



ILKA MARA BORGES BOTELHO

**“PREVALÊNCIA DE INSUFICIÊNCIA DE VITAMINA D EM PACIENTES COM TIREOIDITE
DE HASHIMOTO E SUA RELAÇÃO COM AUTOIMUNIDADE TIREOIDEANA”**

***“Prevalence of Vitamin D insufficiency in patients with Hashimoto’s thyroiditis and
its relationship with thyroid autoimmunity.”***

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ILKA MARA BORGES BOTELHO

“Prevalência de Insuficiência de Vitamina D em pacientes com Tireoidite de Hashimoto e sua relação com autoimunidade tireoideana”

“Prevalence of Vitamin D insufficiency in patients with Hashimoto’s thyroiditis and its relationship with thyroid autoimmunity.”

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

Master's Thesis presented to the Pos graduation in Medical Clinic of the Faculty of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP to obtain the title of Master in Sciences, concentration Medical Clinic.

Orientação: Prof(a). Dr(a). Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

Co-orientação: Prof(a). Dr(a). Sarah Monte Alegre

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO

FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR

ILKA MARA BORGES BOTELHO, E ORIENTADA PELA

PROFA. DRA. DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN.

Assinatura do Orientador

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B657p	Botelho, Ilka Mara Borges, 1979- Prevalência de insuficiência de vitamina D em pacientes com tireoidite de Hashimoto e sua relação com autoimunidade tireoideana / Ilka Mara Borges Botelho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014. Orientador: Denise Engelbrecht Zantut Wittmann. Coorientador: Sarah Monte Alegre. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Vitamina D. 2. Autoimunidade. 3. Glândula tireoide. I. Zantut-Wittmann, Denise Engelbrecht, 1959-. II. Alegre, Sarah Monte, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Prevalence of vitamin D insufficiency in patients with Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid autoimmunity

Palavras-chave em inglês:

Vitamin D

Autoimmunity

Thyroid gland

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Denise Engelbrecht Zantut Wittmann [Orientador]

Maria de Fátima Borges

Maria Cândida Ribeiro Parisi

Data de defesa: 27-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ILKA MARA BORGES BOTELHO

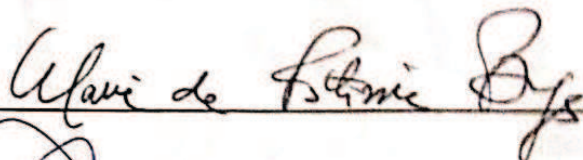
ORIENTADOR(A): PROF. DR. DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN

MEMBROS:

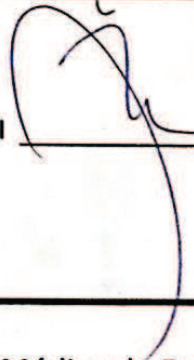
1. PROF. DR. DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN



2. PROF. DR. MARIA DE FÁTIMA BORGES



3. PROF. DR. MARIA CÂNDIDA RIBEIRO PARISI



**Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 27 de agosto de 2014

Aos meus pais, pelo constante incentivo aos estudos.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann, pelo aprendizado, paciência e disponibilidade, exemplo de conduta e profissionalismo.

Ao prof. Dr. Marcos Antônio Tambascia, Profa. Dra. Maria Cândida Ribeiro Parisi, Prof. Dr. Heraldo Mendes Garmes e aos demais professores da Disciplina de Endocrinologia da Unicamp pela generosidade.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Borges, pelos ensinamentos e lições de vida, minha eterna professora.

À Profa. Dra. Elisabete Mantovani Resende, à Profa. Dra. Beatriz Hallal Jorge Lara e às demais professoras da Disciplina de Endocrinologia da UFTM pela ajuda e presença constante em todos os momentos do meu aprendizado.

À Profa. Dra. Sarah Monte Alegre e toda equipe do Laboratório de Unidade Metabólica, pelo apoio no laboratório.

À Laurione, à Conceição e equipe do Laboratório de Fisiologia, pelo empenho e dedicação na realização da parte laboratorial.

Ao Arnaldo, pela paciência e disposição em ajudar sempre.

Aos residentes e alunos dos ambulatórios da Endocrinologia da Unicamp.

A todos os pacientes e voluntários que consentiram em colaborar com este trabalho.

À FAPESP, pelo financiamento concedido em forma de auxílio regular de apoio à pesquisa.

Aos meus pais, Vilma e José, pela presença constante e amor incondicional.

À minha irmã Bruna, meu cunhado Lúcio e meu sobrinho Lucas pelo carinho.

À tia Vânia e ao tio Ceballos pela ajuda e compreensão.

Aos meus queridos amigos Silvana, Luciana, Monique e Bruno pelo apoio e companheirismo de sempre.

Em especial à minha amiga Vivian Muranaka pela solidariedade e amizade inquestionável.

**“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

RESUMO:

Prevalência de Insuficiência de Vitamina D em pacientes com Tireoidite de Hashimoto e sua relação com autoimunidade tireoideana

Introdução: Vitamina D tem sido apontada como importante regulador da resposta imune. Estudos tem demonstrado haver relação entre insuficiência de vitamina D e presença de doenças autoimunes como Tireoidite de Hashimoto (TH). É possível que o processo autoimune na TH seja inibido em diferentes estágios pela vitamina D em sua forma ativa. Nossos objetivos foram estudar a prevalência de insuficiência de vitamina D e a relação de suas concentrações séricas com marcadores de função e autoimunidade tireoideana.

Material e Métodos: Amostras de sangue foram coletadas de 54 pacientes com TH e 54 indivíduos saudáveis sem diagnóstico de TH com idade entre 18 e 75 anos. Foram realizadas dosagens séricas de vitamina D (25OHD), TSH, T4 livre, cálcio, fósforo, paratormônio (PTH), anticorpos anti-tireoperoxidase (AcTPO), anti-tireoglobulina (AcTG) e anti-receptor de TSH (TRAb). Volume tireoideano foi estimado por ultrassonografia. Foram coletados dados demográficos, de peso, altura, índice de massa corporal (IMC) e tempo de diagnóstico. Pacientes e indivíduos do grupo de controle foram pareados por idade e sexo. O nível de significância estatística adotado foi 5%.

Resultados: Prevalência de insuficiência de vitamina D foi encontrada em 68.5% dos pacientes e em 38.9% dos indivíduos do grupo de controle ($p = 0,002$). Houve uma correlação positiva entre níveis de AcTPO e maior volume tireoideano nos pacientes ($r = 0,319$; $p = 0.019$). Não houve correlação entre concentração de vitamina D, TSH, T4 livre, TRAb, AcTG e volume tireoideano.

Conclusões: Demonstramos maior prevalência de insuficiência de vitamina D em pacientes com tireoidite de Hashimoto em relação a indivíduos de um grupo controle saudável, não havendo correlação com o estado hormonal tireoideano ou marcadores séricos de autoimunidade da tireóide. Por sua vez, maior volume da tireóide se associou a maior grau de infiltração inflamatória autoimune, refletido pela correlação com maiores concentrações AcTPO.

ABSTRACT

TITLE:

“Prevalence of Vitamin D insufficiency in patients with Hashimoto’s thyroiditis and its relationship with thyroid autoimmunity.”

Introduction: Vitamin D has been pointed out as an important immune response regulator. Studies have shown a relationship between vitamin D insufficiency and the presence of autoimmune diseases such as Hashimoto’s Thyroiditis (HT). It’s possible that the autoimmune process in HT is inhibited in its different stages by vitamin D on its active form. Our aims were to study the prevalence of vitamin D insufficiency and relationship of the serum concentrations with thyroid function and autoimmunity markers.

Material and Methods: Blood samples were collected from 54 patients with HT and 54 healthy individuals without a diagnosis of HT, aged 18 to 75 years. We conducted serum 25OH vitamin D, TSH, free T4, calcium, phosphorus, PTH, TPOAb, TgAb and TRAb. Thyroid volume was estimated by ultrasound. Data on demographic, weight, height, body mass index and time since diagnosis were collected. Patients and control subjects were matched by sex and age. The significance level for statistical analysis was 5%.

Results: Prevalence of vitamin D insufficiency was found in 68.5% of patients and in 38.9% of subjects in the control group ($p=0.002$). There was a positive correlation between TPOAb and volume in patients ($p=0.019$). There was no correlation between vitamin D concentration and thyroid volume, TRAb, TgAb, TSH or free T4.

Conclusions: We demonstrated a higher prevalence of vitamin D insufficiency in patients with Hashimoto's thyroiditis compared to individuals of a healthy control group, no correlation with thyroid state hormonal or serum markers of thyroid autoimmunity. In turn, greater thyroid volume was associated with a higher degree of autoimmune inflammatory infiltration, reflected by the correlation with higher concentrations AcTPO.

LISTA DE ABREVIATURAS

TSH : Tireotrofina (Hormônio estimulador da tireóide)

T4 livre: Hormônio tiroxina livre

TG: Tireoglobulina

AcTG: Anticorpo antitireoglobulina

TPO: Tireoperoxidase

AcTPO: Anticorpo antitireoperoxidase

TRAb: Anticorpo anti receptor de TSH

PTH: Paratormônio

Ca: Cálcio

P: Fósforo

25OHD: 25-hidroxi-vitamina D

TH: Tireoidite de Hashimoto

DG: Doença de Graves

DM-1: Diabetes Mellitus tipo 1

IL: Interleucina

IMC: Índice de Massa Corporal

DTA: Doença Tireoideana Autoimune

TSH-R: Receptor de TSH

1,25(OH)2D: Calcitriol

VDR: Receptor de Vitamina D

H2O2: Peróxido de Hidrogênio

PAAF: Punção aspirativa por agulha fina

DBP: Proteína de Ligação da vitamina D

SUMÁRIO

A - Introdução.....	01
1. Tireoidite de Hashimoto.....	01
1.1. Definição	01
2. Doença Tireoideana Autoimune.....	02
2.1. Fisiopatologia da Autoimunidade Tireoideana	08
2.2. Papel das citocinas.....	13
2.3. Diagnóstico da Tireoidite de Hashimoto	16
2.4. Tratamento.....	17
3. Vitamina D.....	18
3.1. Papel da vitamina D no sistema imunológico	21
3.2. Papel da vitamina D na doença tireoideana autoimune	24
3.3. Métodos de dosagem da vitamina D.....	27
B - Objetivos	28
1. Geral.....	28
2. Específicos	28
C - Metodologia	29
1. Desenho do estudo e pacientes.....	29
1.1. Critérios de inclusão	30
1.2. Critérios de exclusão	30
2. Grupo controle	30
3. Critérios diagnósticos de TH e alterações nas concentrações de vitamina D.....	31
4. Determinação do volume tireoideano.....	31
5. Variáveis antropométricas.....	32
6. Coleta de amostra sanguínea	32
7. Dosagens hormonais, bioquímicas e de marcadores de autoimunidade tireoideana	32
8. Análise estatística	34
D - Publicação	35
1. Artigo	36
E–Conclusões	53
F –Referências Bibliográficas	54
ANEXOS	60

A – Introdução

1. Tireoidite de Hashimoto

1.1. Definição

Tireoidite de Hashimoto (TH) é uma doença caracterizada pela presença de auto-anticorpos contra o tecido tireoideano associada a vários graus de destruição dos folículos tireoideanos. Também chamada tireoidite crônica, tireoidite linfocítica e tireoidite autoimune. Análise histológica do tecido tireoideano revela infiltração linfocítica extensa, fibrose do estroma e também atrofia das células tireoideanas (1-5).

A doença resulta de uma interação entre fatores genéticos e condições ambientais, ambos ainda não completamente definidos. Manifesta-se clinicamente com bócio ou na forma atrófica, além de ser a principal causa de hipotireoidismo clínico ou subclínico. Apresenta maior incidência no sexo feminino com pico entre 40 e 60 anos de idade. Resulta da combinação entre predisposição genética, resposta imune e exposição a fatores ambientais. Dentre os genes envolvidos destacam-se HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, TSHR, FOXP3, PTPN22, CTLA-4, entre outros (2,5-9).

Tipicamente, a doença acomete mulheres jovens, cursa sem dor, com aumento difuso da glândula e frequentemente desenvolve-se com hipotireoidismo, considerado o estágio final da TH. O dano progressivo à célula tireoidiana pode mudar a aparência clínica da glândula de bócio para atrofia. Ocasionalmente estão presentes sintomas de tireotoxicose moderada, especialmente durante a fase precoce da doença. Sinais e sintomas de hipotireoidismo moderado podem estar presentes em 20% dos pacientes ao diagnóstico, ou comumente se desenvolver após um período de vários anos de evolução (2,10,11,12-14).

A progressão de hipotireoidismo subclínico, estado em que as concentrações de tiroxina (T4) livre encontram-se dentro da normalidade, porém associado a concentrações elevadas de tireotrofina (TSH), para hipotireoidismo manifesto ocorre em 3% a 5% dos pacientes por ano. Eventualmente, pode ocorrer atrofia tireoideana e mixedema, concomitantemente a altos níveis de anticorpos anti-tireoglobulina (AcTG) no plasma. Ocasionalmente, pacientes com TH apresentam dor persistente que não

responde a antiinflamatórios não esteroidais ou reposição com hormônio tireoideano, sendo necessária a utilização de corticoides (10,11,14).

Frequentemente nota-se presença de pequenos nódulos associados a TH. Podem ser encontrados nódulos verdadeiros como adenomatosos, hiperplásicos ou coloidais assim como pseudonódulos decorrentes de alterações inflamatórias como bandas fibróticas. A ultrassonografia é essencial para diferenciar nódulos verdadeiros de pseudonódulos que correspondem à expressão do infiltrado inflamatório. Os achados de punção por agulha fina (PAAF) em nódulos de pacientes com TH mostram escassa quantidade de colóide, células de Hurtle, células foliculares, linfócitos. Em alguns casos visualiza-se folículos linfóides intactos. Vários estudos sugerem maior incidência de carcinoma tireoideano nesses pacientes, porém existem controvérsias (15-17).

2. Doença tireoidiana autoimune

As doenças tireoideanas estão entre as anormalidades de origem endócrina mais comuns e as doenças tireoideanas autoimunes (DTAs) talvez sejam as doenças autoimunes mais prevalentes. A prevalência das DTAs é estimada em 5% da população em geral. Além disso, função tireoideana alterada está presente em 7% a 9% das mulheres e 1% a 2% dos homens, em diferentes populações. Estudos recentes citam uma proporção de mulheres:homens de 5:1 até 10:1 (3,5,7,18).

A predileção pela incidência no sexo feminino relaciona-se a vários fatores dentre eles, a paridade. Evidências sugerem um possível papel das células fetais na modulação de doenças autoimunes. Alguns estudos demonstraram que anticorpos maternos poderiam existir em resposta a antígenos fetais que permanecem em tecidos maternos (microquimerismo fetal) desencadeando doenças autoimunes. Portanto haveria maior risco de desenvolver a doença de acordo com o número de gestações. Porém esta hipótese é contestada por outros pesquisadores (7,19-22).

Uma das justificativas pela maior prevalência da DTA no sexo feminino é o fato de que mulheres podem ter um número mais alto de linfócitos TCD4+ e maiores taxas de produção de citocinas do grupo Th1 em comparação com os homens (12).

As células dos tecidos femininos apresentam dois cromossomos X que são oriundos de duas linhagens de células, materna e paterna. Geralmente 50% são de origem paterna e 50% de origem materna que é o cromossomo ativo. Segundo a teoria

do “Desbalanço da Inativação do Cromossomo X”, em células de mamíferos do sexo feminino, um dos dois cromossomos X é inativado precocemente na vida embrionária. A consequência seria que auto-antígenos em um cromossomo X não são expressos em níveis suficientemente elevados no timo ou em locais periféricos envolvidos na indução de tolerância. A perda da tolerância imunológica a antígenos ligados ao X poderia induzir autoimunidade. Vários estudos demonstraram que esse desbalanço na inativação do cromossomo X está associado a aumento do risco de desenvolvimento de doença tireoideana autoimune. Esta inativação constitui um fenômeno epigenético (modificações no genoma herdadas pelas próximas gerações sem alterar a sequência do DNA) e pode explicar em parte o predomínio destas doenças em pacientes do sexo feminino (7,23,24).

A patogênese das doenças tireoideanas autoimunes, assim como outras doenças autoimunes, é multifatorial, havendo influências ambientais, genéticas, imunológicas e hormonais (5,6,7,18,25,26).

Os três antígenos mais importantes envolvidos na autoimunidade tireoideana estão claramente definidos. O primeiro a ser reconhecido foi a tireoglobulina (TG), uma proteína de 670 kD sintetizada nas células tireoideanas e substrato para a produção dos hormônios tetraiodotironina (T4) e triiodotironina (T3). O segundo antígeno foi identificado como receptor de TSH (TSH-R), uma glicoproteína com 764 aminoácidos. O antígeno TSH-R é um receptor de membrana formado por domínios extra e intracelular o qual se liga à subunidade Gs da adenilciclase. Anticorpos anti-receptor de TSH mimetizam a função do TSH e causam a doença através da ligação ao receptor de TSH estimulando ou inibindo as células tireoidianas. Pacientes com doença tireoideana autoimune podem ter tanto os anticorpos anti-receptores de TSH estimuladores quanto os bloqueadores circulantes no plasma, e o quadro clínico resulta da potência de cada tipo de anticorpo. Alternância entre um subtipo e outro de anticorpo em alguns pacientes, envolvendo mudanças na concentração, potência e afinidade, pode ser causada por numerosos fatores e levar a alteração do estado funcional da glândula, gerando dificuldades no tratamento e algumas vezes necessitando tratamento com levotiroxina, outras, tratamento com drogas anti-tireoideanas (27).

