UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistema complemento e resposta de produção de anticorpos em
ratos hipertireoideos**

Claudia da Silva Bitencourt

Ribeirão Preto

2006

CLAUDIA DA SILVA BITENCOURT

**Sistema complemento e resposta de produção de anticorpos em
ratos hipertireoideos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bitencourt, Claudia da Silva

Sistema complemento e resposta de produção de anticorpos em ratos hipertireoideos. Ribeirão Preto, 2006.

111p.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Assis-Pandochi, Ana Isabel.

1. Sistema Complemento. 2. Via Alternativa. 3. Hormônios Tireoidianos.
4. Produção de Anticorpos. 5. Resposta Imune

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Claudia da Silva Bitencourt

Título: Sistema Complemento e Resposta de Produção de Anticorpos em Ratos Hipertireoideos

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos

Banca Examinadora

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Aprovado pela comissão julgadora em ____/____/____

Agradecimientos

O ponto de chegada.

O fim de uma jornada.

Somente ao olhar para trás depois de uma longa caminhada, é que se tem a noção real do caminho percorrido.

Um sonho.

Um ideal e um objetivo de vida fizeram com que a caminhada se iniciasse.

E desde então, como foi longa a jornada!

Às vezes por caminhos serenos, acolhedores, tranquilos.

O caminho era plano, iluminado, cercado de verde...

Em outros momentos, caminhando por lugares íngremes, tortuosos.

Às vezes vagando a esmo, sem rumo, parecendo ter perdido a direção.

Em outros a certeza da orientação de um Ser Superior,

Ou de seus escolhidos na Terra era latente.

O desânimo por vezes esteve presente, porque o medo, as incertezas e a insegurança o fizeram aflorar.

Mas fé, confiança, perseverança e o discernimento, suplantaram os maus pensamentos,

mesmo nos momentos de maior provação.

Hoje, neste ponto de chegada vislumbro a paisagem...

Olho do alto e avisto a imensidão...

Por vezes penso "Como consegui?"

Sei que outras jornadas se iniciarão, motivadas por novos sonhos,

Sempre...

Mas tenho a certeza de que em todos os momentos Deus esteve

e estará sempre ao meu lado.

Obrigada Senhor por me propiciar coragem para realizar este sonho!

Claudia da Silva Bitencourt

Dedico este trabalho a Maria Jurema da Silva Bitencourt. Mãe, pai, irmã, amiga.

Símbolo de dignidade e exemplo a ser seguido. Obrigada por sua dedicação e seu

amor incondicional.

Tudo o que sou

e o que possuo de maior valor,

é o amor que nos une.

À memória de meu pai, Maurício Bitencourt.

Eternamente querido. Eternamente amado.

Sua presença espiritual me motiva e motivará sempre,

a ser uma pessoa melhor.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi,

A confiança é um sentimento que enobrece o homem.

Obrigada por ter confiado e acreditado em mim sem me conhecer, para a realização deste trabalho. Agradeço por todos os momentos, pelo aprendizado científico e humano. Pelo exemplo de professora que eu quero ser um dia.

Cada pessoa que passa pelas nossas vidas, deixa conosco um pouco de si, e leva um pouco de nós. Agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida durante esta jornada:

Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini

Seu apoio e dedicação foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Sua amizade, um presente que vai além do universo da pesquisa. Obrigado por seu carinho, atenção, companheirismo.

Daiani Cristini de Oliveira Andrade

A cada dia a vida me mostra que nossos caminhos não convergiram por um mero acaso. As incertezas, inseguranças quando divididas ficaram mais brandas. As longas conversas propiciaram sempre crescimento. Amor, lealdade, dedicação são apenas palavras que tentam explicar a grandeza e a profundidade de nossa amizade.

Anaísa Fernandes Calgaro Helena

A amizade que nos une sempre será maior que a distância que agora nos separa. Obrigada por tudo que fez por mim e pela minha família. Palavras jamais expressarão toda a minha gratidão.

Daniel Junqueira Dorta

Amigo, desde os tempos de faculdade. Partilhamos muitas coisas durante todo esse tempo. Pessoa cuja humildade é ímpar. Nossa amizade sempre será maior e mais forte do tudo.

Wagner Rodrigo de Souza

Amigo, colega de trabalho, irmão. Quanto maior o discernimento, maiores serão as provas. Agradeço a Deus por colocar um espírito de luz como você no meu caminho.

Família Oliveira Andrade

Valdemar, Antonia Julia, Fábio, Daiani. Sinônimos do significado real da palavra família. Obrigada pela acolhida, pelo carinho em todos os momentos. A superação é fruto do amor incondicional e da fé em Deus. Terão minha gratidão sempre.

Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Buscar o melhor do que se faz é uma jornada árdua, feita de através de profundidade e entrega. As lições que ensina transcendem os limites do ensino e da pesquisa. Seu ideal de formação de seres humanos melhores sempre irá me inspirar.

Alexandre Kanashiro

Caminhamos juntos, ainda que por caminhos diferentes. As dificuldades foram vencidas. Obrigado por me proporcionar a certeza de que eu conseguiria chegar até o fim.

Ana Paula Landi Librandi

Minha companheira de pesquisa. Partilhamos momentos de dificuldade, mas sempre guardarei comigo as lembranças dos momentos, sempre agradáveis, que vivemos no laboratório.

Ana Claudia Magalhães Neves; Aline Carolina da Costa Lemos; Daniela Freire Bonilha; Julia Santos; Jairson, Keli e Maria Aparecida de Carvalho; Roseane Marcondes.

Amigos e familiares tão queridos. Pessoas cuja convivência tornaram mais amenas as provas. Obrigado por me ouvir. Pelo carinho, e principalmente pela amizade.

Acácio Antonio Pigoso, Adriana Balbina P. Paschoalato, Cássio de Barros Pontes, Celma Gonçalves Duarte, César Rangel Pestana, Denise Pimenta da Silva Leitão, Elisa Maria de S. Russo Carbolante, Fabiana da Silva Paula, Fábio Ermínio Mingatto, Fernando Aparecido

Mariano de Souza, Laura Marins Valdevite, Livia Maria Cordeiro Simões, Luciana Mariko Kabeya, Mateus Freire Leite, Mirian Ribeiro Moreira.

Queridos colegas do laboratório de Bioquímica. Foram anos de convivência no laboratório, alguns momentos de provação em que o auxílio mútuo foi absolutamente necessário. Aprendemos muito juntos, ainda que em trabalhos diferentes. Os momentos de descontração estarão sempre na minha memória.

Alcides Silva Pereira, Ana Cristina Morseli Polizello, Ieda Maria Razaboni Prado, Maria Regina de Pila Raphaloski, Nadir Mazzucato.

Funcionários do Laboratório de Bioquímica. Anos de convivência diária propiciam a formação de laços de amizade, deixam recordações e, principalmente, resultam em aprendizado. Levarei na memória recordações dos bons momentos vividos ao lado de cada um de vocês.

Prof. Dr. Augusto Cesar Cropanese Spadaro, Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, Prof. Dr. Carlos Curti, Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim.

Professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Aprende aquele que observa e extrai para si o melhor de cada um. Obrigado pela convivência e momentos de aprendizado tão necessários à minha formação.

Andréia Silva Garcia de Figueiredo, Cláudia Meirelles de Siqueira, Daniela Godoy, Daniela Paula dos Santos Phelippin, Jennifer Michiko Chauca Vokoya, Joel Gonçalves de Souza, Larissa Deadame de Figueiredo, Sílvia Almeida Cardoso, Taís Nader Chrysostomo, Tatiana Santos Marasca, Viviane Keiko dos Santos Kawata.

Alunos de iniciação científica. Muitos enveredaram por outros caminhos. Agradeço pela oportunidade de conhecê-los e pelos momentos compartilhados.

Agradeço também àqueles cujo auxílio foi imprescindível para a realização deste trabalho:

Aldo Dias Feiteiro Junior, Elder Tambellini, Reinaldo Fernando Batista, Rinaldo Bueno Ferreira. Pelo auxílio e manuseio ético dos animais;

Analuiza Souza Costa, pela disponibilidade e cuidado na realização das dosagens hormonais;

Vanessa Boralí. Pela paciência e disponibilidade em ensinar o manuseio dos ratos;

Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, Prof. Dr. Auro Nomizo. Pela disponibilidade do uso das instalações do laboratório e pelas discussões científicas, que enriqueceram a minha formação;

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza. Pela disponibilidade do uso das instalações do laboratório.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, embora não mencionados, contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Resumo

BITENCOURT, C.S. Sistema complemento e resposta de produção de anticorpos em ratos hipertireoideos. 2006. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Tendo em vista a ocorrência de alterações no sistema imune relacionadas ao hipertireoidismo e à participação do sistema complemento (SC) em processos imunológicos, torna-se importante investigar se os hormônios tireoidianos teriam algum efeito sobre o SC. O SC é composto de uma série de proteínas séricas e de membrana que estão envolvidas em processos da resposta imune. Considerando que os hormônios tireoidianos estão envolvidos em uma série de processos biológicos, e que tanto o hipo- quanto hipertireoidismo podem acarretar alterações importantes nestes processos, os objetivos deste trabalho foram estudar o impacto de níveis séricos elevados de hormônios tireoidianos sobre a atividade do sistema complemento e produção de anticorpos.

Foram utilizados ratos machos wistar para o modelo experimental de hipertireoidismo, investigando-se a atividade lítica das vias clássica/lectina e alternativa através de ensaios hemolíticos; os níveis séricos de fator B da via alternativa através do emprego de reagente deficiente de fator B; e a produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro (SRBC) empregando ELISA (“enzyme linked immunosorbent assay”) e ensaios de “plaque forming cell” (PFC). O hipertireoidismo induzido não resultou em alterações da atividade lítica das vias clássica/lectina. Entretanto, a elevação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos provocou uma

redução da atividade lítica de via alternativa, de forma significante em doses de 1, 5, 50 e 100µg de levotiroxina/200g de peso animal após 14 dias de tratamento, e com dose a partir de 0,15µg de triiodotironina/200g de peso animal, após 7 e 12 dias de tratamento. Os níveis séricos funcionais de fator B foram reduzidos nestas condições. Além disso, ocorre redução da resposta de produção de anticorpos em ratos tratados com T3 e imunizados com SRBC. Estes resultados mostram que níveis elevados de hormônio tireoideano reduzem a capacidade funcional da via alternativa do SC , avaliada pelo desencadeamento da lise em decorrência da interação com hemácias de coelho. Esta redução poderia levar a uma menor geração de fragmentos com atividade nos processos de seqüestro e apresentação do antígeno e interação com as células envolvidas na resposta imune, resultando em títulos menores de anticorpos produzidos. Estudos adicionais são necessários para avaliar estas possibilidades. As observações deste estudo podem auxiliar para o melhor entendimento do impacto biológico das disfunções hormonais sobre a atividade do sistema complemento.

Palavras-chave: sistema complemento, via alternativa, hormônios tireoidianos, produção de anticorpos, resposta imune.

Abstract

BITENCOURT, C.S. Complement System and response of production of antibody in rats with hyperthyroidism. 2006. 98p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Considering the alterations of the immune system that occur in the hyperthyroidism, and the involvement of the complement system (CS) in immune processes, this work aimed to investigate the effect of high levels of thyroid hormones on the CS and on the antibody production.

The CS comprehends a group of serum and membrane proteins which activation leads to the generation of protein fragments or complexes with important biologic functions, such as participation in events of the immune response.

Wistar adult male rats treated with thyroid hormones were used as experimental model of hyperthyroidism, to evaluate the lytic activity of classical/lectin and alternative pathways of the CS through hemolytic assays; the serum levels of factor B employing serum deficient of this component (RB); and the production of anti-sheep red blood cells (SRBC) antibodies through enzyme linked immunosorbent (ELISA) and plaque forming cell (PFC) assays.

Classic and lectin pathways activity was not affected in the hyperthyroidism. However in this condition the alternative pathway activity was significantly reduced at doses of 1; 5; 50 and 100 µg of thyroxine (T4) /200g of animal weight/day after 14 days of treatment, or crescent doses starting from 0,15 µg of triiodothyronine (T3) for periods of 7 and 12 days of treatment. The serum levels of factor B were also reduced

in these conditions. In addition, there was a reduction of the antibody response in rats treated with T3 and immunized with SRBC.

These results show that the functional capacity of alternative pathway is decreased in consequence of high levels of thyroid hormones as evaluated by its lytic potency triggered by the rabbit erythrocytes.

This could then lead to a reduced generation of complement fragments active in antigen sequestering and presentation, and on the interaction of cells in the immune response decreasing the antibody production. Additional studies are required to evaluate these possibilities.

Key words: complement system, alternative pathway, thyroid hormones, antibody production, and immune response.

Lista de Abreviaturas

ANOVA	análise de variância
BCR	receptor de células b
<i>C1-INH</i>	<i>inibidor de c1</i>
C1 a C9	componentes do complemento
C3	componente inativo do complemento
C3bBb	C3 convertase da via alternativa
C3bBb3b	C5-convertase da via alternativa
<i>CD</i>	“cluster of differentiation”
CEUA	comitê de ética no uso de animais do campus de Ribeirão Preto da USP
CFD	“complement fixation diluent”
CMC	carboximetilcelulose
CS	complement system
<i>cps</i>	<i>contagens por segundo</i>
CR	<i>receptor do complemento;</i>
CR1	receptor tipo 1 do complemento
CR2	receptor tipo 2 do complemento
CTLA-4	receptor de alta afinidade para a molécula b7
DAF	<i>fator de aceleração do decaimento das C3 convertases</i>

EA	eritrócito de carneiro sensibilizado com anticorpo anti-hemácia de carneiro
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
EGTA	ácido etileno glicoltetracético
<i>ELISA</i>	<i>imunoensaio com anticorpo ligado à enzima</i>
Fc	fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina
FSH	hormônio folículo estimulante
GH	hormônio do crescimento
hCG	gonadotrofina humana coriônica.
HLA	antígeno leucocitário humano
IFN- γ	interferon- γ
IgD	imunoglobulina da classe D
IgE	imunoglobulina da classe E
IgG	imunoglobulina da classe G
IgM	imunoglobulina da classe M
LH	hormônio luteinizante
MAC	complexo de ataque a membrana
MASP	serina protease associada a MBL
MBL	lectina ligante de manose
MCP	<i>proteína cofator de membrana</i>

MHC	complexo de histocompatibilidade principal
NK	“natural killer”
p	probalilidade
p/v	peso/volume
PBS	solução salina tamponada com fosfato
<i>PBS-T</i>	<i>solução salina tamponada com fosfato adicionada de tween</i>
	20
<i>PFC.</i>	<i>células produtoras de anticorpos</i>
PTU	propiltirouracil
R	reagente
RB	soro deficiente em fator b
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNR	soro normal de ratos
SPF	“ <i>specific patogen free</i> ”
<i>SRBC</i>	<i>hemácias de carneiro</i>
t ½	tempo gasto em minutos para lisar 50% das hemácias
T3	triiodotironina
T4	tiroxina/levotiroxina sódica

TBA	<i>"thyroid binding albumin"</i>
TBG	<i>"thyroid binding globulin"</i>
TEA	trietanolamina
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	tireotrofina
TSH-R	receptor tireoidiano
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO	
1.1 –	Sistema complemento	02
1.2 –	Vias de ativação	07
1.3 –	Regulação do sistema complemento	12
1.4 –	Funções biológicas decorrentes da ativação do sistema complemento	12
1.5 –	Participação de componentes do sistema complemento na produção de anticorpos pelas células B	15
1.6 –	Tireóide, hormônios produzidos e suas funções	19
1.7 –	Disfunções da tireóide	21
1.8 –	Sistema imunológico, sistema complemento e função tireoidiana	23
2 -	OBJETIVOS	28
3 -	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 –	Animais	30
3.2 -	Hormônios	31
3.2.1 –	Preparo da suspensão de levotiroxina (T4) e Cinomel (T3)	31
3.2.2 –	Preparo da suspensão de triiodotironina (T3)	32

3.3 - Tratamento dos animais e colheita de soro	32
3.3.1 – Preparo de Pool de Soro Normal de Ratos (SNR)	33
3.4 – <i>Avaliação da atividade lítica da Via Alternativa</i>	33
3.4.1 – Colheita de sangue de coelhos e preparo de suspensão padronizada de hemácias	34
3.4.2 – Determinação da atividade lítica da via alternativa do Sistema Complemento – “método cinético”	35
3.4.3 – Determinação da atividade lítica da via alternativa do sistema complemento – “Método estático”	36
3.5 – Avaliação da atividade lítica das Vias Clássica/lectina	37
3.5.1 – Determinação do título do anticorpo anti-hemácia de carneiro	37
3.5.2 – Colheita de sangue de carneiros e preparo de suspensão padronizada de hemácias	38
3.5.3 – Determinação da atividade lítica das vias clássica/lectina – “método cinético”	39
3.5.4 – <i>Determinação da atividade lítica das vias clássica/lectina – “método estático”</i>	39

