Delaroudis S, Maltas B, Tzoti M, Dagilas A, Avramides A. A stapedial reflex: a biological index found to be abnormal in clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 1998; 8(Issue 7):583-7.
58. Ozata M, Ozkardes A, Corakci A, Gundogan MA. Subclinical hypothyroidism does not lead to alterations either in peripheral nerves or in brainstem auditory evoked potentials (BAEPs). *Thyroid* 1995; 5(Issue 3):201-5.
59. Misiunas A, Niepomniszcz H, Ravera B, Faraj G, Faure E. Peripheral neuropathy in subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 1995; 5(Issue 4):283-6.
60. Wilansky DL, Greisman B. Early hypothyroidism in patients with menorrhagia. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160:673-7.
61. Tolino A, Nicotra M, Romano L, Petrone A, Langella L. Subclinical hypothyroidism and hyperprolactinemia. *Acta Eur Fertil* 1991; 22 (Issue 5):275-7.
62. Bals-Pratsch M, De Geyter C, Muller T, Frieling U, Lerchl A, Pirke KM, Hanker JP, Becker-Carus C, Nieschlag E. Episodic variations of prolactin, thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, melatonin and cortisol in infertile women with subclinical hypothyroidism. *Hum Reprod*; 1997; 12(Issue 5):896-904.
63. Koutras DA. Subclinical Hypothyroidism. 1999
<http://www.thyrolink.com/html/thyint/journal/3-99int.htm>
64. Ayala AR, Danese MD, Ladenson PW. When to treat mild hypothyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29(2):399-415.

65. Baker BA, Ghavib H, Markovitz H. Correlation of thyroid antibodies and cytologic features in suspected autoimmune thyroid disease. *Am J Med* 1983; 74:941-49.
66. Salvi M, Fukazawa H, Bernard N, Hiromatsu Y, How J, Wall JR. Role of autoantibodies in the pathogenesis and association of endocrine autoimmune disorders. *Endocrine Rev* 1988; 9(4):450-466.
67. Pinchera A, Mariotti S, Vitti P, Marcocci C, Chiovato L, Fenzi GF, Santini F. Thyroid autoantigens and their relevance in the pathogenesis of thyroid autoimmunity. *Biochimie* 1989; 71(2):237-245.
68. Mariotti S, Chiovato L, Vitti P, Marcocci C, Fenzi GF, DelPrete GF, Tisi A, Romagnani S, Ricci M, Pinchera A. Recent advances in the understanding of humoral and cellular mechanisms implicated in thyroid autoimmune disorders. *Clin Immun and Immunopath* 1989; 50:373-384.
69. Kontiainen S, Melamies L, Miettinen A, Weber T. Thyroid autoantibodies in serum samples with abnormal TSH levels. *APMIS* 1994; 102(9):716-720.
70. Dorizzi R, Giavarina D, Moghetti P, Castello R: Anti-TPO and antithyroglobulin antibodies or anti-TPO antibodies alone? *Clin Endocrinol* 1997; 46:235-238.
71. Rasmussen UF, Madsen MH, Bech K, Toft MB, Bliddal H, date J, Samsøe BD, Hegedus L, Hippe E, Hornnes PJ, Kriegbaum NJ, Muller M, Perrild H, Rasmusson B, Schouboe A. Anti-thyroid Peroxidase antibodies in thyroid disorders and non-thyroid autoimmune diseases *Autoimmunity* 1991; 9:245-53.
72. Nordyke RA, Gilbert FI, Miyamoto LA, Fleury KA. The superiority of antimicrosomal over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's Thyroiditis. *Arch Int Med* 1993; 153:862-865.
73. Konishi J, Kasagi K, Iida Y. Thyroid stimulation blocking antibodies – na overview. In: Nagataki S, Mori T, Torizuka K, eds, *80 Years of Hashimoto disease*. Amsterdam: Elsevier Science, 1993; p.573-7.
74. Chiovato L, Vitti P, Santini F, Lopez G, Mammoli C, Bassi P, Giusti L, Tonacchera M, Fenzi G, Pinchera A. Incidence of antibodies blocking thyrotropin effect in vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(1):40-45.
75. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(3):661-669.
76. Doullay F, Ruf J, Cidaccioni JL, Crayon P. Prevalence of autoantibodies to thyroperoxidase in patients with various thyroid and autoimmune diseases *Autoimmunity* 1991; 9(3):237-44.
77. Zimmer KP, Sheumann GFW, Bramswig J, Bocker W, Harms E, Schmid KW. Ultrastructural localization of IgG and TPO in autoimmune thyrocytes referring to the transcytosis of IgG and the antigen presentation of TPO *Histochem Cell Biol* 1997; 107:115-20.
78. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P, Pinchera A. Antibodies Producing Complemento-Mediated Thyroid Cytotoxicity in Patients with Atrophic or Goitrous Autoimmune Thyroiditis *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(6): 1700-5.