O terceiro antígeno tireoideano, inicialmente descrito como “antígeno microssomal”, foi identificado como a tireoperoxidase (TPO), nucleotídeo sintetizado na tireóide. A TPO tem como função promover a iodação da tireoglobulina além de participar do processo de organificação do iodo. O antígeno microssomal/TPO é

expresso tanto na superfície da célula tireoideana quanto no citoplasma, e pode representar o antígeno de superfície celular envolvido na citotoxicidade mediada por complemento assim como na citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (27).

O desenvolvimento da TH cursa com um ataque imunológico anormal contra os antígenos tireoideanos mediado por células T e B onde os linfócitos T estimulam linfócitos B a produzirem altos níveis de anticorpos contra estes antígenos (3,18,27).

Sabe-se que tanto a tireoperoxidase quanto a tireoglobulina e TSH-R participam da biossíntese dos hormônios tireoideanos. Após captar o iodo e concentrá-lo, a tireoide rapidamente promove oxidação do mesmo e ligação a resíduos de tirosina presentes na tireoglobulina que serão agrupados para formação de tetraiodotironina e triiodotironina. Tal processo requer a presença de iodo, TPO, H₂O₂ e a tireoglobulina como proteína receptora de iodo. A TPO, assim como a TG são nucleotídeos sintetizados no retículo endoplasmático do tireocito cuja expressão genética é regulada pelo TSH via fatores de transcrição específicos da glândula tireoide. Em portadores de DTAs anticorpos anti-TPO reagem com proteínas de sua estrutura gerando precipitação da mesma (28).

O tratamento com levotiroxina leva à redução importante dos níveis dos anticorpos anti-TPO e anti-TG. Estudos relatam que a produção de auto-antígenos tireoideanos, como a TPO é um fenômeno dinâmico estimulado pelos níveis de TSH de tal forma que após tratamento bem sucedido com levotiroxina há redução na expressão de auto-antígenos pelas células tireoideanas (13,29,30).

O AcTPO tem maior importância do que os demais anticorpos na fisiopatologia do hipotireoidismo na TH. Estudos demonstraram que o dano tireoideano em pacientes com TH tem relação com os níveis de AcTPO e de citocinas do grupo Th1(13,31).

A frequência de anticorpos anti-TG correlaciona-se com o grau de infiltração linfocitária e mais de 90% dos pacientes com TH apresentam tais anticorpos. Adicionalmente, quase todos os pacientes com TH possuem AcTPO em concentrações elevadas. Estes anticorpos também ocorrem na população geral na ausência de doença tireoideana clinicamente significativa. Contudo, a presença dos auto-anticorpos tem sido associada a maior risco de hipotireoidismo futuro, especialmente nos casos em que há aumento dos níveis de TSH (hipotireoidismo subclínico) (7,14,32).

A história natural da doença tireoideana autoimune inicia-se em um primeiro estágio com testes normais de função tireoideana e anticorpos anti-tireoideanos ausentes no plasma. Nesta primeira fase, porém, os indivíduos predispostos a DTA podem apresentar evidências de ativação imunológica demonstradas por alterações do tecido conjuntivo contendo acúmulos anormais de células dendríticas e/ou macrófagos. Em um estágio subsequente, anticorpos anti-tireoideanos são detectáveis no plasma. A concentração dos mesmos aumenta gradualmente, há alteração dos níveis de TSH com T4 livre permanecendo normal. Inicia-se então uma terceira fase caracterizada por disfunção tireoideana subclínica. Na quarta fase, a disfunção tireoideana subclínica, seja hipertireoidismo ou hipotireoidismo, evolui para disfunção clínica, representada respectivamente pela Doença de Graves (DG) e pela Tireoidite de Hashimoto (TH). Sabe-se que a transição para a última fase é muito mais rápida na DG em comparação à TH (7,27).

Se a reação autoimune, caracteristicamente órgão-específica, extrapola os limites da tireoide e acomete outros órgãos por haver reação cruzada, a doença desencadeada poderá se apresentar como uma síndrome diferente. Os antígenos citados são exclusivos da glândula tireoide, embora tecido gorduroso e possivelmente outros tecidos como o retrobulbar ocular possam expressar TSH-R, assim como há relatos da presença de TG no tecido orbitário de pacientes com oftalmopatia (27).

As células T são subdivididas em algumas categorias de acordo com sua função. Células T regulatórias (Treg), também conhecidas como supressoras, constituem uma subpopulação especializada de linfócitos T responsáveis pela manutenção da homeostase do sistema imune impedindo o ataque a auto-antígenos. As células Treg exercem sua atividade supressora/regulatória sobre outras subpopulações de linfócitos como as células T CD8+ e T CD4+. As células T CD4+ são conhecidas como *T-helper* ou auxiliares porque são células que expressam em sua superfície a proteína CD4 e são responsáveis por auxiliar outras células no processo imune, como por exemplo, maturação de células B em plasmócitos, ativação de macrófagos ou de células T citotóxicas. Estas últimas são conhecidas como células T CD8+ pois expressam em sua superfície a proteína CD8 e são responsáveis pela destruição de células infectadas por vírus, células tumorais e relacionadas a rejeição a transplantes (3,25,33).

Nas doenças tireoideanas autoimunes há redução da atividade das células T regulatórias gerando redução da auto-tolerância e levando ao desenvolvimento da

doença. Na TH há maior quantidade de células T CD8+ em comparação com células T CD4+ (3,33,34).

Citocinas exercem múltiplas ações na tireoide na vigência das doenças tireoideanas autoimunes e provavelmente são responsáveis por determinar as manifestações clínicas como, por exemplo, a oftalmopatia na Doença de Graves (DG). Na TH nota-se a predominância de citocinas do grupo Th1 representadas principalmente por interleucina-2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que juntas integram a resposta imune mediada por células (25,35).

Fatores ambientais como alta taxa de ingestão de iodo, deficiência de selênio, poluentes como fumaça de cigarro, doenças infecciosas como hepatite C crônica e certas drogas, estão implicados no desenvolvimento de tireoidite autoimune. Assim, sabe-se que longo tempo de exposição a iodo pode levar ao aumento da iodação da tireoglobulina, com consequente aumento de sua antigenicidade e desencadeando o processo autoimune em indivíduos geneticamente predispostos. Em áreas com suficiência de iodo nota-se maior prevalência de autoanticorpos tireoideanos e hipotireoidismo autoimune. Por sua vez, a deficiência de selênio reduz a atividade das selenoproteínas, incluindo as glutathionas peroxidases que oxidam peróxido de hidrogênio usando o peptídeo glutathiona como substrato, podendo gerar aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e então promover inflamação e doença tireoidiana. Poluentes ambientais como fumaça, bifenil policlorato, solventes e metais estão implicados na inflamação e no processo autoimune (7,27,35,36).

Algumas drogas, especialmente agentes como interferon-alfa podem precipitar DTA em indivíduos predispostos e mais frequentemente em mulheres que apresentem anticorpos anti-TPO. O interferon pode ter efeito tóxico direto sobre os tireócitos assim como estimular a resposta imune destrutiva. Alemtuzumab, um anticorpo monoclonal e o esquema HAART anti-retroviral podem causar depleção linfocitária e desencadeamento de DTA. Estresse estaria associado, sobretudo ao desenvolvimento de doença de Graves não se associando à TH (7,8).

Similarmente, infecções podem estar relacionadas ao desenvolvimento das DTAs. Há relatos de reação cruzada entre proteínas de membrana da *Yersinia enterocolitica* com epitopos de TSHR. Vírus C relaciona-se claramente à predisposição a DTAs porque pode infectar os tireócitos resultando em secreção de citocinas que

exacerbam a resposta imune. Além disso, *Enterovirus* foram encontrados em tecidos tireoideanos de pacientes com TH (7).

O tabagismo, como evidenciado em vários estudos populacionais, é um fator protetor contra a TH, porém é um marcador de prognóstico desfavorável para o desenvolvimento e curso da oftalmopatia tireoideana associada a DG por motivos ainda pouco conhecidos. Uma explicação para o efeito adverso do tabagismo na orbitopatia seria o fato de que a hipóxia parcial aumentaria a síntese de glicosaminoglicanos pelos fibroblastos retrobulbares intensificando o edema nos músculos extraoculares responsáveis pelo desenvolvimento da orbitopatia. Sabe-se que o tabagismo diminui o risco de desenvolvimento dos anticorpos anti-TPO e anti-TG e a evolução para hipotireoidismo de forma dose-dependente, do mesmo modo que o efeito protetor desaparece em poucos anos após a cessação do tabagismo (7,8,27,35,36).

O consumo moderado de álcool tem sido relatado como responsável por redução do risco de desenvolvimento de TH e DG. O efeito do álcool no sistema imunológico ainda é pouco compreendido, no entanto sabe-se que o álcool exerce um efeito tóxico direto na glândula tireoide (7,37).

A vitamina D em sua forma ativa (1,25(OH)₂D) liga-se ao seu receptor (VDR) que pode estar expresso em várias células imunológicas como monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T. Ao ligar-se ao seu receptor promove ações imunomoduladoras. Baixas concentrações de vitamina D foram associadas à predisposição para várias doenças autoimunes, como diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatoide, esclerose múltipla e DTAs. Há relatos sobre associação de baixos níveis de vitamina D e presença de anticorpos anti-TPO além da associação de polimorfismos no gene VDR em pacientes com DTAs (7,32).

Fatores ambientais ainda não foram, contudo, suficientemente investigados para se definir seu verdadeiro papel na patogênese da DTA e há necessidade de avaliar seus efeitos no desenvolvimento do processo autoimune e os mecanismos de sua interação com os genes suscetíveis (7,35).

2.1 Fisiopatologia da Autoimunidade Tireoidiana

O sistema imunológico humano é composto por cerca de 2×10^{12} linfócitos subdivididos em dois grupos. Linfócitos T são responsáveis pela produção de citocinas que promovem ativação de linfócitos B além de participarem de ativação de macrófagos e das células TCD8+ (citotóxicas). Linfócitos B sintetizam imunoglobulinas que são primeiramente expressas em suas membranas como receptores antígeno-específicos e em seguida, secretados como anticorpos após estimulação antigênica. A capacidade do sistema imune em reconhecer antígenos é notável. Um ser humano pode produzir mais de 10^7 anticorpos com diferentes especificidades (27).

Linfócitos B e T humanos normalmente expressam antígenos do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) em sua superfície. Os mesmos são denominados HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) e subdivididos em classe I (HLA-A, B, C) e classe II (HLA-DR, DP, DQ). Linfócitos B e T expressam em sua superfície HLA de MHC Classe I e apenas as células B expressam antígenos classe II. Linfócitos T “ativados” também expressam antígenos classe II em sua superfície, e são então descritos como “DR+”. Os antígenos HLA-DR classe II presentes nos linfócitos B são responsáveis pela geração da resposta imune através de sua interação com os linfócitos T. Os tireócitos de pacientes com TH expressam anormalmente em sua superfície antígenos HLA-DR por estímulo de citocinas do grupo Th1 o que pode desencadear o ataque imunológico à glândula (2,6,8,38).

Os antígenos HLA do MHC classe II são elementos centrais na apresentação de antígenos exógenos para os linfócitos TCD4+ e para regulação da resposta imune. A expressão destes antígenos na superfície celular está restrita aos linfócitos B, macrófagos, outras células apresentadoras de antígenos e ao endotélio capilar. Alguns autores descrevem expressão anormal de antígenos HLA classe II em células foliculares tireoideanas tanto na DG quanto TH. Há relatos de associação de HLA-DR3, DR-4, DR-5, DQA1*0201/*0301, DQB1*0201 à forma com bócio da TH assim como alelos HLA-DR8, DQB1*0302, DRB1*04, DQB1*03 estariam associados com a forma atrófica (8,9,38).

Há vários estudos que demonstram haver expressão do MHC classe II na forma de moléculas HLA-DR em células foliculares tireoideanas de pacientes com DTA, o

que normalmente não ocorre em indivíduos saudáveis. Este evento faz com que as células tireoideanas se tornem apresentadoras de auto-antígenos tireoideanos sendo então responsáveis por exacerbar a DTA. A expressão das moléculas MHC na superfície da célula tireoideana é estimulada pela citocina IFN- γ secretada pelos linfócitos T (8).

Ao mesmo tempo em que induz expressão de MHC Classe II pelos tireócitos, a interleucina INF- γ também estimula a expressão de MHC classe I pelas células tireoideanas aumentando assim sua susceptibilidade ao reconhecimento pelas células TCD8 citotóxicas, que se acredita serem responsáveis pela maior parte da destruição tecidual que ocorre no hipotireoidismo autoimune (8).

No timo, células precursoras indiferenciadas dão origem a linfócitos T CD4⁺, as células T-*helper* ou auxiliares e CD8⁺, as células T citotóxicas. Nos tecidos linfáticos periféricos as células CD4⁺ se diferenciam após a ativação por exposição a um antígeno em dois subtipos, Th1 e Th2. O microambiente em que as células Th indiferenciadas se desenvolvem definirá qual subtipo será predominante (6).

Sabe-se que a citocina IL-12, secretada por células apresentadoras de antígenos como linfócitos B, monócitos, macrófagos e células dendríticas é uma das mais importantes envolvidas na diferenciação de células Th0 em Th1. Durante uma resposta imune normal os subgrupos Th1 e Th2 se autorregulam havendo um balanço entre os dois subtipos. O grupo de células Th1 é responsável pela imunidade celular e estão relacionadas à defesa contra patógenos intracelulares como vírus e respostas a tumores, secretando as interleucinas IL-2, IFN- γ e TNF- α , entre outras. Nas doenças autoimunes as células Th1 são direcionadas contra proteínas do próprio organismo, resultando na condição patológica. O grupo de células Th2 relaciona-se com a resposta imune mediada por anticorpos e secretam principalmente IL-4 e IL-5 relacionando-se com a resposta do hospedeiro a patógenos extracelulares como bactérias e parasitas e está envolvida na manifestação de processos alérgicos e asma (3,6,13,25,39).

Uma divisão funcional baseada na secreção de linfocinas parece proporcionar uma categorização importante para as células CD4⁺. Células Th1 funcionam como células “inflamatórias”, típicas de uma reação de hipersensibilidade retardada, enquanto células Th2 são mais especificamente células auxiliares (*helper*) para a síntese de imunoglobulinas pelas células B (27).

Os linfócitos TCD4⁺ reconhecem pequenos peptídeos antigênicos apresentados por moléculas MHC classe II através do TCR (receptor de células T), um heterodímero composto pelas cadeias α e β . Existem no mínimo três principais e vários autoantígenos tireoideanos menos importantes e há múltiplos epitopos de peptídeos em cada um. Estudos têm demonstrado que epitopos dos antígenos TPO e TSH-R reconhecidos por linfócitos T não possuem uma região imunodominante, específica de reconhecimento dos mesmos pelo TCR, tornando difícil o desenvolvimento de uma imunoterapia que utilize antagonistas de epitopos peptídicos específicos (8).

Células T reconhecem antígenos em associação com (“apresentados por”) uma molécula-MHC. Células T CD4⁺, que frequentemente funcionam como células T auxiliares, reconhecem moléculas que expressam antígeno classe II, e células T CD8⁺, que frequentemente funcionam como células citotóxicas, reconhecem moléculas que expressam antígeno classe I. O antígeno, um pequeno peptídeo, por exemplo, se encaixa dentro de uma fenda na molécula HLA-DR. O TCR tem a função de reconhecer o peptídeo antigênico na molécula MHC. A resposta normal ocorre via reconhecimento antigênico pelo TCR, sucedendo-se a ativação da célula T através do efeito combinado de reconhecimento do antígeno e de sinais co-estimuladores, incluindo ação da interleucina I (IL-1) levando à secreção de IL-2 e expressão de receptor de IL-2, seguido da proliferação de células T de um clone ativo (27).

As células T auxiliares CD4⁺ auxiliam outras células incluindo ativação de células T citotóxicas e macrófagos. As células T citotóxicas CD8⁺ e as células Tregs agem suprimindo a estimulação do sistema imune e mantendo a tolerância a auto-antígenos. As células Tregs exercem sua função de regulação/supressão atuando tanto em células T CD8 quanto em T CD4, células B e dendríticas. As células B são responsáveis pela imunidade humoral através da produção de anticorpos (3).

Uma terceira população de linfócitos TCD4⁺ auxiliares, denominada Th17 foi posteriormente descoberta como participante da patogênese de várias doenças autoimunes, dentre elas a TH, com produção das citocinas IL-17, IL-22 e IL-23. As IL-17 são as principais moléculas efetoras das células Th17 agindo na produção de autoanticorpos. Há relatos mostrando que as concentrações de IL-17 são maiores na TH e baixas tanto no tecido tireoidiano normal quanto em outras doenças tireoidianas.

Observou-se importante fibrose do estroma associada à presença de IL-17

sugerindo que a mesma desenvolveria um papel no processo de inflamação local (1,40,41,42).

Estudos demonstraram haver expressão de IL-17 tanto na infiltração linfocitária presente nos tecidos tireoideanos quanto nas células epiteliais foliculares da tireoide de pacientes portadores de TH, além de sua presença em linfócitos periféricos destes pacientes. As células Th17 são responsáveis pela defesa contra certos microrganismos como *Klebsiella*, *Borrelia* e fungos, além de desempenharem importante papel na inflamação tecidual e autoimunidade órgão-específica (27,43).