3.6 – Avaliação de componentes do sistema complemento	40
3.6.1 – Preparo de soro depletado de fator B (RB)	40
3.6.2 – Avaliação dos níveis séricos funcionais de fator B	41
3.7 – Determinação dos níveis séricos de hormônios	41
3.8 – Determinação do número de células produtoras de anticorpos (PFC)	43
3.8.1 – Tratamento dos animais e imunização	43
3.8.2 – <i>Soro de cobaia adsorvido com hemácias de carneiro</i>	44
3.8.3 – Isolamento de células do baço	44
3.8.4 – Ensaio de PFC	45
3.9 – <i>ELISA</i> (Imunoensaio ligado à enzima)	46
3.9.1 – Preparo do antígeno para revestimento das placas	46
3.9.2 – <i>Revestimento das placas</i>	47
3.9.3 – <i>ELISA para avaliação de IgM</i>	48
3.9.4 – ELISA para determinação de IgG	49
3.10 – Análise dos resultados	50
4 - RESULTADOS	52

Parte 1 – Desenvolvimento de um modelo experimental de hipertireoidismo em ratos

4.1 – Puran T4®	52
4.2 - Cinomel®	57
4.3 – Triiodotironina	60

Parte 2 – Avaliação da atividade lítica do sistema complemento

4.1 – Titulação da hemolisina	62
4.2 – Atividade lítica da via clássica/lectina	64
4.3 – Atividade lítica da via alternativa	65
4.3.1 – Tratamento com Puran T4®	65
4.3.2 – Tratamento com Cinomel® (T3)	68
4.3.3 – Tratamento com Triiodotironina (T3)	71
4.4 – Avaliação dos níveis séricos funcionais de fator B	72
4.4.1 – Preparo de soro deficiente de fator B (RB)	72
4.4.2 – Avaliação dos níveis séricos funcionais de Fator B	75

Parte 3 – Produção de anticorpos anti-SRBC em ratos tratados com hormônios tireoidianos

4.1 – Avaliação do número de células produtoras de anticorpos	77
4.1.1 – Padronização do período de imunização	77

4.1.2 – Delineamento experimental para a avaliação da resposta imune humoral	78
4.2 – Determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-SRBC	82
4.2.1 – Avaliação dos níveis séricos de IgG	82
4.2.2 – Avaliação dos níveis séricos de IgM	82
5 - DISCUSSÃO	87
6 - CONCLUSÕES	98
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8- ANEXO	111

Introdução

1 – Introdução

1.1 – Sistema Complemento

O sistema complemento é composto por um conjunto de proteínas séricas e de membrana que têm por função proteger o organismo de agentes agressores participando da imunidade inata e adaptativa. O termo complemento foi sugerido por Ehrlich e Morgenroth (COLE; MORGAN, 2003; OSLER, 1976) para nomear um fator termolábil do soro que complementava a ação de anticorpos promovendo a lise de certas bactérias e hemácias (CARROL, 2004). A descoberta deste fator ocorreu no final do século XIX por Bordet, Büchner e Pfeiffer, em diferentes estudos (BORDET, 1900; CARROL, 2004; OSLER, 1976). Décadas depois, através de técnicas cromatográficas, verificou-se que se tratava de um conjunto de proteínas que foi denominado sistema complemento. Mais tarde, este conjunto de proteínas cuja função conhecida era a lise, foi reconhecido como composto por duas vias, a clássica e a alternativa. A via alternativa foi descrita por Pillemer que a nomeou como “Sistema Properdina” (PILLEMER et al., 1954). Porém, esta via, não dependente de anticorpos, só foi reconhecida como uma alternativa à via clássica (OSLER, 1976). Mais recentemente, foi descrita a “via das lectinas” que, embora tenha sido a última a ser descrita, é provavelmente em termos evolutivos a primeira via de ativação do complemento (FUJITA, 2002).

Em contraste com o “fator termolábil” descrito inicialmente, atualmente são conhecidas mais de trinta componentes entre proteínas séricas, de membrana e

receptores que fazem parte do sistema complemento (Tabelas 1, 2 e 3). Embora as funções de lise de bactérias, opsonização e remoção de imunocomplexos da corrente sangüínea sejam as primeiras conhecidas e descritas, a literatura atual tem reportado o complemento como elo de ligação entre a resposta imune específica e a imunidade inata, sendo um componente fundamental (BARRINGTON, et al., 2001; CARROL, 2004; COLE; MORGAN, 2003).

Tabela 1 – Componentes do sistema complemento, respectivos pesos moleculares e concentrações plasmáticas

Componente	Peso molecular (kDa –proteína intacta)	Concentração (µg/mL)	plasmática
Comum a todas as via de ativação			
C3	185 (α - 110/ β - 75)	1200-1300	
Via Alternativa			
Fator B	93	200	
Fator D	24	2	
Properdina*	110/165/200 (monômero – 55)	25	
Via Clássica			
C1q	460	150	
C1r	85	50	
C1s	85	50	
C4	205 (α - 97/ β - 75/ γ - 33)	300-600	
C2	102	20	
Via da lectina			
MBL**	200/300/400	1 (0,01-20)	
MASP-1	100	1,5-12	
MASP-2	76	nd	
Via Terminal			
C5	190 (α - 115/ β - 75)	80	
C6	110	45	
C7	100	90	
C8	150 (α - 64/ β - 64/ γ - 22)	55	
C9	70	60	

MBL – lectina ligante de manose; MASP – serina protease associada a MBL; nd – não determinado; (*)- predominância de oligômeros; (**) – formas predominantes. Adaptado de Paul (1999).

Tabela 2 – Proteínas reguladoras do sistema complemento, respectivos pesos moleculares e concentrações plasmáticas

Componente	Peso molecular (kDa –proteína intacta)	Concentração (µg/mL)	plasmática
No plasma			
Fator I	88	35	
Fator H	150	300-450	
C1-INH	105	240	
C4bp	550(7x70,1x45)	250	
Proteína S (Vibronectina)	84	500	
Clusterina (SP-40,40)	70 (35 +35)	50	
Carboxipeptidase N *	(2x90,2x50)	35	
Nas membranas celulares		Distribuição tecidual	
CR1 (CD35)	190	Monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, eritrócitos, células T e B,	
DAF (CD55)	70	Células sangüíneas periféricas (exceto NK), eritrócitos, células secretoras epiteliais, células endoteliais.	
MCP (CD46)	45-70 **	Idem DAF (exceto eritrócitos)	
CD59	18-20	Idem DAF	

C1-INH – Inibidor de C1; CR – receptor do complemento; DAF – fator de aceleração do decaimento; MCP – proteína cofator de membrana; CD – “cluster of differentiation”; (*) – inativador de anafilatoxina; (**) – devido a glicosilação. Adaptado de Paul (1999).

Tabela 3 - Atividade dos reguladores do sistema complemento: especificidade e função

I – Proteínas reguladoras de membrana e receptores do Complemento				
Receptor reguladora	ou	proteína	Especificidade	Função biológica
CR1			C3b e C4b	Receptor para regulação do complemento, eliminação de ICs, estimulação de fagocitose, imunorregulação.
MCP			C3b e C4b	Cofator do fator I para clivagem de C3b e C4b
DAF			C4b2b, C3bBb	Acelera o decaimento das convertases
HRF/C8bp			C8/C9	Inibição da atividade lítica (MAC)
CD59			C9	Inibição da atividade lítica (MAC)

II – Proteínas reguladoras plasmáticas	
Proteína	Função biológica
Inibidor de C1	Bloqueia a ativação de C1, inibe C1 ativado.
C4bp	Acelera a dissociação do complexo C4b2a, cofator na clivagem de C4b pelo fator I
Fator H	Acelera a dissociação do complexo C3Bb, cofator na clivagem de C3b pelo fator I.
Fator I	Inativa C4b e C3b.
Carboxipeptidase A	Inativa as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a.
Proteína S	Liga-se a C5b67 e impede a ligação deste complexo a superfícies celulares
Clusterina	Liga-se a C5b67 e impede a ligação deste complexo a superfícies celulares.
Properdina	Estabiliza C3 convertases da via alternativa.

Adaptado de Janeway et al. (2003).

1.2 – Vias de ativação

São três as vias de ativação conhecidas do complemento: clássica, alternativa e da lectina ligante de manose. De maneira geral, ocorre ativação de proteases que uma vez clivadas se tornam enzimas ativas e clivam outras proteínas através de um mecanismo em cascata. Este processo pode ser iniciado por algumas classes e subclasses de imunoglobulina, proteína A, proteína C reativa, poliânions e alguns tipos de bactérias e vírus (KLEIN, 1990; PAUL, 1999). A via pela qual será desencadeada a ativação do complemento dependerá da natureza química do ativador. Porém, todas as vias de ativação convergem para um ponto comum – a formação da C3 convertase e a clivagem de C3 (Figura 1). Os eventos que ocorrem após a formação da C3 convertase serão descritos como uma via denominada via terminal.

Via clássica

A ativação da via clássica é na maioria das vezes dependente de anticorpo. Anticorpos secretados durante uma resposta imune humoral ou ainda anticorpos naturais podem ligar-se na superfície ativadora e se tornarem capazes de ativar o complemento. Os anticorpos ativadores desta via são da classe IgG ou IgM, sendo que uma molécula de IgM ligada à superfície ativadora adquire conformação espacial para a ligação do complexo C1, enquanto que são necessárias duas

moléculas de IgG numa distância fixa de 30-40nm para esta ativação (JANEWAY et al., 2003). O primeiro componente desta via é o complexo C1, composto por uma unidade de C1q, duas unidades de C1r e duas unidades de C1s, associadas de forma não covalente, através de interação com íons Ca^{++} (KLEIN, 1990). C1q se liga à porção Fc do anticorpo e sofre uma alteração conformacional que expõe o sítio catalítico de C1r. C1r sofre autocatálise e se torna capaz de clivar C1s, que uma vez ativado, pode clivar C4 que imediatamente se liga à superfície ativadora. A seguir, C2 também é clivado pelo C1s e forma-se na superfície ativadora a C3 convertase da Via Clássica (C4b2b) (JANEWAY et al., 2003; KLEIN, 1990; PAUL, 1999; REID; PORTER, 1981).

Via alternativa

A via alternativa é auto-ativada, sem a presença de anticorpos, de forma contínua e em níveis basais pela clivagem espontânea de C3 (FEARON, 1981; THURMAN; HOLERS, 2006).

São formadas duas C3-convertases: a de fase fluida, e a de membrana. A convertase de fase fluida é formada pela clivagem de uma ligação tioéster de C3 onde se incorpora uma molécula de água, formando o $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})$, molécula de meia-vida curta. Este processo ocorre espontaneamente numa taxa de 1% do total de C3 por hora (THURMAN; HOLERS, 2006). O $\text{C3}(\text{H}_2\text{O})$ pode ser também denominado C3 “C3b-like” devido à sua capacidade de se ligar ao Fator B. Quando esta molécula se liga ao Fator B, torna possível a ação proteolítica do Fator D, que circula como

enzima ativa no plasma e cliva o Fator B em Ba e Bb, formando então a convertase de fase fluida (C3H₂OBb). Nesta convertase, o domínio serino-protease de Bb é exposto, cliva C3, e o C3b formado pode se fixar na superfície ativadora. O C3b ligado é então passível de ligação pelo Fator B, seguida da ação proteolítica do Fator D, que resulta em Ba e Bb. Assim, forma-se a C3 convertase de membrana (C3bBb) da via alternativa (FEARON, 1981; REID; PORTER, 1981; THURMAN; HOLERS, 2006).

As convertases formadas pela via alternativa além da ativação por si, também podem ser formadas pela geração de C3b proveniente das vias clássica e lectina. Este processo corresponde a um mecanismo denominado “alça de amplificação” da ativação do sistema complemento (FEARON, 1981; REID; PORTER, 1981; THURMAN; HOLERS, 2006).

Via da lectina

A ativação desta via ocorre quando a lectina sérica ligante de manose (MBL) se liga a carboidratos contendo manose que são comuns em bactérias tais como as do gênero *Salmonella*, *Listeria* e *Neisseria* (JANEWAY et al., 2003), e vírus (KLEIN, 1990; THIEL, et al, 1997). A MBL (lectina ligante de manose) está associada a duas serino-proteases, MASP-1 e MASP-2, e este complexo é estruturalmente semelhante ao complexo C1 da Via Clássica. A ativação ocorre quando este complexo se liga a uma superfície ativadora e MASP-2 pode clivar C4 e a seguir C2, formando então a C3-convertase desta via (C4b2b) (JANEWAY et al., 2003; KLEIN, 1990). Além da

clivagem de C3 pela convertase desta via, MASP-1 pode clivar diretamente o C3 (FUJITA, 2002).

Via terminal

Todas as vias de ativação convergem para a produção de uma C3-convertase. Os eventos seguintes se referem à Via Terminal que pode culminar na formação de poros em uma membrana celular (COLE ; MORGAN, 2003).

A C3-convertase é capaz de clivar moléculas de C3, o componente do sistema complemento presente em maior quantidade no soro (Tabela 1). O C3 é clivado em C3a e o C3b que se fixa à superfície ativadora. Nas etapas posteriores da ativação, o C3b ligado à membrana em associação com a C3-convertase, forma as C5-convertases, C3bBb3b da via alternativa e C4b2b3b das vias clássica e lectina. A C5-convertase cliva C5 em C5a e C5b. O C5b é o fragmento iniciador do MAC (Complexo de Ataque a Membrana). Na fase fluída, C5b se liga a C6 e C7. Esta ligação resulta numa alteração conformacional, expõe o sítio hidrofóbico de C7, que se insere na membrana. O mesmo processo ocorre posteriormente com C8, que induz a polimerização de C9. Assim, diversas moléculas de C9 se ligam formando o MAC. O MAC inserido em uma membrana representa um poro (LACHMANN; ATKINSON; REID, 1991) ou uma “leaky patch” que pode levar à lise celular por perda de componentes do citosol e do balanço eletrolítico (ESSER et al., 1996).

Figura 1 – Esquema representativo das vias de ativação do Sistema Complemento. Adaptado de JANEWAY et al. (2003).

1.3 –Regulação do sistema complemento

Por ser um sistema envolvendo uma cascata enzimática, a ativação do complemento pode culminar em danos, caso ocorra de forma desordenada, em local ou momento inadequados. O complemento é altamente regulado (CARROLL, 2004; COLE; MORGAN, 2003; JANEWAY et al., 2003; PAUL, 1999). O confinamento na superfície ativadora e a meia-vida curta dos componentes ativados são fatores importantes de regulação. Além disso, possui uma série de proteínas reguladoras séricas e de superfície celular, permitindo diferenciação entre o próprio e não-próprio (JANEWAY et al., 2003; KÖHL, 2006). Estas proteínas correspondem à metade dos componentes conhecidos do sistema (PAUL, 1999) e podem clivar componentes ativados (Fator I); ser inibidores competitivos de moléculas propagadoras da via de ativação (Fator H); cofatores de inativadores (MCP, Fator H); estabilizadores de convertases (properdina); fatores de decaimento de atividade (DAF) ou ainda atuar impedindo a formação e inserção do MAC à superfície autóloga (CD59) (Tabelas 2 e 3) (CARROLL, 2004; COLE; MORGAN, 2003; JANEWAY et al., 2003; KÖHL, 2006; PAUL, 1999).

1.4 –Funções biológicas decorrentes da ativação do sistema complemento

A formação de poros que desorganizam a estrutura da membrana celular do patógeno levando à lise é uma função importante do sistema complemento, mas não

a única. A participação na fagocitose; processamento de imunocomplexos; lise celular; participação no processo inflamatório; na resposta imune; e na homeostase são atividades importantes decorrentes da ativação do sistema complemento.

- Opsonização: a clivagem de C3 gera C3b que ligado à membrana de patógenos ou outras células funciona como opsonina. O C3b ligado à membrana pode continuar a cascata de ativação do complemento ou ser clivado em iC3b, C3d e C3dg, que embora não sejam capazes de prosseguir com a cascata de ativação, preservam a função de opsonina (SAHU.; LAMBRIS, 2001). O C4b, produto da clivagem de C4 pelo Complexo C1, também é uma opsonina (JANEWAY et al., 2003; PAUL, 1999; SAHU; LAMBRIS, 2001).

- MAC: além da função lítica, a formação do complexo de ataque à membrana pode promover morte celular por necrose quando ocorre em grandes quantidades em células autólogas (MEVORACH, 2003). O MAC formado em células autólogas em quantidades sublíticas promove sinalizações intracelulares diversas envolvidas nas funções normais destas células (COLE; MORGAN, 2003). Pode funcionar como um fator de proteção contra a lise mediada pelo próprio MAC, estimulando a síntese protéica e o metabolismo do ácido araquidônico (KLEIN, 1990; PAUL, 1999), e também interferir na fase de execução do processo apoptótico de células homólogas (FISHELSON; ATTALI; MEVORACH, 2003).

- Remoção de imunocomplexos: os imunocomplexos formam-se continuamente, mas os níveis circulantes podem aumentar significativamente em processos infecciosos. As toxinas e restos de microorganismos mortos formam complexos com os anticorpos e podem ser removidos em decorrência da ativação da Via Clássica. Ocorre deposição de C3b no imunocomplexo e estes são ligados ao CR1 (Receptor Tipo 1 do Complemento), presente na membrana de hemácias. As hemácias transportam o imunocomplexo até o fígado e baço, onde são desligados da hemácia e ligados em receptores para a porção Fc do anticorpo e receptores CR1 presentes em macrófagos, sendo então fagocitados. Além da remoção dos imunocomplexos, a ativação do complemento pode prevenir a sua agregação e precipitação no plasma e nos tecidos. Isto se deve possivelmente ao fato da deposição de C3b impedir novas ligações de moléculas de anticorpo a epítomos do antígeno. (JANEWAY et al., 2003; KLEIN, 1990; PAUL, 1999;).