79. Parkes AB, Williams SR, Howells RD, Harris R, Lazarus JH, Waters JS, Hall R. The measurement of complement fixation by autoantibodies directed against thyroid membrane antigens. *J Clin Lab Immunol* 1991; 35(1):1-7.
80. Parkes AB, Orthman S, Hall R, John R, Lazarus JH. Role of complement in the pathogenesis of postpartum thyroiditis: relationship between complement activation and disease presentation and progression. *Eur J Endocrinol* 1995; 133:210-215.
81. Rodien P, Madre AM, Ruf J, Rajas F, Bornet H, Carayon P, Orgiazzi J. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in autoimmune thyroid disease: relationship to anti-thyroperoxidase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(17):2595-2600.
82. Kuijpers JL, De Hann-Meulmann M, Vader HL, Pop VJ, Wiersinga WM, Drexhage HA. Cell mediated immunity and pos-partum thyroid dysfunction: a possibility for the prediction of the disease? *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; 83(6): 1956-66.
83. Okamoto Y, Hamara N, Saito H, Ohno M, Noh J, Ito K, Morii H. Thyroid Peroxidase Activity-Inhibiting Immunoglobulins in Patients with Autoimmune Thyroid Disease *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68(4):730-4.
84. Saller B, Hörmann R, Mann K. Heterogeneity of Autoantibodies against Thyroid Peroxidase in Autoimmune Thyroid Disease: Evidence against Antibodies Directly Inhibiting Peroxidase Activity as Regulatory Factors in Thyroid Hormone Metabolism *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(1): 188-95.
85. French M. Serum IgG subclasses in normal adults. *Monogr Allergy* 1986; 19:100-107.
86. Burton D, Woof JM. Human antibody effector function *Adv Immunol* 1992; 51:1-84.
87. Holm G, Engwall E, Hammastrom S, Natvig JB. Antibody-induced hemolytic activity of human blood monocytes. The role of antibody class and subclass. *Scand J Immunol* 1974; 3:173-180.
88. Kotani T, Kato E, Hirai K, Kuma K, Ohtaki S. Immunoglobulin G Subclasses of Anti-thyroid Peroxidase Autoantibodies in Human Autoimmune Thyroid Diseases *Endocrinol Japon* 1986; 33(4): 505-510.
89. Parkes AB, McLachlan SM, Bird P et al. The distribution of microsome and thyroglobulin antibody activity among the IgG subclasses. *Clin Exp Immunol* 1984; 57:239-243.
90. Jansson R, Thompson PM, Clark F et al. Association between thyroid microsome antibodies of subclass IgG1 and hypothyroidism in autoimmune postpartum thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 1986; 63:80.
91. McLachlan SM, Feldt-Rasmussen U, Young ET, Middleton SL, Blichert-Toft M, Sierksboeck-Nielsen K, Date J, Carr D, Clark F, Smith BR. IgG subclasses distribution of thyroid autoantibodies: a 'fingerprint' of an individual's response to thyroglobulin and thyroid microsome antigen. *Clin Endocrinol* 1987; 226: 335-346.
92. Weetman AP, Black CM, Cohen SB, Tomlinson R, Banga JP, Reimer CB. Affinity purification of IgG subclasses and the distribution of thyroid antibody reactivity in Hashimoto's thyroiditis. *Scand J Immunol* 1989; 30: 73-82.
93. Fukuma N, McLachlan SM, Petersen VB, Beaver K, Smith BR. Relationship between thyroid autoantibody spectrophotype and IgG subclass. *Autoimmunity* 1990; 6:37-45.

94. Guo J, Jaume JC, Rapoport B, McLachlan SM. Recombinant thyroid peroxidase-specific Fab converted to immunoglobulin G (IgG) molecules: evidence for thyroid cell damage by IgG1, but not IgG4 autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3):925-931.
95. Kohno Y, Yamaguchi F, Saito K, Niimi H, Nishikawa T, Hosoya T. Antithyroid peroxidase antibodies in sera from healthy subjects and from patients with chronic thyroiditis: differences in the ability to inhibit thyroid peroxidase activities. *Clin Exp Immunol* 1991; 85:459-463.
96. Kohno Y, Kijima M, Yamaguchi F, Saito K, Tsunoo H, Hosoya T, Niimi H. Comparison of the IgG subclass distribution of antithyroid peroxidase antibodies in healthy subjects with that in patients with chronic thyroiditis. *Endocrinol J* 1993; 40(3):317-321.
97. Guo J, Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid peroxidase autoantibodies of IgE class in thyroid autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82(2):157-62.
98. Briones-Urbina R, Parkes AB, Bogner U, Mariotti S, Walfish PG. Increase in antimicrosomal antibody-related IgG1 and IgG4, and titers of anti-thyroid peroxidase antibodies, but not antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in post-partum thyroiditis with transient hyperthyroidism. *J Endocrinol Invest* 1990; 13(11): 879-86.
99. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Antibodies and Antigens. In: Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Company, 4th ed, p.56-61, 2000.
100. Hedman K, Sepalla I: Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Clin Immunol* 1988; 8:214-221.
101. Wilson R, Ling H, MacLean MA, Mooney J, Kinnane D, McKillop JH, Walker JJ. Thyroid antibody titer and avidity in patients with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 1999 mar; 71(3):558-61.
102. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Velluzzi F, Martino E. Relationship of the increased serum interleukin-6 concentration to changes of thyroid function in nonthyroidal illness. *J Endocrinol Invest* 1994; 17:269-74
103. Komorowski J. Increased interleukin-2 level in patients with primary hypothyroidism. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;63(2):200-2.
104. Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri M, Giuliani N, Minelli R, Braverman LE, Roti E. Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-receptors in patients with Grave's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(8):2976-9.
105. Ward PA, Warren JS, Johnson K. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 1988; 5 (5-6): 403-8.
106. Luscinskas, FW, Cybuisky, MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MA Jr. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leucocyte adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 1991; 146: 1617.
107. Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines in acute inflammation. *Curr Opin Hematol* 1993:26-31, 1993.
108. Rothwell NJ. The endocrine significance of cytokines. *J Endocrinol* 1991; 128(2):171-3.
109. Sato K, Sato HT, Shizume K et al. Inhibition of ¹²⁵I organification and thyroid hormone release by interleukin-1, tumour necrosis factor- α and interferon- γ in human thyrocytes in suspension culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:1745-53.

110. Minelli R, Girasole G, Pedrazzoni M, Giuliani N, Schianchi C, Giuberti T, Braverman LE, Salvi M, Roti E. Lack of increased serum interleukin-6 and soluble IL-6 receptor concentrations in patients with thyroid diseases following recombinant human interferon alpha therapy. *J Investig Med* 1996; 44(6):370-4.
111. Ajjan RA, Watson PF, Mcintosh RS, Weetman AP. Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis *Clin Exp Immunol* 1996; 105:523-528.
112. Lucas-Martin A, Foz-Sala M, Todd I, Bottazzo GF, Pujol-Borrel R. Occurrence of thyrocyte HLA class II expression in a wide variety of thyroid diseases: relationship with lymphocytic infiltration and thyroid antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:367-71.
113. Paolieri F, Salmaso C, Battifora M, Montagna P, Pesce G, Bagnasco M, Richiusa P, Galluzzo A. Possible Pathogenetic Relevance of Interleukin-1 β in "Destructive" Organ-specific Autoimmune Disease (Hashimoto's thyroiditis). *Ann N Y Acad Sci* 1999; 876:221-8.
114. Del Prete GF, Tiri A, Mariotti S, Pinchera M, Rici M, Romagnini S. Enhanced production of IFN- γ by thyroid-derived T cell clones from patients with Hashimoto's Thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 1987; 69:323-31.
115. Piza AT, Santos JL, Chaves LB, Zanetti CR. An ELISA test suitable for the detection of virus neutralizing antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell-culture vaccine or suckling mouse brain vaccine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1999; 41(1):39-43.
116. Del Prete GF, Vercelli D, Tiri A et al. High potential to tumour necrosis factor- α production of thyroid infiltrating lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis: a peculiar feature of thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 1989; 4:267-76.
117. Tominaga T, Yamashita S, Nagayama Y et al. Interleukin-6 inhibits human thyroid peroxidase gene expression *Acta Endocrinol* 1991; 124:290-6.
118. Grubeck-Loebenstein B, Buchan G, Chantry D et al. Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1 α and interleukin-6. *Clin Exp Immunol* 1989; 77:324-30.
119. Weetman AP. The potential immunological role of the thyroid cell in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 1994; 4(4):493-9.
120. Heuer M, Aust G, Ode-Hakim S, Scherbaum WA. Different cytokine mRNA profiles in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, and nonautoimmune thyroid disorders determined by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Thyroid* 1996;6(2):97-106.
121. Watson PF, Pickeril AP, Davies R, Weetman AP. Analyses of cytokine gene expression in Graves' disease and multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 355-60.
122. Rasmussen AK, Benstzen K, Feldt-Rasmussen U. Thyrocyte-interleukin-1 interactions *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108.
123. Migita K, Eguchi K, Tezuka H et al. Cytotoxic activity of interleukin-2 activated killer cells toward thyroid epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 196-201.