A expressão clínica da doença tireoideana autoimune depende do balanço existente entre resposta Th1 e Th2, resultando então na DG ou nas formas de TH com bócio ou atrófica. A TH forma com bócio está relacionada ao predomínio de imunidade celular via ativação de Th1 promovendo apoptose das células foliculares tireoideanas levando à disfunção. A forma atrófica da TH está relacionada ao predomínio de imunidade humoral, via ativação de Th2 que induz linfócitos B antígeno-específicos a produzirem anticorpos anti-receptor de TSH (TRAb) bloqueadores de estímulo causando assim a doença. Similarmente, na Doença de Graves, as células Th2 ativadas levam à produção de TRAb estimulador da glândula (27,44).

Estudos mostram que na TH há um defeito genético na função da célula T supressora (Treg). Desta forma, as células T-CD4+ não são suprimidas, estando livres para promover ativação dos linfócitos B. Concomitantemente, as células Th2 produzem várias citocinas que induzem os tireócitos a expressarem antígenos de superfície HLA-DR tornando-os suscetíveis ao ataque imunológico. Embora estes antígenos não sejam habitualmente expressos nas células tireoidianas, os pacientes com TH expressam os antígenos referidos na superfície das células foliculares desencadeando o processo autoimune. Linfócitos B ativados pelos linfócitos T produzem anticorpos que reagem aos antígenos tireoidianos (5,6,35,45).

Na Tireoidite de Hashimoto forma com bócio o ataque imunológico parece ser tipicamente agressivo e destrutivo, ao invés de estimulatório como na DG, e a diferença ocorre muito provavelmente pelas características da resposta imune (14).

No estado basal, estágio 1, a reação imune contra antígenos autólogos ocorre como um processo habitual. Este existe provavelmente em um nível fisiológico insignificante, uma vez que nem todas as células B ou T que reagem com TSH-R, TPO ou TG são

excluídas, e o antígeno normalmente está presente na circulação. O tempo para desenvolvimento de linfócitos T e B reativos aos antígenos tireoideanos antes da manifestação clínica da doença ainda não está bem definido. Se os ensaios forem sensíveis o suficiente, provavelmente encontraremos alguma concentração de anticorpos contra TSH-R, TPO e TG presentes em pessoas saudáveis, aumentando em prevalência e concentração com o avançar da idade, especialmente nas mulheres uma vez que o sexo feminino está relacionado de alguma forma com autoimunidade tireoideana (14,27).

Pacientes que herdaram certos genes suscetíveis, como aqueles codificados como HLA-DR3 ou DR5 estarão especialmente predispostos a desenvolver DTA porque seu repertório de células T e B inclui células que reconhecem antígenos próprios, sugerindo que seus imunócitos são especialmente bons em coleta, apresentação e resposta ao antígeno, ou são incapazes de clarear efetivamente os complexos imunes de seu plasma (7,14).

O estágio 2 mostra que possivelmente uma infecção viral ou outras causas de dano celular ou reação cruzada de anticorpos presente após infecção por *Yersinia* (ou outros) levaria ao desenvolvimento de determinadas quantidades de antígenos tireoideanos que, em indivíduos geneticamente predispostos, conduziriam a um aumento, porém pouco significativo, da resposta imune. O processo pode perdurar por vários anos, e se intensifica e diminui, justificando casos em que a tireoidite pode ser clinicamente aparente e então desaparecer, alternando fases de atividade da doença. Fatores envolvidos em supressão temporária ou permanente da resposta imune podem incluir redução da apresentação de antígenos, ou a indução normal auto-regulatória de células T com função supressora, incluindo as reguladas mutuamente pelos subtipos Th1 e Th2 (14).

No estágio 3 observa-se que se fatores de supressão não controlam o desenvolvimento da resposta imune, a doença progride com uma nova intensidade, agora direcionada para antígenos específicos, induzindo à hiperfunção celular (TSAb – anticorpo anti-receptor de TSH estimulador), ou hipofunção (bloqueio do TSH ou anticorpos anti-NIS - *Sodium Iodide Symporter*), ou destruição celular. Presume-se que a citólise e apoptose diretas da célula T e a citotoxicidade mediada por células T CD8+ têm um importante papel neste estágio, tornando a doença clinicamente evidente (14).

No estágio 4, no qual a doença se desenvolve, uma variedade de fatores secundários entram em jogo e aumentam a imunoreatividade anti-tireoideana. Qualquer estímulo que cause aumento da expressão de DR nas células tireoideanas, como a secreção de IFN- γ pela célula T, juntamente com o aumento da estimulação pelo TSH, pode permitir que células epiteliais tireoidianas desempenhem papel de células apresentadoras de antígenos (APCs) (14).

No estágio 5, citocinas derivadas das células T podem induzir ativação de células T e B por um antígeno inespecífico e consequentemente produzir anticorpos. Células auto-reativas ficarão acumuladas no tecido tireoideano e aumentarão o desenvolvimento da resposta por secreção de linfocinas ou citólise, de uma maneira independente dos antígenos tireoideanos. Neste estágio, o processo autoimune inespecífico pode dominar o processo de doença que já não depende do antígeno específico para sua continuação (14).

No estágio 6, como a concentração de células T e B ativadas presentes no tecido tireoideano, e células T auto-reativas e inespecíficas tornam-se progressivamente envolvidas, a destruição celular pode levar então, ao desenvolvimento de novos antígenos. Epitopos de reação cruzada e estimulação não específica de células T em indivíduos geneticamente predispostos, podem levar a adição de novas síndromes imunológicas associadas (exoftalmia, mixedema pretibial, gastrite atrófica), típico de pacientes mais velhos com maior tempo de doença clinicamente manifesta (14).

2.2 Papel das Citocinas :

As citocinas constituem a base do processo de resposta autoimune. São secretadas por linfócitos T, B, macrófagos, monócitos e células dendríticas após estímulos, exercendo uma série de efeitos diretos e indiretos (14).

Tanto as células T quanto B liberam uma grande quantidade de citocinas que executam suas funções efetoras e alteram a função de outras células. Como os linfócitos sofrem maturação no timo e tornam-se ativados na exposição ao antígeno, existe alteração quanto ao tipo de citocina a que respondem e produzem. Em animais, e menos frequentemente em humanos, tipos de linfócitos podem operacionalmente ser definidos

pelas citocinas produzidas. Por exemplo, células T “Th1” produzem IL-2, IFN- γ e TNF- α e são predominantes nas reações do tipo “hipersensibilidade tardia” enquanto que as células T “Th2” produzem IL-4 e IL-5, estimulam células B e estão envolvidas especialmente em reações anticorpo-mediadas. Citocinas produzidas por células Th1 aumentam a atividade deste subtipo, mas inibem células Th2 e vice versa. Esse tipo de regulação pode ser crucial na determinação de uma resposta imune e em fenômenos supressores. Adicionalmente, subtipos de Th como as células Th-17 que secretam IL-17 entre outras citocinas são fortemente pró-inflamatórias (1,2,6,13,18,43,46).

Sabe-se que em pacientes com diagnóstico de Tireoidite de Hashimoto há o predomínio da imunidade mediada por células via linfócitos Th1 com aumento da secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Além disso, pode haver o predomínio da imunidade humoral via linfócitos Th2 e aumento da secreção de IL-4 e IL-5, com produção de anticorpos anti-receptor de TSH bloqueadores de estímulo e consequente desenvolvimento de TH forma atrófica ou estimuladores, levando à doença de Graves (7,14,39).

A interleucina IFN- γ do grupo Th-1 é responsável por induzir a expressão de moléculas HLA-DR do MHC classe II na superfície dos tireócitos, evento este responsável por perpetuar o processo autoimune. Ao mesmo tempo em que induz a expressão de moléculas MHC classe II, é responsável por aumentar a expressão de moléculas MHC classe I na superfície das células tireoideanas fazendo com que se tornem mais facilmente suscetíveis à ação dos linfócitos TCD8 citotóxicos responsáveis pela destruição do tecido tireoideano no hipotireoidismo autoimune. Adicionalmente, apresenta função inibitória direta sobre a iodação das células epiteliais tireoideanas e síntese de TG. Além disso, sua produção pelos linfócitos T pode ser estimulada pela IL-2, também pertencente ao grupo Th1 e também tem seus níveis regulados pela IL-12, citocina secretada por células apresentadoras de antígenos, encontrando-se reduzida após tratamento com levotiroxina (13,41,47).

A interleucina TNF- α pode ser produzida por macrófagos e tem efeito potencialmente citotóxico sobre as células epiteliais tireoideanas as quais podem produzir numerosas citocinas incluindo IL-1 que é responsável por ativar células T e IL-6 que estimula células T e B. Células dendríticas são importantes fornecedoras de IL-1 e IL-6 no tecido tireoideano e podem inibir o crescimento da célula folicular tireoideana (14).

Adicionalmente, IL-1 causa uma dissociação de complexos juncionais entre as células tireoideanas expondo autoantígenos ocultos. As citocinas apresentam ainda um papel na patogênese da oftalmopatia da doença tireoideana autoimune através de seus efeitos estimulatórios nos fibroblastos orbitários (14).

As células tireoideanas expressam moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) e antígeno-3 associado à função linfocitária (LFA-3) os quais estão em maior quantidade na presença de determinadas citocinas como INF- γ , TNF- α e IL-1. Estas têm ação direta sobre a potencialização da citotoxicidade e outras interações com linfócitos, pois ambas as moléculas exercem papel importante na ligação dos linfócitos aos seus alvos (7,8,14,27).

Na DTA pode haver exacerbação da ativação do sistema complemento gerando liberação de citocinas, prostaglandinas e metabólitos oxigenados pelas células tireoideanas após alterações metabólicas das mesmas, secundárias ao ataque do complemento. Estas respostas são atenuadas por drogas antitireoideanas que se concentram nas células tireoideanas podendo contribuir para imunomodulação tireoideana gerando uma queda nos níveis dos auto-anticorpos (8).

Outro caminho através do qual os linfócitos podem ser ativados nas DTAs se realiza por intermédio do seu ligante CD40 que se liga ao CD40 expresso nas células tireoideanas. Este ligante é estimulado pelas citocinas INF- γ , TNF- α e IL-1 produzidas pelo infiltrado linfocítico tireoideano. Após estimulação por IL-1, muitas citocinas podem ser produzidas nas células tireoideanas entre elas a própria IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13 e IL-15. Além disso, verifica-se a expressão da citocina IL-17 em células tireoideanas estimuladas por INF- γ , TNF- α e IL-1 (8).

As interleucinas IL-17 podem agir em várias células induzindo a expressão de citocinas como IL-6 e IL-8 além de atuarem em conjunto com outras citocinas, como TNF- α , potencializando as ações inflamatórias das mesmas. Portanto, pode-se dizer que a TH é uma doença autoimune mediada por células Th1 e Th17 e que estas são responsáveis por intensa fibrose do estroma que a distingue de outras doenças tireoideanas benignas (1).

Há relato de concentrações elevadas de IL-17 em tecidos de pacientes com TH, o que não ocorre em outras doenças tireoidianas como câncer, bócio multinodulares ou no tecido tireoideano normal, sugerindo envolvimento desta IL na fisiopatologia da TH.

Essas concentrações de IL-17 estariam relacionadas ao grau de hipotireodismo do paciente por seu papel adicional na indução da expressão de outras citocinas como IL-6, IL-8, IL-1, IL-12, G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos na medula óssea) além de interagir com IL-1 β , TNF- α (1,43).

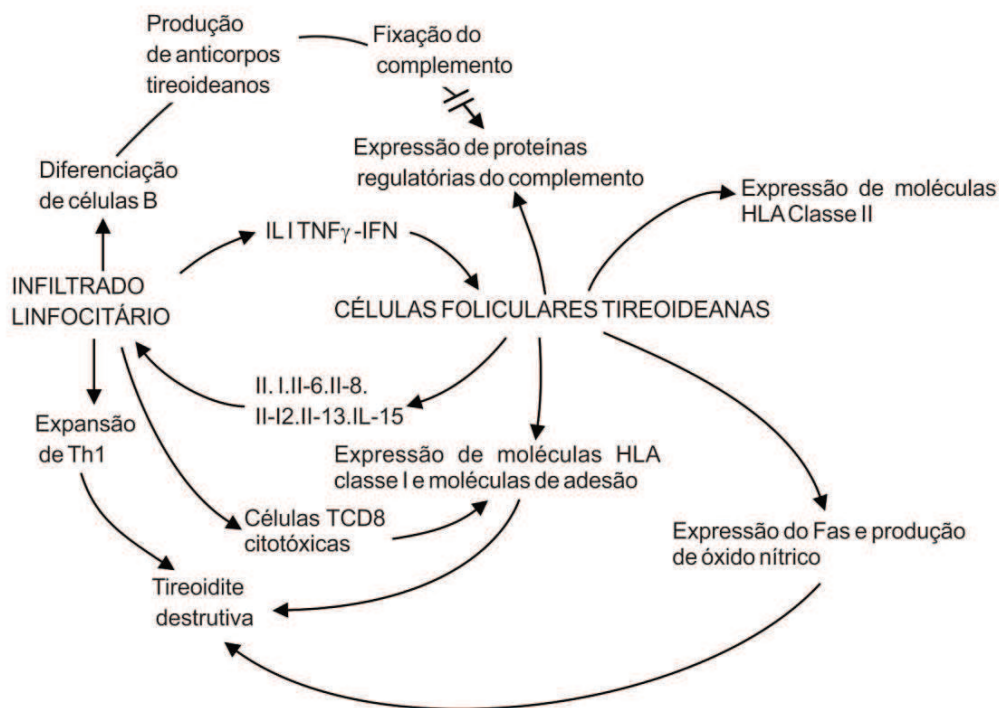


Figura 1: Interações entre células foliculares da tireoide e do sistema imunológico na doença autoimune da tireoide. Fonte [HTTP://thyroidmanager.org](http://thyroidmanager.org). Adaptado de Weetman AP Ajjan; R Watson; PF Bailliere's. Clin Endocrinol Metab 11:481-497,1997.

2.3 – Diagnóstico de Tireoidite de Hashimoto

O diagnóstico de TH envolve duas considerações – o diagnóstico diferencial da lesão tireoideana e a avaliação do *status* metabólico do paciente. Um bócio firme e difuso, com aumento do lobo piramidal e sem sinais de tireotoxicose poderia sugerir o diagnóstico de TH. Mais frequentemente a glândula é bocelada. Usualmente é simétrica, embora possam ocorrer muitas variações na simetria e na consistência. A traqueia está

raramente desviada ou comprimida. A associação de bócio com hipotireoidismo é característica desta condição, porém encontra-se também em algumas síndromes em que há defeito de síntese na resposta hormonal (5,14).

A concentração de T₄ total e de T₄ livre pode variar de valores baixos a altos, mas são encontrados mais tipicamente em níveis normais ou baixos. A avaliação da captação tireoidiana, raramente necessária, varia desde valores abaixo do normal até elevados, dependendo de fatores tais como níveis de TSH, da eficiência do uso de iodeto pela tireoide e da natureza dos componentes que estejam sendo liberados para a circulação. Níveis de gamaglobulina podem estar elevados, embora usualmente estejam normais. Esta alteração evidentemente reflete a presença de altas concentrações de auto-anticorpos anti-tireoideanos (5,14).

Anticorpos anti-TPO e menos frequentemente anti-TG estão presentes no plasma na TH. Altas concentrações confirmam o diagnóstico de doença tireoideana autoimune. AcTG apresenta-se em elevadas concentrações em aproximadamente 80% dos pacientes, AcTPO em 90% a 95% dos pacientes e quando tanto AcTPO quanto Ac TG são mensurados, encontram-se elevados em 97% dos casos. Particularmente, pacientes jovens tendem a apresentar níveis baixos e ocasionalmente negativos destes anticorpos. Neste grupo etário, mesmo baixas concentrações indicam a presença de autoimunidade tireoideana (5,14).

Ultrassonografia pode mostrar imagens variadas, desde aumento da glândula com textura normal, imagem característica com ecogenicidade muito baixa, ou sugestiva de múltiplos nódulos mal definidos. Além disso, pode haver nódulos verdadeiros associados à TH como os adenomatosos, coloidais e hiperplásicos. Os chamados pseudo-nódulos são caracterizados por alterações no tecido tireoideano de natureza inflamatória localizada e o tecido tireoideano alterado pode apresentar áreas de fibrose (14,15).

2.4 - Tratamento

O hormônio tireoideano levotiroxina em dose de reposição completa está indicado se o hipotireoidismo encontra-se instalado. O tratamento é recomendado se as concentrações de TSH estão elevadas e as de T₄ livre estão baixas. Diante de concentrações ainda normais de T₄ livre, existe a possibilidade de tratamento, desde que o aparecimento de hipotireoidismo é previsível em tais pacientes. Não há evidências de

que a reposição de hormônio tireoideano realmente interrompa o processo contínuo de tireoidite, mas em alguns pacientes recebendo tratamento nota-se que os níveis de anticorpos sofrem uma queda gradual ao longo de vários anos (14).

A dose de levotiroxina normalmente deve ser a necessária para trazer os níveis de TSH para dentro dos valores de referência ou mesmo próximos ao limite inferior. Este objetivo é normalmente alcançado com a administração de 1 micrograma de levotiroxina por kilo de peso por dia, em média, doses de 75 a 125 microgramas por dia em mulheres e 125 a 200 microgramas por dia em homens (14).