- Participação no processo inflamatório: fragmentos obtidos da clivagem de C3, C4 e C5 (C3a, C4a e C5a) são denominados anafilatoxinas pela sua capacidade de promover no organismo uma reação similar ao choque anafilático mediado por IgE (FEARON, 1981; JANEWAY et al., 2003). As anafilatoxinas se ligam a receptores de membrana de células envolvidas com a resposta inflamatória. C3a e C5a promovem desgranulação e liberação de histamina por mastócitos. O aumento da permeabilidade vascular induzido pela liberação de histamina pode aumentar a deposição de imunocomplexos; promover o efluxo de proteínas do plasma, tais como

imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento, além de causar ativação extracelular, que pode aumentar a resposta inflamatória. Os efeitos biológicos de C4a são similares, porém em concentrações muito maiores do que C3a e C5a, devido a sua baixa afinidade pelos receptores (FRANK; FRIES, 1991). C3a induz a contração do músculo liso e tem receptores em basófilos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos (FRANK; FRIES, 1991). C5a é quimiotático sendo que o gradiente formado pela difusão do peptídeo do local de ativação do complemento causa a migração de neutrófilos e outros leucócitos (FEARON, 1981; FRANK; FRIES, 1991) além de induzir a secreção de mediadores e adesão destas células. C5adesArg (o C5a sem atividade anafilática) conserva a função de quimiotaxia (FEARON, 1981). Também tem sido reportado atualmente como mediador da apoptose celular (COLE; MORGAN, 2003), onde provavelmente tem efeitos anti apoptóticos (FISHELSON; ATTALI; MEVORACH, 2001). C5a pode atuar na regulação do reparo e remodelagem tecidual de órgãos e tecidos (KÖHL, 2006) tais como o fígado, após um dano tóxico, onde colabora nos estágios iniciais do processo (STREY et al., 2003).

1.5 – Participação de componentes do sistema complemento na produção de anticorpos pelas células B

A produção de anticorpos, devido à interação com linfócitos B e T é o efeito mais evidente na interação entre a imunidade inata e adaptativa promovida pelo sistema complemento (BOHANA-KASHTAN et al., 2004; CARROL, 2004;

EGWANG; BEFUS, 1984; KÖHL, 2006; MASTELLOS, et al., 2005; RICKERT, 2005; SAHU; LAMBRIS, 2001; TOSI, 2005). Entre as primeiras evidências da participação do complemento na resposta imune, verificou-se que o C3 podia se ligar à linfócitos B (NUSSENZWEIG et al., 1971) e que a depleção de C3 diminuía a imunidade a antígenos timo-dependentes (PEPYS, 1972). Papamichail (1975) verificou que a ativação da via clássica era necessária para a retenção do antígeno nos tecidos linfóides. Sabe-se que o complemento pode atuar na produção de anticorpos, dada a função de “adjuvante natural” de C3d (DEMPSEY et al., 1996).

De acordo com Carrol (2004), o complemento participa de cinco processos distintos da função de linfócitos B: ativação de células B virgens; sobrevivência de linfócitos B nos centros germinativos; produção do repertório de anticorpos naturais; manutenção de células B de memória, e seleção negativa de linfócitos B auto-reativos.

Os linfócitos B virgens possuem em sua membrana uma associação de imunoglobulinas de superfície, composta por IgM e IgD, que exercem a função de receptor celular para antígenos protéicos, denominada BCR (receptor de células B) (JANEWAY et al., 2003; PAUL, 1999). Quando o BCR reconhece um antígeno timo-dependente, transmite sinais intracelulares e através da endocitose mediada pelo receptor o antígeno é enviado aos sítios intracelulares onde é degradado e devolvido para a superfície da célula B, como peptídeo ligado a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II (JANEWAY et al., 2003; PAUL, 1999). Para que a célula B seja diferenciada em plasmócito (célula secretora de

anticorpos), é necessária a participação de células T auxiliares (antígeno-específicas), que reconhecem o complexo peptídeo:MHC de classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos e enviam os sinais ativadores necessários para que célula B sofra ativação e expansão (JANEWAY et al., 2003). Este processo pode ser modulado pela ligação de fragmentos de C3 ao antígeno (CARROL, 2004; RICKERT, 2005; SAHU; LAMBRIS, 2001; KÖHL, 2006). Tal fato se deve a um complexo co-receptor formado por três moléculas de superfície celular CD21:CD19:CD81 das células B, associado ao BCR, que aumenta a responsividade ao antígeno. Os antígenos recobertos por C3d e C3dg podem se ligar ao CD21 (receptor CR2 para o complemento) e essa associação pode promover recrutamento de tirosina quinases que resultam em uma produção de anticorpos de maneira mais eficaz (KÖHL, 2006; MORGAN, 2005; RICKERT, 2005). Já os antígenos timo-independentes são capazes de ativar as células B diretamente, sem a participação de linfócitos T antígeno-específicos. Tratam-se de polissacarídeos bacterianos que induzem produção somente de IgM e não induzem a formação de células de memória (JANEWAY et al., 2003).

Os centros germinativos são microambientes formados por células B, células dendríticas foliculares e tecido linfóide que duram de 15 a 21 dias depois de uma imunização. É nesse local que os linfócitos sofrem expansão, troca de isotipo para a produção de anticorpos e hipermutação somática. As interações com linfócitos T auxiliares, células foliculares dendríticas e complexo co-receptor do linfócito B são necessárias para que estes processos ocorram (CARROL, 2004). As células foliculares

dendríticas retêm os antígenos opsonizados e imunocomplexos para a apresentação aos linfócitos B (RICKERT, 2005). Uma vez iniciado o processo de reconhecimento e apresentação do antígeno, as células B sofrem processos de diferenciação e seleção, podendo numa etapa final se diferenciar em plasmócitos. Os plasmócitos são as principais células produtoras de anticorpos, tem a habilidade de secretar estas moléculas em grandes quantidades e normalmente estão localizados no baço, medula óssea e linfonodos (CARROL, 2000; CARROL, 2004; JANEWAY et al., 2003; RICKERT, 2005).

Os anticorpos naturais, produzidos por uma sub-classe de linfócitos B, os linfócitos B-1, requerem a participação do complemento, que aumenta a sinalização para antígenos cognatos através dos receptores CD21 e CD35 (CR2 e CR1), e tem papel na expansão e manutenção dessas células (CARROL, 2004, KÖHL, 2006).

O processo de seleção de linfócitos para que o organismo não produza auto-anticorpos é complexo e multimediado (CARROL, 2004). Deficiências de C1q e C4 aumentam a susceptibilidade ao Lupus eritematoso sistêmico, doença autoimune, o que reporta a importância do complemento no processo de seleção de células B auto-reativas. CD 21 e CD35, receptores para fragmentos do complemento, também parecem estar envolvidos neste processo (CARROL, 2004).

1.6 – Tireóide, hormônios produzidos e suas funções

A tireóide secreta três hormônios: triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e calcitonina. O T3 e T4 são os únicos compostos iodados com atividade biológica conhecida (BIANCO, 1991; LARSEN; INGBAR, 1993). Circulam na corrente sanguínea ligados a proteínas plasmáticas. O T4 e o T3 estão ligados a 70%, e 75-80% de TBG (“thyroid binding globulin”), respectivamente. A porção restante está ligada a TBA (“thyroid binding albumin”), sendo que apenas uma pequena fração não ligada (0,3% de T3 e 0,02-0,03% de T4) é capaz de entrar nas células e exercer sua função (BARRA et. al, 2003; LARSEN; INGBAR, 1993; LITTLE, 2006).

No interior das células, os hormônios tireoidianos ligam-se em receptores nucleares da família dos receptores de hormônios esteróides. Estes receptores estão ligados a regiões promotoras do DNA, e regulam a expressão gênica por modificações na transcrição e estabilização do RNA mensageiro. Os genes sensíveis aos hormônios tireoidianos variam de acordo com o tecido, sendo que de maneira geral tem-se síntese aumentada de enzimas, receptores e transportadores. Os efeitos biológicos são muitos: desenvolvimento e diferenciação celular, aumento do metabolismo energético pelo aumento da taxa metabólica basal; alterações no metabolismo lipídico, através do aumento da lipogênese no fígado; estímulo da síntese e catabolismo protéicos. O T3 é o hormônio mais ativo biologicamente, pois se liga com avidez de 10 a 15 vezes maior aos receptores nucleares do que o T4 (AHLQVIST, 1976; LARSEN; INGBAR, 1993; LITTLE, 2006).

O T4 é denominado pró-hormônio e exercerá sua função quando reduzido a T3 pela 5'-desiodase. Esta conversão ocorre no interior das células de tecidos periféricos que podem transformar 40% do T4 secretado em T3 ativo. A 5'-desiodase também pode reduzir o T4 a T3 reverso (T3r), que não possui ação biológica. Este evento é um mecanismo de controle da ação dos hormônios tireoidianos. Do total da produção diária da glândula, 93% é de T4 e o restante de T3, sendo que a maioria do T3 plasmático é derivada da conversão de T4 nos tecidos periféricos (AHLQVIST, 1976; LARSEN; INGBAR, 1993; LITTLE, 2006).

Os hormônios tireoidianos parecem ter efeitos não nucleares uma vez que são detectados efeitos biológicos minutos ou segundos após sua administração. Ocorre ligação a um receptor de membrana ($\alpha V\beta 3$ integrina) que resulta em alterações no transporte de íons (INSERPI, 2005). Estas alterações colaborariam para o metabolismo basal e estão diretamente relacionadas com a angiogênese e reparo dos vasos endoteliais (GRANINGER, et al., 1986).

A regulação da síntese dos hormônios da tireóide se dá por mecanismos de retroalimentação negativa. A hipófise regula este mecanismo através da síntese de TSH ("Thyroid Stimulant Hormone"). O TSH atua em nível de membrana celular e esta ligação resulta em uma série de eventos na glândula que culminam no aumento da síntese e secreção de hormônios tireoidianos. Desta maneira, o TSH é secretado em resposta à diminuição dos níveis séricos de T4.

1.7 – Disfunções da tireóide

As disfunções da glândula podem ser por hipo ou hiperfunção. O bócio endêmico, um tipo de hipotireoidismo, é a disfunção mais comum, causada por deficiência de iodo, incide em mais de 10% da população mundial (LITTLE, 2006), e é classificado pela Organização Mundial da Saúde como um grave problema de saúde pública (ANDERSSON, et al., 2005).

Das hiperfunções, de 60 a 80% correspondem à Doença de Graves cuja patogenia é autoimune, sendo mais prevalente em mulheres. O Reino Unido apresenta 25 a 30 novos casos a cada 10.000 mulheres por ano (LARSEN; INGBAR, 1993; LITTLE, 2006). É causada por falha da autotolerância à tireóide, que resulta na produção de auto-anticorpos contra o receptor de TSH da glândula. Os auto-anticorpos formados hiperestimulam o receptor tireoidiano (TSH-R) e tem-se a secreção aumentada de hormônios. As doenças da tireóide de caráter autoimune acometem de 4 a 5% da população mundial (COLLINS; GOUGH, 2002).

Há outras patogenias que resultam num excesso de hormônio tireoidiano (Tabela 4). Quando os níveis séricos de hormônios tireoidianos estão em excesso na corrente sangüínea, tem-se uma tireotoxicose e quando este processo ocorre pela ingestão de hormônios denomina-se tireotoxicose factícia (LITTLE, 2006).

O tratamento do hipertireoidismo é feito com drogas cujo mecanismo de ação é diminuir a síntese e por conseqüência os níveis séricos dos hormônios tireoidianos.

Já o tratamento do hipotireoidismo é feito com administração de hormônios tireoidianos sintéticos.

A levotiroxina (T4 sintético) é o fármaco de escolha para o tratamento do hipotireoidismo devido a sua estabilidade, uniformidade de conteúdo, baixo custo e meia-vida prolongada. Como o T4 é convertido a T3 no interior das células, após a administração de Levotiroxina têm-se os dois hormônios ativos circulantes. A Liotironina (T3 sintético) é mais potente que a levotiroxina e devido a sua meia-vida curta não tem sido utilizada na prática clínica para a reposição hormonal (GREENSPAN; DONG, 1995).

Tabela 4 - Classificação das distúrbios hipertireoidianos

Doença	Causas
Hipertireoidismo (tireotoxicose)	Hiperfunção primária da tireóide
	Doença de Graves
	Bócio multinodular tóxico
	Adenoma tóxico
	Hiperfunção secundária da tireóide
	Adenoma pituitário – Secreção de TSH
	Secreção inapropriada de TSH
	Secreção trofoblástica de hCG
	Uso de hormônios tireoidianos (factitia)
	Câncer metastático da tireóide
	Iatrogenia (superdosagem de hormônios tireoidianos)

TSH – Hormônio tireoestimulante; hCG – gonadotrofina humana coriônica.
Adaptado de Little (2006).

1.8 – Sistema imunológico, sistema complemento e função tireoidiana

Os sistemas imunológico e neuroendócrino estão estritamente relacionados. Os hormônios produzidos pelo sistema endócrino podem atuar sobre muitos processos do sistema imune (SAVINO; DARDENNE, 1995). Ocorrem alterações hormonais durante a resposta imune que podem ser importantes na imunoregulação (BESEDOVSKY; SORKIN, 1975). Estímulos físicos e fisiológicos podem induzir a secreção de neurotransmissores e hormônios que atuam em receptores de células do sistema imunológico e alteram a sua função. Os hormônios da hipófise sintetizados pelo estímulo hipotalâmico tem ações sobre o sistema imunológico. A corticotropina modula a síntese de anticorpos, crescimento de linfócitos B e produção de interferon- γ (IFN- γ). O hormônio do crescimento (GH) atua sobre células T citotóxicas e os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) sobre a produção de citocinas (SMITH; BLALOCK, 1988).

Os hormônios reguladores da função tireoidiana (TSH e TRH), bem como os produtos de síntese da glândula (T3 e T4) também estão relacionados com o sistema imunológico. Linfócitos e timócitos têm receptores nucleares para hormônios tireoidianos (AHLQVIST, 1976; KEAST; AYRE, 1980; WALL; TWOHIG; CHARTIER, 1981). O TRH e o TSH podem aumentar a síntese de anticorpos (KRUGER, et al., 1989), sendo que o TSH tem também ações sobre a diferenciação de linfócitos B (BLALOCK, et al., 1984; KRUGER, et al., 1986). Além disso, Kruger (1989) demonstrou que o TSH pode ser produzido em resposta a alguns patógenos e

aumentar a produção de anticorpos timo-dependentes in vitro e que a função normal da tireóide está relacionada com o funcionamento do sistema imunológico.

As doenças da tireóide mais amplamente estudadas são aquelas de caráter autoimune, do tipo órgão específicas e que envolvem fatores genéticos, ambientais e endógenos. Neste contexto pode-se citar o envolvimento de genes do complexo HLA e CTLA-4 e de tireócitos, que interagem com o sistema imunológico levando a expressão de moléculas ativas nas células da glândula, de moléculas de adesão, citocinas, CD 40 e proteínas do complemento (WEETMAN, 2003). Sabe-se que os eventos que ocorrem numa doença autoimune da tireóide são infiltrado de linfócitos na glândula, e autoreatividade contra antígenos próprios da glândula (tireoglobulina, peroxidase e TSH-R). Na doença de Graves tem-se hiperestimulação do TSH-R por autoanticorpos o que está relacionado a alelos de MHC de classe II e I e ao polimorfismo genético (WEETMAN, 2001). Nesta doença também são formados anticorpos anti-fração microssomal da tireóide que não destroem os tecidos da glândula (NAKAI, et al., 1992). Em estudo com pacientes portadores de Doença de Graves e sadios tratados com T4 verificou-se que as células NK têm sua atividade diminuída pelos níveis elevados de T4 (PAPIC, et al., 1987). Além disso, a melhora da Doença de Graves, em consequência da diminuição dos níveis de autoanticorpos circulantes, pode não ser um resultado direto da normalização dos níveis hormonais (ATWA, et al., 1995; HASSMAN, et al., 1985).

Na tireoidite pós-parto, uma disfunção que ocorre em 50% das mulheres após a gravidez, tem-se níveis aumentados de autoanticorpos contra a peroxidase da

tireóide, os quais ativam o complemento. Entretanto, o complemento parece não ter participação na patogênese da doença (OKOSIEME, et al., 2002). O hipertireoidismo severo tem efeitos sobre o sistema imunológico: ativação de subclasses de linfócitos T; redução do número de células NK; aumento no soro de sHLA (classe I) e beta-2-microglobulina, e a diminuição da responsividade de linfócitos TCD4+ a antígenos da tireóide (VOLPÈ, 2001).

Porém, o envolvimento do Complemento na patogênese de doenças autoimunes não é bem compreendido. Sabe-se que ocorre deposição de MAC em células da tireóide nas Doenças de Graves e Hashimoto. A expressão de reguladores de membrana do sistema complemento (CD46, CD55 e CD59) pode ser determinante para o dano produzido pela fixação do complemento nestas células (TANDON, et al., 1994). Oleesky (1986) verificou que os níveis de C9 estão aumentados na Doença de Graves e que o tratamento com drogas antitireoidianas diminui estes níveis. C9 pode estar envolvido na patogênese da doença devido a formação do MAC em células da tireóide, o que pode resultar em alguns efeitos biológicos.