124. Sato K, Yamazaki K, Shizume K et al Pathogenesis of autoimmune hypothyroidism induced by lymphokine-activated killer (LAK) cell therapy: *in vitro* inhibition of human thyroid function by interleukin-2 in the presence of autologous intrathyroidal lymphocytes. *Thyroid* 1993; 3:179-88
125. Vassilopoulou-Sellin R, Sella A, dexeus FH, Theriault RL, Pololoff DA Acute thyroid dysfunction (thyroiditis) after therapy with interleukin-2. *Horm metab Res* 1992; 24(9): 434-8
126. Kroemer G, Francese C, Martinez C. The role of interleukin 2 in the development of autoimmune thyroiditis. *Int Rev Immunol* 1992; 9(2): 107-23.
127. Mossmann TR. Properties and function of IL-10 *Adv Immunol* 1994; 56:1-26.
128. Powrie F, menon S, Coffman RL. Il-4 and IL-10 synergize to inhibit cell mediated immunity *in vivo*. *Eur J Immunol* 1993; 23:3043-9.
129. Brennan FM, Feldmann M. Cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:872-7.
130. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mossmann TR, Howard M, O'Garra AO. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147:3815-22.
131. De Wall-Malefyt R, Haanen J, Spitis H et al. IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II MHC expression. *J Exp Med* 1992; 174:915-24.
132. La Vega JR, Vilaplana JC, Biro A, Hammond L, Bottazzo GF, Mirakian R IL-10 expression in throid glands: protective or harmful role against thyroid autoimmunity? *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 126-135.
133. Vargas F, Tolosa E, Sospedra M et al. Characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in thyroid follicular cells: induction by cytokines and over-expression in autoimmune glands. *Clin Exp Immunol* 1994; 98:478-88.
134. Taverne J, Rayner DC, Van Der Meide PH, Lydyard PM, bidey SP, Cooke A. Cytotoxicity of tumor necrosis factor for thyroid epithelial cells and its regulation by interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1987; 17:1855-8.
135. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Rago T, Vitti P, Pinchera A, Martino E. Interleukin-6: a marker of thyroid-destructive processes? *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1424-7.
136. Van Sinck J. Interleukin-6: an overview *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-78.
137. Ahmad L, Parkes A, Lazarus J, Bartalena L, Martino E, Diamond E, Stagnaro-Green A. Interleukin-6 levels are not increased in women with postpartum thyroid dysfunction. *Thyroid* 1988 May;8(5):371-5.
138. Houssiau FA, Coulie PG, Olive D, Van Snick J. Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6. *Eur J Immunol* 1988;18: 653-8.
139. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Martino E. Interleukin-6 and the thyroid. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:386-93.

140. Fuchs D, Weiss G, Wachter, H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int. Arch. Allergy Immunol* 1993; 101:1-6.
141. Schlomburg A, Grunwald F, Schultes B, Hotze A, bender H, Biersack HJ. Are serum neopterin concentrations superior to other parameters in the differential diagnosis and prognostic assessment of Graves' disease? *Exp Clin Endocrinol* 1996;104(2):123-9.
142. Wagner R, Hayatghebi S, Rosenkranz M, Reinwein D Increased serum neopterin levels in patients with Graves' disease *Exp Clin Endocrinol* 1993;101(4):249-54.
143. Kondera-Anazs Z, Mertas A, Jochemczyk J. Level of neopterin in blood serum in selected thyroid diseases. *Pol Arch Med Wewn* 1997;97(5):418-25.
144. Sawin CT, Chopra D, Azizi F, Mannix JE, Bacharach P The aging thyroid. Increased prevalence of elevated serum thyrotropin levels in the elderly. *JAMA*1979;242:247-50.
145. Parle JV, Franklin JA, Cross KW, Jones SC, Sheppard MC. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom *Clin Endocrinol* 1991; 34: 77-83.
146. Brochmann H, Bjoro T, Baarder PI, Hanson F, Frey HM. Prevalence of thyroid dysfunction in elderly subjects. A randomized study in a Norwegian community (Naeroy) *Acta Endocrinol* 1988; 117:7-12.
147. Billewicz WZ, Chapman RS, Crooks J et al. Statistical methods applied to the diagnosis of hypothyroidism. *Q J Med* 1969;38:255-266.
148. Doucet J, Trivalle CH, Chassagne PH, Perol MB, Vuillermet P, Manchon ND, Menard JF, Bercoff E. Does aage play a role in the clinical presentation of hypothyroidism? *J Am Geriatrics Soc* 1994; 42: 984-6.
149. Huber G, Mitrache C, Guglielmetti M, Huber P, Staub JJ. Predictors of overt hypothyroidism and natural course: a long term follow-up study in impending thyroid failure. [abstract] *American Thyroid Association* 1997;4 (S-2).
150. Dean BM, Bottazzo GF, Cudworth AG. IgG subclasses distribution in organ specific autoantibodies. The relationship to complement fixing activity. *Clin Exp Immunol* 1983; 52:61-66.
151. Dinarello CA, Wolf SM. The role of Interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 528(2):106-13.
152. Chopra IJ, Sakane S, Teco GN. A study of the serum concentration of Tumor Necrosis Factor-alpha in thyroidal and nonthyroidal illnesses *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(15):1113-6.
153. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Martino E. Increased serum interleukin-6 concentration in patients with subacute thyroiditis: relationship with concomitant changes in serum T4-binding globulin concentration. *J Endocrinol Invest* 1993; 16:213-8.
154. Kotani T, Umeki K, Matsunaga S, Kato E, Ohtaki S. Detection of autoantibodies to thyroid peroxidase in autoimmune thyroid diseases by microELISA and immunoblotting. *J Clin Endocrinol Metab* 1986a; 62:928-933.
155. Hamada N, Grimm C, Mori H, DeGroot LJ. Identification of a thyroid microsomal antigen by Western blot and immunoprecipitation. *J Clin Endocr Metab* 1985;61:120-8.

156. Mariotti S, Anelli S, Ruf J, Bechi R, Czarnocka B, Lombardi A, Carayon P, Pinchera A. Comparison of serum thyroid microsomal and thyroid peroxidase antibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 987-93.
157. Portmann L, Fitch FW, Havran W, Hamada N, Franklin WA, DeGroot JL. Characterization of the thyroid microsomal antigen and its relationship to thyroid peroxidase, using monoclonal antibodies. *J Clin Investig* 1988; 81: 1217-24.

ANEXOS

ANEXO 1

**APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA MÉDICA EM PESQUISA COM SERES
HUMANOS**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE - CAIXA POSTAL 476
CEP 88.010-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA CATARINA
TEL.: (048) 234-1000 - FAX: (048) 234-4069

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Parecer

Processo nº: 009/99

Projeto de Pesquisa: Perfil Imunológico do Hipotireoidismo Subclínico

Pesquisador Responsável: Carlos Roberto Zanetti

Instituição: UFSC

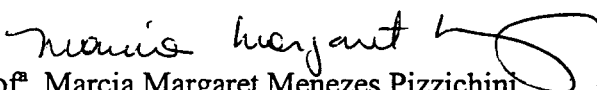
Parecer dos Relatores:

- aprovado
- com pendência (detalhes pendência)*
- retirado
- aprovado e encaminhado ao CONEP

Justificativa: O projeto é bem descrito e fundamentado, contendo todas as etapas necessárias; o tema é relevante; o pesquisador revela conhecimentos sobre o assunto. Inclui toda a documentação necessária e está de acordo com os termos das Resoluções 196/96 e 251/97 e que todas as pendências foram adequadamente esclarecidas pelo pesquisador responsável. O parecer é pela aprovação do presente projeto e consentimento informado.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado, por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 07/06/99.

Florianópolis, 09/06/99.


Prof^a Marcia Margaret Menezes Pizzichini
Coordenadora

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização Imunológica do Hipotireoidismo Subclínico

O hipotireoidismo é uma doença que atinge principalmente mulheres e é resultante da diminuição da produção de hormônios pela glândula tireóide. A falta destes hormônios faz com que as pessoas apresentem mudanças de humor, alterações musculares e ósseas e algumas vezes ainda problemas no coração. Na maioria dos casos o tratamento é muito simples, bastando para isso que os pacientes tomem medicamentos contendo estes hormônios. Muitas vezes, antes mesmo de as pessoas apresentarem alguns sintomas de doença, algumas substâncias encontradas no sangue já estão alteradas, indicando que, com grande probabilidade, a doença irá se manifestar posteriormente. Neste estudo, pretendemos estudar uma destas substâncias com mais detalhes. É um anticorpo que agride a própria glândula que produz estes hormônios. Existem vários tipos destes anticorpos e pretendemos neste estudo verificar qual ou quais tipos e com que força eles se ligam a glândula. Para isso estamos convidando a senhora, juntamente com outras 89 mulheres para participar desta pesquisa.

Procedimento: Caso a senhora concorde, sua participação consistirá em fornecer um pouco de sangue (10ml) no primeiro dia em que for atendida. Seu sangue será analisado e dependendo das quantidades de hormônios encontradas, a senhora será incluída em um dos seguintes grupos: 1- Pessoas com níveis de hormônios normais; 2- Pessoas com níveis de hormônios levemente alterados e 3 – Pessoas com níveis de hormônios muito alterados.

Possíveis desconfortos e potenciais benefícios: A senhora poderá se beneficiar desta pesquisa, pois caso nossas hipóteses sejam verdadeiras, o seu tratamento começará antes que a doença se estabeleça. Além disso, estará auxiliando outros indivíduos que futuramente apresentem estes mesmos problemas. Asseguramos que seu nome nunca será utilizado em nenhum momento dos trabalhos. As possíveis complicações que podem acontecer durante ou após a coleta de sangue são dor no local ou formação de hematoma – sendo que se isto acontecer, a senhora terá toda a assistência necessária.

Participação e confidencialidade: A participação das pacientes neste estudo é confidencial e nenhum nome será divulgado em qualquer tipo de publicação. As pacientes serão identificadas apenas pelas iniciais do nome e sobrenome e/ou número. Queremos deixar bem claro que esta participação é voluntária, podendo não participar caso não o queira. O mesmo tratamento lhe será oferecido, participando ou não do estudo. A senhora não tem obrigação em participar. Caso aceite participar, poderá se retirar da pesquisa no momento que desejar, bastando para isto comunicar a pesquisadora médica responsável.

Por favor pense bem nas condições de participação no estudo, nos procedimentos já mencionados e faça todas as perguntas que desejar; esclareça todas as suas dúvidas. Caso apareça alguma dúvida, a senhora poderá sempre durante o estudo perguntar à sua médica.

CONSENTIMENTO

Eu recebi uma cópia e li (ou leram para mim) as informações acima descritas. Foram explicados para mim os procedimentos deste estudo. Sei que posso perguntar o que desejar e compreendo exatamente o que acontecerá, incluindo os possíveis riscos, desconfortos e benefícios com a participação neste estudo.

Sou livre para retirar-me deste estudo a qualquer momento.

Eu concordo com a minha participação neste estudo.

Nome da paciente:

Assinatura:

Nome e assinatura do médico responsável:.....

Local:

data: / /

ANEXO 3

AVALIAÇÃO CLÍNICA HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO

HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO

Número:

Nome: data de nasc. / /
Endereço:
Fone: prontuário:
Data:

Avaliação de sintomas e sinais no momento do primeiro atendimento

0 – resposta negativa ao ser inquirido / não observação ao exame físico

1 – resposta positiva ao ser inquirido / observação ao exame físico

.....fadiga (letargia, cansaço, indisposição)

.....sonolência

.....intolerância ao frio (comparativamente aos pares)

.....queda de cabelo

.....sintomas depressivos (desinteresse, apatia, tristeza, indiferença, choro freqüente)

.....ganho de peso

.....obstipação

.....dores generalizadas

.....palidez

.....edema

.....pele seca

.....extremidades frias

.....alteração de voz

.....bradipsiquismo

.....bócio

.....lentificação do tempo de relaxamento do reflexo Aquileu, conforme observado ao exame físico

dosagem de colesterol total:.....

ANEXO 4

**GRÁFICOS DE CORRRELAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTI-TPO E SUA AVIDEZ
COM NÍVEIS DE TSH E T4 LIVRE NO GRUPO DE PACIENTES PORTADORAS
DE HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO**

ANEXO 4 – GRÁFICOS DE CORRRELAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTI-TPO E SUA AVIDEZ COM NÍVEIS DE TSH E T4 LIVRE NO GRUPO DE PACIENTES PORTADORAS DE HIPOTIREOIDISMO SUBCLÍNICO

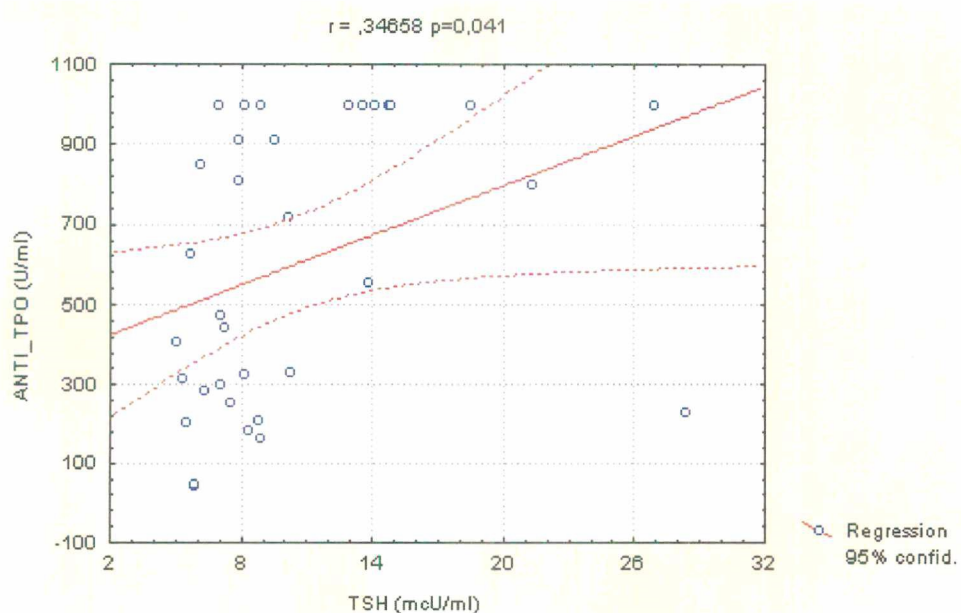


Figura 1 - Correlação entre os níveis de TSH e anti-TPO

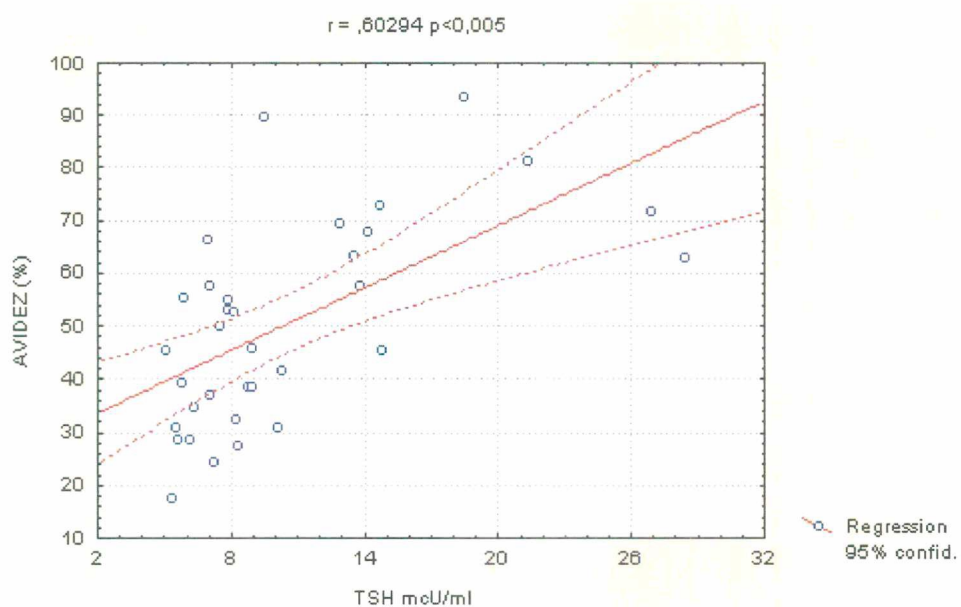


Figura 2 - Correlação entre os níveis de TSH e a medida da avides de IgG anti-TPO

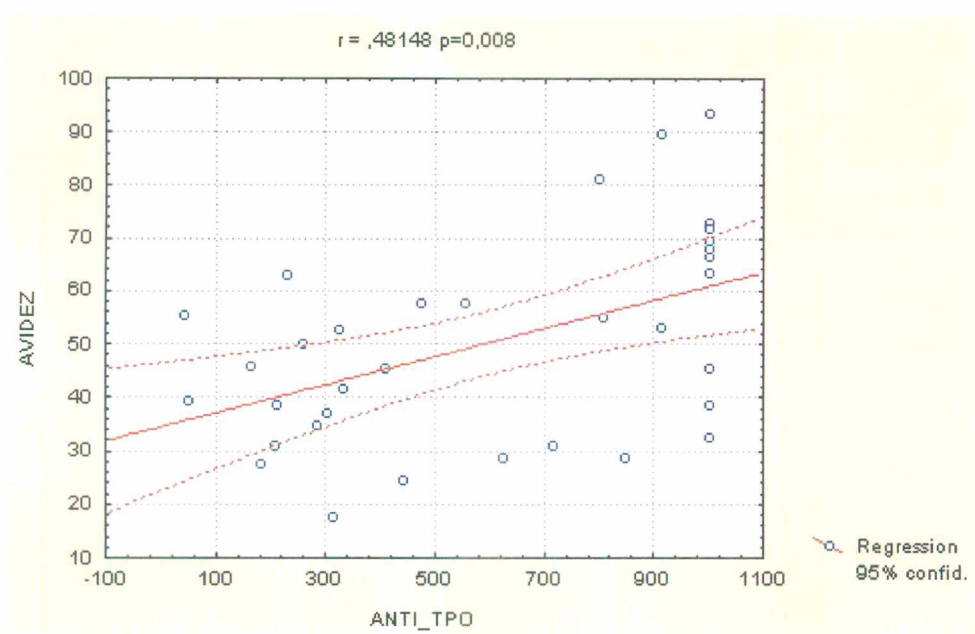


Figura 3 – Correlação entre os níveis de anti-TPO e a medida da sua avidéz

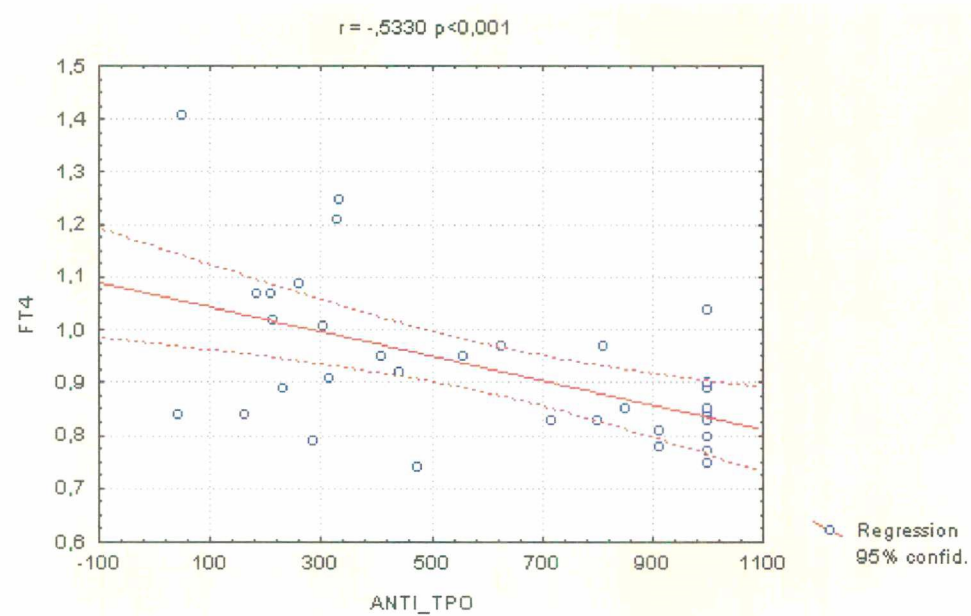


Figura 4 - Correlação entre os níveis de anti-TPO e T4 livre

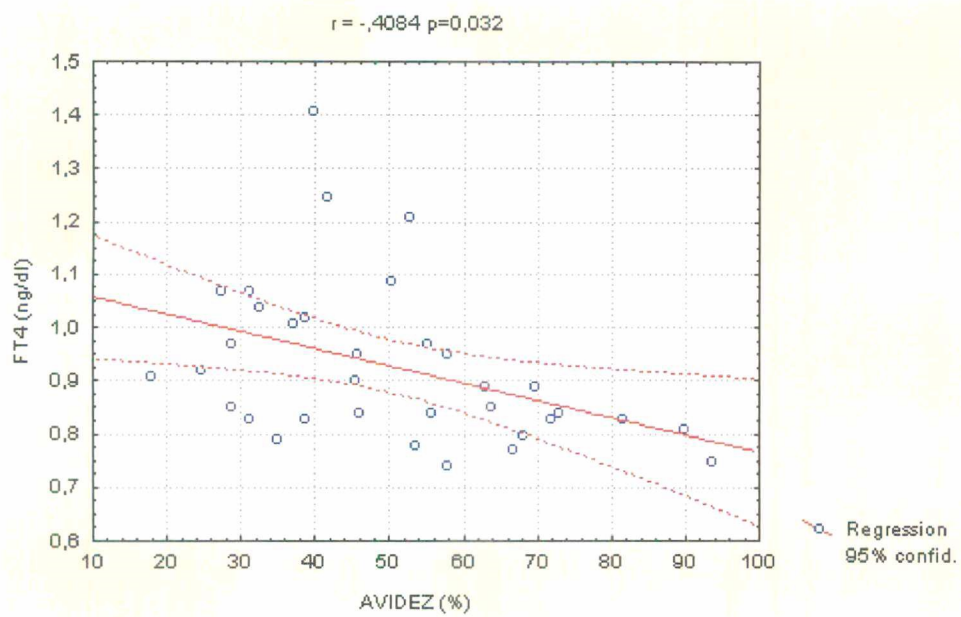


Figura 5 - Correlação entre os níveis de T4 livre e a medida de avides de IgG anti-TPO

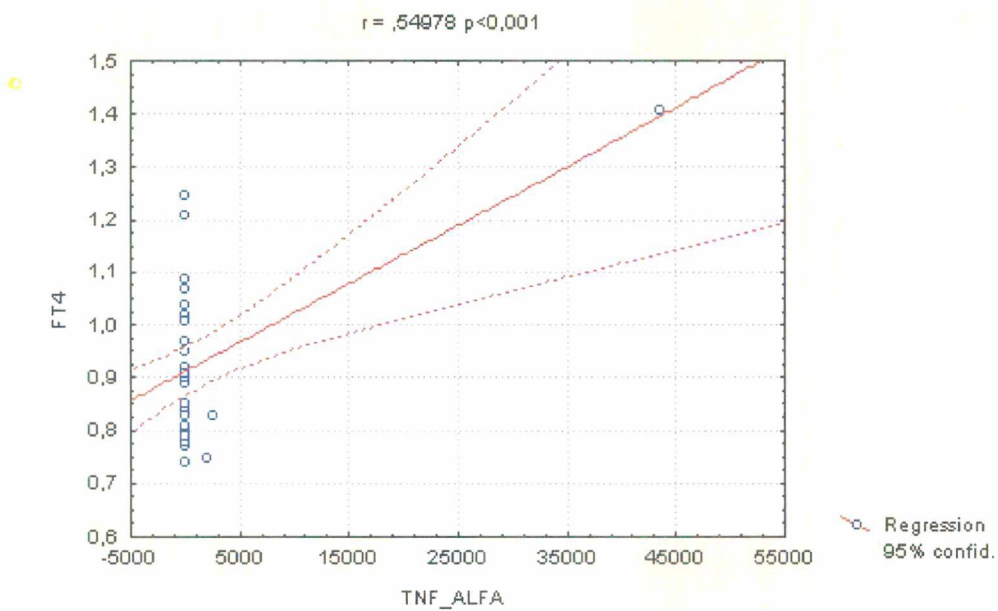


Figura 6 – Correlação entre os níveis de T4 livre e TNF- α

ANEXO 5

**DADOS GERAIS REFERENTES ÀS ANÁLISES LABORATORIAIS
REALIZADAS**

Tabela geral contendo os dados referentes às dosagens dos soros das pacientes estudadas, registrando as seguintes variáveis: **pac** (número da paciente), **id** (idade), **gr** (grupo: hs-hipotireoidismo subclínico, he-hipotireoidismo estabelecido, c-controle), **aTPO** (anti-TPO), **col** (colesterol), **IgG1**, **IgG2**, **IgG3**, **IgG4**, **avidez**, **IL-1**, **TNF-a** (TNF-alfa), **IL-6**, **IFNg** (IFN-gama), **IL-10** e **neop** (neopterinina).

pac	id	gr	TSH	ft4	aTPO	col.	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	avidez	IL-1	TNF-a	IL-6	IFNg	IL-10	neop
1	23	hs	8.16	1.04	1000	155	0.518	0.116	0.071	0.155	32.47	0	0	0	0	0	8.9
5	48	he	44.569	0.49	880	259	0.559	0.126	0.09	0.921	57.39	0	0	0	0	0	7.5
11	40	hs	7.83	0.97	809	241	0.773	0.198	0.398	0.115	54.95	0	0	0	0	0	11.9
12	42	he	26.062	0.57	66.2	161	0.261	0.082	0.136	0.039	68.84	0	0	0	0	0	10.2
13	60	hs	5.83	0.84	41.6	229	0.166	0.062	0.08	0.001	55.47	0	0	0	0	0	7.14
18	21	he	8.22	0.61	1000	234	0.422	0.111	0.642	1.234	61.68	0	0	0	0	0	9.6
19	56	hs	7.005	0.74	473	155	0.384	0.096	0.118	0.11	57.76	0	0	0	0	0	9.6
21	50	hs	18.45	0.75	1000	203	0.397	0.17	0.168	1.315	93.55	0	1,878	0	0	0	11.2
22	43	hs	14.089	0.8	1000	195	0.329	0.067	0.192	0.689	67.89	0	0	0	0	0	9.1
24	45	he	6.306	0.61	236	160	0.204	0.041	0.04	0.022	50.8	0	0	0	0	0	9.3
27	60	hs	7.452	1.09	258	290	0.23	0.092	0.16	0.829	50.23	0	0	0	0	0	2.7
28	44	hs	8.319	1.07	183	245	0.234	0.064	0.405	0.319	27.38	0	0	0	0	0	10.7
29	42	hs	5.511	1.07	207	228	0.175	0.048	0.105	0.57	31.12	0	0	0	0	0	12.1
33	32	he	100	0.22	144	345	0.169	0.05	0.116	0.374	36.19	0	0	0	0	5,669	9.9
34	33	hs	14.706	0.84	1000	267	0.408	0.064	0.291	1.162	72.86	0	0	0	0	0	11.7
41	51	hs	6.963	0.77	1000	265	0.815	0.155	0.22	0.809	66.51	0	0	49.4	0	0	9.4
45	44	hs	26.872	0.83	1000	244	0.816	0.109	0.081	0.496	71.83	0	0	0	0	0	5.1
47	54	hs	5.628	0.97	626	212	0.294	0.067	0.349	0.143	28.62	0	0	0	0	0	7.2
48	47	hs	6.117	0.85	849	190	0.157	0.081	0.085	0.529	28.66	0	0	11.3	0	0	7.6
49	32	hs	8.731	1.02	212	210	0.267	0.093	0.2	0.183	38.65	0	0	70.6	0	0	14.6
50	46	hs	5.066	0.95	407	215	0.32	0.114	0.061	0.775	45.64	0	0	0	0	0	8.7
51	38	he	57.837	0.52	1000	245	0.291	0.061	0.041	0.015	55.41	0	0	8.3	0	0	12.8
53	53	hs	10.127	0.83	717	206	0.178	0.072	0.152	0.446	31.12	0	2,457	371.4	0	0	8
55	34	hs	8.904	0.84	162	205	0.221	0.067	0.215	0.7	45.88	0	0	0	0	0	11.3
56	47	hs	7.871	0.78	913	253	0.413	0.1	0.264	0.742	53.25	0	0	0	0	0	9.3
57	38	hs	10.27	1.25	332	238	0.106	0.035	0.129	0.721	41.48	0	0	322.6	0	0	9.6
60	52	hs	8.152	1.21	326	249	0.196	0.066	0.164	0.954	52.55	0	0	0	0	11,32	9.7
61	24	hs	28.384	0.89	231	235	0.379	0.08	0.109	0.622	62.86	0	0	0	0	0	5.5
63	36	hs	12.9	0.89	1000	217	0.838	0.133	0.121	1.022	69.47	0	0	0	0	0	6.3
64	43	hs	6.301	0.79	286	241	0.25	0.069	0.21	0.631	34.84	0	0	0	0	0	12.7
65	33	hs	14.77	0.9	1000	222	0.744	0.116	0.283	0.192	45.29	0	0	0	0	0	11.1
66	26	hs	5.8	1.41	48.9	185	0.292	0.069	0.165	0.381	39.52	0	43,56	0	0	0	11.9
70	48	he	22.115	0.63	581	275	0.205	0.064	0.087	0.43	39.73	0	0	0	0	0	6.6
72	35	hs	7.03	1.01	303	262	0.423	0.065	0.073	0.746	37.08	0	0	0	0	0	3.8
73	62	hs	13.5	0.85	1000	272	0.38	0.113	0.328	1.213	63.52	0	0	65.3	0	0	17.8
74	33	hs	9.5	0.81	913	245	0.176	0.054	0.147	0.838	89.8	0	0	0	0	0	6.9
75	33	he	100	0.43	1000	289	0.54	0.07	0.244	0.54	43.6	0	0	0	0	0	6.9
76	31	hs	7.2	0.92	442	175	0.237	0.073	0.135	0.5	24.62	0	0	0	0	0	9.1
78	57	hs	8.883	0.83	1000	318	0.661	0.079	0.167	0.794	38.6	0	0	0	0	0	9.4
80	49	he	19.019	0.34	316	257	0.699	0.089	0.083	0.194	24.89	0	0	0	0	0	9.5
81	44	he	13.516	0.58	1000	245	0.794	0.072	0.134	1.021	61.17	0	0	0	0	0	8.9
82	30	he	55.034	0.07	1000	281	0.757	0.154	0.157	1.085	59.71	0	0	0	0	0	9.3
85	38	he	8.767	0.5	1000	197	0.932	0.116	0.265	0.916	72.31	0	0	0	0	0	7.5
86	34	c	0.827	1.1	10	271	0.125	0.048	0.12	0.006		0	0	0	0	0	9.5
87	32	hs	5.34	0.91	315	229	0.192	0.067	0.046	0.333	17.81	0	0	0	0	0	10.6

88	32	c	1.021	1.17	10	172	0.047	0.027	0.002	0.021		0	0	0	0	0	8.3
89	61	c	1.182	1.1	10	185	0.115	0.063	0.019	0.031		0	0	0	0	0	8.9
90	36	c	1.917	1.23	10.2	158	0.117	0.083	0.017	0.001		0	0	0	0	0	9.4
91	25	he	9.205	0.69	813	188	0.276	0.079	0.142	0.614	59.39	0	0	0	0	0	9.8
93	42	c	1.212	0.86	10.1	174	0.088	0.043	0.069	0.024		0	0	0	0	0	10
94	40	c	1.08	0.82	34.6	253	0.086	0.029	0.103	0.05		0	0	0	0	0	9.5
96	42	c	1.265	0.9	438	213	0.1	0.039	0.02	0.047	31	0	0	0	0	0	20.2
98	55	c	1.024	1.27	23	151	0.067	0.017	0.048	0.002		0	0	0	0	0	13.7
99	59	c	0.795	0.99	12.4	217	0.092	0.054	0.015	0.001		0	0	0	0	0	11.6
100	31	c	2.072	0.99	12.3	184	0.177	0.063	0.074	0.007		0	1,478	194	0	0	13.9
101	56	he	2.243	1.13	893	382	0.321	0.116	0.045	0.523	31.47	0	0	0	0	0	13.1
102	29	c	1.418	1.07	15.2	198	0.065	0.026	0.058	0.015		0	0	0	0	0	10.6
103	23	c	0.166	1.27	334	217	0.094	0.045	0.052	0.161	38.07	0	0	0	0	0	10.4
104	40	c	1.378	1.07	10	230	0.141	0.043	0.069	0.012		0	0	0	0	0	8.7
105	36	c	1.266	1.14	10.3	239	0.117	0.061	0.031	0.006		0	0	0	0	2,943	2.8
107	37	c	2.088	1.19	10	224	0.042	0.011	0.055	0.029		0	0	0	0	0	10.8
108	39	c	1.022	1.14	10	245	0.09	0.045	0.099	0.004		0	0	0	0	0	9.9
109	36	c	1.025	1.06	10	213	0.099	0.023	0.021	0.006		0	0	0	0	0	6.9
111	34	he	24.816	0.6	1000	177	0.384	0.136	0.295	0.843	77.55	0	0	0	0	0	5.8
112	42	he	10.491	0.92	1000	212	0.646	0.141	0.117	0.596	86.67	0	0	0	0	0	9.1
114	57	c	0.743	1.61	23.8	200	0.124	0.036	0.061	0.026		0	0	30.22	0	0	14.4
116	57	he	16.302	0.62	433	305	0.335	0.078	0.065	0.194	31.81	0	0	0	0	0	9.2
118	27	he	0.839	1.23	887	200	0.491	0.1	0.36	0.087	30.64						
120	58	he	0.065	1.27	308	351	0.209	0.043	0.083	0.373	31.9	0	0	0	0	0	8.6
122	46	he	12.297	0.67	497	244	0.184	0.038	0.066	0.203	41.11	0	0	0	0	0	7.6
123	50	he	80.122	0.32	1000	362	0.841	0.114	0.385	0.801	85.73	0	0	0	0	0	12.8
124	21	he	7.88	0.96	129	205	0.129	0.046	0.051	0.257	37.33	0	0	0	0	0	7.9
125	44	he	0.453	1.14	1000	191	0.479	0.092	0.372	0.461	42.45	0	0	0	0	0	9.3
126	42	c	1.844	0.8	12.1	121	0.085	0.052	0.086	0.011		0	0.852	388.6	0	0	6.9
127	54	c	2.227	1.1	100	162	0.066	0.019	0.018	0.008							
128	51	c	4.141	1.14	10	212	0.103	0.019	0.004	0.02		0	4,002	0	0	0	6.3
129	50	c	1.323	1.11	12.4	143	0.143	0.054	0.04	0.004		0	0	0	0	0	11.8
130	52	c	0.606	1.07	13	235	0.135	0.028	0.053	0.024		0	0	0	0	0	8.5
131	41	c	2.126	0.91	10	188	0.165	0.054	0.222	0.045		0	0	50.39	0	0	9.5
132	51	c	0.664	1.18	10	216	0.182	0.008	0.079	0.038		0	34,96	30.71	0	0	7.9
133	29	he	0.51	1.55	523	200	0.383	0.091	0.054	0.284	64.39	0	1,467	0	0	0	19.1
134	55	c	0.56	1.2	10	188	0.169	0	0.041	0.039		0	0	0	0	0	10.2
137	32	he	6.417	1.1	75.8	137	0.197	0.055	0.087	0.019	88.26	0	0	0	0	0	8.9
138	45	he	6.709	1.27	235	254	0.193	0.051	0.028	0.001	84	0	0	0	0	0	9.7
139	23	he	0.96	1.4	772	211	0.215	0.065	0.203	0.442	84.95	0	0.26	6.5	0	0	12
140	33	he	12.84	0.65	190	213	0.183	0.074	0.051	0.027	122.29						
141	45	he	30.724	0.74	1000	234	0.264	0.105	0.362	0.314	28.9	0	0	0	0	0	9.9
143	27	he	9.64	0.91	1000	565	0.359	0.086	0.152	0.712	61	0	0	0	0	0	12.4
145	27	he	100	0.6	248	203	0.236	0.094	0.062	0.082	52.73	0	0	0	0	0	11.5
147	57	he	84.888	0.27	73.3	264	0.154	0.068	0.134	0.01	101.31	0	0	0	0	0	11.4
151	46	hs	21.271	0.83	800	210	0.162	0.041	0.047	0.4	81.4	0	0	0	0	0	6.3
152	30	he	100	0.34	1000	241	0.288	0.081	0.05	0.546	60.77	0	0	0	0	0	5.2
153	44	hs	13.786	0.95	555	195	0.273	0.089	0.195	0.075	57.69	0	0	0	0	0	14.2
154	67	c	4.812	1.8	11.7	304	0.238	0.005	0.029	0.02		0	0	0	0	0	7.9
155	24	c	2.826	1.13	10.9	195	0.224	0.046	0.08	0.065		0	0	0	0	0	6.8

Para efeito de análise estatística, em função do software utilizado, a vírgula está substituída por ponto e vice-versa.