3 - Vitamina D

A vitamina D, embora descrita inicialmente como uma vitamina e conhecida a princípio por seu papel na regulação da homeostase cálcio-fósforo, é considerada um hormônio. Hoje se sabe que a vitamina D possui múltiplas funções incluindo ações imunomodulatórias, desempenhando um importante papel na patogênese de doenças autoimunes dentre elas as doenças tireoideanas como a TH (2).

Os efeitos imunomodulatórios da vitamina D decorrem de sua ação direta no receptor VDR da célula T resultando em proteção de tecidos-alvo, como as células tireoideanas na doença autoimune. Também promove inibição da proliferação de células B pós-ativação por células T e indução de apoptose das mesmas com consequente redução de anticorpos reativos aos antígenos tireoidianos, além de inibir o desenvolvimento e a função de células Th1 (2).

A vitamina D possui várias funções importantes no organismo. Apresenta como principal fonte a provitamina D3 (7-deidrocolesterol) presente na membrana celular de queratinócitos sendo convertida em pré-vitamina D3 pela ação da luz UVB e posteriormente em vitamina D3 que é liberada para a circulação. A produção cutânea de vitamina D é influenciada por fatores externos como protetor solar, roupas, latitude, hora do dia e estação do ano. Também pode ser encontrada em menor quantidade em alimentos de origem vegetal (Vitamina D2 ou ergocalciferol) e animal (Vitamina D3 ou colecalciferol), sendo estocada nos hepatócitos após a absorção intestinal. O atual estilo de vida das pessoas com redução de atividades ao ar livre e dieta pobre em vitamina D tem sido responsável pela diminuição em seus níveis (27,36,47-53).

Após duas hidroxilações sucessivas, a vitamina D transforma-se em sua forma ativa, a 1α -25(OH) $_2$ D $_3$. A primeira hidroxilação ocorre no fígado por ação da enzima D-25-hidroxilase e a segunda ocorre no rim por ação da 1α -hidroxilase-25(OH)D. A partir de então desempenha as funções de regulação do metabolismo do cálcio e fosfato mantendo níveis séricos adequados, promovendo a absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio, além de supressão da secreção de paratormônio (PTH), preservando assim a integridade do esqueleto e atuando diretamente na osteoclastogênese, efeito nos osteoblastos e mineralização da matriz óssea. A vitamina D vem sendo amplamente estudada por apresentar importante participação na regulação da resposta imune juntamente com seu receptor nuclear (VDR), que pertence à classe dos esteroides (25,36,53,54).

Níveis de vitamina D são avaliados através da medida da concentração da 25-hidroxi vitamina D (25OHD). O nível ideal de 25OHD sérica para a saúde óssea é controverso. Baseado em estudos de suplementação de vitamina D alguns especialistas são a favor da manutenção dos níveis de 25OHD entre 20 e 40 ng/ml (50 A 100 nmol/L), ou seja, concentrações abaixo de 20 ng/ml seriam consideradas insuficientes, ao passo que níveis abaixo de 10 ng/ml entrariam na categoria deficiência, embora se sugira que principalmente em idosos níveis abaixo de 30 ng/ml definiriam insuficiência. Sendo assim, o nível habitualmente considerado adequado ficaria entre 30 a 40 ng/mL (75 a 100nmol/L). Especialistas concordam que concentrações abaixo de 20 ng/mL são baixas para manter a saúde óssea. As concentrações séricas de 25OHD ideais para a saúde extra óssea ainda não estão estabelecidas (55,56).

Outros especialistas sugerem que um valor mínimo de 30 ng/mL (75 nmol/L) seria necessário em adultos mais velhos para minimizar o risco de quedas e fratura. Níveis abaixo de 30 ng/ml indicam insuficiência de vitamina D ao passo que níveis abaixo de 10 ng/ml são considerados como deficiência de vitamina D (48).

Os níveis séricos de vitamina D são influenciados por vários fatores incluindo principalmente o tempo de exposição aos raios solares, estação do ano, latitude, pigmentação da pele, idade, adiposidade, prática de atividade física, ingestão pela dieta e uso de medicações. Áreas equatoriais apresentam normalmente pequenas variações nas concentrações de vitamina D entre as diferentes estações do ano, porém há uma junção de todos os fatores na definição dessas concentrações. Alguns estudos

demonstraram não haver diferença entre as concentrações de vitamina D e as estações do ano ao passo que outros evidenciam claramente esta diferença ressaltando presença de maiores níveis nos meses de primavera e verão (2, 12, 44,57-62).

Particularmente na região de Campinas, segundo o Cepagri (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) o índice de incidência de raios ultravioletas tem sido bem alto nos últimos anos. Tal quantidade seria suficiente para manter níveis de síntese de vitamina D adequados, seguindo-se as recomendações de cerca de 20 minutos de exposição solar ao dia. Considera-se baixa exposição solar quando a mesma ocorre menos de 3 vezes na semana por um período menor que 15 minutos ao dia de exposição apenas de face e membros superiores. Considera-se alta quando os banhos de sol com exposição de face, membros superiores e também tórax ocorre no mínimo 5 vezes na semana por mais de 30 minutos por vez (58,63).

Investigadores da maioria dos estudos prospectivos demonstram haver forte relação inversa entre as concentrações de 25OHD e doenças cardiovasculares, concentração sérica de lipídios, inflamação, distúrbios do metabolismo da glicose, ganho de peso, doenças infecciosas, transtornos cognitivos, malignidades, várias doenças autoimunes como *diabetes mellitus* tipo 1, Doença de Addison, Doença de Chron, DTA, doenças reumatológicas, entre outros. A vitamina D em sua forma ativa 1α -25(OH) $2D_3$ atua como potente imunomodulador inibindo diferenciação celular e agindo também na proliferação e apoptose de células de defesa através de sua ligação a seu receptor VDR expresso nestas células (2,18,46,64-67).

Na esclerose múltipla, a gravidade das manifestações oscila de acordo com as estações do ano e vários estudos demonstraram que durante inverno e primavera, quando os níveis de vitamina D são menores, as exacerbações da doença são mais frequentes. Estudos com mulheres que fazem uso de suplementos de vitamina D mostram haver redução importante dessas manifestações clínicas (55).

Estudos clínicos baseados na administração de análogos de vitamina D em pacientes portadores de DM1 demonstraram haver controle da doença após o tratamento, ocorrendo queda da porcentagem de hemoglobina glicada e aumento dos níveis de peptídeo C no plasma, mostrando possível importância dessa forma de tratamento. Entretanto, mais estudos são necessários para explorar esse campo (55).

Artrite Reumatoide também é uma doença autoimune fortemente associada à insuficiência de vitamina D. Demonstra-se haver relação entre baixos níveis de vitamina D durante períodos de atividade da doença. Os baixos níveis de vitamina D também se relacionam com manifestações de doenças como psoríase, síndrome de Sjögren e Lupus Eritematoso Sistêmico (2,68,69).

Do mesmo modo, baixas concentrações de vitamina D estão relacionadas à presença de anticorpos anti-tireoideanos e alterações da função tireoideana, sugerindo o envolvimento da vitamina D na patogênese das DTA (2,12,36,55,57).

Estudos experimentais demonstram que a vitamina D tem efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios atenuando doenças em modelos animais. Evidências do tratamento com vitamina D em doenças autoimunes humanas ainda são inconclusivas e são necessários mais estudos clínicos para definir se há realmente um bom resultado terapêutico associando doses toleráveis e efeitos colaterais possíveis (55).

Assim, identificação e tratamento da deficiência de vitamina D evidenciam-se importantes para a saúde musculoesquelética e possivelmente também para a saúde extra-esquelética, incluindo os sistemas cardiovascular e imunológico (48,55).

3.1 Papel da Vitamina D no Sistema Imunológico

A vitamina D é considerada um imunomodulador natural e reguladora de vários processos imuno-mediados. O mecanismo exato da ação da vitamina D na autoimunidade ainda não está muito claro, mas provavelmente está associado com suas funções antinflamatórias e imunomodulatórias (12,26,36,44).

A associação entre deficiência de vitamina D e manifestação de doenças autoimunes encontra-se bem documentada. Entre estas doenças encontram-se as tireoidopatias autoimunes como Doença de Graves e Tireoidite de Hashimoto, insuficiência adrenal autoimune (Doença de Addison), *Diabetes Mellitus* tipo 1, doenças reumatológicas como Lupus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatoide, Esclerose Múltipla, doenças intestinais inflamatórias (Doença de Chron e Retocolite Ulcerativa), entre outras (2,4,6,7,8,25,26,36,44,54,57,68,70-74).

A vitamina D exerce seus efeitos através da ligação ao seu receptor intracelular nuclear VDR o qual é expresso em uma variedade de células imunológicas como

macrófagos, monócitos, células dendríticas, linfócitos T, B, entre outros. Estas mesmas células podem expressar as enzimas necessárias para o metabolismo da vitamina D em sua forma ativa. A vitamina D se liga a seu receptor através de sua forma ativa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que é produto da ação da enzima $25(\text{OH})\text{D}-1\alpha$ -hidroxilase (2,6,18,23,34,44,61,63).

A vitamina D3 na sua forma ativa possui amplos efeitos em varias linhagens de células de defesa evidenciando seu importante papel no desenvolvimento de alterações imunomediadas e na autoimunidade. Regula a diferenciação e atividade das células TCD4^+ através de vários mecanismos. Promove a inibição da ativação das células TCD4^+ Th1 reduzindo assim a produção das citocinas $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 e $\text{TNF-}\alpha$, resultando no aumento da proliferação de células TCD4^+ Th2 com consequente aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10, fato este demonstrado por vários pesquisadores. Estudos *in vitro* demonstram que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exerce um efeito inibitório na proliferação de células T e na expressão de proteínas das células T e do RNAm de IL-2 e $\text{IFN-}\gamma$. Foi demonstrado ainda que a vitamina D poderia aumentar a atividade de células T regulatórias (Treg) (2,12,25,36,44,54).

Adicionalmente, foi evidenciado que citocinas do grupo Th17 são inibidas pela vitamina D. As células Th17 integram um subtipo de linfócitos Th CD4^+ que secretam IL-17, IL-22 e IL-23, envolvidas na indução da apoptose de linfócitos B, impedindo assim a produção de anticorpos. A expressão de citocinas associadas às células Th17 está significativamente aumentada em doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatóide e DTA (1,36,55,53,75,76).

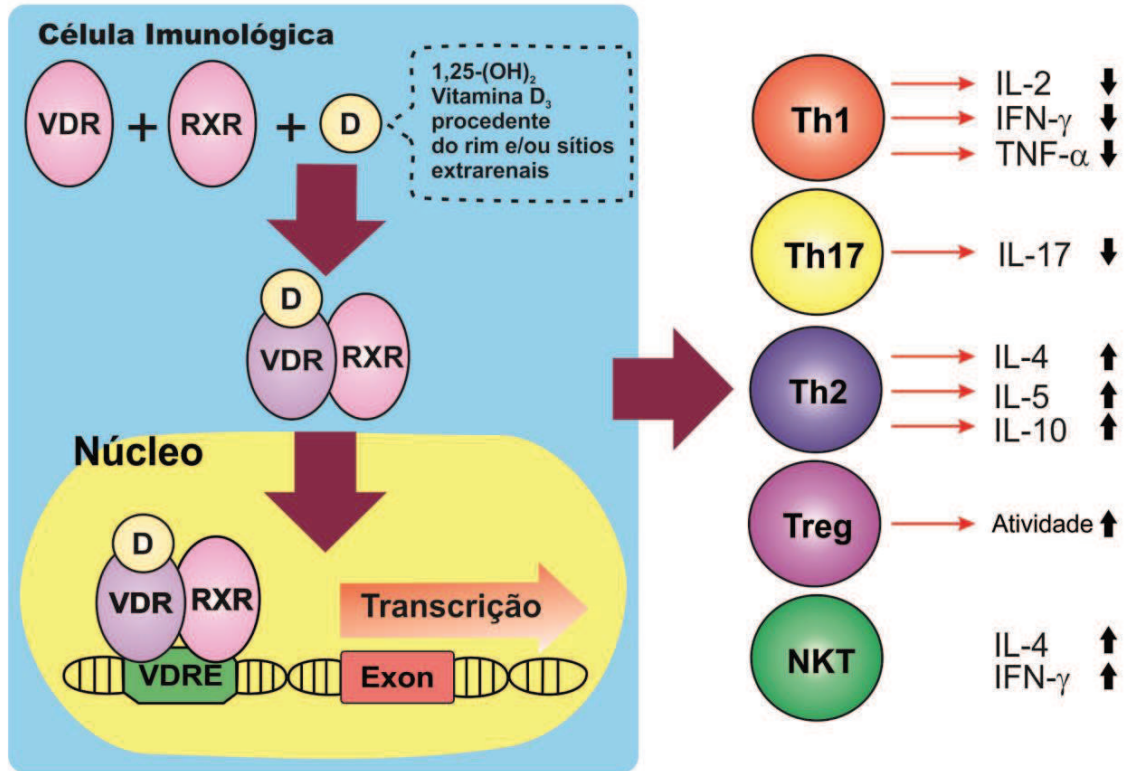


Figura 2: VDR - Receptor nuclear de vitamina D; RXR:Receptor de ácido retinoico; VDRE: elementos de resposta à vitamina D. Adaptado de Yang et al, 2013

As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígenos originárias da medula óssea. Após a maturação antigênica, as CDs secretam IL-12 e apresentam em sua superfície o antígeno processado em associação com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II para outras células do sistema imune, como por exemplo, linfócitos T (2,77).

Vários estudos demonstraram que a diferenciação de células dendríticas na presença de vitamina D ou de seus análogos provê um estado de tolerância em que há redução da expressão de moléculas co-estimulatórias, inibição da secreção da interleucina pro-inflamatória IL-12 e indução da interleucina imunorregulatória IL-10. Cada célula dendrítica tolerante leva à promoção de respostas anti-inflamatórias mediadas por células T incluindo a indução da maturação de células T regulatórias (55).

A descoberta da expressão do receptor de vitamina D (VDR) em células do sistema imunológico e a presença da enzima 25(OH)D-1 α -hidroxilase em células dendríticas e macrófagos sugerem que 1,25(OH)₂D₃ produzida neste local possua propriedades de regulação hormonal local. A vitamina D ativa modula a resposta imune

através da regulação de linfócitos T para inibir a produção e ativação de citocinas. Desta forma, a vitamina D ativa regula diretamente a função dos linfócitos T inibindo a proliferação de células Th1 e aumentando a concentração de células Th2. Células T latentes expressam baixos níveis de VDR e quando ativadas expressam-no em uma concentração até cinco vezes maior. O aumento de células T reguladoras causado pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tem sido sugerido como um mecanismo responsável pela capacidade da mesma em suprimir a autoimunidade (6,36,47,70).

Polimorfismos no gene do VDR associaram-se ao maior risco de desenvolvimento de doenças tireoideanas autoimunes. Entre estes, se destacam os polimorfismos no exon 2 do gene VDR *FokI*, além de *BsmI* e *ApaI* ambos no intron 8 e *TaqI* (exon 9), todos acometendo loci do gene VDR (4,12,78,36,39,71).

A proteína de ligação da vitamina D (DBP) é o principal transportador sistêmico da forma ativa da vitamina D e fundamental para sua endocitose celular. Níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ têm correlação com os níveis de DBP. Há relatos de polimorfismos no gene da DBP entre os quais são citadas a repetição (TAAA) no intron 8, a substituição T-G no exon 11 e a substituição C-G no códon 420. Estes polimorfismos geram alterações na afinidade de ligação da vitamina D a DBP e estão relacionados à manifestação das DTAs (69).

Há uma associação importante entre fatores ambientais e genéticos com o desenvolvimento da autoimunidade. Neste contexto, o papel da vitamina D vem ganhando força, uma vez que tem importante função como imunomoduladora no processo de desenvolvimento da autoimunidade. Dentre os fatores ambientais, a redução do período de exposição solar é o mais fortemente associado à deficiência de vitamina D (7,36,55,73,79,80).

3.2 Papel da Vitamina D na Doença Tireoideana Autoimune

A vitamina D é um pró-hormônio lipossolúvel e controla mais de 200 genes de forma direta ou indireta, incluindo genes relacionados à regulação da proliferação celular, diferenciação, apoptose e angiogênese. Apresenta importância no desenvolvimento das DTAs por exercer ação inibitória sobre a produção de determinadas citocinas e trata-se de um relevante regulador imune (6).

Muitos trabalhos têm demonstrado haver maior prevalência de deficiência de vitamina D em pacientes com DTA em comparação aos que apresentam outras tireoidopatias e a indivíduos saudáveis. Adicionalmente, demonstrou-se haver associação entre baixas concentrações de vitamina D e presença de auto-anticorpos tireoideanos assim como alteração dos testes funcionais tireoideanos nestes pacientes. Outros estudos citam a correlação entre a gravidade da deficiência de vitamina D relacionada ao tempo de duração da TH e ao volume tireoideano. Similarmente, alteração ultrassonográfica e AcTPO em níveis elevados são mais prevalentes em mulheres com deficiência de vitamina D (2,6,12,57).

As DTAs, representadas principalmente pela Doença de Graves e Tireoidite de Hashimoto são caracterizadas pela produção de auto-anticorpos e extensa infiltração linfocitária resultando em inflamação tecidual e destruição celular. Sua patogênese ainda não está completamente esclarecida e sabe-se que em seu desenvolvimento há uma associação entre predisposição genética e fatores ambientais (1,6,18,43,46).

A reação autoimune na TH se produz predominantemente à custa do grupo de linfócitos Th1, apresentando-se com alta expressão das interleucinas e de células Th17 que secretam citocinas próprias (43).

A TH é uma doença mediada predominantemente pela imunidade celular que se manifesta através de um defeito na função da célula T supressora (Treg) de tal forma que as células Th (CD4+) não suprimidas ficam livres para interagir com os linfócitos B. Adicionalmente, as células Th1 produzem várias citocinas, dentre elas interferon-gama que tem papel na indução da expressão de antígenos HLA classe II na superfície dos tireócitos tornando-os suscetíveis ao ataque imunológico. Em condições normais estes antígenos não são expressos em células tireoideanas e quando presentes nestas células podem desencadear o processo autoimune. Os linfócitos B produzem anticorpos contra os antígenos tireoideanos sob estímulo dos linfócitos T (6).

A maioria dos efeitos biológicos conhecidos da vitamina D é mediada através de sua ligação ao seu receptor VDR e é regulada pela enzima 1α -hidroxilase (CYP1 α). Vários estudos demonstraram a associação entre susceptibilidade a autoimunidade tireoideana e polimorfismos genéticos de VDR e CYP1 α levando à redução da atividade biológica da vitamina D (2,12,18,78).

Os VDRs não são encontrados em quantidades significativas nos linfócitos B e estão presentes em grande quantidade nas populações de linfócitos T e macrófagos.

Contudo suas maiores concentrações estão presentes nas células imunológicas imaturas do timo e em linfócitos TCD8+ maduros (6).

As propriedades imunomodulatórias da vitamina D são atribuídas aos seus efeitos em células dos sistemas inato e adaptativo, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, os quais possuem expressão tanto de VDR quanto CYP1 α . As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos originárias da medula óssea e correspondem aos primeiros marcadores das atividades imunomodulatórias da vitamina D. Após sua maturação, as células dendríticas secretam IL-12 e apresentam, em associação ao MHC classe II, o antígeno processado em sua superfície a outras células do sistema imune. Adicionalmente, a 1,25(OH)2D tem efeitos imunomodulatórios diretos no receptor VDR da célula T (2).

Na TH é possível que o processo autoimune seja inibido pela vitamina D em diferentes estágios. Primeiramente, a vitamina pode bloquear a ativação das células T, inibindo a partir de então a secreção de citocinas pelas células Th1 (6,18,77).

Posteriormente, o ataque imunológico na TH é desencadeado quando os tireócitos expressam em sua superfície antígenos do complexo de histocompatibilidade classe II (HLA-DR). A produção de citocinas via Th1, principalmente IFN- γ , que induz os tireócitos a expressarem HLA-DR pode ser inibida pela vitamina D (18,77).

Em outro estágio, após a ativação por células T, a proliferação de células B pode ser inibida e sua apoptose induzida pela vitamina D. Dessa forma a vitamina D poderia gerar redução de anticorpos que reagem contra antígenos tireoidianos. Deficiência de vitamina D tem sido associada à presença de auto-anticorpos tireoideanos e função anormal da glândula. No entanto, os níveis ideais de vitamina D necessários para promover a regulação imunológica adequada carecem de investigação adicional (2,6,18,77,81).

Embora a maioria dos pacientes com doença tireoideana autoimune não apresente fatores que expliquem a presença de deficiência de vitamina D, como doenças de pele, malabsorção, redução de atividades com exposição ao sol, provavelmente há outro motivo para justificar a redução da produção, absorção ou utilização da vitamina D nestes pacientes, sugerindo que a vitamina D possa ter um papel primário na patogênese da doença tireoideana autoimune (2,18).

O papel significativo que a vitamina D desempenha como imunossupressor foi demonstrado através de sua capacidade em prevenir ou suprimir o desenvolvimento de doenças autoimunes em modelos animais. Estudos demonstram experimentalmente que

doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais podem ser prevenidas ou suprimidas pela administração de 1,25(OH)₂D (6).

Entretanto, esse benefício obtido com a suplementação com vitamina D foi demonstrado apenas em modelos animais, sendo necessários mais estudos para definir esta conduta. Até o presente momento tem se considerado que níveis de vitamina D acima de 30 ng/ml seriam suficientes e confeririam proteção contra doenças ósseas (2,18,55,48).

Há vários relatos mostrando associação entre vitamina D e TH, porém é consenso que são necessários mais estudos para elucidar o papel da associação entre as concentrações de vitamina D e a fisiopatologia da autoimunidade presente na Tireoidite de Hashimoto (2,6,14,27,57,40,41).

3.3 Métodos de Avaliação da Vitamina D sérica

Concentrações de 25OHD (colecalciferol) circulante representam o melhor indicador do *status* de vitamina D (82).

As metodologias de dosagem de vitamina D utilizadas em laboratórios clínicos incluem os ensaios competitivos de proteína de ligação à vitamina D (CPBA), imunoensaios, cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC), cromatografia e espectrometria de massa em *tandem* com líquido (LC-MS/MS) (83).

Embora as metodologias de testes de 25OHD tenham se aprimorado significativamente, ainda existe um viés considerável entre os diferentes métodos e laboratórios. Portanto, a padronização de um método faz-se necessária. Os níveis ideais de 25OHD devem ser determinados com base neste método padronizado (83).

Um importante fator presente no soro humano e que pode ser responsável pela alteração nas dosagens da 25OHD é o C-3 epímero da vitamina D (3-epi-25(OH)D₃). O epímero tem o mesmo peso molecular da vitamina e ambos diferem apenas na estereoquímica do grupo hidroxila na posição 3. Trata-se de um substrato para a enzima 1 α -hidroxilase sendo convertido em 3-epi-1,25 dihidroxivitamina D₃ e sendo capaz de ligar-se ao receptor de vitamina D porém sua importância fisiológica ainda permanece incerta (84).

Certos métodos de dosagem a exemplo da LC-MS/MS, não separam este metabólito. Por sua vez, radioimunoensaios e alguns métodos cromatográficos não são afetados pela presença do C-3 epímero. Alguns estudos encontraram o epímero em concentrações significativas apenas em soro de crianças (84-86).

B - Objetivos

1. Geral

- Estudar a prevalência de insuficiência de vitamina D em pacientes com Tireoidite de Hashimoto e relação de vitamina D com estado hormonal tireoideano e marcadores séricos de autoimunidade tireoideana.

2. Específicos

- Avaliar concentrações séricas de vitamina D (25OHD) e a prevalência de deficiência desta vitamina em pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto comparativamente a indivíduos sem tireoidopatia de um grupo de controle.
- Relacionar concentrações séricas de 25OHD ao *status* hormonal tireoideano e características demográficas em pacientes com tireoidite de Hashimoto e em indivíduos do grupo de controle.
- Relacionar concentrações séricas de 25OHD aos marcadores séricos de autoimunidade tireoideana, AcTPO, AcTG e TRAb, em pacientes com tireoidite de Hashimoto.
- Relacionar volume tireoideano estimado por ultrassom em pacientes com tireoidite de Hashimoto aos parâmetros demográficos e características do *status* hormonal tireoideano, de concentrações séricas de 25OHD e de marcadores de autoimunidade tireoideana.

C – Metodologia

1 – Desenho do estudo e Pacientes

Este foi um estudo transversal incluindo 108 pessoas, sendo 54 pacientes com TH acompanhados no ambulatório de Disfunção Tireoidiana da Disciplina de Endocrinologia em funcionamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e 54 indivíduos eutireoidianos, sem TH, como grupo de controle, pareados por sexo e idade.

Os pacientes e indivíduos sem TH que se encaixavam nos critérios de inclusão e exclusão foram convidados a participar da realização de entrevista com coleta de informações demográficas, sobre paridade e uso regular da medicação além de efetuar as medidas antropométricas de peso e altura. Os demais dados sobre dose de medicação, tempo de diagnóstico, volume tireoideano à ultrassonografia foram retirados dos prontuários dos pacientes no mesmo período da avaliação.

Realizou-se coleta de sangue visando à dosagem dos parâmetros laboratoriais hormonais (TSH, T4L, PTH, 25OHD), bioquímicos (Ca, P) e imunológicos (AcTPO, AcTG, TRAb) objetivando a verificação de diferenças entre tais parâmetros nos grupos de pacientes e indivíduos sem TH. Inicialmente, foi analisada a prevalência de insuficiência de vitamina D nos pacientes comparada ao grupo de controle.

Procurou-se estabelecer no grupo dos pacientes, relações entre as dosagens de vitamina D e parâmetros como idade, volume tireoideano, níveis de auto-anticorpos, concentrações de TSH e T4 livre, cálcio, fósforo, paratormônio e IMC.

Realizou-se análise interina de poder estatístico para avaliação de correlação entre hormônios tireoidianos, vitamina D e marcadores de autoimunidade tireoidiana resultando em número mínimo de 54 pacientes para um poder estatístico de 80%.

O projeto recebeu financiamento integral da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), programa de auxílio regular à pesquisa, nº 2012/20984-2.

Todos os pacientes, bem como os indivíduos sem TH, leram e assinaram um termo de consentimento livre esclarecido (anexo I), devidamente aprovado pelo Comitê

de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, número 62370/ano (anexo II).

1.1- Critérios de inclusão

Incluíram-se pacientes com diagnóstico confirmado clínica e laboratorialmente de hipotireoidismo por Tireoidite Crônica de Hashimoto e indivíduos sem TH entre 18 e 75 anos de idade que concordaram em participar do estudo, após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

1.2- Critérios de exclusão

- Pacientes tireoidectomizados
- Pacientes agudamente enfermos
- Neoplasia maligna ou doença inflamatória em atividade
- Uso de amiodarona
- Uso de corticoides
- Uso de cálcio e/ou vitamina D
- Uso de contraste iodado há menos de 3 meses antes do início do estudo
- Insuficiência cardíaca (classe III ou IV da NYHA), doença hepática grave (albumina reduzida ou aumento de RNI), doença renal avançada (estadio 4 ou 5) e pacientes em hemodiálise
- Pacientes sabidamente soropositivos para os vírus HIV e hepatite C

2 – Grupo de controle

Constituído por 54 indivíduos eutireoidianos, sendo excluído o diagnóstico de TH, conforme próprio relato e posteriormente confirmado laboratorialmente através de dosagens de T4 livre e TSH dentro dos valores de referência e AcTPO, AcTg e TRAB indetectáveis. Os indivíduos foram selecionados entre acompanhantes dos pacientes e funcionários do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, pertencentes a estrato sócio-econômico-cultural semelhante ao dos pacientes com tireoidite de Hashimoto, obedecendo-se aos mesmos critérios de inclusão e exclusão definidos para os pacientes com TH.

3 – Critérios diagnósticos de Tireoidite de Hashimoto e de alterações nas concentrações de vitamina D

Considerou-se o diagnóstico prévio de hipotireoidismo primário em pacientes que apresentaram concentrações de TSH acima do valor de referência associado a níveis de T4 livre abaixo do valor de referência, antes da instituição do tratamento específico. Todos os pacientes estavam em vigência de tratamento com levotiroxina. Foram incluídos no estudo apenas pacientes com AcTPO e/ou AcTG em concentrações elevadas, confirmando a etiologia autoimune do hipotireoidismo. Os indivíduos do grupo de controle eram eutireoidianos e apresentavam AcTPO, AcTG e TRAb indetectáveis.

Concentrações séricas de vitamina D abaixo de 30 ng/ml foram classificadas como insuficiência enquanto que concentrações abaixo de 10 ng/ml foram classificadas como deficiência de vitamina D.

As coletas foram realizadas nos períodos correspondentes a primavera e verão.

4 – Determinação do volume tireoideano

Os dados de ultrassonografia foram coletados de todos os pacientes do estudo através de revisão de prontuário, baseando-se no laudo de exame disponível, com análise descritiva morfológica da tireoide, englobando dimensões dos lobos, ecotextura do parênquima, presença de nódulos. Os exames foram realizados no Serviço de Radiologia do HC-Unicamp, obtidos em aparelho de US com frequência múltipla linear com transdutor de 10-12 MHz para análise morfológica e 4.5-7 MHz para análise de *Doppler*. O volume tireoideano total foi determinado em mililitros (ml) através do produto das medidas longitudinal, transversal e anteroposterior dividindo-se pela constante 0,52, somando-se os volumes dos lobos direito, esquerdo e istmo. Considerou-se o volume normal do adulto de 6 a 15 ml (10-11 +/- 3-4 ml).

5 - Variáveis antropométricas

Realizou-se medidas de peso e altura com o paciente em posição ortostática, em balanças calibradas com estadiômetro acoplado (Filizola ®) e o cálculo de IMC pela divisão do peso em kg pelo quadrado da altura em metros. O IMC foi classificado como:

Abaixo de 18,5 kg/m²: baixo peso

Entre 18,5 e 25 kg/m²: normal

Entre 25 e 30 kg/m²: sobrepeso

Entre 30-35 kg/m²: obesidade leve ou grau 1

Entre 35-40 kg/m²: obesidade moderada ou grau 2

Maior do que 40 kg/m²: obesidade grave ou grau 3

6- Coleta de amostra sanguínea

Realizou-se coleta única de 20ml de sangue periférico de pacientes e indivíduos do grupo de controle para dosagens laboratoriais no mesmo dia da avaliação clínica. O sangue foi coletado por punção de veia antecubital, sendo em seguida imediatamente centrifugado e estocado a -20°C para posterior efetivação das dosagens.

7- Dosagens séricas Hormonais, Bioquímicas e de marcadores de autoimunidade tireoidiana

As dosagens foram realizadas utilizando-se o equipamento COBAS E.411 – KPACK.

Para avaliação dos níveis hormonais nos pacientes com TH e grupo de controle utilizou-se as concentrações de TSH dosado por ensaio eletroquimioluminométrico Elecsys (valor de referência 0,41 a 4,5 µUI/mL), com a precisão intra-ensaio (CV) de 5%, intervalo de medição 0,01-100 µUI/ml, sensibilidade analítica 0,01 pg/ml e sensibilidade funcional 0,014 µUI/ml com CV de variação de 20%. T4 livre foi dosado por imunoensaio competitivo por quimioluminescência Elecsys FT4 II (VR 0,9 a 1,8 ng/mL), intervalo de medição utilizado ficou entre 0,02-7,76 ng/dl, CV 5% com sensibilidade analítica 0,023 ng/ml e funcional 0,39 ng/ml, CV 20%.

TRAb foi dosado por Imunoensaio competitivo por eletroquimioluminescência empregando receptores de TSH Elecsys TRAb com valores de referência até 1,22 UI/L e com intervalo de medição entre 0,3-40,0 UI/L, CV 5%, sensibilidade analítica 0,3 UI/L, funcional 0,9 UI/L. AcTPO e AcTG foram dosados por ensaio imunométrico quimioluminescente Elecsys com valores de referência até 34UI/MI e até 115 UI/MI, respectivamente. Para AcTPO intervalo de medição foi utilizado entre 5,0 - 600,0 UI/ml, CV 5%, sensibilidade analítica 5,0 UI/ml, funcional 34 UI/ml. Para AcTG medição entre 10,0 – 4000,0 UI/ml, CV 5%, sensibilidade analítica 10 UI/ml, funcional 34 UI/ml.

A vitamina D total (25OHD) foi dosada por Ensaio imunométrico quimioluminescente com valores de referência entre 30 a 100 ng/ml, sendo a amostra coletada em tubos de ensaio protegidos contra a luz. Posteriormente a amostra foi submetida à centrifugação durante dez minutos a 3500 rpm. Foram coletadas alíquotas do soro sobrenadante após a centrifugação e armazenadas a -20°C para posterior dosagem. Concentrações abaixo de 30 ng/ml foram classificadas como insuficiência, enquanto que concentrações abaixo de 10 ng/ml foram classificadas como deficiência de vitamina D. Intervalo de medição entre 3,0 a 70,0 ng/ml, com precisão intra-ensaio 5%, sensibilidade analítica 5,0 ng/ml, sensibilidade funcional 4,01 ng/ml com CV de 20%.

Concentrações de paratormônio (PTH) foram determinadas por eletroquimioluminescência com valores de referência entre 15 e 65 pg/ml, sendo as amostras coletadas em banho de gelo com intervalo de medição entre 1,2 e 5000 pg/ml, precisão intra-ensaio (CV) de 5%, sensibilidade analítica 1,2 pg/ml, sensibilidade funcional 6,0 pg/ml e coeficiente de variação 20%. Fósforo foi dosado por fotometria UV com valores de referência entre 2,7 e 4,5 mg/dl para adultos. Cálcio foi dosado por colorimetria com valores de referência entre 8,8 e 10,2 mg/dl para faixa etária de 21 a 50 anos e entre 8,4 e 9,7 mg/dl para faixa etária acima dos 50 anos.

8 – Análise Estatística

Análise interina de poder estatístico para avaliação de correlação entre valores das dosagens séricas de hormônios tireoidianos, vitamina D e marcadores de autoimunidade tireoidiana resultou em numero mínimo de 54 pacientes.

Realizou-se análise descritiva dos dados por meio de medidas de posição e dispersão para as variáveis contínuas e tabelas de frequência para variáveis categóricas. Utilizou-se mediana e intervalo interquartil para as variáveis contínuas e contagem absoluta e porcentagem para as categóricas.

Avaliou-se associação entre duas variáveis contínuas com o teste de correlação de Spearman e entre variáveis categóricas pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando uma ou mais das frequências estudadas era igual ou menor a 5. Analisaram-se diferenças entre dois grupos com o teste de Mann-Whitney. Para todos os testes adotou-se um valor de significância estatística de 0,05.

D – Publicação

1.0. Artigo:

“Prevalence of Vitamin D insufficiency in patients with Hashimoto’s thyroiditis and its relationship with thyroid autoimmunity.”

Prevalence of Vitamin D insufficiency in patients with Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid autoimmunity.

Botelho, IMB; Moura Neto, A; Silva, CA; Tambascia, MA; Alegre, SM; Zantut-Wittmann, DE.

INTRODUCTION:

Hashimoto's thyroiditis (HT) is a disease characterized by the presence of autoantibodies against thyroid tissue associated with various degrees of destruction of thyroid follicles and is the main cause of clinical or subclinical hypothyroidism. It results from a combination of genetic predisposition, abnormal immune response and exposure to environmental factors (1,2,3,4,5).

Studies show that there is a genetic defect in T cell suppressor (Treg) function in TH. Thus, CD4⁺ T cells are not deleted when they are free to promote activation of B lymphocytes. Concomitantly, the Th cells produce various cytokines that induce thyrocytes to express surface antigens HLA-DR making them susceptible to immune attack. Although these antigens are not normally expressed in thyroid cells, patients with TH expressing HLA-DR antigens on the surface of follicular cells triggering the autoimmune process. B lymphocytes activated by T lymphocytes produce antibodies reactive to thyroid antigens. Autoantibodies against the TSH receptor molecule in the plasma membrane thyroid follicles does not cause a physiological response and patients with TH produce high levels of thyroid autoantibodies (4,5,6,7).

Aside from its well documented role in calcium metabolism, vitamin D exerts pleiotropic immunomodulatory effects on both innate and adaptative immune cells. Its active form (1,25 (OH)₂VitD) binds to the nuclear vitamin D receptor (VDR), which is expressed in various immune cells such as monocytes, macrophages, dendritic cells, B and T lymphocytes, promoting immunomodulatory actions. Low concentrations of vitamin D have been associated with predisposition to various autoimmune diseases such as type 1 diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and autoimmune thyroid diseases (ATDs). There are reports on the association between low

vitamin D levels and the presence of anti-TPO antibodies as well as the association of polymorphisms in the VDR gene with ATDs (8-19).

The VDR expression in immune cells and the presence of the enzyme 25 (OH) D-1 α -hydroxylase in dendritic cells and macrophages suggests that 1,25(OH)₂D₃ has local hormonal regulation properties. The active vitamin D modulates the immune response by influencing regulatory T cell activity, inhibiting cytokine production and activation. As a consequence, there is decreased proliferation of Th1 cells and increased concentration of Th2 cells. Expression of VDR increases five times over activation of latent T cells. The increase in regulatory T cells caused by 1,25(OH)₂D₃, both *in vitro* and *in vivo* has been suggested as responsible for autoimmunity suppression (4,8,15,20).

In HT, it is possible that the autoimmune process is inhibited by vitamin D in different stages. Firstly, it can block the activation of T cells, inhibiting the secretion of Th1 cytokines (4,21,22). Secondly, the immune response in TH is triggered when the thyrocytes express antigens on their surface HLA-DR. The production of Th1 cytokines, especially IFN- γ , which induces thyrocytes to express HLA-DR, can be inhibited by vitamin D. Additionally, after activation by T cells, B cell proliferation can be inhibited and apoptosis induced by vitamin D. Thus, the reduction in vitamin D concentration could promote generation of antibodies that react against thyroid antigens. Vitamin D deficiency has been associated with the presence of thyroid autoantibodies and abnormal gland function (4,2,21,22,23).

Considering the possible role of Vitamin D in thyroid autoimmunity, our aims were to study the prevalence of vitamin D insufficiency and the relationship of serum vitamin D concentrations with thyroid hormone *status* and serum markers of thyroid autoimmunity in patients with HT.

Subjects and Methods:

Interim analysis was conducted to evaluate the statistical power of correlation between thyroid hormone, vitamin D and thyroid autoimmunity markers resulting in minimum of 54 patients.

To test our hypothesis, we set up a case-control study involving 54 patients with HT treated in our university hospital (HC / UNICAMP) and 54 individuals without HT, all aged 18 to 75 years.

Blood samples were collected from both groups for measurements of serum total 25OH vitamin D, thyrotropin (TSH), free thyroxine (free T4), calcium, phosphorus, parathormone (PTH), anti-thyroid peroxidase antibody (TPOAb), anti-thyroglobulin antibody (TGAb) and anti-TSH receptor antibody (TRAb).

Thyroid volume in patients with HT was estimated by ultrasound. The total thyroid volume was determined in milliliters (ml) by the product of the longitudinal, transverse and anteroposterior measurements divided by the constant 0.52, adding up the volumes of the right and left lobes and isthmus. Values between 6 and 15 ml (10-11 + / - 3-4 ml) were considered normal for adults (24).

Exclusion criteria were: previous history of thyroidectomy, acutely ill patients, active malignant or inflammatory disease, use of amiodarone, steroids, calcium and / or vitamin D, use of iodinated contrast less than 3 months before the start of the study, heart failure (class III or IV NYHA), severe liver disease (reduced albumin or increased INR), advanced kidney disease (stage 4 or 5), patients under hemodialysis and those known to be seropositive for HIV and hepatitis C.

Data on weight, height, body mass index, parity and time since diagnosis were collected from patients' records or by direct interview. Patients and control subjects were matched by age and gender.

For evaluation of hormone levels in patients with HT and the control group we used the concentrations of TSH dosed by eletrochemiluminescence (Roche Cobas Elecsys - reference value from 0.41 to 4.5 μ UI / mL) and free T4 dosed by competitive chemiluminescence immunoassay Elecsys FT4 II (RV 0,9 and 1,8 ng / ml). The intra-assay coefficient of variation (CV) was 5%; measuring range 0.01-100 μ UI / ml, analytical sensitivity 0.01 pg / mL and functional sensitivity μ UI 0,014 / ml with inter-assay CV of 20%. For FT4 measurement interval was used between 0.02 to 7.76 ng / dl,

intra-assay CVs of 5% analytical sensitivity 0.023 ng / ml and functional 0.39 ng / ml and inter-assay CV 20%.

TPOAb and TgAb were measured by chemiluminescent immunometric assay Elecsys with normal reference values up to 34UI/ml for AcTPO and up to 115 IU / MI for ACTG. For AcTPO, measurement interval was 5.0 to 600.0 IU / ml, CV 5% analytical sensitivity 5.0 IU / ml Functional 34 IU / ml. For ACTG measurement interval was between 10.0 to 4000.0 IU / ml (5% CV); analytical sensitivity 10 IU / ml and functional sensitivity 34 IU / ml. TRAb was measured by competitive electrochemiluminescence immunoassay using Elecsys TRAb TSH receptors with normal reference values up to 1.22 IU / L; measurement interval range from 0.3 to 40.0 IU / L, CV 5%; analytical sensitivity of 0.3 IU / L and functional sensitivity of 0.9 IU / L.

Total vitamin D (25OHVitD) was measured by chemiluminescent immunometric assay with reference values from 30 to 100 ng / ml. Measurement range between 3.0 and 70.0 ng / ml with intra-assay precision 5%; analytical sensitivity 5.0 ng / ml and functional sensitivity of 4.01 ng / ml with a 20% CV.

The diagnosis of primary hypothyroidism was performed in the presence of TSH concentrations above the reference value and/or free T4 below the reference value. At the time of collection, all patients were on replacement therapy with levothyroxine. Only patients with AcTPO and/or positive ACTG confirming the etiology of autoimmune hypothyroidism were included. All subjects in the control group were clinical and laboratory euthyroid, AcTPO, ACTG and TRAb undetectable. Vitamin D concentrations below 30 ng / ml and above 20ng/ml were classified as insufficiency, while concentrations above 30 ng / ml were classified as vitamin D sufficient.

The significance level for statistical analysis was 5%. The project received full funding from the Research Foundation of the State of São Paulo (FAPESP), N°. 2012/20984-2. The study was approved by the University Ethics in Research Committee. Written informed consent was obtained from each patient or subject after full explanation of the purpose and nature of all procedures.

Statistical Methods:

Descriptive analysis of clinical and laboratorial parameters was done by measurement of position and dispersion for continuous variables and by frequency tables for categorical variables.

Comparison of vitamin D concentrations, serum FT4, TSH, TPOAb, TGAb, TRAb, calcium, phosphorus and PTH between both groups was performed with the Mann-Whitney test.

Association between two clinical categorical variables was assessed with the Chi-Square test or Fischer's exact test, as appropriate. Correlations between thyroid hormone concentrations, thyroid volume, autoantibodies, concentrations of vitamin D, calcium, phosphorus and PTH, and clinical parameters (age, body mass index, parity) were examined with Spearman's linear correlation coefficient. Significance level was set at 5%. Data are reported as median (interquartile range) for continuous variables and frequency (percentage) for categorical variables.

Influence of vitamin D levels on thyroid volume, TSH, FT4, TPOAb, TGAb was assessed by univariate linear regression with variables log transformed. Independent predictors for TSH, FT4, thyroid volume, TPOAb and TGAb were assessed by multiple linear regression analysis (stepwise method) in a model adjusted by sex, age, vitamin D and all abovementioned variables.

All calculations were done with SPSS (IBM Co, USA), version 20.0.

RESULTS:

Descriptive analysis:

The study included 54 patients, of which 50 were female (92.6%). In the control group, there were 54 subjects, 48 female (88.9%). Mean time of diagnosis of HT was 11.98 years (range 1-60 years). Clinical and laboratorial characteristics of patients and control groups are described in table 1.

Vitamin D insufficiency was found in 21 individuals (38.9%) in the control group versus 37 patients in the HT group (68.5%), $p = 0.002$.

The prevalence of secondary hyperparathyroidism in patients with HT was 5.5%. There were no patients with secondary hyperparathyroidism in the control group.

In the group of patients, hypocalcemia occurred in 12 subjects (22.2%). The same amount of individuals in the control group showed hypocalcemia. Hypophosphatemia occurred in 5 patients with HT (9.25%) and 5 (9.25%) individuals in the control group. The remaining subjects in both groups had normal calcium levels.

In the group of patients, 48 individuals (88.8%) had normal concentrations of phosphorus and only 1 patient (1.85%) showed a result higher than the reference value. Among the control group, 49 subjects (90.7%) had normal phosphorus concentrations.

As for the markers of thyroid autoimmunity, 52 (96.2%) patients with HT showed high levels of TPOAb and high levels of TgAb were found in 41 individuals (75.9%). In the HT group, 39 (72.2%) had high levels of both markers. TRAb was increased in 7 patients (12.9%). Serum concentration of TPOAb, TGAb and TRAb were undetectable in all individuals of the control group.

Analyzing parity, the mean number of children per women was 2.34 among patients and 1.59 among the control group.

In the group of patients with HT, mean of thyroid volume was 14.81 ml (RV: 6 to 15 ml) and goiter was seen in 19 subjects (35.2%; mean thyroid volume: 26.36 ml), while 35 individuals had normal or decreased thyroid volume ($n = 35$, 64.8%, mean thyroid volume: 8.53 ml). In the patients without goiter vitamin D insufficiency was seen in 21 patients (60%). In the group of patients with goiter this occurred in 16 individuals (84.2%). There was no difference in volume comparing patients with normal levels of vitamin D with those presenting vitamin D insufficiency.

Comparative analysis between individuals with Hashimoto's thyroiditis and the control group:

Both groups were paired by age and gender (Table 1).

There was no significant difference in sex, age, parity, concentrations of calcium, phosphorus, PTH and FT4 between patients and the control group. There was significant difference in TSH ($p < 0,001$) and BMI ($p = 0,005$) between the groups.

However, we verified significant differences between groups comparing 25OHvitamin D concentration and prevalence of vitamin D insufficiency (table 1). Prevalence of vitamin D insufficiency was significantly higher in patients (68.5% vs 38.9%; $p=0.002$).

Correlations between vitamin D concentrations, demographic characteristics, parameters of calcium metabolism, thyroid hormone status and serum markers of thyroid autoimmunity in patients with Hashimoto's thyroiditis and the control group:

In the group of patients there was no correlation between vitamin D concentrations and age, BMI, parity, thyroid volume, serum levels of calcium, phosphorus, PTH, TRAb, TPOAb, TGAb, TSH or free T4.

Also, there was no correlation among thyroid volume and age, BMI, calcium, phosphorus, PTH, TRAb, TGAb and free T4 (Table 2). There was a positive correlation between thyroid volume and TPOAb ($r = 0,319$; $p = 0.019$); Figure 1.

There was no significant correlation between the concentrations of calcium and vitamin D in both the groups. The same was true for correlations between vitamin D and phosphorus and parity.

In the control group, there was no correlation between concentrations of vitamin D and any of the parameters considered (Data not shown).

Univariate linear regression analysis for vitamin D levels in patients with Hashimoto's Thyroiditis

In univariate regression analysis, vitamin D was not a predictor of any of the parameters evaluated: TSH, free T4, TPOAb, TGAb, TRAb and thyroid volume (Data not shown).

Multivariate linear regression analysis for vitamin D levels in patients with Hashimoto's Thyroiditis

The multivariate analysis model included gender, age, TSH, free T4, TPOAb, TGAb, TRAb and thyroid volume.

TSH was found to be an independent predictor of free T4 ($B = -0.013$; IC 95% - 0.019; -0.008; $p < 0.001$).

TPOAb was an independent predictor of thyroid volume ($B = 0.006$; IC 95% 0.001; 0.01; $p = 0.003$).

DISCUSSION:

Our study has found a higher prevalence of vitamin D insufficiency in patients with HT compared to the group of healthy individuals. However, lower concentrations of vitamin D were not correlated with parity, parameters of calcium metabolism, and thyroid hormone *status* or serum markers of thyroid autoimmunity. Also, there was no association between vitamin D and thyroid volume but larger thyroid volume was correlated with higher levels of TPOAb, which could reflect a greater magnitude of the autoimmune inflammatory process in patients presenting larger thyroid volume.

Although initially described as a “vitamin”, vitamin D is considered a hormone, known, first of all, for its role in regulation of calcium-phosphate homeostasis. Vitamin D acts as an immunomodulatory factor and may play a role in the pathogenesis of HT (2,4,18,22,25,26,27).

Vitamin D levels are estimated by measuring the concentration of 25-hydroxy vitamin D (25OHD). The optimal level of serum 25OHD for bone health is controversial. Based on studies of vitamin D some experts are in favor of maintaining 25OHD levels between 20 and 40 ng / ml (50 to 100 nmol / L). Concentrations below 20 ng / ml are deemed insufficient, whereas levels below 10 ng / are classified as deficiency. Some authors consider levels below 30ng/dl as deficiency in the elderly. Thus, the level generally considered adequate would be between 30 and 40 ng / mL (75 to 100 nmol / L). Experts agree that concentrations below 20 ng / mL are low to maintain bone health. Serum concentrations of 25OHD ideal for extra bone health are not yet established (9).

Conversely, vitamin D has been associated with higher risk of development of autoimmunity and implicated in prevention of autoimmune diseases. Therefore, some authors consider a future possibility of treating vitamin D deficiency to prevent autoimmune diseases (8).

In this study, as was expected, patients with HT presented lower serum levels of vitamin D than the control group paired by age and gender. This finding is in line with previous works showing low levels of vitamin D in patients with HT. This point could reflect environmental factors, such as insufficient sunshine exposure or the presence of VDR polymorphisms that could contribute to lower vitamin D concentrations (2,4,8,9,22,27).

Kivity et al evaluated the levels of vitamin D in 50 patients with autoimmune thyroid diseases (AITDs) compared to 42 patients with non-AITDs and 98 healthy controls. Vitamin D deficiency was designated at levels lower than 10 ng/ml. The prevalence of vitamin D deficiency was significantly higher in patients with AITDs compared with healthy individuals (72% versus 30.6%), as well as in patients with HT compared to patients with non-AITs (79% versus 52%) (22).

Tamer et al performed a prevalence case-control study that included 161 cases with HT and 162 healthy controls. The prevalence of vitamin D insufficiency in HT (148 of 161; 92%) was significantly higher than that observed in healthy controls (102 of 162; 63%)(4).

Choi YM et al conducted a cross-sectional study including 6685 subjects (58% male and 42% female) and concluded that the levels of serum vitamin D were significantly lower in patients with autoimmune thyroid diseases, especially in premenopausal women, suggesting a possible role of vitamin D in the development of AITD and a potential crosstalk mechanism between vitamin D and estrogen in the pathogenesis of AITD (27).

In the present study, evaluation of thyroid hormone *status* in patients with HT indicated no correlation with vitamin D insufficiency, although TSH levels have presented differences between groups. The same occurred with thyroid volume. Also, these correlations did not occur in the control group. Similar results were demonstrated by Pani et al, who found polymorphisms of DBP (vitamin D-binding protein) in patients with GD but not in HT. Goswami et al and Effraimidis et al have showed conflicting results of weak or no association between low vitamin D levels and thyroid autoimmunity. Zhang et al demonstrated that vitamin D concentrations were not associated with higher thyroid antibody titers after controlling for age and gender. They also found no significant differences in thyroid volume comparing groups with vitamin D insufficiency and sufficiency (28,29,30,31).

On the other hand, Kivity et al. documented significantly low levels of vitamin D in patients with AITDs, which were related to the presence of abnormal thyroid function tests. Similarly, Tamer et al demonstrated that the prevalence of vitamin D insufficiency was higher in patients with overt hypothyroidism (47 of 50; 94%) or subclinical hypothyroidism (44 of 45; 98%) than in euthyroid individuals (57 of 66; 86%), but the differences were not statistically significant. Bozkurt et al demonstrated

that 25OHD deficiency severity correlated with duration of HT, thyroid volume, and thyroid antibodies (4,22,32).

The preference for females is related to several factors, parity among them. Evidence suggests a possible role of fetal cells in the modulation of autoimmune diseases. Studies have shown that maternal antibodies might respond to fetal antigens remaining in maternal tissues (fetal microchimerism) triggering autoimmune diseases. Therefore there would be an increased risk of developing the disease according to the number of pregnancies. But other researchers dispute this hypothesis. In our study there were no differences regarding parity and concentrations of vitamin D (33,34,35,36,37).

Another interesting point concerns the relationship between obesity and vitamin D deficiency observed in women (Shinkov, 2014), correlation not found in the present study, although there are differences in BMI between groups.

It is known that the conversion of 25OHD to calcitriol $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, the biologically active form of vitamin D, is catalyzed by parathyroid hormone (PTH) in the kidney. Therefore, states of low levels of vitamin D, as well as low calcium and phosphorus, stimulate PTH secretion. In this study, despite the insufficiency of vitamin D being more prevalent in patients, there were no significant differences in the prevalences of secondary hyperparathyroidism and hypocalcaemia. Also, there were no significant differences in the concentrations of phosphorus.

This study has some limitations. The number of individuals was relatively small, although the sample size calculation was found to be reliable. In addition, the measurement of total 25OHvitD was performed by a method (chemiluminescent immunometric assay) that intersects C3 epimer, but we do not believe this was relevant because all individuals included are adults and cross-reactivity occurs mainly in children (38-40).

We emphasize that all patients were euthyroid due to hormone replacement and still, there was a higher prevalence of vitamin D insufficiency in the HT group, inferring that this finding would not be due to hypothyroidism, which could be a factor influencing the homeostasis of vitamin D. However, individuals in the control group were also euthyroid, but had a significantly lower prevalence of vitamin D insufficiency than patients with HT. Thus, thyroid autoimmunity emerges as a factor that differentiates the two groups evaluated, but in our study we found no correlation with the serum markers of thyroid autoimmune chronic inflammation. The study of vitamin

D levels with other variables related to thyroid autoimmunity such as lymphocyte subset infiltration and their products may yield different results.

In conclusion, we demonstrated a higher prevalence of vitamin D insufficiency in HT patients in relation to a healthy control group and no correlation with thyroid hormone *status* or serum markers of thyroid autoimmunity. Larger thyroid volumes were positively correlated with higher TPOAb serum concentrations suggesting association with greater thyroid autoimmune inflammatory activity.

Additional studies are warranted to clarify the precise role of vitamin D in AITD.

Acknowledgments

The authors wish to thank FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), a public research support institution of the state of São Paulo, for funding this work (n° 2012/20984-2).

Disclosure

None of the authors have any potential conflicts of interest associated with this research.

REFERENCES:

- 1) Li D et al. 2013. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clinical Immunology* 149:411- 420.
- 2) Mazokopakis E, Kotsiris D. 2014. Hashimoto's autoimmune thyroiditis and vitamin D deficiency. Current aspects. *Hell J Nucl Med* 17 (1): 37-40.
- 3) Zha et al. 2014. Distribution of Lymphocyte Subpopulations in Thyroid Glands of Human Autoimmune Thyroid Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* (00): 1-6.
- 4) Tamer G, Arik S, Tamer I, Coksert D. 2011. Relative Vitamin D Insufficiency in Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid* 21(8): 891-896.
- 5) Bindra A, Braunstein G. 2006. Thyroiditis. *American Academy of Family Physicians* 73 (10): 1769-1776.
- 6) Orgiazzi J. 2012. Thyroid autoimmunity. *Presse Med* 41 (12 P 2):e611-25.
- 7) So M, Macisaac RJ, Grossman M. 2012. Hypothyroidism. *Aust Fam Physician* 41(8):556-62.
- 8) Yang C, Leung P, Adamopoulos I, Gershwin E. 2013. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2013 Jan 29.
- 9) Tsatsoulis A. 2006. The role of stress in the clinical expression of thyroid autoimmunity. *An N Y Acad Sci* 1088:382-95.
- 10) Weetman A, DeGroot L. 2012. Autoimmunity to the thyroid gland. [www.thyroid manager.org](http://www.thyroidmanager.org)
- 11) The Endocrine Society. 2011. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7): 1911-1930.
- 12) Specker BL, Tsang RC, Hollis BW. 1985. Effect of race and diet on human-milk vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Am J Dis Child*. 139(11):1134-7.
- 13) Murphy SP, Calloway DH. 1986. Nutrient intakes of women in NHANES II, emphasizing trace minerals, fiber, and phytate. *J Am Diet Assoc*. 86(10):1366-72.
- 14) Pillai S, Bikle DD, Elias PM. 1988. 1,25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J Biol Chem*. 15;263(11):5390-5.
- 15) Specker BL, Valanis B, Hertzberg V, Edwards N, Tsang RC. 1985. Sunshine exposure and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in exclusively breast-fed infants. *J Pediatr* 107(3):372-6.
- 16) Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK. 1968. 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D3. *Biochemistry*. 7(10):3317-22.
- 17) Fraser DR, Kodicek E. 1970. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature*. 21;228(5273):764-6.

- 18) Effraimidis G, Wiersinga W. 2014. Autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol* Mar 7.
- 19) Lin WY, Tsai CH, Chen RH, Lee CC, Tsai FJ. 2006. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in Chinese patients in Taiwan 20(3): 109-112.
- 20) Cantorna M. 2010. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc Nutr Soc* 69(3): 286-289.
- 21) Lacka K, Maciejewski A. 2013. Vitamin D in the etiopathogenesis of autoimmune thyroiditis. *Pol Merkur Lekarski* 34 (203): 281-285.
- 22) Kivity et al. 2011. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases. *Cellular & Molecular Immunology* (8) : 243-247.
- 23) Bruce D, Yu S, Ooi JH, Cantorna M. 2011. Converging pathways lead to overproduction of IL-17 in the absence of vitamin D signaling. *International Immunology* 23(8):519-528.
- 24) Shabana W, Peeters E, De Maeseneer M. 2006. Measuring thyroid gland volume: should we change the correction factor? *AJR Am J Roentgenol* Jan; 186(1): 234-6.
- 25) Proal A, Albert P, Marshall T. 2009. Dysregulation of the Vitamin D Nuclear Receptor May Contribute to the Higher Prevalence of Some Autoimmune Diseases in Women. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 252-259.
- 26) Perricone C, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. 2013. Novel pebbles in the mosaic of autoimmunity. *BMC Medicine* , 11:101.
- 27) Choi YM et al. 2014. Low levels of serum vitamin D3 are associated with autoimmune thyroid disease in pre-menopausal women. *Thyroid* 24 (4): 655-660.
- 28) Pani MA et al. 2002. A polymorphism within the vitamin D-binding protein gene is associated with Grave's disease but not with Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87 (6): 2564-2567.
- 29) Goswami R et al. 2009. Prevalence of vitamin D deficiency and its relationship with thyroid autoimmunity in Asian Indians: a community-based survey. *British Journal of Nutrition* Aug 102(3):382-6.
- 30) Effraimidis G, Badenhoop K, Tijssen JG, Wiersinga WM. 2012. Vitamin D deficiency is not associated with early stages of thyroid autoimmunity. *European Journal of Endocrinology* Jul 167(1):43-8.
- 31) Zhang et al. 2014. Association of High Vitamin D Status with Low Circulating Thyroid-Stimulating Hormone Independent of Thyroid Hormone Levels in Middle-Aged and Elderly Males. *International Journal of Endocrinology*, volume 2014.
- 32) Bozkurt NC et al. 2013. The Association Between Severity of Vitamin D Deficiency and Hashimoto's Thyroiditis. *Endocr Pract.* 21:1-14.

- 33) Effraïmidis G, Wiersinga W. 2014. Autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol* Mar 7.
- 34) Klitschkar, M et al. 2001. Evidence of Fetal Microchimerism in Hashimoto's Thyroiditis. *Journ Clin Endocrinol* 86(6): 2494-2498.
- 35) Ando T, Davies T. 2003. Postpartum autoimmune thyroid disease: the potential role of fetal microchimerism. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2965–2971.
- 36) Connolly MK, McCalmont TH. 1998. Fetal DNA and cells in women with systemic sclerosis. *New England Journal of Medicine* 339: 771-772.
- 37) Welsh K. 1997. Chimerism, the blind man, and the scientist. *Lancet* 351: 1886.
- 38) Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. 2013. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D C3-epimer. *Clinical Biochemistry* 46(3): 190-6.
- 39) Van den Ouweland JM, Vogeser M, Bächer S. 2013. Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry. *Reviews in endocrine and metabolic disorders* Jun; 14(2):159-84.
- 40) Yazdanpanah M, Bailey D, Walsh W, Wan B, Adeli K. 2013. Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D3, 25-OH-vitamin D2 and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens. *Clinical Biochemistry* Sep; 46 (13-14):1264-71.

Table 1: Characteristics of the patients with Hashimoto's Thyroiditis and control group (median/percentiles)

Characteristics	HT patients (n =54)	Control group (n=54)	P
Age (years)	48.0 (38.5-53.25)	49.0 (36.75-58)	0.936
Sex (Female/Male) n(%)	50/4 (92.6/7.4)	48/6 (88.9/11.1)	0.742
Body Mass Index (Kg/m ²)	28.5 (25.78-31.7)	25.0 (22.75-28.7)	0.005
Free T4 (ng/dl)	1.26 (1.0-1.44)	1.2 (1.0-1.3)	0.442
TSH (μUI/ml)	3.6 (1.63-6.54)	1.85 (1.2-2.92)	<0.001
TPOAb (UI/ml)	266.5 (131.5-475.5)	0	NR
TGAb (UI/ml)	427.0 (96.25-703.0)	0	NR
TRAb (UI/L)	0	0	NR
Calcium (mg/dl)	8.9 (8.5-9.3)	8.8 (8.5-9.1)	0.265
Phosphorus (mg/dl)	3.3 (3.07-3.52)	3.4 (3.0-3.85)	0.174
Paratormonio (pg/ml)	39.0 (29.75-49.25)	33.0 (27.75-44.0)	0.174
25OHVitamin D (ng/ml)	26.85 (22.92-32.72)	32.0 (22.87-37.87)	0.042
Vitamin D insufficiency n(%)	37.0 (68.5)	21.0 (38.9)	0.002

Table 2: Thyroid volume in patients with Hashimoto's Thyroiditis (percentages/median)

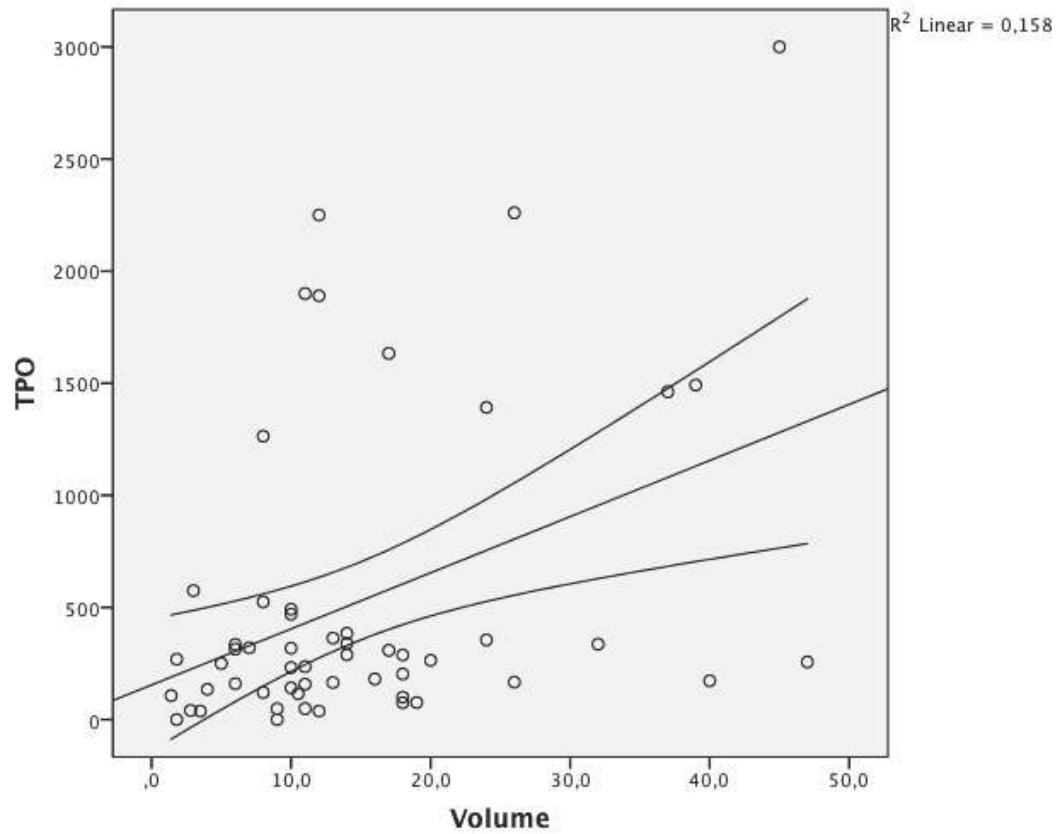
PATIENTS	
Thyroid volume (ml)	14.81
With goiter	35.2 / 26.36
Without goiter	64.8 / 8.53

Table 3: Correlations between the study variables in the group of patients. Correlation coefficients (Spearman's rho) for associations between vitamin D levels, thyroid volume, markers of thyroid autoimmunity and function parameters.

		FT4	TPOAb	TGAb	TRAb	VITD	Thyroid Volume	TSH
Vitamin D	r	0.029	-0.088	0.174	0.145	1.000	-0.232	-0.209
	p	0.834	0.525	0.805	0.209	.	0.092	0.129
Thyroid Volume	r	-0.092	0.319	0.060	-0.123	-0.232	1.000	0,116
	p	0.507	0,019	0.665	0.374	0.092	.	0,404

		Age	BMI	Calcium	Phosphorus	PTH
Vitamin D	r	0.202	0.005	0.085	- 0.012	0.134
	p	0.144	0.973	0.54	0.933	0.336
Thyroid Volume	r	-0.254	- 0.017	- 0.259	-0.194	-0.259
	p	0.063	0.904	0.059	0.159	0.059

Figure 1 Correlation between thyroid volume and TPOAb



E – Conclusões

- Pacientes portadores de tireoidite de Hashimoto apresentaram maior prevalência de insuficiência de vitamina D (63,2%) quando comparados aos indivíduos do grupo de controle (38,6%).
- Não foi observada associação entre concentrações de vitamina D em pacientes com TH e indivíduos do grupo de controle aos níveis de T4 livre e TSH.
- Não foi observada em pacientes com TH associação entre concentrações de vitamina D e marcadores de autoimunidade tireoideana, como AcTPO, AcTG e TRAb.
- Concentrações de vitamina D não se correlacionaram a alterações do volume da tireóide, entretanto maior volume da tireóide se correlacionou a níveis mais elevados de AcTPO.
- Nossos achados demonstraram maior prevalência de deficiência de vitamina D em pacientes com tireoidite de Hashimoto. No entanto, não houve correlação entre as concentrações de vitamina D e *status* hormonal tireoideano ou marcadores séricos de autoimunidade tireoideana. A correlação entre concentrações mais elevadas de AcTPO e maiores volumes tireoideanos poderia refletir a magnitude do processo inflamatório crônico auto-imune.

F – Referências Bibliográficas

1. Li D et al. 2013. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clinical Immunology* 149:411- 420.
2. Mazokopakis E, Kotsiris D. 2014. Hashimoto's autoimmune thyroiditis and vitamin D deficiency. *Current aspects. Hell J Nucl Med* 17 (1): 37-40.
3. Zha et al. 2014. Distribution of Lymphocyte Subpopulations in Thyroid Glands of Human Autoimmune Thyroid Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* (00):1-6.
4. G.Akinci B et al. 2008. Hashimoto's thyroiditis, but not treatment of hypothyroidism, is associated with altered TGF-beta1 levels. *Arch Med Res* 39(4): 397-401.
5. Bindra A, Braunstein G. 2006. Thyroiditis. *American Academy of Family Physicians* 73 (10): 1769-1776.
6. Tamer G, Arik S, Tamer I, Coksert D. 2011. Relative Vitamin D Insufficiency in Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid* 21(8): 891-896.
7. Effraimidis G, Wiersinga W. 2014. Autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol* Mar 7.
8. Weetman A. 2003. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *European Journal of Endocrinology* (148): 1-9.
9. Zantut-Wittmann DE et al. 2004. HLA-DRB1*04 and HLA-DQB1*03 association with the atrophic but not with the goitrous form of chronic autoimmune thyroiditis in a Brazilian population. *Horm Metab Res* 36 (7): 492-500.
10. Effraimidis G et al. 2011. Natural history of the transition from euthyroidism to overt autoimmune hypo- our hyperthyroidism: a prospective study. *Eur J Endocrinol* (164):107-113.
11. Davies TF, Amino N. 1993. A neu classification for human autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 3:332.
12. Choi YM et al. 2014. Low levels of serum vitamin D3 are associated with autoimmune thyroid disease in pre-menopausal women. *Thyroid* 24 (4): 655-660.
13. Guclu F et al. 2009. Down-regulation of the auto-aggressive processes in patients with hypothyroid Hashimoto's thyroiditis following substitutive treatment with L-thyroxine. *Eur Cytokine Netw* 1(20):27-32.
14. Akamizu T, Amino N, De Groot L. 2013. Hashimoto's thyroiditis. www.thyroidmanager.org.
15. Yildirim D et al. 2011. Nodule or Pseudonodules? Differentiation in Hashimoto's Thyroiditis with Sonoelastography. *Journ Intern Med Res* 39: 2360-2368.