Modelos experimentais de doenças da tireóide são utilizados para estudar o envolvimento do complemento. Coelhas deficientes em C6 tem uma diminuição do desenvolvimento de hipertireoidismo autoimune, relacionando deposição do MAC à patogênese da doença (INOUE, et al., 1993). O hipertireoidismo aumenta o tamanho dos órgãos linfóides e a diferenciação das células T. Neste modelo, T4 suprime a resposta imune e a autoimunidade (ATWA, et al., 1995; HASSMAN, et al., 1985).

Cope e Kapnick (1940) demonstraram uma relação entre a função da tireóide e a concentração de complemento no soro de coelhas, observando que no hipotireoidismo induzido tem-se diminuição do complemento, e no hipertireoidismo induzido ocorre aumento. Os autores correlacionaram estes resultados com o status nutricional e afirmaram que a resposta a um patógeno não foi alterada nestas disfunções induzidas. Entretanto, a metodologia utilizada neste estudo não permite interpretar os resultados obtidos por estes pesquisadores à luz do conhecimento atual nesta área.

Em trabalho realizado anteriormente (DUARTE, 2002), verificou-se que em ratos o tratamento com propiltiouracil (PTU), medicamento que bloqueia a síntese dos hormônios tireoidianos, determina um quadro de hipotireoidismo associado a alterações no sistema complemento, evidenciadas por aumento na atividade lítica da via alternativa sem alteração da via clássica. A investigação de componentes da via alternativa mostrou que ocorre aumento significativo na concentração sérica de fator B, efeito que é observado também em animais tireoidectomizados, evidenciando relação com os baixos níveis de hormônios tireoidianos nestas condições (DUARTE et al., 2000). A produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro em ratos com hipotireoidismo decorrente do tratamento com PTU está aumentada (DUARTE et al, 2003), sugerindo que as alterações no complemento que ocorrem devido ao tratamento, podem estar influenciando em parte esta resposta.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Pelo contexto apresentado, este estudo teve os objetivos citados a seguir:

- Investigar o efeito do hipertireoidismo, determinado pela administração de hormônios tireoidianos (T3 e T4) sobre o sistema complemento, avaliando a atividade lítica das vias clássica/ lectina e alternativa;
- Efetuar um estudo sistemático empregando várias doses de hormônios tireoidianos, para avaliar o complemento em condições de níveis supra-normais variáveis destes hormônios. Este estudo incluiu também investigação do efeito do período de tratamento sobre o sistema complemento, empregando doses pré-estabelecidas de hormônios tireoidianos;
- Investigar possíveis alterações nas concentrações de componentes do complemento nos animais hipertireoideos;
- Considerando as possíveis alterações observadas no complemento avaliar a resposta de produção de anticorpos em ratos hipertireoideos.

Materiais e Métodos

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Os seguintes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP - Ribeirão Preto, e mantidos no biotério da FCFRP-USP:

- Ratos wistar machos, adultos jovens (180 ± 10 g) para obtenção de soro normal, tratamento com levotiroxina (T4) ou triiodotironina (T3), e/ou imunização com hemácias de carneiro;
- Coelhas New Zealand, fêmeas adultas jovens (± 3 Kg) para obtenção de hemácias usadas no estudo da Via Alternativa, e para produção de anticorpos;
- Carneiros Merino adultos para obtenção de hemácias para o estudo das vias clássica/lectina e para o preparo de antígeno de membrana utilizado em metodologia para avaliar o efeito dos hormônios sobre a produção de anticorpos;
- Cobaías adultas jovens para a obtenção de soro utilizado em ensaios de avaliação do número de células produtoras de anticorpos (PFC).

Também foram fornecidos pelo Biotério SPF (“specific pathogen free”) da FCFRP-USP e mantidos nas mesmas condições:

- Ratos wistar machos, adultos jovens (180 ± 10 g) para tratamento com triiodotironina e imunização com hemácias de carneiro.

Todos os animais foram manipulados segundo critérios éticos, aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais do Campus de Ribeirão Preto da USP – CEUA – processo número 05.1.1160.53.9. A menos que seja especificado, os ensaios foram realizados em ratos SPF.

3.2 – Hormônios

3.2.1 – Preparo da suspensão de levotiroxina (T4) e Cinomel® (T3)

Comprimidos de levotiroxina sódica (Puran T4® - Sanofi-Synthelabo) foram macerados e adicionou-se água para se obter a dispersão aquosa do fármaco nas concentrações de 0,15; 0,30; 1,0; 5,0; 50 e 100 µg/mL. A suspensão de triiodotironina foi obtida utilizando-se comprimidos de Cinomel® macerados e adicionados de água para concentrações de 0,15; 1,0; 10 e 50 µg/mL. Adotou-se o volume fixo de 1mL de suspensão para tratamento de cada animal.

3.2.2 – Preparo da suspensão de triiodotironina (T3)

O fármaco triiodotironina na forma de sal sódico (Laboratório Purifarma) foi veiculado em suspensão aquosa de carboximetilcelulose (CMC), segundo a formulação abaixo:

Formulação – suspensão base:

Carboximetilcelulose (CMC).....0,5%

Nipagin.....0,18%

Nipazol.....0,02%

Água destilada qsp.....100mL

A suspensão concentrada do fármaco foi diluída em suspensão base em concentrações finais de T3 de 0,15; 1,0; 10; 25; e 50 µg/mL. Adotou-se o volume fixo de 1mL de suspensão para tratamento de cada animal.

3.3 – Tratamento dos animais e colheita de soro

Os ratos foram divididos em grupos controles e experimentais mantidos em gaiolas (4 ratos/gaiola) recebendo ração e água "ad libitum", em sala com temperatura controlada ($\cong 24^{\circ}\text{C}$). Os períodos de tratamento foram de 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

Os grupos controles receberam água ou suspensão aquosa de CMC e os grupos experimentais suspensão de levotiroxina sódica ou triiodotironina. A administração do fármaco em suspensão aquosa foi realizada por via intragástrica, através de seringa acoplada a uma cânula de polietileno, durante todo o período estabelecido, uma vez ao dia em horários fixos. Após o término do período de tratamento, os animais foram pesados e submetidos a jejum de 8-10 horas. Depois da eutanásia por decapitação, o sangue foi colhido em tubos de vidro com auxílio de funil e mantido à temperatura ambiente para retração do coágulo por 40 minutos. Após este período foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O soro foi aliquotado e estocado a -70°C para análises posteriores.

3.3.1 – Preparo de “Pool” de Soro Normal de Ratos (SNR)

Ratos não tratados foram eutanasiados por decapitação (n=20). O soro obtido da colheita do sangue foi reunido em um recipiente em banho de gelo para obtenção de um “pool” de soro normal de Ratos (SNR), o qual foi aliquotado em tubos Eppendorf® e estocado a -70°C .

3.4 – Avaliação da atividade lítica da via alternativa

A atividade lítica da via alternativa foi determinada através de ensaios hemolíticos pelos métodos: cinético (POLHILL; PRUITT; JOHNSTON, 1978) e estático (MAYER, 1971).

3.4.1 – Colheita de sangue de coelhos e preparo de suspensão padronizada de hemácias

O sangue de duas coelhas foi colhido em solução de Alséver (HOFFMAN; MAYER, 1977) na proporção 1:1 e incubado por 15 minutos a 37°C em igual volume de tampão TEA/EDTA (trietanolamina – 28mM; ácido etileno diaminotetracético – 10mM; pH 7,4; 0,1% (p/v) gelatina). Após o período de incubação, foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm, o sobrenadante e a interface, que continha os leucócitos, foram descartados e as hemácias ressuspensas em TEA-Mg²⁺ (trietanolamina – 28mM; Sulfato de magnésio – 0,002M; pH 7,4; 0,1% (p/v) gelatina) . A seguir, foram lavadas por três vezes com este tampão e após a última lavagem, ressuspensas em solução de Alséver. A suspensão de hemácias foi identificada e estocada a 4°C por até 15 dias para utilização.

Nos ensaios de avaliação da atividade lítica da via alternativa, utilizou-se uma alíquota de suspensão de hemácias de cada coelha, centrifugada por 10 minutos a

2000 rpm. As hemácias foram ressuspensas e lavadas por duas vezes com tampão TEA/EGTA/Mg²⁺ (trietanolamina – 28mM; ácido etileno glicoltetracético – 10mM; Sulfato de magnésio – 0,002M; pH 7,4; 0,1% (p/v) gelatina). A seguir, a suspensão de hemácias foi padronizada pela medida da absorvância em 700nm, para uma densidade óptica de 0,70-0,80, quando diluída 1,5 vezes.

3.4.2 – Determinação da atividade lítica da via alternativa do sistema complemento – “método cinético”

O soro dos animais, estocado a –70°C foi degelado a 37°C, diluído em TEA/EGTA/Mg²⁺ nas proporções 1:3 e 1:4 (200µl) e incubado no compartimento termostaticado do espectrofotômetro (modelo DU-70 Beckman - USA) a 37°C por 2’30’’. Transcorrido este tempo, adicionou-se imediatamente a suspensão padronizada de hemácias de coelho previamente mantidas a 37°C (400µl) e iniciou-se o registro da cinética de lise no período de 10 minutos (POLHILL; PRUITT; JOHNSTON, 1978).

A partir do registro gráfico da cinética de lise calculou-se o $t_{1/2}$, isto é, o tempo gasto em minutos para lisar 50% das hemácias presentes no meio de reação (Figura 2). A atividade lítica é inversamente proporcional ao valor obtido de $t_{1/2}$, sendo que quanto maior o $t_{1/2}$, menor será a atividade lítica, e quanto menor o $t_{1/2}$, maior a atividade lítica.

Figura 2 – Registro gráfico representativo da cinética de lise de hemácias de coelho em ensaio para a avaliação da atividade lítica da Via Alternativa. As setas indicam os pontos onde ocorre 50% de lise, utilizados para os cálculos de $t_{1/2}$. A – Soro diluído 1:3 e B – Soro diluído 1:4.

3.4.3 – Determinação da atividade lítica da via alternativa do sistema complemento – “Método estático”

O soro teste estocado a -70°C foi degelado a 37°C , diluído em TEA/EGTA/ Mg^{2+} em várias proporções (300 μl). Em tubos de hemólise mantidos em banho de gelo, adicionou-se suspensão padronizada de hemácias para um volume final de 500 μL , incubando-se a 37°C por 30 minutos. Os tubos foram então colocados em banho de gelo e adicionou-se imediatamente 500 μL de PBS (solução salina tamponada com fosfato) gelado. Centrifugou-se por 10 minutos a 2000rpm e a

absorvância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 412nm. As leituras de absorvância foram convertidas em porcentagem de lise em relação à absorvância da suspensão de hemácias lisadas em água (100% de lise).

3.5 – Avaliação da atividade lítica das vias clássica/lectina

3.5.1 – Determinação do título do anticorpo anti-hemácia de carneiro

O anticorpo obtido através da imunização de coelhas com hemácias de carneiro foi titulado segundo Almeida e Fife (1976).

Para a titulação da hemolisina, diferentes quantidades de anticorpo, em diluições de 1:50 até 1:800 (volume/volume), foram utilizadas para sensibilizar hemácias de carneiro, obtendo-se EAs (eritrócito de carneiro sensibilizado com anticorpo anti-hemácia de carneiro). Os EAs foram submetidos a ensaio hemolítico estático da via clássica (descrito posteriormente), para a obtenção de uma curva de hemólise. A partir da curva, determinou-se o título da hemolisina, ou seja, a quantidade de anticorpo necessária para sensibilizar de forma adequada as hemácias de carneiro.

3.5.2 – Colheita de sangue de carneiros e preparo de suspensão padronizada de hemácias

O sangue de dois carneiros foi colhido em solução de Alséver na proporção 1:1, identificado e estocado a 4°C por até 15 dias para utilização.

Para a avaliação da atividade lítica das vias clássica/lectina, utilizou-se uma alíquota do sangue de cada carneiro foi adicionada de Alsérver, foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. A seguir, o sobrenadante e a interface, que continha os leucócitos, foram descartados e as hemácias lavadas por duas vezes com tampão CFD (“complement fixation diluent” – ácido dietilbarbitúrico – 0,0155 M; barbital sódico – 0,0045M; cloreto de sódio – 0,725 M; cloreto de magnésio – 0,00415 M; cloreto de cálcio – 0,00125 M; azida sódica – 0,005 M) (HARRISON; LACHMANN, 1986). A suspensão de hemácias foi padronizada para densidade óptica de 0,70-0,80 em espectrofotômetro pela absorvância em 700 nm, quando diluída 40 vezes.

Para o preparo do EA foram misturados volumes iguais de anticorpo anti-hemácia de carneiro diluído conforme o título pré-determinado e suspensão padronizada de hemácias. A mistura foi mantida a 4°C com agitação ocasional por 15 minutos e padronizada para densidade óptica de 0,70-0,80 em espectrofotômetro pela absorvância em 700 nm, quando diluída 1,5 vezes.

3.5.3 – Determinação da atividade lítica das vias clássica/ lectina do sistema complemento – “método cinético”

A determinação da atividade das Vias Clássica/Lectina foi realizada segundo Ewald et al. (1961) e Ferriani (1990).

O soro a ser avaliado foi diluído em CFD para um volume final de 200µL, diluído nas proporções de 1:20 e 1:40, e incubado no compartimento termostatizado do espectrofotômetro (modelo DU-70 Beckman - USA) a 37°C por 2'30". Imediatamente após este tempo, adicionou-se o EA (400µL) previamente mantido a 37°C e iniciou-se o registro da cinética de lise (10 minutos).

A partir das curvas de lise, calculou-se o $t_{1/2}$, de maneira similar ao procedimento realizado para a Via Alternativa.

3.5.4 – Determinação da atividade lítica das vias clássica/ lectina – “método estático”

O soro estocado a -70°C foi degelado a 37°C e diluído em CFD em várias proporções (300µL). Em tubos de hemólise em banho de gelo, adicionou-se EA (200µL) sendo o volume final de 500 µL e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Os tubos foram então colocados em banho de gelo e foram adicionados imediatamente

500 µL de PBS gelado. Centrifugou-se por 10 minutos a 2000 rpm e a absorvância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 412 nm.

As leituras de absorvância foram convertidas em porcentagem de lise em relação a absorvância da suspensão de hemácias lisadas em água (100% de lise).

3.6 – Avaliação de componentes do sistema complemento

3.6.1 – Preparo de soro depletado de fator B (RB)

Soro depletado de componentes do sistema complemento é denominado como reagente (R) (HARRISON; LACHMANN, 1986). Aliquotas de 0,5 mL de SNR em tubos Eppendorf® de 1,5mL foram submetidas a aquecimento em banho-maria a exatamente 56°C. A cada 30 segundos retirou-se 60 µL de soro que foram transferidos para tubos de hemólise contendo 240 µL de TEA/EGTA/Mg²⁺, mantidos em banho de gelo. A seguir, adicionou-se suspensão padronizada de hemácias de coelho (200 µL) e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Adicionou-se 500 µL de PBS gelado e centrifugou-se por 10 minutos a 2000 rpm. A absorvância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro a 412 nm. Os valores obtidos de porcentagem de lise foram utilizados para avaliar a atividade lítica residual dependente da via alternativa, determinando-se o tempo de incubação a 56°C necessário para a inativação total desta atividade. A inativação seletiva do fator B foi avaliada pela recuperação da atividade lítica da via alternativa após a reposição com fator B humano purificado (HARRISON; LACHMANN, 1986).

3.6.2 – Avaliação dos níveis séricos funcionais de fator B

Os níveis séricos funcionais de fator B foram avaliados em ensaio hemolítico estático empregando o soro dos ratos controles e tratados como fonte de Fator B para recuperar a atividade lítica do RB. Soro de animais controle ou tratado (300 µL diluído 1:5) em TEA/EGTA/Mg²⁺ foram acrescidos de 60 µL do RB e 200 µL de hemácias de coelho padronizadas.

3.7 – Determinação dos níveis séricos de hormônios

Foram avaliados os níveis séricos de T3, T4 e TSH através de imunoensaio pelo princípio da quimioluminescência no aparelho Immulite® modelo 1000 (DPC), utilizando kits específicos para cada hormônio. Para tal, o soro a ser analisado foi pipetado em recipientes do aparelho denominados “unidade teste”. As “unidade teste” foram colocadas no aparelho que procede todo o ensaio automaticamente.

Os níveis de T3 sérico foram dosados utilizando kit para T3 total, que mede os níveis de triiodotironina livres e ligados a proteínas plasmáticas. Para tal, 25 µL de amostra foram incubados a 37°C por 30 minutos na unidade teste do aparelho contendo uma pérola revestida com anticorpo monoclonal de rato anti-T3 e fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugada com T3. Após a incubação, a unidade teste foi lavada para a separação da pérola dos marcadores livre ou ligado. O substrato

quimioluminescente (dioxietano) foi adicionado, e as unidades teste foram transferidas para a esteira do luminômetro e incubadas por 10 minutos a 37°C. Após a incubação, a emissão de fótons foi mensurada por tubo fotomultiplicador (PMT), sendo que as contagens por segundo (cps) foram convertidas em concentração de T3 (ng/dL), utilizando-se curva padrão.

Os ensaios para dosagem de T4 e TSH foram feitos de maneira similar.

Os níveis de T4 sérico foram dosados utilizando kit para T4 total, que mede os níveis tiroxina livres e ligados a proteínas plasmáticas. 15 µL de amostra foram incubados a 37°C por 30 minutos com anticorpo monoclonal de rato anti-T4 e fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugada com T4. O resultado foi mensurado em concentração de T4 (µg/dL), utilizando-se curva padrão.

O TSH sérico foi dosado através de kit de terceira geração para TSH, utilizando 75 µL de amostra incubada a 37°C por 60 minutos com anticorpo monoclonal de rato anti-TSH e fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugada com TSH. O resultado foi obtido em unidade de concentração para TSH (µIU/mL), utilizando-se curva padrão.

3.8 – Determinação do número de células produtoras de anticorpos (PFC)

3.8.1 – Tratamento dos animais e imunização

Ratos foram divididos em grupos (n=8) controle, tratados com suspensão de CMC; e experimental, tratados com triiodotironina em suspensão de CMC pela via intragástrica por 12 dias. No oitavo dia de tratamento foram imunizados com 0,6 mL da suspensão de hemácias de carneiro em NaCl estéril 0,9% (1:5), preparada conforme descrito abaixo, inoculada pela via subcutânea. Após um período de 5-6 dias da imunização, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi colhido para a obtenção de soro e o baço retirado para o ensaio de PFC.

Para a imunização dos ratos, uma alíquota de aproximadamente 5 ml de sangue de dois carneiros, colhido e estocado com solução de Alsever (1:1) a 4°C, foi lavada e centrifugada com NaCl estéril 0,9% (p/v) por 10 minutos a 2000rpm. O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lavadas por mais duas vezes sob as mesmas condições. O sedimento de hemácias obtido foi suspenso em NaCl estéril 0,9% (p/v) para uma proporção 1:5 (sedimento:NaCl, v:v) e esta suspensão foi utilizada para a imunização dos animais.

3.8.2 – Soro de cobaia adsorvido com hemácias de carneiro

Sangue de cobaias normais adultas jovens previamente anestesiadas foi obtido por punção cardíaca. Após 40 minutos para a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos e o soro obtido reunido em um recipiente em banho de gelo para obtenção de um “pool”. Para a adsorção, o sedimento de hemácias de dois carneiros, obtido através de três centrifugações a 2000 rpm com PBS estéril, foi adicionado ao soro de cobaia na proporção de 1:10 (sedimento:soro, v:v). A mistura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 4°C por 5 minutos a 1500g (UEDA et al.,1991). O soro foi separado e estocado em alíquotas a -70°C.

3.8.3 – Isolamento de células do baço

Os baços retirados de ratos eutanasiados por decapitação foram macerados em malha plástica sobre uma placa de Petri contendo 3 ml de solução estéril de Hanks (pH 7.4). Adicionou-se 1 mL de solução estéril de Hanks e o macerado foi transferido para tubo Falcon® de 15 mL. Após 10 minutos de repouso para que os debris celulares fossem decantados, a suspensão foi transferida para tubo Falcon® de 50 mL onde se adicionou 40 mL de NH₄Cl 0,85% (p/v; pH 7,2), para lisar as hemácias. Incubou-se a 37°C por 10 minutos, e após este período a suspensão foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se solução estéril

de Hanks e centrifugou-se novamente sob as mesmas condições por duas vezes. O sedimento foi ressuspensão em 3mL de solução estéril de Hanks. Determinou-se em câmara de Neubauer a viabilidade e o número de esplenócitos por mL de suspensão utilizando corante azul de Tripán que cora em azul as células não viáveis (FRESHNEY, 1987). A suspensão de esplenócitos foi diluída para $2,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^6$ células/mL.

3.8.4 – Ensaio de PFC

Para a realização do ensaio de PFC utilizou-se:

- Lâminas de vidro (2,5x7,5 cm) previamente recobertas por agarose 0,5% em água e secas em estufa por 48 horas;
- Tubos de hemólise com 400µl de agarose de baixo ponto de fusão (GIBCO ®) a 0,5% (p/v) em solução estéril de Hanks;
- SRBC - o sedimento de hemácias de dois carneiros, obtido através de três lavagens com NaCl estéril 0,9% (p/v), foi ressuspensão em solução estéril de Hanks para uma concentração de 5% (v/v) de hemácias;
- Suspensão de células de baço nas concentrações de $2,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^6$ células/mL.
- Soro de cobaia adsorvido com hemácia de carneiro.

Nos tubos com agarose de baixo ponto de fusão mantidos a 37°C, adicionou-se 50µL de SRBC e 100µL de suspensão de esplenócitos. Homogeneizou-se e o conteúdo foi vertido em lâminas de vidro numa superfície plana. Após a gelificação da agarose, as lâminas foram transferidas para um suporte de acrílico com a face da agarose voltada para baixo. Adicionou-se solução estéril de Hanks na canaleta do suporte acrílico. O suporte foi transferido para uma câmara úmida e incubado em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 150 minutos. Após este período, retirou-se o tampão da canaleta e adicionou-se o soro de cobaia adsorvido com hemácia de carneiro diluído a 1:5 em solução de Hanks. Incubou-se novamente em câmara úmida em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 45 minutos.

Os pontos de lise das hemácias formados na placa foram contados com auxílio de lupa.

3.9 – ELISA (Imunoensaio com anticorpo ligado à enzima)

3.9.1 – Preparo do antígeno para revestimento das placas

O antígeno de membrana de hemácia de carneiro, parcialmente purificado, foi preparado de acordo com o descrito por Temple et al (1993,1995), com modificações. Sangue de dois carneiros foi colhido em solução de Alsever na proporção 1:1, sendo o volume de sangue 800 mL. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 1000g. Descartou-se o sobrenadante e a interface, e as hemácias obtidas foram ressuspensas em NaCl 0,9% em volume 5 vezes superior ao volume de células. Centrifugou-se e o

processo foi repetido por três vezes nas mesmas condições. Descartado o sobrenadante, as hemácias lavadas foram lisadas com tampão (Tris-HCl 0,05M EDTA 0,1mM, pH7.6). O lisado foi centrifugado a 25.000g por 30 minutos e o processo foi repetido até a ausência de cor. Os sedimentos foram filtrados em gaze e estocados por uma noite a 4°C. Após centrifugação a 25.000g por 30 minutos, o sedimento foi ressuspenso em três vezes o seu volume com dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,1% (p/v) contendo 0,02% (p/v) de azida sódica. O antígeno solubilizado de membrana foi dializado contra SDS 0,1% (p/v) em PBS a temperatura ambiente, aliquoteado e estocado a -20°C.

A concentração de proteínas na preparação do antígeno para revestimento das placas foi determinada pelo método de Bradford (1976), obtendo-se um valor de 0,7 mg/mL.

3.9.2 – Revestimento das placas

Placas de ELISA Immulon 2HB® de 96 poços foram revestidas com antígeno (125 µL/poço) preparado de hemácia de carneiro contendo 8 µg/mL e estocadas a -4°C por até 30 dias.

3.9.3 – ELISA para avaliação de IgM

Para avaliar a resposta imune primária, placas previamente revestidas com antígeno foram lavadas por 3 vezes com 125µL/poço de PBS pH 7,4 contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T). Adicionou-se PBS-T contendo 5% (p/v) de leite em pó e incubou-se a temperatura ambiente por 2 horas. A seguir, a placa foi lavada com PBS-T (125µL/poço) por 3 vezes. Amostras de soro de ratos foram adicionadas em diluição seriada em PBS-T, sendo a diluição inicial 1:16 e a final 1:2048. As placas foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Procedeu-se nova lavagem, segundo as condições acima citadas, e adicionou-se o anticorpo (Goat anti-rat IgM – μ chain specific – Southern Biotech®) diluído em PBS-T 1:1000, 125µL por poço. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente a placa foi lavada por 3 vezes em PBS-T, seguindo-se a adição de substrato (Sigma Fast™- p-nitrophenyl phosphato Table sets). Incubou-se a placa no escuro por 15 minutos e imediatamente após foi feita a leitura a 405nm em espectrofotômetro EIA multi-well reader – Sigma Diagnostics. Em todas as análises foi feito um controle positivo, com “pool” de soro de ratos não tratados e imunizados; e controle negativo, com “pool” de soro de ratos normais.

3.9.4 – ELISA para determinação de IgG

Placas previamente revestidas com antígeno foram lavadas por 3 vezes com 125µL por poço de PBS pH 7,4 contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T). Adicionou-se PBS-T contendo 5% (p/v) de leite em pó e incubou-se a temperatura ambiente por 2 horas. A placa foi lavada novamente com PBS-T (125µL por poço) por 3 vezes. Amostras de soro de ratos foram adicionadas em diluição seriada feita com PBS-T, sendo a diluição inicial 1:64. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Procedeu-se nova lavagem, segundo as condições acima citadas e adicionou-se anticorpo (Goat anti-rat IgG – γ chain specific – Southern Biotech®) diluído em PBS-T 1:1500, 125µL por poço. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente a placa foi lavada por 3 vezes em PBS-T e adicionou-se substrato (Sigma Fast™- p-nitrophenyl phosphato Table sets). Incubou-se a placa no escuro por 15 minutos e imediatamente após transcorrido este período foi feita a leitura a 405nm em espectrofotômetro EIA multi-well reader – Sigma Diagnostics. Para todas as análises foi feito um controle positivo, com “pool” de soro de ratos não tratados e imunizados; e controle negativo, com “pool” de soro de ratos normais.

3.10 – Análise dos resultados

Para o tratamento estatístico dos resultados foram utilizados os testes mais convenientes.

O teste de ANOVA e DUNNETT foi utilizado para comparações múltiplas em grupos definidos por um fator, que no caso é o controle.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação de dois valores. Trata-se de um teste não paramétrico que compara dois grupos não pareados onde os dados são substituídos por postos (valores numéricos) e o valor de P é dado de acordo com a diferença da soma dos valores atribuídos.

Todos os resultados foram analisados através do software GraphPad Prism versão 3.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA (MOTULSKY H. J., 1999). A significância estatística foi estabelecida com $p < 0.05$.

Resultados

4. RESULTADOS

Parte 1 – Padronização de um modelo experimental de hipertireoidismo em ratos

Para o tratamento dos animais, os hormônios tireoidianos foram administrados sob três diferentes apresentações:

- Puran T4® - levotiroxina sódica (T4) sob a forma de comprimidos;
- Cinomel® - triiodotironina sódica (T3) sob a forma de comprimidos;
- Triiodotironina sódica (T3) – do laboratório Purifarma, constituído do fármaco em pó, utilizado para fins de manipulação.

4.1 – Puran T4®

Foi realizado um estudo dose efeito, avaliando-se a atividade lítica do sistema complemento e o perfil hormonal dos animais, determinando-se os níveis de TSH (Figura 3), T4 (Figura 4) e T3 (Figura 5).

Os ratos foram tratados com doses de levotiroxina por período de 14 dias. O tratamento com a dose de 50 µg de levotiroxina alterou de forma estatisticamente significativa os níveis de TSH, quando comparados ao controle (Figura 3). A dose de

5 µg não alterou os níveis deste hormônio, quando se utilizou o mesmo período de tratamento.

Os hormônios tireoidianos circulantes foram alterados com a dose de 50 µg de levotiroxina (Puran T4®) após 14 dias de tratamento. Os níveis séricos de T4 foram aumentados de forma estatisticamente significativa nesta dose, porém não foram observadas diferenças no tratamento com 5 µg. Os níveis de T3 (hormônio funcional) não foram alterados pelo tratamento com 5 µg, porém estão menores quando comparados ao controle (Figura 4) no tratamento com 50 µg de levotiroxina, embora esta alteração não seja estatisticamente significativa.

Figura 3 – Efeito do tratamento com levotiroxina (T4) sobre os níveis séricos de TSH. Níveis séricos de TSH de ratos tratados com água (controle), tratados com 5μg (A) ou 50μg (B) de T4, durante 14 dias. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney, onde: A - $p= 0,7242$, $n=10$. B - $p= 0,0107$, $n=10$; (*) estatisticamente significativo.

Figura 4 – Efeito do tratamento com levotiroxina (T4) sobre os níveis séricos de T4. Níveis séricos de T4 de ratos tratados com água (controle), tratados com 5µg (A) ou 50µg (B) de T4, durante 14 dias. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney, onde: A - $p= 0,1274$, $n=10$. B - $p= 0,0081$, $n=10$; (*) estatisticamente significativo.

Figura 5 – Efeito do tratamento com levotiroxina (T4) sobre os níveis séricos de T3. Níveis séricos de T3 de ratos tratados com água (controle), tratados com 5µg (A) ou 50µg (B) de T4, durante 14 dias. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney, onde: A - $p=0,7242$, $n=10$. B - $p=0,0727$, $n=10$.

A partir dos resultados apresentados acima, pode-se dizer que o tratamento com levotiroxina, dependendo da dose, altera os níveis de TSH, T4 e T3, sendo o último de forma moderada.

4.2 - Cinomel®

O tratamento com Cinomel® (T3) resultou em alterações dos níveis de T4 (Figura 6) e de T3 (Figura 7) de maneira dose-dependente. O TSH (Figura 8) foi alterado nas doses de 1, 10 e 50µg.

Verifica-se que os níveis séricos de T4 foram diminuídos nos animais tratados com doses de 1, 10 e 50µg de Cinomel®. Doses de 10 e 50 µg determinaram uma redução dos níveis de T4 para níveis não detectáveis pela metodologia utilizada deste hormônio.

Figura 6 – Efeito do tratamento com Cinomel (T3) sobre os níveis séricos de T4. Níveis séricos de T4 de ratos tratados com água (controle) e tratados com 1, 10 e 50µg de T3, durante 7 dias.

Os níveis circulantes de T3 são aumentados à medida que se aumenta a dose de T3 no período de 7 dias de tratamento. Esta elevação corresponde a valores máximos, mais de seis vezes maiores do que os obtidos em animais tratados com água.

Figura 7 – Efeito do tratamento com Cinomel (T3) sobre os níveis séricos de T3. Níveis séricos de T3 de ratos tratados com água (controle) e tratados com 1, 10 e 50µg de T3, durante 7 dias. Dados analisados por teste estatístico de ANOVA e DUNNETT para comparações múltiplas, n=16, onde (*) estatisticamente significante.

O tratamento com Cinomel® altera os níveis de TSH. Observam-se variações dos valores de animais tratados com todas as doses as quais não foram de significância estatística, nas condições analisadas.

Figura 8 – Efeito do tratamento com Cinomel (T3) sobre os níveis séricos de TSH. Níveis séricos de TSH de ratos tratados com água (controle) e tratados com 1, 10 e 50μg de T3, durante 7 dias. Dados analisados por teste estatístico de ANOVA e DUNNETT para comparações múltiplas, n=16, onde não houve alteração estatisticamente significativa.

4.3 – Triiodotironina

Os ratos tratados com suspensão aquosa de T3 (Figura 9) apresentaram altos níveis deste hormônio e diminuição significativa dos níveis séricos de TSH (figura 10). Os níveis de T4 nos animais tratados foram reduzidos para valores não detectáveis pelo método analítico utilizado (menores do que 1µg/dL).

Figura 9 – Efeito do tratamento com triiodotironina (T3) sobre os níveis séricos de T3. Níveis séricos de T3 de ratos tratados com suspensão de CMC (controles) e tratados com 25µg de suspensão de T3, durante 12 dias. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney, $p=0,0043$, $n=10$, onde (*) estatisticamente significante.

Figura 10 – Efeito do tratamento com triiodotironina (T3) sobre os níveis séricos de TSH. Níveis séricos de TSH de ratos tratados com suspensão de CMC (controles) e tratados com 25μg de suspensão de T3, durante 12 dias. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney, $p=0,0022$, $n=10$, onde (*) estatisticamente significativa.

Parte 2 – Avaliação da atividade lítica do Sistema Complemento

Desenvolveu-se um estudo nos três modelos de indução de hipertireoidismo, utilizando-se doses variáveis de hormônios, administradas por vários períodos de tratamento, visando verificar possíveis alterações do sistema complemento. A avaliação foi feita tanto em animais onde o tratamento resultou em níveis séricos elevados de hormônios tireoidianos e/ou TSH, quanto naqueles onde estes níveis não foram alterados.

Via Clássica

4.1 – Titulação da hemolisina

Para a realização dos ensaios de atividade lítica da via clássica, titulou-se a hemolisina (anticorpo anti-hemácia de carneiro) previamente produzida no laboratório e utilizada para a sensibilização das hemácias de carneiro.

A hemolisina foi titulada através de ensaio hemolítico estático, conforme descrito. Na curva de titulação (figura 11), tem-se uma diminuição progressiva do percentual de hemólise devido à diminuição dos diferentes títulos de anticorpos utilizados no preparo do EA. Observa-se que o percentual de hemólise é reduzido de forma acentuada em títulos a partir 1:80 (terceiro ponto da curva). Assim, de forma a garantir uma sensibilização adequada das hemácias de carneiro para os ensaios

hemolíticos, utilizou-se o título de 1:50 da hemolisina, correspondente ao intervalo entre o segundo e o terceiro ponto da curva de titulação.

Figura 11 – Curva do percentual de hemólise obtido em ensaio hemolítico estático das vias clássica/lectina. Cada ponto corresponde ao percentual de hemólise obtido a partir de um “pool” de soro de ratos e hemácias de carneiro sensibilizadas com diferentes títulos de anticorpo anti-hemácia de carneiro (hemolisina), sendo, de forma crescente: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640. Ensaio realizado em triplicata.