16. Lima PCM Neto AM, Tambascia MA, Zantut-Wittmann D; 2013. Risk Factors Associated with Benign and Malignant Thyroid Nodules in Autoimmune Thyroid diseases. *ISRN Endocrinology* 2013.
17. Holm LE, Blomgren H, Lowhagen T; 1985. Cancer Risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *New Engl Journ Med* 312(10):601-604.
18. Kivity et al. 2011. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases. *Cellular & Molecular Immunology* (8): 243-247.
19. Klintschar, M et al. 2001. Evidence of Fetal Microchimerism in Hashimoto's Thyroiditis. *Journ Clin Endocrinol* 86 (6):2494-2498.
20. Ando T, Davies T. 2003. Postpartum autoimmune thyroid disease: the potencial role of fetal microchimerism. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2965–2971.
21. Connolly MK, McCalmont TH. 1998. Fetal DNA and cells in women with systemic sclerosis. *New England Journal of Medicine* 339: 771-772.
22. Welsh K. 1997. Chimerism, the blind man, and the scientist. *Lancet* 351: 1886.
23. Simmonds MJ et al. 2014. Skewed x chromosome inactivation and female preponderance in autoimmune thyroid disease: an association study and meta-analysis. *Journ Clin Endocrinol Metabol* (99): 127-131.
24. Ozcelik T et al. 2006. Evidence from autoimmune thyroiditis of skewed X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *European Journal of Human Genetics* (14): 791–797.
25. Cantorna M, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. 2004. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 80 (suppl): 1717S-1720S.
26. Camurdan OM, Doger E, Bideci A, Celik N, Cinaz P. 2012. Vitamin D status in children with Hashimoto's thyroiditis. *J Pediatr Endocrinol Metab*.25(5-6):467-70.
27. Weetman A, DeGroot L. 2012. Autoimmunity to the thyroid gland. www.thyroidmanager.org
28. Miot F, Dupuy C, Dumont J. 2012. Thyroid Hormone Synthesis and secretion. www.thyroidmanager.org
29. Chiovato L et al. 1994. Simultaneous expression of thyroid peroxidase and human leucocyte antigen-DR by human thyroid cells: modulation by thyrotropin, thyroid-stimulating antibody, and interferon-gamma. *J Clin Endocrinol Metab* 79:653.
30. Padberg S, Heller K, Usadel KH, Schumm-Draeger PM. 2001. One-year prophylactic treatment of euthyroid Hashimoto's thyroiditis patients with levothyroxine: is there a benefit? *Thyroid* 11: 249.
31. Karanikas G et al. 2005. Relation of anti-TPO autoantibody titre and T-lymphocyte cytokine production patterns in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol* 63:191.

32. Quinn FA, Reyes-Mendez MA, Nicholson L, Compean LP, Tavera ML. 2014. Thyroid function and thyroid autoimmunity in apparently healthy pregnant and non-pregnant Mexican women. *Clin Chem Lab Med*- Apr 29.
33. Marazuela M et al. 2006. Regulatory T-cells in human autoimmune thyroid disease. *J clin endocrinol metab* (91): 3639-3646.
34. Nakamura Y et al. 2004. Intrathyroidal CD4+ T lymphocytes express high levels of Fas and CD4+CD8+ macrophages/dendritic cells express Fas ligand in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* (14): 819-824.
35. So M, Macisaac RJ, Grossman M. 2012. Hypothyroidism. *Aust Fam Physician* 41(8):556-62.
36. Yang C, Leung P, Adamopoulos I, Gershwin E. 2013. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2013 Jan 29.
37. C. Effraimidis G, Tjissen J, Wiersinga W. 2012. Alcohol consumption as a risk factor for autoimmune thyroid disease: a prospective study. *Eur Thyroid J* (1):99-104.
38. Zantut-Wittmann DE, Boechat LHB, Pinto GA, Trevisan MAS, Vassallo J. 1999. Autoimmune and non-autoimmune thyroid diseases have different patterns of cellular HLA class II expression. *Sao Paulo Medical Journal* 117 (4): 161-164.
39. Phenekos C et al. 2004. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation* 11 (4): 209-213.
40. Qin Q et al. 2012. The increased but non-predominant expression of Th-17 and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Braz J Med Biol Res* 45(12):1202-8.
41. Bossowski A et al. 2012. Evaluation of CD4+CD161+CD196+ and CD4+IL-17+ Th17 cells in the peripheral blood of young patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves'disease. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 18(3):89-95.
42. Li J, Hong F, Zeng J, Huang G. 2013. *Cellular Immunology* 281: 85-90.
43. Qin Q. et al. 2012. The increased but non-predominant expression of Th17 and Th1 specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves disease. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research* 45:1202-1208.
44. Tsatsoulis A. 2006. The role of stress in the clinical expression of thyroid autoimmunity. *An N Y Acad Sci* 1088:382-95.
45. Orgiazzi J. 2012. Thyroid autoimmunity. *Presse Med* 41 (12 P 2):e611-25.
46. Mansournia N, Mansournia MA, Saeedi S, Dehghan J. 2014. The association between serum 25OHD levels and hypothyroid Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest* (37): 473-476.

47. Specker BL, Valanis B, Hertzberg V, Edwards N, Tsang RC. 1985. Sunshine exposure and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in exclusively breast-fed infants. *J Pediatr.* 107(3):372-6.
48. The Endocrine Society. 2011. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7): 1911-1930.
49. Specker BL, Tsang RC, Hollis BW. 1985. Effect of race and diet on human-milk vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Am J Dis Child.* 139(11):1134-7.
50. Murphy SP, Calloway DH. 1986. Nutrient intakes of women in NHANES II, emphasizing trace minerals, fiber, and phytate. *J Am Diet Assoc.* 86(10):1366-72.
51. Pillai S, Bikle DD, Elias PM. 1988. 1,25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J Biol Chem.* 15;263(11):5390-5.
52. Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK. 1968. 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃. *Biochemistry.* 7(10):3317-22.
53. Fraser DR, Kodicek E. 1970. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature.* 21;228(5273):764-6.
54. Bikle DD. 2011. Vitamin D regulation of immune function. *Vitam Horm* 86:1-21.
55. Fletcher J, Basdeo S, Allen A, Dunne P. 2012. Therapeutic use of vitamin D and its analogues in autoimmunity. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* (6): 22-34.
56. Antico M, Tampoia M, Tozoli R, Bizzaro N. 2012. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmunity Reviews* 12(2012): 127-136.
57. Bozkurt NC et al. 2013. The Association Between Severity of Vitamin D Deficiency and Hashimoto's Thyroiditis. *Endocr Pract.* 21:1-14.
58. Maeda S, Kunii IS, Hayashi L, Lazaretti-Castro M. 2007. The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of medical and biological research* 40(12): 1653-1659.
59. Paula FJA, Rosen CJ. Vitamin D Safety and Requirements. 2012. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523(1):64-72.
60. Saraiva GL et al. 2005. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25-hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of São Paulo (23 degrees 34'S), Brazil. *Osteoporosis International* 16(12): 1649-54.
61. Cabral MA, Borges CN, Maia JMC, Aires CAM, Bandeira F. 2013. Prevalence of vitamin D deficiency during the Summer and its relationship with Sun exposure and skin phototype in elderly men living in the tropics. *Clinical Interventions in Aging* 2013;8 1347-1351.

62. Martini LA, Verly E Jr, Marchioni DM, Fisberg RM. 2013. Prevalence and correlates of calcium and vitamin D status adequacy in adolescents, adults, and elderly from the Health Survey-São Paulo. *Nutrition* 29(6):845-50.
63. Cepagri Unicamp: www.cpa.unicamp.br
64. Agmon-Levin N, Theodor E, Segal RM, Shoenfeld Y. 2013. Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases. *Clinical Rev Allergy Imunol* (45): 256-266.
65. Lamprecht SA, Lipkin M. 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* (3): 601-614.
66. Zhang R, Naughton DP. 2010. Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr J* (9):65.
67. Ramagopalan SV et al. 2013. Hospital admissions for vitamin D related conditions and subsequent immune-mediated disease: record-linkage studies. *BMC Med* (11):171.
68. Proal A, Albert P, Marshall T. 2009. Dysregulation of the Vitamin D Nuclear Receptor May Contribute to the Higher Prevalence of Some Autoimmune Diseases in Women. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 252-259
69. Pani MA et al. 2002. A polymorphism within the vitamin D-binding protein gene is associated with Grave's disease but not with Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87 (6): 2564-2567.
70. Cantorna M. 2010. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc Nutr Soc* 69(3): 286-289.
71. Pani M, Seissler J, Usadel K, Badenhoop K. 2002. Vitamin D receptor genotype is associated with Addison's disease. *Eur J Endocrinol.* 147: 635-640.
72. Schoindre Y et al. 2012. Vitamin D and autoimmunity. First part: Fundamental aspects. *Rev Med Interne*.33(2):80-6.
73. Perricone C, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. 2013. Novel pebbles in the mosaic of autoimmunity. *BMC Medicine* , 11:101
74. Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. 2011. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmun Rev* 10: 599—608.
75. Cantorna M. 2011. Why do T cells express the vitamin D receptor? *Ann N Y Acad Sci* 1217: 77-82.
76. Feng M, Li H, Chen SF, Li WF, Zhang FB. 2012. Polymorphisms in the Vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocrine*. Oct 12.
77. Lacka K, Maciejewski A. 2013. Vitamin D in the etiopathogenesis of autoimmune thyroiditis. *Pol Merkur Lekarski* 34 (203): 281-285.
78. Lin WY, Tsai CH, Chen RH, Lee CC, Tsai FJ. 2006. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in Chinese patients in Taiwan 20(3): 109-112.

79. Disanto G et al. 2012. Month of birth, vitamin D and risk of immune mediated disease: a case control study. *BMC Med* 10:69.
80. Tincani A et al. 2013. Novel aspects of Sjogren's Syndrome in 2012. *BMC Med* 11:93.
81. Bruce D, Yu S, Ooi JH, Cantorna M. 2011. Converging pathways lead to overproduction of IL-17 in the absence of vitamin D signaling. *International Immunology* 23(8):519-528.
82. Fraser WD, Milan AM. 2013. Vitamin D assays: past and present debates, difficulties, and developments. *Calcified Tissue International* 92(2): 118-27.
83. Su Z, Narla SN, Zhu Y. 2014. 25-Hydroxyvitamin D:analysis and clinical application. *Clinica Chimica Acta* 433: 200-5.
84. Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. 2013. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clinical Biochemistry* 46(3): 190-6.
85. Van den Ouweland JM, Vogeser M, Bächer S.2013. Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry *Reviews in endocrine and metabolic disorders* Jun; 14(2):159-84.
86. Yazdanpanah M, Bailey D, Walsh W, Wan B, Adeli K. 2013. Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D3, 25-OH-vitamin D2 and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens. *Clinical Biochemistry* Sep; 46 (13-14):1264-71.

ANEXO I:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa em Seres Humanos

Projeto:

Tireoidite de Hashimoto e Deficiência de Vitamina D: estudo de prevalência e relação com autoimunidade

Responsáveis pela pesquisa : Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

Dra Ilka Mara Borges Botelho

Eu,....., HC n°, anos, portador do RG n°, residente à, n°, Bairro, cidade de, Estado de, telefone....., ou através de....., anos, RG n°, residente à, n°, Bairro, cidade de, Estado, telefone, grau de parentesco, responsável por mim, concordo em participar da realização deste protocolo, observados os itens abaixo.

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA: Segundo estudos recentes pacientes com baixas concentrações de vitamina D no sangue estão mais predispostos a desenvolver doença crônica da tireoide. A relação entre a deficiência de vitamina D e o desenvolvimento da doença tireoideana ainda não está muito bem definida necessitando estudos mais aprofundados sobre o papel da vitamina D como causa ou consequência da doença em questão, bem como a relação entre reposição da mesma no controle da atividade da doença justificando a realização do presente projeto de pesquisa.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS Não haverá alteração na rotina de seguimento ambulatorial nem do tratamento do paciente que participar do estudo. Além dos exames de rotina do nosso ambulatório, será colhida uma amostra de cerca de 15 ml de sangue da veia periférica para dosagem de hormônios e outras substâncias relacionadas à tireoide (T₄L, TSH, anticorpos anti-tireoide (AcTPO, AcTg), anticorpo anti-receptor de TSH (TRAB) e substâncias que refletem o estado de inflamação crônica que pode estar presente na doença tireoideana (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-5). Será realizado também um exame de Ultrassonografia da tireoide para avaliar o tamanho e textura da glândula, além de presença de nódulos na mesma. Os pacientes serão tratados, sendo mantidos o tratamento e o atendimento médico de rotina. Não haverá estoque de material biológico (do sangue colhido) para outro tipo de uso neste estudo ou em outros futuros.

ESCLARECIMENTOS A equipe responsável pela pesquisa estará sempre pronta e preparada para esclarecer quaisquer dúvidas dos pacientes nos assuntos relacionados à pesquisa e ao tratamento, e compromete-se a proporcionar informação atualizada sobre o assunto em estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando da pesquisa.

OBS: Os dados do pesquisador são para dúvidas sobre a pesquisa, e os dados do CEP, são para denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da Pesquisa.

O NÃO CONSENTIMENTO em participar do estudo ou a desistência de participar da pesquisa a qualquer tempo, não irá alterar o atendimento da paciente no ambulatório. Todos os dados referentes ao indivíduo no estudo serão mantidos em sigilo e a identificação do paciente em estudo não será exposta em conclusões ou publicações posteriores.

Telefone da secretaria da Disciplina de Endocrinologia: (019)3521-7775; Telefone da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa: (019)3521-8936. Campinas, de de

.....
RESPONSÁVEL PELO ESTUDO

.....
PACIENTE OU RESPONSÁVEL

ANEXO II:

Protocolo de coleta de dados de PACIENTES com TH

Nome:..... HC:.....
Data de nascimento:..... cor:..... Procedência.....
Gênero:.....
Antecedentes Pessoais.....
Antecedentes Familiares.....

Idade de início do Hipotireoidismo:

Exame físico: FC:.....bpm volume:

Tratamento clínico: droga dose/dia duração:

Exames iniciais (data:...../...../.....): **T3L:**..... **T4L:**..... **TSH:**.....

AcTPO:..... **AcTg:**..... **TRAb:**.....

US Tireóide (data:...../...../.....)

LD:..... volume:

LE:..... volume:

Citologia(data:.....):.....

Exames em tratamento (data:...../...../.....): **T3L:**..... **T4L:**..... **TSH:**.....

IL-2: **IFN- γ :**..... **TNF- α :**.....

IL-4:..... **IL-5:**.....

Exame físico:

ANEXO III:

Protocolo de coleta de dados de indivíduos do GRUPO DE CONTROLE

Nome..... HC.....

Sexo..... Idade..... Etnia..... Peso..... Altura..... IMC.....

Comorbidades.....

1ª Dosagem: data...../...../.....

T4..... T4L TSH.....

ACTPO..... ACTG..... TRAB.....

IL-2: IFN- γ TNF- α

IL-4..... IL-5.....

Observações relevantes

.....
.....
.....

ANEXO IV:

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde
PROJETO DE PESQUISA

Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 62370

Data da Relatoria: 10/07/2012

Versão 2

CAAE: 03330912.3.0000.5404

Área Temática:

Título: Tireoidite de Hashimoto e Deficiência de Vitamina D: estudo de prevalência e relação com autoimunidade

Pesquisador: Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se muito bem redigido, proporcionando ao leitor uma visão clara dos objetivos propostos pela pesquisadora.

Objetivo da Pesquisa:

Este projeto tem por objetivo estudar as alterações de vitamina D em pacientes portadores de Tireoide Crônica Autoimune (Tireoide de Hashimoto) e relação com as citocinas inflamatórias envolvidas no desenvolvimento da doença

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este trabalho não possui riscos previsíveis aos pacientes, porém como a relação entre a deficiência de vitamina D e o desenvolvimento de TH ainda não está muito bem definida, este estudo poderá auxiliar a identificar a vitamina D como causa ou consequência da TH, bem como a relação entre a reposição da vitamina D no controle da doença e o papel das citocinas inflamatórias em cada condição.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa proposta apresenta grande relevância a comunidade científica, podendo auxiliar no tratamento de pacientes com TH

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou todos os termos de apresentação obrigatória redigidos de acordo com as normas exigidas.

Recomendações: Sem recomendações no momento

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Projeto aprovado

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Conforme discussão em reunião do colegiado em 24/07/2012.

CAMPINAS, 28 de Julho de 2012

Assinado por: Carlos Eduardo Steiner