4.2 – Avaliação do efeito do tratamento dos animais com hormônios tireoidianos sobre a atividade lítica das vias clássica/lectina

A atividade lítica das vias clássica/lectina foi avaliada em todos os grupos tratados com levotiroxina e triiodotironina. Conforme pode ser observado na figura 12, a atividade desta via não foi alterada pelo tratamento com levotiroxina. Resultados similares foram observados para o tratamento com T3.

Figura 12 – Efeito do tratamento com levotiroxina (T4) sobre a atividade lítica das vias clássica/lectina. Os pontos representam os valores individuais de $t_{1/2}$ (minutos) do soro de ratos tratados com água (controle), 1 µg e 5 µg de T4 ao dia. As barras horizontais indicam a média dos valores individuais de um experimento representativo. Períodos de tratamento: 7, 14, 21 e 28 dias (indicados na figura). Dados analisados por teste estatístico de ANOVA e DUNNET para comparações múltiplas, não houve alterações significantes sobre a atividade.

4.3 – Avaliação do efeito do tratamento dos animais com hormônios tireoidianos sobre a atividade lítica da via alternativa

4.3.1 – Tratamento com Puran T4®

O período de 14 dias de tratamento foi escolhido para avaliar doses a partir de 0,15 µg de levotiroxina (Puran T4®). A seleção destas doses foi baseada na prática clínica, onde a levotiroxina é utilizada no tratamento de humanos que apresentam hipotireoidismo. A figura 13 apresenta os resultados com estas doses.

Figura 13 – Efeito do tratamento com levotiroxina (T4) sobre a atividade lítica da via alternativa. Cada barra representa o valor médio obtido (n=8 animais) dos valores de t ½ (minutos) do soro de ratos tratados com água (controle); 0,15; 0,30; 1,0 e 5µg de T4 ao dia. Período de tratamento: 14 dias. Dados analisados por teste estatístico de ANOVA e DUNNET para comparações múltiplas, (*) estatisticamente significante.

De acordo com a figura 13, verifica-se uma diminuição acentuada da atividade lítica da via alternativa nas doses de 1,0 e 5,0 μ g de levotiroxina. As doses menores não determinaram efeito observável sobre esta atividade.

A figura 14 apresenta os resultados obtidos na avaliação da atividade lítica da via alternativa no soro de ratos tratados com doses superiores às utilizadas no tratamento descrito anteriormente, porém empregando períodos variáveis de tratamento.

Como se pode observar, a atividade lítica da via alternativa é alterada pelo tratamento com levotiroxina de forma período dependente. O tratamento com doses de 50 e 100 μ g determinou redução da atividade lítica da via, mais acentuada após 14 dias de tratamento. A manutenção do tratamento por períodos de 21 e 28 dias mostrou uma tendência de recuperação da atividade lítica.

Figura 14 – Efeito do tratamento com levotiroxina (T4) sobre o perfil de atividade lítica da via alternativa. Cada ponto representa o percentual de atividade obtido a partir da razão entre os valores de $t_{1/2}$ de controle e tratados. Os ratos foram tratados com água (controle), 50 e 100 µg de T4 ao dia, por períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. Dados analisados por teste estatístico de ANOVA e DUNNETT para comparações múltiplas. A alteração da atividade lítica é estatisticamente significativa nas doses de 50 e 100µg de levotiroxina por período de 14 dias de tratamento (*).

4.3.2 – Tratamento com Cinomel® (T3)

A dose inicial de Cinomel® para o tratamento dos animais foi estipulada com base nos valores utilizados na prática clínica para o tratamento do hipertireoidismo. Avaliou-se períodos de 3, 7 e 14 dias (figura 15). O período de 14 dias foi avaliado inicialmente devido às alterações de atividade lítica obtidas no tratamento com levotiroxina, e não foram observadas alterações da atividade lítica da via alternativa.

O tratamento por 3 dias com 0,15µg de Cinomel® não resultou em alterações da atividade lítica da via alternativa, porém após 7 dias de tratamento, foi detectada uma redução significativa desta atividade. Assim, com base neste resultado, nos ensaios seguintes o período de 7 dias de tratamento foi escolhido para investigar o efeito de outras doses deste fármaco sobre a via alternativa.

A figura 16 apresenta os resultados obtidos com doses variando de 1 a 50 µg. Verificou-se que o tratamento com doses variáveis de triiodotironina alterou a atividade lítica em relação ao controle, de forma mais pronunciada na dose de 50 µg. Dos animais tratados com 50µg, quatro apresentaram $t_{1/2}$ superior a 10 minutos (acima do limite de tempo padronizado para o experimento). Embora não tenha sido possível avaliar estatisticamente todas as doses pelo teste de Anova e Dunnet, observa-se que o aumento dos valores de $t_{1/2}$ está diretamente relacionado com o aumento da dose.

Figura 15 – Efeito do tratamento com Cinomel (T3) sobre a atividade lítica da via alternativa. Os pontos representam os valores individuais de $t_{1/2}$ (minutos) do soro de ratos tratados com água (controle), 0,15µg de T3 ao dia, durante 3 dias (A); 7 dias (B) e 14 dias (C). As barras horizontais indicam a média dos valores individuais de um experimento representativo. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney sendo que: (A) $p=0,6730$; (B) $p=0,006$; (C) $p=0,6454$, $n=8$, (*) estatisticamente significante.

Figura 16 – Efeito do tratamento com Cinomel (T3) sobre a atividade lítica da via alternativa. Os pontos representam os valores individuais de $t_{1/2}$ (minutos) do soro de ratos tratados com água (controle), 1 , 10 e 50 µg de T3 ao dia, durante 7dias. As barras horizontais indicam a média dos valores individuais de um experimento representativo. Dados analisados pelos testes estatísticos de ANOVA e DUNNETT para comparações múltiplas, onde não houve diferenças significantes, e de Mann-Whitney, onde Controle x 1µg, $p=0,1728$; Controle x 10µg, $p=0,4747$.

4.3.3 – Tratamento com triiodotironina (T3)

A partir dos resultados obtidos com o tratamento com Cinomel® onde a atividade lítica da via alternativa é diminuída com dose de 50 µg, utilizou-se uma dose intermediária a esta (25µg), para o tratamento com suspensão de triiodotironina (Figura 17). Por conveniência, esta dose foi avaliada no período de 12 dias. Observou-se um aumento estatisticamente significativo dos valores de $t_{1/2}$, o que reflete em diminuição da atividade lítica da via alternativa no soro dos ratos tratados com T3.

Figura 17 – Efeito do tratamento com triiodotironina (T3) sobre a atividade lítica da via alternativa. Cada barra representa o valor médio obtido (n= 8 animais) dos valores de $t_{1/2}$ (minutos) do soro de ratos tratados com suspensão de CMC (controle) e tratados com 25µg suspensão de T3, durante 12 dias. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney, $p=0,019$, $n=10$, (*) estatisticamente significativa.

4.4 –Avaliação dos níveis séricos funcionais de fator B

Tendo em vista a alteração da atividade lítica da via alternativa em decorrência do tratamento com hormônios tireoidianos (T3 e T4) por vários períodos e doses, os níveis séricos de Fator B foram avaliados nestas condições.

4.4.1 –Preparo de soro deficiente de Fator B (RB)

Para a preparação do RB, o soro aquecido a 56° C foi submetido a um ensaio hemolítico estático para a avaliação da via alternativa (Figura 18). O aquecimento do soro por 30 segundos resulta em hemólise de aproximadamente 65%, e ocorre uma redução 30% após 60 segundos de aquecimento. Observa-se que a atividade lítica da via alternativa, representada em % de hemólise, é diminuída à medida que o soro é exposto a um tempo maior de aquecimento. Com base na de cinética de lise, o intervalo de tempo de incubação selecionado para a inativação do fator B foi de 180 segundos. A seguir, investigou-se se a inativação por aquecimento foi seletiva para o fator B. Para tal, alíquotas de soro aquecido a 56° C por 180 segundos foram adicionadas de fator B humano purificado. Foram utilizadas três concentrações distintas de fator B: 0,133 µg/µL, abaixo da quantidade normal; 0,210 µg/µL, correspondente à quantidade normal; e 0,300 µg/µL, valor acima da quantidade normal de fator B encontrada no soro humano (PAUL, 1999) (Figura 19).

Figura 18 – Cinética de inativação da atividade lítica da via alternativa por aquecimento do “pool” de soro normal de ratos a 56° C. Cada ponto representa a média da atividade lítica avaliada em duplicata.

Figura 19 – Análise da reconstituição da atividade lítica da via alternativa em soro de rato aquecido a 56° C. Onde: Fator B - atividade lítica de soro aquecido a 56° C, suplementado com diferentes concentrações de fator B humano purificado (indicadas na figura). RB – atividade lítica de soro aquecido a 56° C sem suplementação de Fator B. Controle 1 – 100% de hemólise (em água). Controle 2 – atividade lítica de soro normal não aquecido a 56° C.

De acordo com o resultado ilustrado na figura 19, a atividade lítica do soro aquecido a 56° C é restaurada pela suplementação de fator B humano purificado, sendo que com 0,210 µg/µL tem-se uma atividade lítica semelhante à obtida a partir do soro não aquecido. Assim, verificou-se que o aquecimento a 56° C por 180 segundos provocou seletivamente a desnaturação do fator B. Desta maneira, “pool” de soro normal de ratos foi aquecido por 180 segundos para a produção de RB, utilizado nos ensaios a seguir.

4.4.2 –Avaliação dos níveis séricos funcionais de fator B

Os níveis de Fator B foram avaliados no soro de ratos onde a atividade lítica da via alternativa foi alterada de forma estatisticamente significativa em decorrência do tratamento com T3.

Os resultados mostraram redução da atividade lítica em ratos tratados com doses crescentes de triiodotironina por período de 7 dias (Figura 20). Estes dados indicam redução funcional do fator B nestas condições.

O tratamento dos ratos por período de 12 dias com suspensão aquosa de triiodotironina (figura 21) também resultou numa diminuição dos níveis séricos funcionais de Fator B. Este efeito foi observado em todos os grupos tratados por este período e dose, os quais foram utilizados em ensaios de investigação da produção de anticorpos em animais tratados com T3.

Figura 20 – Efeito do tratamento com Cinomel (T3) sobre os níveis séricos funcionais de Fator B. Cada barra representa o valor médio do percentual de hemólise e desvio de soro RB, adicionado de soro de ratos tratados com água (controle); 1,0 , 10 e 50 µg de T3 ao dia. Período de tratamento: 7 dias. Dados analisados por teste estatístico de ANOVA e DUNNET para comparações múltiplas, (*) estatisticamente significativa.

Figura 21 – Efeito do tratamento com Triiodotironina (T3) sobre os níveis séricos funcionais de Fator B. Cada barra representa o valor médio do percentual de hemólise de soro RB, adicionado de soro de ratos tratados com suspensão de CMC (controle) ou com 25µg suspensão de T3, durante 12 dias. Dados analisados por teste estatístico de Mann-Whitney, $p=0,007$, $n=8$, onde (*) estatisticamente significativa.

Parte 3 – Avaliação da resposta imune humoral em ratos tratados com hormônios tireoidianos

4.1 – Avaliação do número de células produtoras de anticorpos (PFC)

4.1.1 – Padronização do período de imunização

Para estabelecer o período de imunização mais adequado para a realização dos ensaios, ratos normais não tratados foram imunizados com SRBC a 5% e o ensaio de PFC foi feito em diferentes dias (figura 22). De acordo com o resultado, após cinco dias de imunização, tem-se um número maior de células produtoras de anticorpos anti-SRBC, quando comparados aos outros períodos analisados. O período de cinco dias foi escolhido para as análises posteriores, por ser aquele em que a resposta à imunização foi mais efetiva.

Figura 22 - Número de células secretoras de anticorpos (PFC) de ratos imunizados. As células do baço foram obtidas entre 4 a 7 dias após a imunização dos animais com suspensão de SRBC 5%. A suspensão de células foi avaliada em duplicata e cada período de imunização em triplicata. (n=3 animais/período).

4.1.2 – Delineamento experimental para a avaliação da resposta imune humoral

Foram planejados dois protocolos de tratamento visando verificar a ação do hormônio sob a resposta de produção de anticorpos. No primeiro (figura 23, esquema 1), o hormônio tireoidiano foi administrado por 7 dias e no oitavo dia os animais foram imunizados, sendo que após cinco dias foram eutanasiados para a avaliação da resposta imune humoral. No segundo (figura 23, esquema 2), os ratos foram tratados com T3 por 12 dias e imunizados no oitavo dia de tratamento, sem interrupção.

Esquema 1:

Esquema 2:

Figura 23 - Delineamentos experimentais para a avaliação da resposta imune humoral. Os quadrados indicam o número de dias de tratamento e os elementos destacados em cinza correspondem aos dias de tratamento com triiodotironina.

Os resultados de ensaios de PFC obtidos através delineamento experimental do esquema 1, onde o hormônio era administrado por 7 dias, não apontaram diferenças significantes entre os ratos tratados e não tratados com T3 (resultados não apresentados). Assim, os demais ensaios de PFC foram feitos seguindo o protocolo do esquema 2, com administração ininterrupta de T3.

A figura 24 ilustra as lâminas de PFC preparadas a partir de suspensão de células do baço de animais imunizados, tratados com T3 ou não (controle). Observa-

se que o tratamento com suspensão de triiodotironina resultou em diminuição no número de células do baço produtoras de anticorpos anti-SRBC.

A redução do número de células produtoras de anticorpos foi observada em todos os grupos tratados com T3 (Tabela 5). Verifica-se que em 71, 87% dos animais tratados, observa-se este efeito.

A tabela 6 documenta os resultados de um destes grupos, onde o número de células produtoras de anticorpos foi avaliado.

Figura 24 – Reprodução fotográfica de lâmina de vidro (2,5x7,5 cm) representativa do ensaio de células produtoras de anticorpos, onde cada ponto escuro na placa representa um PFC. Ensaio feito com $2,5 \cdot 10^5$ células/mL do baço de ratos tratados e não tratados com 25µg de triiodotironina por 12 dias e imunizados no oitavo dia de tratamento com SRBC. A- rato controle. B – rato tratado.

Tabela 5 - Resposta imune primária, estimada através do número de PFC.

Número de animais experimentais avaliados ^(a,b)	Animais que apresentaram redução do número de PFCs	
	Número	Percentual (%)
32	23	71,87%

(a) ratos tratados com 25µg de triiodotironina por 12 dias e imunizados com SRBC no oitavo dia de tratamento.

(b) um número equivalente de animais controle foi avaliado

Tabela 06 – Número de células produtoras de anticorpos.

Valor médio do número de PFC(± desvio)*

Rato	C	T
1	29,00 ±1,41	0
2	27,00±3,53	0
3	31,50±9,19	78,00±4,24
4	0	0

Controle – não tratado com T3, imunizado

Tratado – tratado com T3, imunizado

(*) resultado obtido através da média de duas lâminas de PFC para cada animal.

Experimento realizado com diluição de $2,5 \cdot 10^5$ células/mL.

Ensaio feito no 5º dia de imunização.

Ensaio representativo.

4.2 – Determinação dos níveis séricos de anticorpos anti-SRBC

Visando caracterizar melhor a correlação entre os tratamentos com hormônios e os níveis séricos de anticorpos IgG e IGM produzidos em função da imunização com SRBC, estes foram avaliados por ELISA.

4.2.1 – Avaliação dos níveis séricos de IgG

O soro de animais tratados com T3 e imunizados de acordo com os delineamentos experimentais apresentados foram avaliados quando à produção de IgG por ELISA. Não foram detectados valores referentes a níveis séricos de IgG anti-SRBC nos experimentos realizados em animais tratados e controle imunizados; e nos controles positivo e negativo.

4.2.2 – Avaliação dos níveis séricos de IgM

Para a avaliação dos níveis séricos de IgM por ELISA, foi feita uma curva de titulação, para avaliar as diluições mais adequadas de soro a serem utilizadas em análises posteriores. A figura 25 mostra a curva obtida a partir de “pool” de soro de ratos imunizados com SRBC e não imunizados. As diluições do soro feitas nesta análise foram utilizadas nos demais ensaios. Utilizaram-se estes “pools” de soro como controles positivo e negativo dos experimentos.

O tratamento com T3 resultou em diminuição dos níveis séricos de anticorpo anti-SRBC (figuras 26 e 27). Quando se compara as figuras 25 e 26, nota-se que a alteração do título de IgM anti-SRBC em ratos tratados foi diminuída, levando a produção deste anticorpo a níveis similares aos obtidos para ratos normais não imunizados.

Figura 25 - Curva de titulação de IgM anti-SRBC por ELISA. Símbolos fechados (■) , valores de absorvância obtidos a partir de “pool” normal de soro de ratos. Símbolos abertos (○), valores de absorvância obtidos a partir de um “pool” de soro de ratos imunizados intraperitonealmente com SRBC .

Figura 26 – Efeito do tratamento com Triiodotironina (T3) sobre os níveis séricos de anticorpo IgM anti-SRBC. Cada ponto representa valores médios de absorvância obtidos em diferentes diluições do soro de ratos tratados com suspensão de CMC (controle - ■), e tratados com 25µg suspensão de T3 (○), durante 12 dias, n=8.

Os dados referentes à diminuição dos níveis séricos de IgM anti-SRBC foram agrupados em somatória dos valores de absorvância, obtidos para cada diluição de soro, e estão apresentados na figura 27. Verifica-se que a diminuição dos níveis de IgM anti-SRBC é estatisticamente significativa.

Figura 27 – Efeito do tratamento com Triiodotironina (T3) sobre os níveis séricos de anticorpo IgM anti-SRBC. Cada barra representa a somatória dos valores de absorvância obtidos para cada diluição de soro em ELISA, dividido pelo número de diluições feitas. Soro de ratos tratados com suspensão de CMC (controle) e tratados com 25µg suspensão de T3, durante 12 dias. Dados analisados por teste Mann-Whitney, $p=0,0286$, $n=8$, (*) estatisticamente significativa.

Discussão

5 – DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou a investigação de possíveis relações entre a atividade lítica do sistema complemento e as funções da tireóide, e a interface produção de anticorpo e sistema complemento no hipertireoidismo. O hipertireoidismo foi induzido em ratos por tratamento com Puran T4® (T4), Cinomel® (T3) e triiodotironina sódica (T3). Analisou-se a atividade lítica das vias clássica/lectina e alternativa do sistema complemento; os níveis séricos funcionais de Fator B; o número de células produtoras de anticorpos, bem como o título de IgM de ratos previamente imunizados.

Os modelos experimentais para a indução do hipertireoidismo descritos na literatura normalmente utilizam T4 ou o T3 na forma pura, administrados pela via subcutânea ou intraperitonal (QUEIROZ ; SHAO; ISMAIL-BEIGI, 2004; YAMADA et al., 2004; MARAN, et al., 2001). Esses modelos não são os mais adequados para estudos do sistema complemento, visto que as preparações de fármacos feitas num ambiente de laboratório de pesquisa podem não ser manipuladas de acordo com as boas práticas de manipulação para injetáveis. Caso estas preparações não sejam estéreis e inócuas, quando injetadas podem acarretar numa resposta imune local e/ou num processo inflamatório, que comprometeria os estudos. Um modelo mais adequado para o estudo do sistema complemento seria aquele onde não fossem administradas doses diárias por vias invasivas, onde a preparação não fosse imunogênica. Para minimizar estes fatores, a via intragástrica, por não possuir os

inconvenientes acima citados e por mimetizar o tratamento hormonal realizado na prática clínica, foi escolhida neste estudo.

Na escolha das doses iniciais de tratamento para os três modelos analisados (Puran T4®, Cinomel® e triiodotironina sódica), o parâmetro utilizado foi o uso dos fármacos na prática clínica. Para o tratamento do hipotireoidismo utiliza-se 50µg de Puran T4® ao dia, inicialmente (GREENSPAN; DONG, 1995). Assim, a dose de 0.15µg/dia para ratos de 200g corresponde à menor dose utilizada em humanos de 70kg (50µg/dia). As doses de T3 foram selecionadas de maneira semelhante. Sabe-se que em casos de hipertireoidismo de diferentes patogenias, quando há hiperplasia da glândula, esta pode produzir quantidades de hormônios de 5 a 15 vezes maiores do que o normal (GUYTON; HALL, 1996). No hipertireoidismo autoimune, os autoanticorpos estimulam muito mais a glândula a produzir hormônio do que o TSH (a ligação do anticorpo anti-TSH-R estimula a produção de hormônios por 12 horas enquanto que o TSH tem ação apenas por uma hora), resultando em altos níveis de hormônios tireoidianos circulantes (GUYTON; HALL, 1996; GREENSPAN; DONG, 1995). Assim, foram utilizadas doses pequenas, que em animais eutireoideos já resultaram em alterações dos níveis hormonais, e doses elevadas, que corresponderiam ao hipertireoidismo não tratado em humanos.

O Puran T4® foi utilizado inicialmente nos estudos, por ser um medicamento de escolha no tratamento do hipotireoidismo. O tratamento em determinadas doses diminuiu os níveis séricos de TSH, aumentou os níveis de T4, mas não alterou de maneira significativa os níveis de T3. A diminuição dos níveis de TSH ocorre devido

a mecanismos de retroalimentação negativa, onde altos níveis séricos de T4 suprimem a secreção de TSH pela hipófise (LARSEN; INGBAR, 1993; GUYTON; HALL, 1996). Em casos de hipertireoidismo o TSH está diminuído ou às vezes até não detectável (LITTLE, 2006). A princípio, poderia ser esperado que o tratamento com T4 aumentasse também os níveis de T3 circulantes, o que não ocorreu nos ensaios deste estudo. Provavelmente isto se deve a um mecanismo de regulação destes hormônios. Para exercer suas funções o T4 requer conversão enzimática em T3 no interior das células. Em situações onde há excesso de T4, ao invés da síntese de T3 as enzimas sintetizam T3 reverso, o qual não possui a capacidade de se ligar a receptores nucleares e promover efeitos biológicos (LARSEN; INGBAR, 1993). Esta conversão de T4 em T3 reverso pode ter ocorrido no tratamento com Puran T4®. Desta maneira, o tratamento com levotiroxina, embora altere os níveis de TSH e T4, acarreta uma diminuição dos níveis de T3, hormônio com maior atividade metabólica intrínseca.

Para que o tratamento resultasse em aumento dos níveis do hormônio funcional circulante (T3), foram utilizados Cinomel® e triiodotironina. O Cinomel® foi utilizado em uma fase inicial dos estudos com triiodotironina, tendo sido posteriormente retirado do mercado. O estudo inicial feito com este medicamento permitiu verificar que, à semelhança dos resultados obtidos com o Puran T4®, ocorre uma diminuição da atividade da via alternativa, e esta alteração é dose dependente. Utilizou-se então a triiodotironina sódica na forma de sal (Laboratório Purifarma®). Foi necessária a elaboração de um veículo para a administração deste fármaco,

insolúvel em água. A administração de fármacos insolúveis pela via oral requer a veiculação em suspensões que usualmente são aquosas. Assim a triiodotironina foi veiculada em uma suspensão de CMC, como agente espessante. A CMC é amplamente utilizada nas áreas de manipulação e indústria farmacêutica, bem como na indústria alimentícia. Utilizou-se também nipagin e nipazol que são conservantes microbiológicos de ampla utilização, de forma a garantir que a preparação não fosse contaminada pelo crescimento de fungos ou bactérias (ANSEL; POPOVICH; ALLEN Jr., 2001). Assim, a veiculação do T3 numa suspensão aquosa assegurou homogeneidade das doses e um veículo apropriado para a administração pela via oral nos animais. Os ratos dos grupos controle receberam a suspensão de CMC contendo nipagin e nipazol.

O tratamento com suspensão de T3 em diversas doses e períodos resultou numa tireotoxicose com níveis diminuídos de TSH e T4, e níveis circulantes elevados de T3. Os baixos níveis de T4 se devem provavelmente à competição de T4 e T3 pelos sítios de ligação com proteínas plasmáticas (LARSEN; INGBAR, 1993).

A avaliação de possíveis alterações do sistema complemento em função do tratamento com os hormônios tireoidianos, foi feita através da determinação da atividade lítica, empregando ensaios para a via alternativa e clássica/lectina. Nas condições deste estudo, a atividade lítica das vias clássica/lectina não foi alterada pelo tratamento com hormônios tireoideanos. Muitos estudos descrevem alterações do Complemento em hipertireoidismo autoimune, tendo sido observado um

aumento da deposição de C9 nos tecidos da glândula (OLEESKY, et al. 1986; NAKAI, et al. 1992; TANDON et al, 1994). Porém, para que C9 se insira nas células autólogas é necessária uma ativação do sistema complemento. Riis et al. (2005) em estudo feito com pacientes com Doença de Graves antes e depois da terapia com metimazol, em hipertireoidismo temporariamente induzido e hipertireoidismo autoimune, verificaram que o excesso de hormônios tireoidianos aumenta os níveis de MBL e MASP-2, indicando uma ativação da via das lectinas neste caso. No presente trabalho não foram observadas alterações na atividade lítica das vias clássica/lectina, nos três modelos experimentais utilizados. Corroborando de certa forma os resultados deste trabalho, Duarte (2002) verificou que em ratos com hipotireoidismo induzido com propiltiouracil, há alteração da atividade lítica da via clássica apenas com doses elevadas e períodos longos de tratamento.

A atividade lítica da via alternativa foi alterada em diversas doses e períodos, nos três modelos de indução de hipertireoidismo analisados.

Os resultados mostraram que o tratamento com Puran T4® diminui a atividade nas doses a partir de 1 µg, embora não altere os níveis séricos de T3. Doses menores (0,15 e 0,30 µg) não resultaram em alterações, enquanto que doses intermediárias (1 e 5 µg) diminuíram a atividade lítica da via alternativa no período de 14 dias de tratamento. Nos ratos tratados por 7, 14, 21 e 28 dias com doses de 50 e 100 µg de levotiroxina, observou-se diminuição significativa da atividade lítica após 14 dias de tratamento. Assim, o efeito do tratamento com levotiroxina foi dependente do período de tratamento. Também se observou uma tendência de

recuperação da atividade lítica para níveis normais em tratamentos prolongados. Isto também foi observado em estudos de hipotireoidismo induzido (DUARTE, 2002). Sabe-se que, embora com menor afinidade, o T4 pode se ligar aos receptores nucleares e exercer ações nas células. Desta forma, pode-se dizer que as alterações decorrentes do tratamento com Puran T4® que resultaram na redução da atividade lítica da via alternativa podem estar associadas às variações nos níveis de T4.

O tratamento com triiodotironina também resultou em redução da atividade lítica da via alternativa, de maneira dose e período dependente. Observou-se que as menores doses utilizadas de T3 (0,15µg) diminuem a atividade lítica da via alternativa após 7 dias de tratamento, e que esse efeito não foi observado após períodos mais prolongados (14dias). Doses crescentes de T3 administradas pelo período de 7 dias resultam em alteração da atividade lítica. Os efeitos ocorrem em períodos mais curtos de tratamento do que quando se utiliza o T4. Tal resultado se deve possivelmente ao fato do T3 ser o hormônio funcional, não necessitando de conversão enzimática, conforme ocorre com o T4. Assim, eventuais alterações mensuráveis da atividade lítica seriam detectadas mais precocemente.

Embora em alguns períodos e doses de tratamento não tenham sido observadas alterações nos níveis séricos de hormônios tireoidianos, houve diminuições significativas da atividade lítica da via alternativa. Tal fato sugere que os efeitos de alteração da via podem estar relacionados com o início do tratamento, onde podem ocorrer variações discretas e não detectáveis nos níveis hormonais,

corroborando o fato de que não ocorrem alterações da atividade lítica quando se utilizam períodos mais prolongados.

Devido às alterações encontradas na atividade lítica da via alternativa, o fator B, componente desta via, foi analisado. Esta escolha se baseou no fato de que o fator B é um dos componentes iniciais mobilizados durante a ativação da via alternativa. Para a análise da atividade desta proteína no soro produziu-se um soro deficiente de fator B. Soros deficientes de determinados componentes do complemento são denominados de “reagentes R”, seguindo-se o nome do componente em questão, neste caso RB (PAUL, 1999). O RB foi preparado a partir do aquecimento do soro a 56°C, por um tempo determinado, para a inativação seletiva do Fator B. A seletividade da inativação foi comprovada pela adição de fator B humano purificado ao RB, havendo restauração da atividade lítica da via alternativa. Para as análises, soro diluído dos animais controles e tratados, cuja função foi repor o fator B, foram adicionados ao RB (HARRISON; LACHMANN, 1986) A análise entre o percentual de atividade lítica de ratos controle e tratados permitiu determinar os níveis séricos funcionais relativos de fator B neste estudo. Estes níveis foram diminuídos pelo tratamento com hormônios tireoidianos. Estes resultados possivelmente estão relacionados com a atividade lítica da via alternativa. Entretanto, não é possível afirmar, de acordo com os resultados e método utilizado, que a quantidade da proteína fator B no soro dos animais hipertireoideos está diminuída. Em contrapartida, outros componentes da via alternativa podem ter suas concentrações séricas alteradas nestas condições, o que merece investigação posterior.

Conforme já descrito, o sistema complemento está envolvido nos mecanismos da produção de anticorpos pelas células B. Investigou-se então se a atividade lítica da via alternativa alterada devido ao hipertireoidismo, estaria associada a alterações na produção de anticorpos. O tratamento com T3 alterou a produção de anticorpos anti-SRBC. Verificou-se que em grupos onde a atividade da via alternativa estava diminuída, os níveis séricos funcionais de Fator B estavam reduzidos, e o número de PFC foi similarmente alterado, sendo não detectado em determinados grupos.

Em estudo utilizando cultura de linfócitos de camundongos, verificou-se que tratamento com T3 altera a síntese de DNA e a produção de anticorpos, e que o bloqueio temporário da tireóide deprime a produção de anticorpos (KEAST; TAYLOR, 1981). Em trabalho utilizando propiltiouracil para a indução de hipotireoidismo em ratos (DUARTE, et al., 2003), verificou-se que o hipotireoidismo decorrente deste tratamento ou de tireoidectomia resulta em aumento da produção de anticorpos mediante a imunização com SRBC, mostrando a participação do hormônio tireoidiano neste processo. Este resultado foi o oposto ao obtido no hipertireoidismo induzido neste estudo. Em um estudo utilizando pássaros como modelo experimental, foi sugerido que o T3 pode ter papel decisivo como regulador da proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos em aves e mamíferos (KEAST; AYRE, 1980). Kruger et al., (1989) em estudo utilizando TSH como alvo, correlaciona a função normal da glândula tireóide com o sistema imune. Atwa e colaboradores (1995) verificaram que em doenças autoimunes da tireóide o T4 pode

atuar sobre linfócitos B que produzem anticorpos contra os receptores de TSH. Hassman e colaboradores (1985) verificaram que em ratos cujo hipertireoidismo foi induzido por T4 e autoimunidade pela administração de tireoglobina e adjuvante de Freund completo, os hormônios tireoidianos suprimem a autoimunidade. Os mecanismos pelos quais esta modulação ocorre necessitam de estudos mais aprofundados. Os resultados do presente estudo sugerem a possibilidade de que alterações do complemento, decorrentes do hipertireoidismo, e podem ter um papel nestes mecanismos.

Volpè (2001) verificou que o hipertireoidismo em humanos tem uma série de efeitos sobre a imunidade celular e humoral, os quais são observados quando há altos níveis de hormônios tireoidianos circulantes. Este dado corrobora os resultados obtidos neste estudo, visto que foram observados efeitos sobre a resposta de produção de anticorpos. Ainda neste estudo, o autor afirma que a utilização de T4 no hipertireoidismo induzido não resultou em diminuição da resposta imune. Estes resultados se devem provavelmente ao uso do T3 e não do T4, da dose, via de administração e período utilizados.

Devido à menor sensibilidade do ensaio de PFC, optou-se por uma segunda análise utilizando a técnica de ELISA e avaliando a produção de IgM anti-SRBC para uma comparação dos dados. Os resultados obtidos nos ensaios de ELISA foram os esperados de acordo com os ensaios de PFC. Ratos tratados com T3 por 12 dias, apresentaram uma diminuição acentuada na produção de IgM anti-SRBC, a qual foi equivalente à determinada em um pool de soro normal de ratos não imunizados.

Sabe-se a que participação do complemento no processo de apresentação do antígeno aos linfócitos B na imunidade humoral é importante. Através dos resultados obtidos pode-se inferir que em casos de hipertireoidismo a produção de anticorpos contra antígenos apresentados para as células B poderia ser ineficaz. Este fato pode estar relacionado com a diminuição da atividade lítica via alternativa ocasionada, dentre outros fatores, pela diminuição dos níveis séricos funcionais de fator B.

Conclusões

6 – CONCLUSÕES

- O tratamento de ratos com T3 e T4 estabeleceu um estado de hipertireoidismo, que provocou redução da atividade lítica da via alternativa do sistema complemento, e não interferiu com a atividade lítica das vias clássica/lectina. A redução da atividade lítica da via alternativa é dependente da dose de hormônio e do período de tratamento.
- Os ratos hipertireoideos apresentaram uma diminuição dos níveis séricos funcionais de fator B.
- A triiodotironina provocou em animais imunizados com SRBC uma redução da produção de anticorpos anti-SRBC, o que reforça a sugestão da ação moduladora de hormônios tireoidianos sobre a resposta imune humoral.
- Os dados obtidos mostram que alterações dos níveis séricos de hormônios tireoidianos podem interferir com a atividade do sistema complemento, e este pode ser um dos mecanismos através dos quais estes hormônios afetam a resposta imune.

Referências

8. REFERÊNCIAS

AHLQVIST, J. The thyroid: some endocrine aspects. **Acta endocrinologica**, Copenhagen, v.206, p. 64-71, 1976.

ALMEIDA, J. O.; FIFE JÚNIOR, E.H. Quantitatively stardardized complement fixation methods for clinical evaluation of antigens prepared from *Tripanossoma cruzi*. **Pan. Am. Health Org. Scient.Public.**, Oxford, v. 319, 92p, 1976.

ANDERSSON, M.; TAKKOUCHE, B.; EGLI, I.; ALLEN, H.E.; BENOIST, B. Current global iodine status and progress over the last decade towards the elimination of iodine deficiency. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.83, n.7, p. 518-25, 2005.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistema de Liberação de Fármacos**. 6 ed. Editorial Premier, São Paulo. 2001.

ATWA, M.A.; LUKES, Y.D.; SALATA, K.; ABO-HASHEM, E.M.; EL-KANNISHY, M.H.; BURMAN, K.D. The influence of triiodothyronine, thyroxine, thyrotropin, an methimazole on thyroid cell MHC class II antigen expression. **Clinical immunology and immunopathology**, Nova York, v. 76, n.2, p.209-213, 1995.

BARRA, G.B.; VELASCO, L.F.R.; PESSANHA, R.P.; CAMPOS, A.M.; MOURA, F.N.; DIAS, S.M.G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R.C.J.; SIMEONI, L.A.; NEVES, F.A.R. Mecanismo molecular de ação do hormônio tireoidiano. **Arquivo brasileiro de endocrinologia e metabolismo**, Botucatu, v.48, n.1, p.25-39, 2003.

BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M.C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 180, p.5-15, 2001.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Experimental Biology and Medicine**, New York. v. 150, p. 466-470, 1975.

BEVERLEY, P. The importance of T3 in the activation of lymphocytes. **Nature**, Londres, v. 304, n.4, p. 398-9, 1983.

BIANCO, A.C. A glândula tireóide. In: AIRES, M.M.; **Fisiologia**, Guanabara-Koogan, p.696-705, 1991.

BLALOCK, J.E.; JOHNSON, H.M. SMITH, E.M., TORRE, B.A. Enhancement of the in vitro antibody response by thyrotropin. **Biochemical and biophysical research communications**, Nova York, v. 125, n.1, p. 30-4, 1984.

BOHANA-KASHTAN, O.; ZIPOREN, L.; DONIN, N.; KRAUS, S.; FISHELSON, Z. Cell signals transduced by complement. **Molecular Immunology**, Oxford, v.41, p. 583-97, 2004.

BORDET, J. Les serum hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. **Ann. Institut. Pasteur**, Paris. v. 7, p. 257-96, 1900.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Nova York, v.72, n.7, p.248-54, 1976.

CARROL, M.C. The complement system in B cell regulation. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 41, p. 141-46, 2004.

CARROL, M.C. The complement system in regulation of adaptative immunity. **Nature Immunology**. New York, v. 5, n.10, p. 981-6. 2004.

CARROL, M.C. The role of complement in B cell activation and tolerance. **Advances in Immunology**, New York, v.74, p.61-89, 2000.

COLE, D.S.; MORGAN, P.B. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clinical Science**, Washington, v. 104. p. 455-66, 2003.

COLLINS, J.; GOUGH, S. Autoimmunity in thyroid disease. **European Journal of Nuclear Medicine**, Heidelberg, v.29, n.2, p. S417-S424, 2002.

COPE, O.; KAPNIC, I. The relation of endocrine function to resistance and immunity. **Endocrinology**, Springfield, v.2, p. 533-42, 1940.

DEMPSEY, P.W.; ALLISON, M.E.; AKKARAJU, S.; GOODNOW, C.C.; FEARON, D.T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. **Science**, Washington, v. 271, p. 348-50, 1996.

DUARTE, C. G. **Via alternativa do sistema complemento em ratos tratados com propiltiouracil: investigação de componentes e de correlação com níveis séricos de hormônio tireoideano e resposta de produção de anticorpos.** 2002.Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

DUARTE, C.G.; AZZOLINI, A.E.C.S; PANDOCHI, A.I.A. Effect of the period of treatment with a single dose of propylthiouracil on the antibody response in rats. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.3, p. 1419-1427, 2003.

DUARTE, C.G.; SANTOS, G.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; PANDOCHI, A.I.A. The effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the alternative pathway of complement in rats. **Inter. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v.22, p.25-33, 2000.

EGWANG, T.G.; BEFUS, A.D. The role of complement in the induction and regulation of immune responses. **Immunology**, Oxford, v. 51, n. 207, p. 207-219, 1984.

ESSER, A.F.; TARNUZZER, R.W.; TOMLINSON, S.; TATAR, L.D.; STANLEY, K.K. Horse complement protein C9: primary structure and cytotoxic activity. **Molecular Immunology**, Oxford. v.33, n. 7/8, p. 725-33, 1996.

EWALD, R.A.; WILLIAMS, J.H.; BOWDEN, D.H. Serum complement in the newborn. An investigation of complement activity in normal infants and in Rh and Ab hemolytic disease. **Vox sang.**, Oxford, v.6.p.312-9, 1961.

FEARON, D.T. Complement as a mediator of inflammation. In: FAUCI, A.S. (ed), *Clinics in Immunology and allergy*, v. 1, n.2, 1981.

FERRIANI, V. P.; BARBOSA, J.E., DE CARVALHO, I.F. Serum haemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy: age-related changes. **Acta Paediatr. Scand.**, Stocolmo, v.79, p. 322-7, 1990.

FISHELSON, Z.; ATTALI, G.; MEVORACH, D. Complement and apoptosis. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 38, n. 2-3, p.207-19, 2001.

FRANK, M.M; FRIES, L.F. The role of complement inflammation and phagocytosis. **Immunology today**, Amsterdam, v. 12, n.9, 1991.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature reviews immunology**, Londres, v.2, p. 346-53, 2002.

GRANINGER W.; PIRICH K.R.; SPEISER W.; DEUTSCH E.; WALDHAUSL W.K. Effect of thyroid hormones on plasma protein concentrations in man. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Springfield, v. 63, n.2, p. 407-11, 1986.

GREENSPAN, F.S.; DONG, B.J. Tireóide e drogas antitireoidianas. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**, 6.ed., Guanabara-Koogan, p.439-49, 1995.
GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of medical physiology**. W.B Saundes company, 9.ed., 1996, p. 945-56.

HARRISON, R.A.; LACHMANN, P.J. Complement Technology. In: **Handbook of Experimental Immunology**. C. 39. Weir D.M., Editor. Blackwell Scientific Publications, Oxford, v.1, p. 39.1-49, 1986.

HASSMAN, R.; WEETMAN, A.P.; GUNN, C.; STRINGER, M.J.; WYNFORD-THOMAS, D.; HALL, R.; MCGREGOR, A.M. The effects of hyperthyroidism on experimental autoimmune thyroiditis in the rat. **Endocrinology**, Springfield, v. 116, n.4, 1985.

HOFFMAN, L.G.; MAYER, M.M. Immune hemolysis and complement fixation. In: **Methods in immunology and immunochemistry**, Williams, C.A. and Chase, M.W. (ed), Academic Press, p.140, 1977.

INOUE, K.; NIESEN, N.; BIESECKER, N.G.; MILGRON, F.; ALBINI, B. Role of late complement components in experimental autoimmune thyroiditis. **Clinical immunology and immunopathology**, Nova York, v. 66, n.1, p.1-10, 1993.

INSERPI, S. Thyroid hormones: rapid reply by surface delivery only. **Endocrinology**, Springfield, v. 146, n.7, p. 2862-3, 2005.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. c. 8. p. 8:31-8:34, 8:44, 8:45,9:18, 2003.

JOHNSON, E.O.; KAMILARIS, T.C.; CALOGERO, A.E.; GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. Experimentally-induced hyperthyroidism is associated with activation of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 153, p. 177-85, 2005.

KEAST, D.; AYRE, D.J. Antibody regulation in birds by thyroid hormones. **Developmental and comparative immunology**, Elmsford, v.4, p.323-330, 1980.

KEAST, D.; TAYLOR, K. The effect of tri-iodotyronine on the phytohaemagglutinin response of T lymphocytes. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 47, p. 217-220, 1982.

KLEIN, J. Complement. In: **Immunology**. Blackweel scientific publications, Boston, p. 188-226, 1990.

KÖHL, J. The role of complement in danger sensing and transmission. **Immunologic Research**, Nova York, v. 34, n.2, 157-176, 2006.

KRUGER, T.E.; BLALOCK, J.E. Cellular requirements for thyrotropin enhancement of in vitro antibody production. **The journal of immunology**, Baltimore, v. 137, n.1, p. 197-200, 1986.

KRUGER, T.E.; SMITH, L.R.; HARBOUR, D.V.; BLALOCK, J.E. Thyrotropin: an endogenous regulator of the in vitro immune response. **The journal of immunology**, Baltimore, v. 142, n.3, p. 744-7, 1989.

LACHMANN, P.J.; ATKINSON, J.; REID, K. Debate: the mechanism of complement lysis. **Immunology today**, Amsterdam, v.12, n.9, p. 316-21, 1991.

LARSEN, P.R.; INGBAR, S.H. The thyroid gland: In: Williams, S. Foster, J.D. **Williams Textbook of Endocrinology**. Wilson and Foster, D.W. Editors; 8.ed. W.B. Saunders Company, p.682-815, 1993.

LITTLE, J.W. Thyroid disorders. Part I: Hyperthyroidism. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology**, St. Louis, v.101, n.3, 276-83, 2006.

MARAN, R.R.; PRIYADARSINI D.; UDHAYAKUMAR, R.C.; ARUNAKARAN, J.; ARULDHAS, M.M. Differential effect of hyperthyroidism on rat epididymal glycosidases. **International journal of andrology**, Copenhagen, v.21, n.4, p. 206-15, 2001.

MASTELLOS, D.; ANDRONIS, C.; PERSIDIS, A.; LAMBRIS, J.D. Novel biological networks modulated by complement. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 115, p. 225-35, 2005.

MAYER, M.M. Complement and complement fixation. In: Chales, C. **Experimental Immunochemistry**. USA ,Thomas Publisher, 1971. Chapter 4, p.133-140. 1971.

MEVORACH, D. Complement and apoptosis. In: HERMANN, M.; KALDEN, R. J. **Apoptosis and Autoimmunity: From Mechanisms to treatment**. ed. Willey-VCH, Weinheim, p. 57-78, 2003.

MORGAN B.P.; MARCHBANK K.J.; LONGHI M.P.; HARRIS C.L.; GALLIMORE A.M. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunology letters**, Amsterdam, v.97, 171-9, 2005.

MOTULSKY, H.J. Analyzing Data with GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com, 1999.

NAKAI, H.; HIRAKAWA, S.; HAYAKAWA, N.; AMANO, T.; OTA, Z. Enhanced expression of complement regulatory proteins on thyroid epithelial cells of Graves' disease. **Acta Med Okayama**, Okayama, v.46, n.5, p. 323-30, 1992.

NUSSENZWEIG, V.; BIANCO, C.; DUKOR, P.E.; EDEN, A. Receptors for C3 on B lymphocytes: possible role in the immune response. **Academic Press**, New York. 1971.

OKOSIEME, O. E.; PARKES, A. B.; McCULLOUGH, B.; MORGAN, B. P.; RICHARDS, C.J.; LAZARUS, J.H. Complement activation in postpartum thyroiditis. **The Quarterly journal of medicine**, Oxford, v.95, p.173-179, 2002.

OLEESKY, D.A.; RATANACHAIYAVONG, S.; LUDGATE, M.; MORGAN, B.P.; CAMPBELL, A. K.; MCGREGOR, A. M. Complement component C9 in Graves' disease. **Clinical Endocrinology**, Oxford, v.25, n.6, p. 623-32, 1986.

OSLER, A. G. Introduction. In: OSLER, A.G.; WEISS, L. **Complement: mechanisms and functions**. New York, Prentice-Hall, 1976, p. 1-5.

PAPAMICHAIL, M.; GUTIERREZ, C.; EMBLING, P.; JOHNSON, P. ; HOLBOROW, E.J. ; PEPYS, M.B. Complement dependence of localization of aggregated IgG in germinal centers. **Scandinavian journal of immunology**, Oxford. v.4, p. 343, 1975.

PAPIC, M.; STEIN-STREILEIN, J.; ZAKANJA, M. ; MCKENZIE, J.M ; GUFFEE, J. ; FLETCHER, M.A. Suppression of peripheral blood natural killer cell activity by excess thyroid hormone. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v.79, p. 404-8, 1987.

PARMENTIER, H.K.; BAELMANS, R.; NIEUWLAND, M.G.B. ; DORNY, P. ; DEMEY, F. Haemolytic complement activity, C3 and Factor B consumption in serum

from chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 90, p.91-100, 2002.

PAUL, W.E. Complement. In: **Fundamental Immunology**. Lippincott – Ravens Publishers. 4. ed., c. 29,1999, p. 967-995.

PEPYS, M.B. Role of complement in induction of the allergic response. **Nature New biology**, Londres, v. 237, p. 157-9, 1972.

PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I.H.; ROSS, O.A.; TODD, E.W.; WARDLAW, A.C. The properdin system and immunity: Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science**, Washington, v. 120, p. 279-85, 1954.

POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON JR, R.B. Kinetic assessment of alternative complement pathway in a hemolytic system. Experimental and mathematical analysis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.121, n.1, p.363-70, 1978.

QUEIROZ, M.S.; SHAO, Y.; ISMAIL-BEIGI, F. Effect of thyroid hormone on uncoupling protein-3 mRNA expression in rat heart and skeletal muscle. **Thyroid**, Nova York, v.14, n.3, p.177-85. 2004.

REID, K.B.M.; PORTER, R.R. The proteolytic activation systems of complement. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 50, p. 433-64, 1981.

RICKERT, R.C. Regulation of lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 17, p. 237-243, 2005.

RIIS A.L.; HANSEN T.K.; THIEL S.; GRAVHOLT C.H.; GJEDDE S.; GORMSEN L.C.; JORGENSEN J.O.; WEEKE J.; MOLLER N. Thyroid hormone increases mannan-binding lectin levels. **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 153, p. 643-649, 2005.

SAHU, A.; LAMBRIS, J.D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. **Immunological Reviews**. Copenhagen, v. 180. p. 35-48, 2001.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Immune-neuroendocrine interactions. **Immunology today**, Amsterdam, v.16, n.7, p. 318-21, 1995.

SMITH, E.M.; BLALOCK, J.E. A molecular basis for interactions between the immune and neuroendocrine system. **Int. J. Neurosci.**, Philadelphia, v.38, p.455-464, 1988.

STREY, C.W.; MARKIEWSKI, M.; MASTELLOS, D.; TUDORAN, R.; SPRUCE, L.A.; GREENBAUM, L.E.; LAMBRIS, J.D. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. **The Journal of experimental medicine**, Nova York, v. 198, n. 2, p. 913-23, 2003.

TANDON, N.; YAN, S. L.; MORGAN, B.P.; WEETMAN, A.P. Expression and function of multiple regulators of complement activation in autoimmune thyroid disease. **Immunology**, Oxford, v.81, n.4, p.643-7, 1994.

TEMPLE, L.; BUTTERWORTH, L.; KAWABATA, T.T.; MUNSON, A.E.; WHITE, K.L. ELISA to measure SRBC specific serum IgM: method and date evaluation. **Methods in immunotoxicology**, Nova York, v.1, p.137-58, 1995.

TEMPLE, L.; KAWABATA, T.T.; MUNSON, A.E.; WHITE, K.L. Comparison of ELISA and Plaque-forming cells assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo{a}pyrene or cyclophosphamide. **Fundamental and applied toxicology**, Orlando, v.21, n.4, p. 412-9, 1993.

THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; STOVER, C.M.; SCHWAEBLE, W.; LAURSEN, S.B.; POULSEN, K.; WILLIS, A. C.; EGGLETON, P.; HANSEN, S.; HOLMSKOV, U.; REID, K.B.; JENSENIUS, J.C. A second serine protease-associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**. Londres, v. 386, p. 506-10, 1997.

THURMAN, J.M.; HOLERS, V.M. Alternative complement pathway in human disease. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, p. 1305-1310, 2006.

TOSI, M. F. Innate immune responses to infection. **The Journal of allergy and clinical immunology**, St Louis, v. 116, p. 241-9, 2005.

VOLPÈ, R. The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signalling: a review. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v.7, p.451-460, 2001.

WALL, J.R.; TWOHIG, P.; CHARTIER, B. Effects of experimental hyper- and hypothyroidism on numbers of blood mononuclear cells and immune function in rats and guinea-pigs. **The Journal of Endocrinology**, Londres, v. 91, p. 61-67, 1981.

WEETMAN, A. P.; COHEN, S.B.; OLLESKY, D.A.; MORGAN, B.P. Terminal complement complex and C1/C1 inhibitor complex in autoimmune thyroid disease. **Clinical and Experimental Immunology**. Oxford, v.77, p. 25-39, 1989.

WEETMAN, A.P. Determinants of autoimmune thyroid disease. **Nature immunology**, Nova York, v. 2, n.9, p. 769-70, 2001.

WEETMAN, A.P.; Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v.148, p.1-9, 2003.

YAMADA, T.; INASHIMA, S.; MATSUNAGA, S.; NARA, I.; KAJIHARA, H.; WADA M. Different time course of changes in sarcoplasmic reticulum and myosin isoforms in rat soleus muscle at early stage of hyperthyroidism. **Acta physiologica Scandinavica**, Estocolmo, v.180, n.1, p.79-87, 2004.

Anexo – Parecer do Comitê de ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

COPIA

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.1160.53.9), intitulado: "Sistema Complemento e Resposta de Produção de Anticorpos em Ratos Hipertireoideos", de autoria de **Ana Isabel de Assis Pandochi**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 08.02.06

Ribeirão Preto, 10 de fevereiro de 2006

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro