

BEATRIZ CAROLINE JESUS MIRANDA DA SILVA

T₃ CIRCULANTE EM EXCESSO REGULA NEUTRÓFILOS E CÉLULAS
CD138⁺CXCR4⁺ NA MEDULA ÓSSEA E NO BAÇO



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2019

Trabalho realizado no Laboratório de Imunofisiologia, do Instituto Ciências Biomédicas, UFRJ, sob a orientação da Professora Valeria de Mello Coelho.

FICHA CATALOGRÁFICA

Jesus Miranda da Silva, Beatriz Caroline

T₃ circulante em excesso regula neutrófilos e células CD138⁺CXCR4⁺ na medula óssea e no baço / Beatriz Caroline Jesus Miranda da Silva. -- Rio de Janeiro, 2019.

50 f.

Orientadora: Valeria de Mello Coelho.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2019.

Bibliografia: f.44-51.

1. Triiodotironina. 2. Neutrófilos. 3. Plasmócitos. 4. Baço. 5. Medula óssea. I. de Mello Coelho, Valeria, orient. II. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Beatriz Caroline Jesus Miranda da Silva**
 DRE: 116059262

BANCA EXAMINADORA: Prof. Alberto Félix da Nóbrega (Presidente)
 Prof. Hélio dos Santos Dutra
 Prof. Robson Coutinho Silva
 Profa. Alessandra D'Almeida Filardy (Suplente)

Título da Monografia: **"T3 circulante em excesso regula neutrófilos e células
 CD138⁺CXCR4⁺ na medula óssea e no baço"**

Local: **Auditório do PCM, no Instituto de Ciências Biomédicas / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **12 de dezembro de 2019 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2019.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

Prof. Alberto Félix da Nóbrega

Prof. Hélio dos Santos Dutra

Prof. Robson Coutinho Silva

Profa. Alessandra D'Almeida Filardy

Aluno:

Beatriz Caroline Jesus Miranda da Silva

Orientador:

Profa. Valéria de Melo Coelho

Coordenador
de TCC

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho aos meus pais, meus pilares e suportes nessa jornada, sem eles eu não teria chegado aqui. Ademais, dedico este trabalho a minha avó (in memoriam) que estaria orgulhosa da neta.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado força e sabedoria para chegar até este momento.

Aos meus pais, por todo o suporte e carinho ao longo de minha vida. Eu não teria chegado até aqui sem vocês.

À minha orientadora, Profa. Valeria de Mello Coelho, por me guiar na carreira científica e me estimular a melhorar sempre.

Ao Prof. Felipe Leite de Oliveira, pela ajuda na elaboração dos experimentos e na análise dos resultados de citometria de fluxo com células isoladas da medula óssea.

À minha tutora, Profa. Alessandra D'Almeida Filardy, pela inspiração na área de imunologia. Suas aulas eram maravilhosas.

Aos meus professores, por agregarem conhecimento e experiências enriquecedoras.

Ao Lucas, pela cumplicidade e capacidade de me tranquilizar nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos: Anna, Bárbara, Breno, Gabriel, Guilherme, Isaac, Santiago e Vitor. Saibam que vocês são muito importantes para mim.

Aos amigos que fiz ao longo da jornada da graduação: Paulo, Isabella, Dener e Michel. Obrigada pela cumplicidade e boas conversas.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro através do Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Aos membros da banca, Dr. Alberto Félix da Nóbrega, Dr. Hélio dos Santos Dutra, Dr. Robson Coutinho Silva e Dra. Alessandra D'Almeida Filardy.

“Não está na natureza das coisas que o homem realize um descobrimento súbito e inesperado; a ciência avança passo a passo e cada homem depende do trabalho de seus predecessores”. **Ernest Rutherford**

RESUMO

Beatriz Caroline Jesus Miranda da Silva

**T₃ circulante em excesso regula neutrófilos e células CD138⁺CXCR4⁺
na medula óssea e no baço**

Valeria de Mello Coelho

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Palavras-chave: Triiodotironina, sistema imune, medula óssea, baço, neutrófilos e linfócitos B

Triiodotironina (T₃) em excesso é capaz de estimular diferenciação de linfócitos B na medula óssea e no baço, onde é observado um aumento das áreas linfoides. Os mecanismos para diferenciação de linfócitos B no hipertireoidismo não são conhecidos, mas já foi descrito a capacidade de neutrófilos em induzir a ativação e diferenciação de linfócitos B através da produção de citocinas. No presente estudo, objetivamos avaliar os efeitos do excesso de T₃ circulante sobre o perfil de neutrófilos na medula óssea e no baço, assim como sobre a morfologia esplênica, nos sítios de interação entre neutrófilos e linfócitos B e de diferenciação plasmocitária. Para tal, camundongos foram injetados subcutaneamente com T₃ (5µg/10g de peso corporal/dia) ou solução veículo por 14 dias antes da eutanásia no 15º dia após o tratamento. Realizamos análise histológica e histomorfométrica do baço de animais tratados com T₃ para avaliar as áreas de folículo e de zona marginal, as quais correspondem ao sítio de chegadas dos linfócitos B *naive*; e ao sítio de interação entre plasmablastos, linfócitos B, macrófagos e granulócitos, respectivamente. Além disso, realizamos citometria de fluxo para análise de neutrófilos e plasmócitos extraídos da medula óssea e do baço. Nossos dados preliminares mostraram que T₃ em excesso promoveu fusão de folículos no baço de animais fêmeas e machos. Entretanto, o ampliação da área folicular foi mais evidente em camundongos fêmeas que em machos, onde observou-se em alguns uma redução dos folículos e distribuição mais difusa de leucócitos na polpa vermelha. Para análise do perfil da população de neutrófilos, linfócitos B e plasmócitos na medula óssea e no baço dos animais tratados com T₃, avaliamos a imunofenotipagem utilizando a citometria de fluxo. Nossos resultados referentes aos neutrófilos maduros (cKit⁺CD11b⁺Ly6G⁺) mostraram um crescimento de seu número no baço e na medula óssea dos animais tratados com T₃, com tendência a diminuição a expressão de CD11b. Em paralelo, o número de plasmócitos (cKit⁺B220⁻CD138⁺) maduros também aumentou na medula óssea e no baço de animais tratados com T₃. Curiosamente, houve um decréscimo da população de plasmócitos de vida longa (cKit⁺B220⁻CD138⁺CXCR4⁺) nos animais tratados. Em conclusão, T₃ em excesso regula diferenciação de neutrófilos e possivelmente a fisiologia dessas células, o que se correlaciona com a diferenciação plasmocitária.

ABSTRACT**Beatriz Caroline Jesus Miranda da Silva****Circulating triiodothyronine hormone in excess regulates neutrophils and CD138⁺ cells on bone marrow and spleen****Valeria de Mello Coelho**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

TEXTO EM INGLÊS (No máximo 500 palavras e no mínimo 150)

Key-words: Triiodothyronine, immune system, bone marrow, spleen, neutrophils, B lymphocytes

Excess triiodothyronine (T₃) is able to stimulate B lymphocyte differentiation in the bone marrow and spleen, where an increase in lymphoid areas is observed. The mechanisms for B lymphocyte differentiation in hyperthyroidism are not known, but the ability of neutrophils to induce B lymphocyte activation and differentiation through cytokine production has already been described. In the present study, we aimed to evaluate the effects of circulating T₃ excess on bone marrow and spleen neutrophil profile, as well as splenic morphology, on neutrophil and B lymphocyte interaction sites and on plasma cell differentiation. To this end, mice were injected subcutaneously with T₃ (5 µg / 10g body weight / day) or vehicle solution for 14 days before euthanasia on the 15th day after treatment. We performed histological and histomorphometric analysis of the spleen of T₃-treated animals to evaluate follicle and marginal zone areas, which correspond to the naive B lymphocyte arrival site; and to the interaction site between plasmablasts, B lymphocytes, macrophages and granulocytes, respectively. In addition, we performed flow cytometry for analysis of neutrophils and plasma cells extracted from bone marrow and spleen. Our preliminary data showed that excess T₃ promoted fusion of follicles in the spleen of female and male animals. However, the expansion in follicular area was more evident in female than in male mice, where some follicles had a reduction in follicles and a more diffuse distribution of leukocytes in the red pulp. For analysis of the neutrophil, B lymphocyte and plasma cell population profile in the bone marrow and spleen of T₃-treated animals, we evaluated immunophenotyping using flow cytometry. Our results for mature neutrophils (cKit⁺CD11b⁺Ly6G⁺) showed an increase in spleen and bone marrow numbers in T₃-treated animals, with a tendency to decrease CD11b expression. In parallel, the number of mature plasmocytes (cKit⁺B220⁺CD138⁺) also increased in the bone marrow and spleen of T₃-treated animals. Interestingly, there was a decrease in the long-lived plasma cell population (cKit⁺B220⁺CD138⁺CXCR4⁺) in the treated animals. In conclusion, excess T₃ regulates neutrophil differentiation and possibly the physiology of these cells, which correlates with plasma cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição do hipertireoidismo pelo mundo de acordo com sua prevalência.

Figura 2 – Tipos de hipertireoidismo e suas causas.

Figura 3 – Hematopoiese.

Figura 4 – Morfologia esplênica e circulação sanguínea.

Figura 5 – Diferenciação de linfócitos B e fenótipos associados.

Figura 6 – Diferenciação plasmocitária.

Figura 7 – Metodologia da histomorfometria.

Figura 8 – Fotomicrografias do baço de camundongos machos tratados com triiodotironina.

Figura 9 – Fotomicrografias do baço de camundongos machos e fêmeas do grupo controle e tratado com triiodotironina e histomorfometria de áreas linfoides.

Figura 10 – Aumento da celularidade e de neutrófilos na medula óssea de camundongos tratados com triiodotironina.

Figura 11 – Efeito de triiodotironina sobre esplenócitos e neutrófilos.

Figura 12 – Modulação da expressão de CD11b em camundongos tratados com triiodotironina.

Figura 13 – Aumento de população CD138⁺ na medula óssea e no baço de camundongos tratados com T₃.

Figura 14 – População CD138⁺CXCR4⁺ aumenta no baço e diminui na medula óssea de camundongos tratados com T₃.

Figura 15 – Resumos dos resultados obtidos e hipóteses elaboradas.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Prevalência de hipertireoidismo por gênero: estudo populacional.

Tabela 2 – Efeitos do hipertireoidismo e hipotireoidismo em funções comuns do sistema imune.

Tabela 3 – Efeito de triiodotironina sobre o sistema imune inato e adaptativo.

Tabela 4 – Anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

Tabela 5 – Especificações do citômetro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACK – do inglês: *ammonium chloride potassium lysing buffer*.
- ANOVA – do inglês: *analysis of variance*, análise de variância.
- APC – do inglês: *antigen presenting cell*, célula apresentadora de antígeno.
- APC – alocianina.
- APRIL – do inglês: *proliferation-inducing ligand*, ligante de indução de proliferação.
- ASC – do inglês *antibody secreting cells*, células secretoras de anticorpos.
- BAFF – do inglês: *b cell activating factor*, fator de ativação de células B
- BCR – do inglês: *b cell receptor*, receptor de células B
- BSA – do inglês: *bovine serum albumin*, soro de albumina bovino
- CD11b – integrina $\alpha M\beta 2$
- CD138 – proteoglicana transmembrana de heparan-sulfato, membro da família proteoglicana dos sindecanos.
- cKit – CD117, proto-oncogene cKit
- CTH – LD – células: tronco de longa duração
- CTH – CD – células: tronco de curta duração
- CXCR4 – do inglês: *C-X-C chemokine receptor type 4*, receptor de quimioquina C-X-C do tipo 4
- ELISA – do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*, ensaio de imun absorção enzimática
- EUA – Estados Unidos da América
- FSC – do inglês: *forward scatter channel*. canal de dispersão frontal de luz
- FITC – fluoresceína
- G-CSF – do inglês: *granulocyte colony stimulating factor*, fator estimulante de colônia de granulócitos
- IL-10 – interleucina 10
- iNOS – do inglês: *inducible nitric oxide enzyme*, enzima óxido nítrico sintase induzida
- Ly6G – do inglês: *lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*
- MALT – do inglês: *mucosa-associated lymphoid tissue*, tecido linfóide associado a mucosa
- MPO – do inglês: *myeloperoxidase*, mieloperoxidase
- NET – do inglês: *neutrophils extracellular traps*, armadilhas extracelulares de neutrófilos
- NIH – do inglês: *National Institute of Health*, instituto nacional da saúde
- NK – do inglês *Natural Killers*
- PAMPs – do inglês: *pathogen-associated molecule patterns*, padrões moleculares associados a patógenos
- PBS – do inglês: *phosphate buffered saline*, tampão fosfato salino
- PCM – progenitor comum mielóide
- PCL – progenitor comum linfóide
- PE – ficoeritrina
- PerCP – proteína clorofila piridina
- PGM – progenitor de granulócito/macrófago
- PME – progenitor de megacariócito/eritrócito
- ROS – do inglês: *reactive oxygen species*, espécies reativas de oxigênio
- Sca-1 – do inglês: *stem-cell antigen 1*, antígeno 1 de células tronco
- SFB – soro fetal bovino
- SSC – do inglês: *side-scatter channel*, canal de dispersão lateral de luz
- T₃ – triiodotironina

T₄ – tiroxina

TRAb – do inglês: *thyroid hormone receptor antibody*, anticorpo anti-receptor do hormônio estimulador da tireoide

TRH – do inglês: *thyrotropin releasing hormone*, hormônio liberador da tireotrofina

TSH – do inglês: *thyroid stimulating hormone*, hormônio estimulador da tireoide, tireotrofina

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tireoide: função e disfunção.....	1
1.2 Aspectos gerais da hematopoiese na medula óssea.....	3
1.3 O baço.....	5
1.4 Neutrófilos.....	6
1.5 Linfócitos B e diferenciação plasmocitária	7
1.6 Ações de hormônios tireoideanos sobre o sistema imune.....	10
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVOS	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1. Animais.....	14
4.2. Preparação da solução de T ₃ e injeção <i>in vivo</i>	14
4.3. Processamento e coloração histológica.....	14
4.4. Histomorfometria.....	15
4.5. Citometria de fluxo.....	15
4.5.1. Preparação das amostras.....	15
4.5.2. Aquisição e análise pós-aquisição.....	16
4.6. Análise estatística.....	17
5 RESULTADOS.....	18
5.1. Tratamento com triiodotironina promove fusão folicular no baço de camundongos e análise histomorfométrica de áreas esplênicas.....	18
5.2. Distribuição difusa de leucócitos no baço de camundongos machos tratados com T ₃	20
5.3. T ₃ aumenta celularidade esplênica e o número de neutrófilos no baço.....	21
5.4 T ₃ aumenta celularidade e modula granulopoiese na medula óssea.....	22
5.5 A expressão de CD11b parece reduzir em neutrófilos da medula óssea e do baço após tratamento dos animais com T ₃	23
5.5 Aumento de plasmablastos e plasmócitos na medula óssea e no baço de camundongos tratados com T ₃	24
5.6 População CD138 ⁺ CXCR4 ⁺ aumenta no baço e diminui na medula óssea de camundongos tratados com T ₃	26
6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÃO.....	30
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tireoide: função e disfunção

A tireoide, glândula do sistema endócrino localizada na base do pescoço é responsável por produzir os hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), os quais atuam em desenvolvimento, crescimento e metabolismo do organismo (Mullur, Liu e Brent, 2014). O funcionamento da tireoide é regulado via eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Neste contexto, o hipotálamo produz o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) induzindo a hipófise a gerar o hormônio estimulador da tireoide (TSH), o qual estimula a produção dos hormônios T_3 e T_4 pela tireoide (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2016).

Uma das disfunções da tireoide é o hipertireoidismo, condição em que há excesso de produção de hormônios tireoideanos. Esta desordem aflige em torno de 0,1 a 1,3% da população mundial com suficiência de iodo (Garmendia *et al.* 2014) (Figura 1).

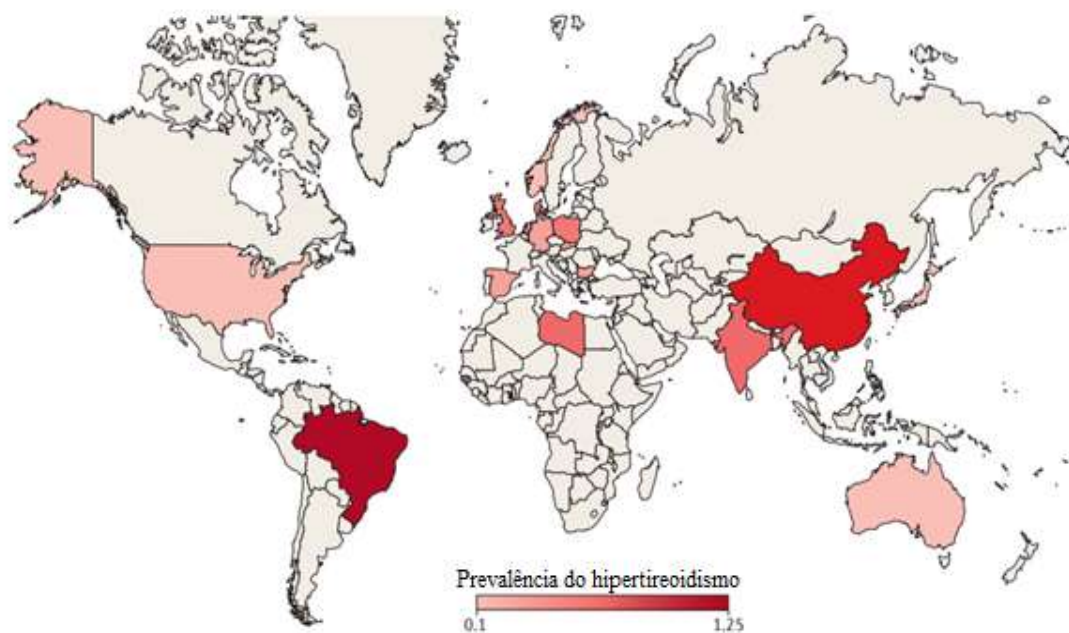


Figura 1 - Distribuição do hipertireoidismo no mundo de acordo com sua prevalência. As regiões em branco no mapa representam ausência de dados obtidos. As regiões em vermelho escuro apresentam maior presença de hipertireoidismo, onde destaca-se o Brasil. Adaptado a partir de Taylor *et al.*, 2018

Alguns fatores associados à predisposição ao hipertireoidismo são: ser do sexo feminino (McLeod e Cooper, 2012), idoso (Bagchi, Brown e Parish, 1990) ou fumante (Wiersinga, 2013) e ingerir iodo em excesso (Manji *et al.*, 2006; Leung e Braverman, 2014). As estatísticas no Brasil mostram a variação da prevalência de acordo com gênero e idade (Tabela 1). Na faixa etária entre 35 a 74 anos, o percentual de hipertireoidismo subclínico, o qual se caracteriza por níveis normais de T_3 e T_4 e reduzidos de TSH, o total foi de 1,3%, sendo mais presente em mulheres, onde o percentual foi de 0,8% (Benseñor

et al., 2011). Já o percentual de pacientes com hipertireoidismo evidente, o qual se caracteriza por níveis aumentados de T₃ e T₄ e reduzidos de TSH, observou-se um percentual de 0,3% e 0,4% para homens e mulheres, respectivamente. Em outro estudo realizado com pacientes acima de 65 anos, encontrou-se um percentual de hipertireoidismo subclínico de 2,4% no total, sendo 2,8% em mulheres e 1,9% em homens (Olmos *et al.*, 2015) (Tabela 1). O percentual de idosos acima de 65 anos com hipertireoidismo evidente foi de 0,7% neste estudo.

Tabela 1. Prevalência de hipertireoidismo por gênero: estudo populacional

ELSA-Brasil (2015): 14,590 men and women 35–74 years from 6 capitals in Brazil ²	Homem (%)	Mulher (%)	Total (%)
Hipertireoidismo subclínico	0,5	0,8	1,3
Hipertireoidismo evidente	0,3	0,4	0,7
Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH) (2013): 1373 men and women ≥ 65 years from poor area of São Paulo¹	Homem (%)	Mulher (%)	Total (%)
Hipertireoidismo subclínico	1,9	2,8	4,7
Hipertireoidismo evidente	0,4	0,8	1,2

¹R.D. Olmos *et al.* Gender, race and socioeconomic influence on diagnosis and treatment of thyroid disorders in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). Brazilian Journal of Medical and Biological Research. vol.48 no.8 Ribeirão Preto Agosto. 2015.² Benseñor I.M *et al.* Prevalence of thyroid disorders among older people: results from the *São Paulo Ageing & Health Study*. Cad. Saúde Pública vol.27 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2011.

O hipertireoidismo pode ser subdividido de acordo com suas causas (Figura. 2), a principal sendo a doença de Graves — uma condição autoimune responsável por estimular a produção de anticorpo anti-receptor do hormônio estimulador da tireoide (TRAb) (TSH) (Weetman, 2003). A presença de nódulos ou tumores na tireoide podem levar ao elevação da produção de hormônios tireoideanos (De Leo, Lee e Braverman, 2016). Além disso, o iodo é parte da composição dos hormônios tireoideanos e o desnível em sua concentração sérica pode estimular a produção hormonal pelos folículos tireoideanos (Leung e Braverman, 2014).

O hipertireoidismo fictício é condição onde os níveis de hormônios circulantes encontram-se aumentados sem alterações morfológicas ou funcionais aparentes (Pearce, 2006). Este resultado pode ser devido a ingestão de hormônios tireoideanos para tratamento do hipotireoidismo ou para emagrecimento (De Leo, Lee e Braverman, 2016). Além disso, o tratamento da arritmia cardíaca com a droga amiodarona, a qual é estruturalmente semelhante a tiroxina e promove aumento de T₄ circulante por inibir a atividade enzimática da conversão para T₃ (Loh, 2000).

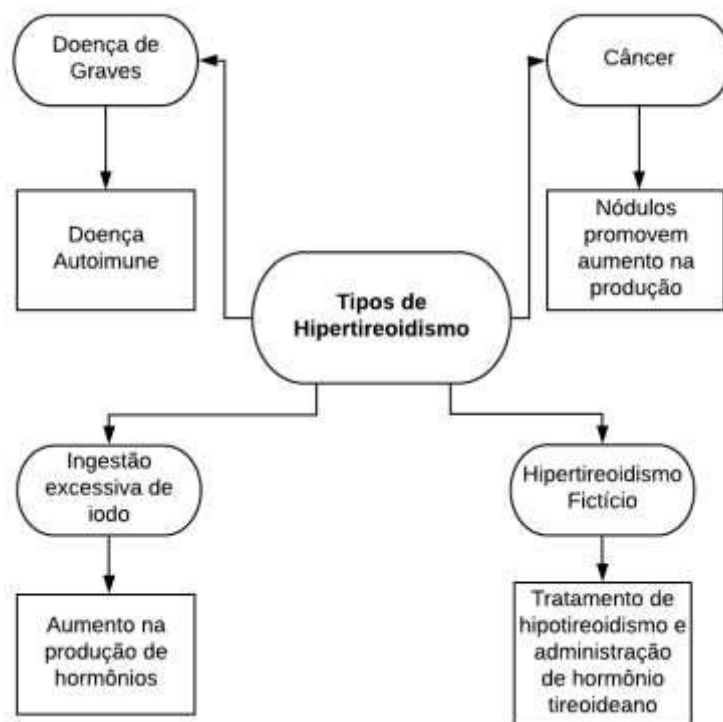


Figura 2 - Tipos de hipertireoidismo e suas causas. O hipertireoidismo possui algumas causas conhecidas como: a Doença de Graves, onde há produção de anticorpos anti-receptor de TSH; alterações funcionais causadas por nódulos (tumores ou câncer); ingestão excessiva de iodo que faz parte da composição dos hormônios; e o hipertireoidismo fictício, que não altera a atividade funcional da glândula mas promove aumento dos níveis circulantes de hormônios tireoideanos por administração hormonal.

1.2. Aspectos gerais da hematopoiese na medula óssea

A geração de células do sistema linfo-hematopoiético ocorre na medula óssea, onde se diferenciam a partir de células tronco, processo este denominado hematopoiese (Orkin e Zon, 2008) (Figura 3).

A medula óssea, localizada no interior de ossos longos, é constituída pelo parênquima, responsável pela hematopoiese, e o estroma, responsável pela sustentação e manutenção das células-tronco e progenitoras hematopoéticas que se auto-renovam (Dzierzak e Speck, 2008). No parênquima, próximo ao endóstio, as células-tronco multipotentes quiescentes (CTH-LD) são as responsáveis pela geração das diferentes linhagens de células sanguíneas listadas na Figura 3 (Fliedner *et al.*, 2012). O estroma contém células tronco multipotentes não-hematopoéticas capazes de gerar células como osteoblasto, adipócitos, células reticulares e endoteliais (Zhao *et al.*, 2012).

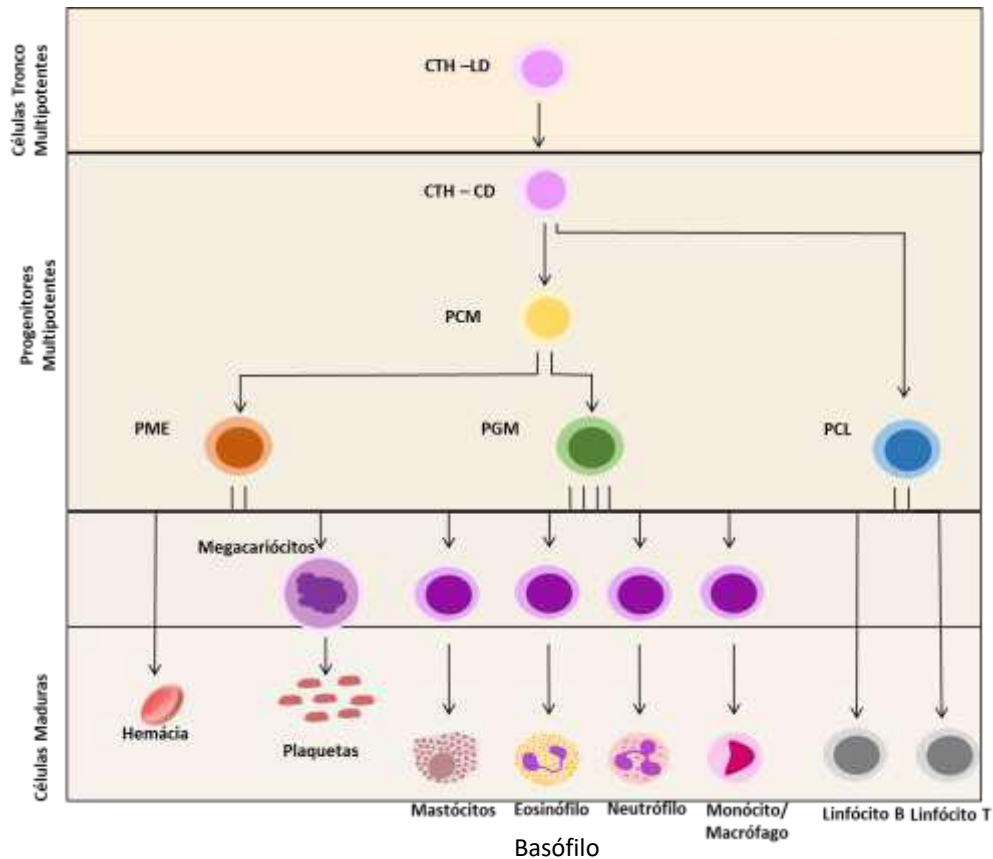


Figura 3 – Hematopoiese. CTH – LD: células tronco de longa duração. CTH – CD: células tronco de curta duração. PCM: progenitor comum mieloide. PCL: progenitor comum linfoide. PME: progenitor megacariócito/eritrócito. PGM: progenitor granulócito/macrófago. Adaptada a partir de Orkin e Zon, 2008.

As células-tronco de longa duração (CTH-LD) são mais indiferenciadas que as células-tronco de curta duração (CTH-CD), as quais tem uma capacidade de auto-renovação limitada (Wilson *et al.*, 2008; Fuchs e Chen, 2013). Tais células dão origem aos progenitores comuns mieloide (PCM) e linfoide (PCL). A partir dos PCM ocorre a diferenciação dos progenitores de megacariócitos e eritrócitos (PME) e progenitores de granulócitos e monócitos (PGM) que vão se diferenciar em basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e macrófagos. A partir dos PCL ocorre a diferenciação dos progenitores de linfócitos B e T (Orkin e Zon, 2008). Enquanto, os linfócitos B se diferenciam na medula óssea, os progenitores de linfócitos T oriundos da medula óssea migram para o timo, onde terminam o processo de seleção e diferenciação em células T maduras capazes de distinguir o próprio do não próprio (Mostardinha e Vistulo de Abreu, 2012; Furusawa e Yamaguchi, 2016). Após a diferenciação na medula óssea e no timo, células maduras caem na corrente sanguínea e migram para os órgãos linfoides secundários, sítios onde ocorre a resposta imune (Thompson, 2012).

A regulação do processo de diferenciação de células-tronco no nicho hematopoiético ocorre em resposta a fatores solúveis, como fatores de crescimento, hormônios, citocinas e quimiocinas; e ao contato célula-matriz extracelular ou célula-célula, através dos receptores de membrana (Anthony e Link, 2014). Os progenitores e precursores variam a expressão de algumas moléculas conforme ocorre a especialização e diferenciação celular. Um desses marcadores é cKit, um receptor de tirosina quinase codificado pelo protooncogene de mesmo nome, cuja função está relacionada à manutenção de progenitores hematopoiéticos e controle da diferenciação (Ogawa *et al.*, 1991).

1.3. O baço

O baço é um órgão capsulado localizado próximo ao estômago, cujas funções estão ligadas a circulação sanguínea. Sua morfologia distingue-se entre a polpa vermelha, marcada pela forte presença de eritrócitos, e a polpa branca apresenta células do sistema imune, principalmente linfócitos (Cesta, 2014). No baço, ocorre a eliminação de eritrócitos antigos ou danificados e nele estão presentes linfócitos T e B em sítios específicos (Mebius e Kraal, 2005). Tais células chegam ao baço através de artérias aferentes que se ramificam em vasos de menor calibre como as arteríolas centrais. Ao redor dessa arteríola se forma uma área denominada de bainha periarteriolar, rica em linfócitos T. Na porção final da ramificação se forma a área rica em linfócitos B denominada folículo (Figuras 4A e 4B). Ao redor do folículo se encontra a zona marginal contendo macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e plasmócitos (Figura 4C). O sangue retorna através dos seios venosos presentes na polpa vermelha e os vasos aumentam de calibre até a veia coletora (Steiniger, Bette e Schwarzbach, 2011).

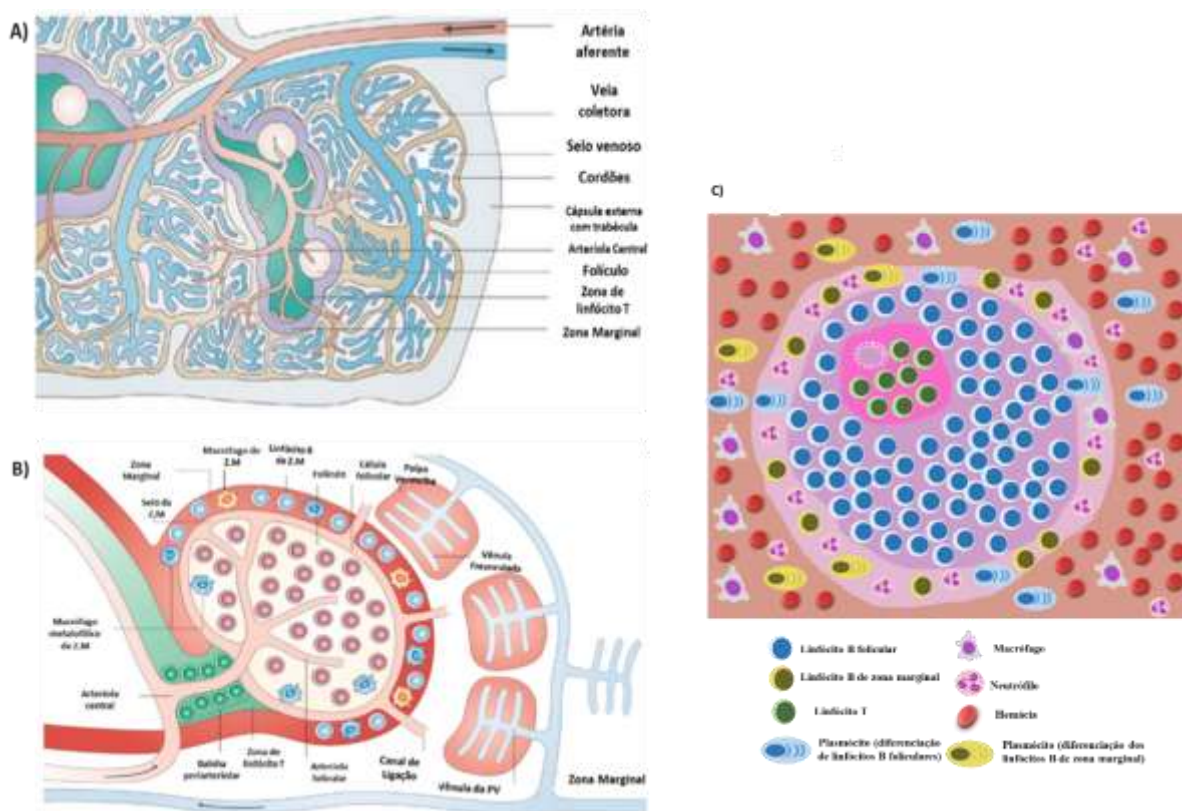


Figura 4 – Morfologia esplênica e circulação sanguínea. **A)** Estrutura morfológica e **B)** Circulação aferente e eferente esplênica (adaptada a partir de Meubius e Kraal 2005 e Cataldi *et al.*, 2017). **C)** Imagem ilustrativa mostrando células mieloides e linfoides no folículo linfóide e na zona marginal e a polpa vermelha.

A organização da área de polpa branca do baço e o posicionamento de linfócitos são mantidos com auxílio de quimiocinas, como CXCL13 que atrai linfócitos B CXCR5⁺ para o folículo (Ansel *et al.*, 2000); e CCL21 e CCL19 que atraem linfócitos T CCR7⁺ para a bainha periaarteriolar (Gunn *et al.*, 1999). Já na zona marginal e na polpa vermelha, a localização de linfócitos B é mantida através da alta expressão de esfingosina 1-fosfato (S1P) (Arnon e Syster, 2014) e seus respectivos receptores nos linfócitos B, esfingosina 1-fosfato (S1PR1) e 3-fosfato (S1PR3). Dessa forma, os linfócitos B sofrem menor influência da quimiocina CXCL13 (Cinnamon *et al.*, 2004). Ademais, linfócitos B de zona marginal conseguem circular através da corrente sanguínea pela alta presença de S1P (Pappu *et al.*, 2007).

1.4. Neutrófilos

Oriundos de precursores granulocíticos da medula óssea, os neutrófilos são células do sistema imune inato com capacidade de serem os primeiros a chegarem da circulação a um sítio de inflamação e responderem, mas apresentam um tempo de meia vida curto sendo eliminados

após a resposta (Anderson, 2001). Essas células polimorfonucleadas, assim chamadas pelo formato de seus núcleos quando maduras, são produzidas na medula óssea diariamente em grandes quantidades, aproximadamente 10^{11} células. A maior parte dessas células permanece em seu sítio de origem até serem estimuladas a migrar conforme necessidade (Dancey *et al.* 1976, Furze e Rakin, 2008). A regulação da produção desses granulócitos ocorre mediante a apoptose dessas células na periferia e na medula óssea. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz a formação de um ambiente anti-inflamatório com redução da expressão de IL-23 e IL-17, o que leva a diminuição da sua produção (Stark *et al.*, 2005).

Para se manterem na medula óssea, os neutrófilos possuem alta expressão de CXCR4. Quando saem do órgão, tais células recebem sinalização para diminuir a expressão de CXCR4 e aumentar a expressão de CXCR2 e de moléculas adesão tais como CD11b (Eash *et al.*, 2010; Mazor *et al.*, 2008). Outro marcador associado a neutrófilos é o Ly6G do clone 1A8 (Daley *et al.*, 2008; Bruhn *et al.*, 2016).

As funções clássicas dos neutrófilos incluem a eliminação de patógenos através da fagocitose e a liberação de grânulos e formação de redes extracelulares de neutrófilos (NET). Contudo, já foi demonstrada a existência de grupos heterogêneos de neutrófilos com atuações variadas (Rosales, 2018). Como por exemplo, a participação de um tipo específicos desses granulócitos na ativação, sobrevivência e diferenciação de linfócitos B de zona marginal juntamente com uma diversificação do repertório de anticorpos (Puga *et al.*, 2011).

1.5. Linfócitos B e diferenciação plasmocitária

Os linfócitos B têm origem a partir de um progenitor comum linfoide comprometido com a linhagem linfocitária que passar a expressar a molécula B220 (Ogawa, ten Boekel e Melchers, 2000). O processo de diferenciação de linfócitos B é guiado pela montagem de estrutura responsável por reconhecer antígenos em linfócitos B, o receptor de linfócitos B (BCR), formado por uma cadeia leve e uma cadeia pesada de imunoglobulina (Hardy e Hayakawa, 2001).

Antes de migrarem para a periferia, as células B são testadas quanto à funcionalidade e intensidade de reatividade de seu BCR, por seleção positiva e seleção negativa respectivamente. A seleção positiva serve para garantir a sobrevivência e proliferação de linfócitos B com BCR funcionais, ou seja, com capacidade de ligar aos antígenos específicos (Pillai 1999; Monroe *et al.*, 2003). Já na seleção negativa, é realizada um balanço na avidéz de interação com antígenos próprios. Alta avidéz induz anergia ou morte celular (Harley *et al.*, 1993), enquanto uma baixa

interação leva a uma baixa sobrevivência (Goodnow *et al.*, 1988), sendo este um mecanismo de tolerância central (Gradien *et al.*, 1994; King *et al.*, 1998). Uma vez finalizadas as etapas de checagem, os linfócitos B são liberados para migrarem em direção aos órgãos periféricos incluindo linfonodo e baço, no qual também ocorre seleção negativa (Hartley *et al.*, 1993).

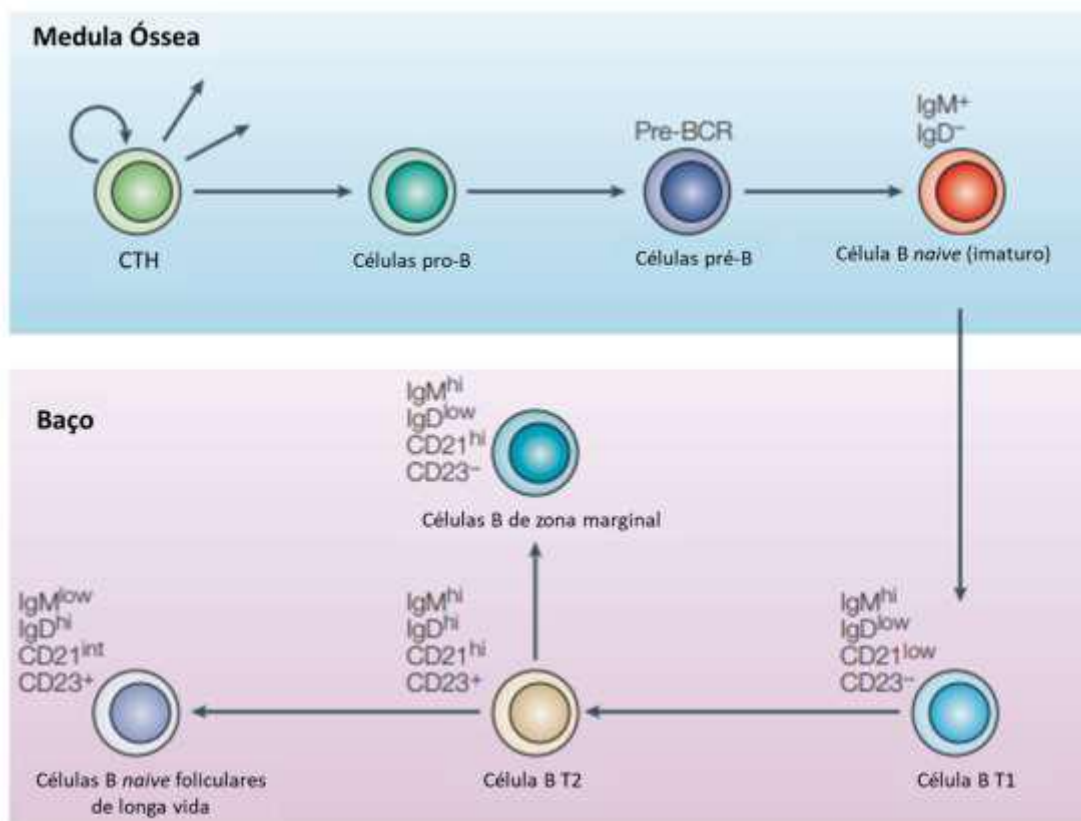


Figura 5 – Desenvolvimento de linfócitos B e fenótipos associados. CTH: célula tronco hematopoiética. Adaptador a partir de Shapiro-Shelef e Calame, 2005.

No baço, o linfócito B chega como célula de transição (T1) (CD23⁻CD21^{lo} IgD^{lo}) e ao aumentar a expressão de IgD, CD21 e CD23 adquire o fenótipo de célula de transição 2 (T2) (Figura 5) (Shapiro-Shelef e Calame, 2005). Neste estágio, a célula pode se tornar um linfócito B folicular comprometido com respostas T dependentes, ou um linfócito B de zona marginal comprometido com resposta T independente. (Pillai e Cariappa, 2009). Os linfócitos B quando ativados sofrem expansão clonal e diferenciam para plasmablasto e plasmócitos (Montecino-Rodriguez e Dorshkind, 2012).

Além da população de linfócitos B convencionais (também conhecida como B2), existe a população B1, oriunda do fígado fetal. Estas células se localizam principalmente nas cavidades pleurais e peritoneal e produzem anticorpos naturais ligados e IgA (Allman e Pillai, 2008; Baumgarth, 2011; Montecino-Rodriguez e Dorshkind, 2012).

Os linfócitos B de zona marginal, pela sua localização são capazes de responder a antígenos vindos do sangue mediante ativação T-independente com co-estimulação através de receptores de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) como os receptores do tipo Toll (Lopes-Carvalho e Kearney, 2004; Genestier *et al.*, 2007). Os plasmócitos gerados neste tipo de resposta costumam ser de vida curta, entrando em apoptose após realizar a sua função por falta de recebimento de estímulos para a sobrevivência (Nossal e Makela, 1962).

Já os linfócitos B foliculares são dependentes da ativação de linfócitos T e estímulo para a formação de centro germinativo na área folicular (Nutt e Tarlinton, 2011; Shlomchik e Weisel, 2012). Nesta área, ocorre a expansão clonal e a hipermutação somática resultando em maior especificidade da imunoglobulina e, posteriormente, a troca da classe desse anticorpo ou *class-switching* (Liu *et al.*, 1996). Neste ponto, podem ser geradas células B de memória, as quais podem se diferenciar em plasmócitos em uma resposta imune secundária (Tangye *et al.*, 2003), ou plasmócitos de longa vida (Phan *et al.*, 2006) (Figura 6).

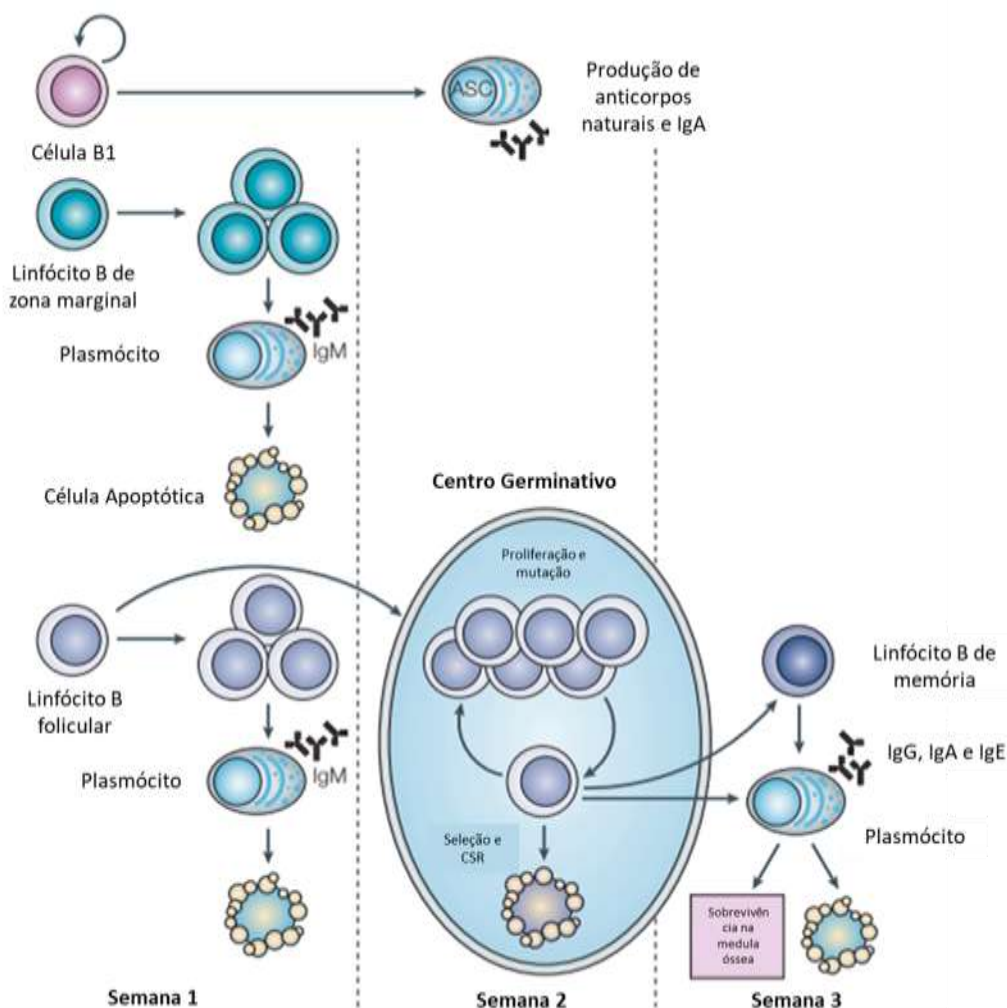


Figura 6 – Diferenciação plasmocitária. ASC: do inglês *antibody secreting cells*. CSR: do inglês *class-switching recombination*. Adaptador a partir de Shapiro-Shelef e Calame, 2005.

Os plasmócitos de longa vida são encarregados de promoverem uma resposta humoral a longo prazo, uma vez que migram para sítios de sobrevivência tais como a medula óssea. Para conseguirem realizar este retorno e retenção na medula óssea, os plasmablastos passam a expressar CXCR4 para chegar aos nichos de sobrevivência medulares se diferenciam na sua forma final efetora e ali permanecem produzem anticorpos e recebendo constante estímulos moleculares de citocinas para manutenção de sua longevidade. (Manz *et al.*, 1998; Tokoyoda *et al.* 2010). O nicho de sobrevivência de plasmócitos é um local onde células estromais expressam CXCL12 (Sugiyama *et al.*, 2006), uma quimiocina para endereçamento à medula ligante de CXCR4, e citocinas tais como o fator de ativação de linfócitos B (BAFF) e ligante indutor de proliferação (APRIL) atuantes na sobrevivência plasmocitária (Benson *et al.*, 2008; Chu e Berek, 2013).

1.6. Ações de hormônios tireoideanos sobre o sistema imune

Os receptores de hormônios tireoideanos estão presentes em praticamente todos os tipos celulares (Ortiga-Carvalho, Sidhaye e Wondisford, 2014). Assim, a desregulação do funcionamento da tireoide, pode alterar a fisiologia de células do sistema imune (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos de hipertireoidismo e hipotireoidismo em funções comuns do sistema imune

Função	Hipertireoidismo	Hipotireoidismo
Produção de anticorpos	↑ ou ↓	↑ ou ↓
Migração/quimiotaxia	↑ ou —	— ou ↓
Marcadores pro-inflamatórios	↓	↑
Proliferação linfocitária	↑	↓
Espécies reativas de oxigênio	↑	— ou ↓
Capacidade antioxidante	↓	↑

Adaptado a partir de De Vito *et al.*, 2011.

Na literatura, há resultados controversos quanto à produção de anticorpos em condição de hipertireoidismo ou hipotireoidismo (De Vito *et al.*, 2011). Em células do sistema

linfopoiético, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram a capacidade de T₃ e T₄ em estimular a eritropoiese, a produção de hemácias (Malgor *et al.*, 1965; Golde *et al.*, 1977; Fandrey *et al.*, 1994). Em testes com células dendríticas imaturas expostas a T₃ *in vitro* mostrou-se aumento de sua maturação em comparação ao grupo controle (Mascanfroni *et al.*, 2008). Um aumento da diferenciação de macrófagos e a polarização dessas células para anti-inflamatório M2 também foi observado no hipertireoidismo (Perrota *et al.*, 2014). Estudos com animais que receberam injeção intratímica de T₃ com fluoresceína mostraram que ocorreu um aumento de recentes emigrantes tímicos para os órgãos linfoides periféricos (Ribeiro Carvalho *et al.*, 2007).

A interação entre os sistema imune, endócrino e imunológico é feita através da produção de moléculas sinalizadores, hormônios e citocinas, assim como através de seus respectivos receptores (Besedovsky e del Rey, 1996). A triiodotironina atua em células do sistema imune inato promovendo aumento de liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de mieloperoxidase em neutrófilos; e de ROS e enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos. T₃ ainda estimula ativação de células dendríticas e apresentação de antígenos a linfócitos T. Já nas células do sistema imune adaptativo, T₃ é descrito como capaz de promover aumento da proliferação de linfócitos T e da proliferação e diferenciação plasmocitária a partir de linfócitos B (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito de triiodotironina sobre o sistema imune inato e adaptativo

Sistema Imune Inato		Sistema imune adaptativo	
Tipo celular	Resultado	Tipo celular	Resultado
Neutrófilos	↑ ROS ¹ , MPO ²	Linfócitos B	↑ Proliferação, ⁸ diferenciação plasmocitária ⁹
Células dendrítica	↑ ³ Maturação, ⁴ ativação ⁵ apresentação	Linfócitos T	↑ Proliferação ¹⁰ , migração ¹¹
Monócitos/macrófagos	↑ ⁶ ROS, ⁷ iNOS		

¹Szabo *et al.*, 1996; ²Fernandez e Videla, 1995; ³Mooij *et al.*, 1994. ⁴Mascanfroni *et al.*, 2008. ⁵Alamino *et al.*, 2015; ⁶Rosa *et al.*, 1995. ⁷Ruytinx *et al.*, 2018. ^{8,10}Balázs *et al.*, 1980. ⁹Bloise *et al.*, 2014. ¹¹Villa-verde *et al.*, 1993.

2. JUSTIFICATIVA

No hipertireoidismo já foi descrito aumento do tamanho do baço (Baldrige e Peterson, 1927) assim como da celularidade de esplenócitos, tendo sido mais evidente em machos que em fêmeas (Bloise *et al.*, 2014). Porém, não se sabe se o excesso de T_3 circulante promove alterações na morfologia esplênica de forma distinta entre machos e fêmeas. Nosso grupo também demonstrou a capacidade de triiodotironina em excesso em induzir aumento da diferenciação plasmocitária (Bloise *et al.*, 2014). Neste caso, o mecanismo responsável pela diferenciação de plasmócitos ainda é desconhecido. Por outro lado, dados da literatura indicam que granulócitos, em particular os neutrófilos, podem regular a diferenciação de linfócitos B. Buscamos compreender como os efeitos de T_3 no sistema imune poderão contribuir para entendimento dos mecanismos de regulação no hipertireoidismo de Graves, onde ocorre produção de auto-anticorpos por linfócitos B que estimulam a produção constante de hormônios tireoideanos (Weetman, 2003). Assim, nesse estudo interessamo-nos por investigar o efeito do excesso de T_3 circulante sobre a diferenciação de neutrófilos e sobre a população de neutrófilos esplênicos buscando estabelecer uma possível correlação com a diferenciação plasmocitária.

..

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Investigar o efeito do excesso de triiodotironina sobre a morfologia esplênica e populações de neutrófilos e plasmócitos na medula óssea e no baço murino.

Objetivos específicos

- Analisar as alterações morfológicas de distintas regiões esplênicas, onde estão localizados os granulócitos, linfócitos B e plasmablastos, em camundongos machos e fêmeas tratados com T₃
- Investigar o efeito do excesso de T₃ circulante sobre a população de neutrófilos e plasmócitos na medula óssea e no baço.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 jovens machos com idade de 5 semanas foram mantidos em gaiolas de propileno contendo maravalha esterilizada e acesso a água e ração *ad libitum* em temperatura e iluminação controlados no Biotério do bloco F2 do Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação/CCS/UFRJ) aprovados sob nº de protocolo A09/19-048-18.

4.2. Preparação da solução de T₃ e injeção *in vivo*

T₃ (cat #T2877 - Sigma 95% HPLC Powder–100MG. Lot. 106K1157V) foi dissolvido em solução de NaOH 1N de acordo com as recomendações do fabricante. A solução foi diluída em um volume final de 5,8mL na concentração de 0,5mg/mL, aliqüotada em microtubos (200µL cada) e armazenada a -20°C.

Os camundongos foram separados em grupos controle e tratados com T₃ (n=4/grupo) e pesados para se calcular o volume necessário de T₃ a ser injetado, em torno de 5µg/10g peso do camundongo em ambiente estéril. O tratamento hormonal consistiu na injeção subcutânea diária de 100µL de solução contendo solução salina de NaCl 0,9% e/ou T₃ durou quatorze dias. No 15º dia os animais foram eutanasiados, baço foi retirado e fêmur fora removido para obtenção da medula óssea a partir de *flushing*.

4.3. Processamento e coloração histológica

Os baços foram coletados e fixados em formalina 4% e permaneceram imersos por 24h. As amostras foram processadas em banhos de quarenta minutos cada com quantidades crescentes de álcool 80%, 90%, 100% para remover a água presente no tecido. Em seguida, o material passou para a etapa de diafanização em dois banhos de xilol. Por fim, na etapa de inclusão as amostras foram submergidas em parafina líquida a 60°C e resfriados posteriormente no congelador a -20°C. Os cortes foram realizados nos micrótomos (Leica RM2125 RTS; SLEE CUT 5062), uma média de 3 a 5 cortes por bloco de parafina, com espessura de 5µm e colocados em banho-maria a 48°C antes de serem aderidos às lâminas de vidro. As lâminas ao estarem secas foram colocadas a 60°C para derreter a parafina. As etapas seguintes foram: desparafinização com xileno; reidratação com concentrações decrescentes de álcool (100%, 95%, 70%) e água; coloração com hematoxilina e eosina; desidratação com concentração

crescentes de álcool (95%,100%,100%), clarificação em três banhos de xileno. A montagem final foi feita com Entellan e aplicação de lamínula. As fotomicrografias foram capturadas em um microscópio invertido Olympus IX71 (Olympus, EUA) nas objetivas de 4x,10x,40x e 100x.

4.5. Histomorfometria

Dez folículos esplênicos íntegros foram selecionados aleatoriamente dentro de quadrados de 1mm^2 por corte de cada animal (Figura 7A). As delimitações foram feitas utilizando um halo interno (folículo) e um halo externo (polpa branca) com a área de zona marginal sendo obtida a partir da subtração entre o halo externo e o interno. Uma linha foi tracejada na escala de 1mm para atribuição de valores reais ao programa. A delimitação da polpa branca, folículos e zona marginal e o cálculo foram feitos com auxílio do programa ImageJ (NIH, EUA).

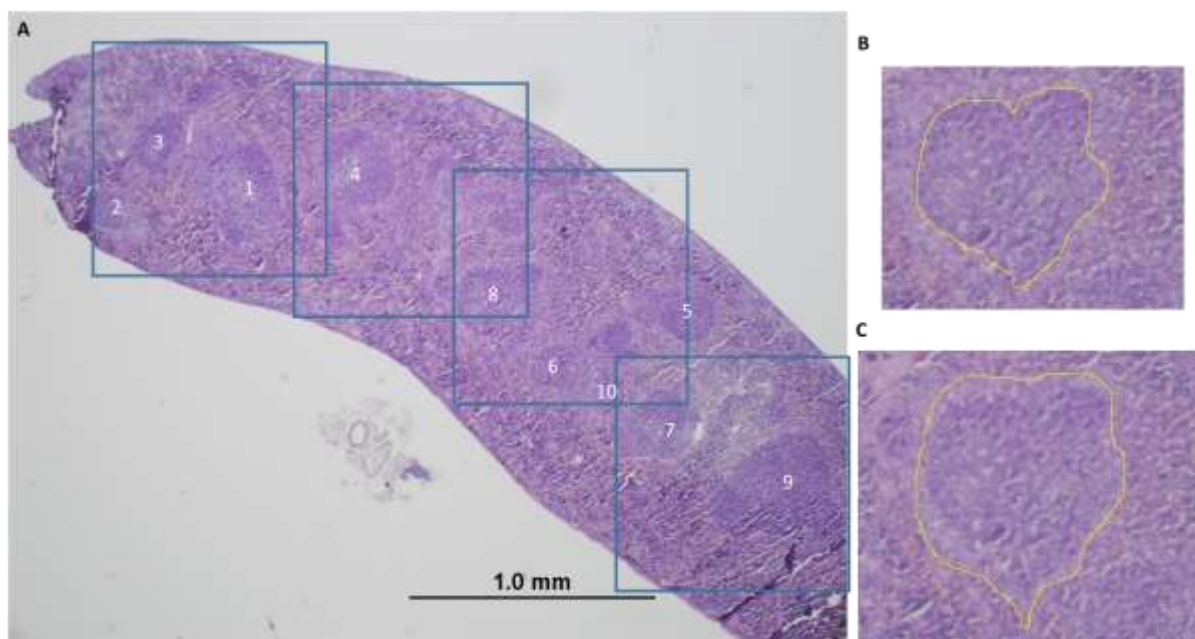


Figura 7 – Metodologia da histomorfometria. Baço de camundongo tratado com triiodotironina. **A)** Em azul, áreas de 1mm^2 contendo folículos selecionados. Aumento de 40x. **B)** em amarelo, marcação envolvendo o folículo e **C)** em amarelo, marcação de limitando a polpa branca (folículo+zona marginal). Imagens ampliadas de mesmo aumento.

4.3. Citometria de Fluxo

4.3.1. Preparação das amostras

O baço foi macerado em solução PBS+SFB 1%. As células foram centrifugadas e ressuspensas em solução de ACK afim de remover as hemácias presentes, com posterior

remoção do ACK. A medula óssea foi removida através da técnica de flushing do fêmur com auxílio de agulha e seringa. A celularidade dos órgãos foi obtida através da contagem em câmara de Neubauer. Um total de 10^6 células suspensas em 20 μ l PBS+SFB 1% a temperatura de 4°C foram colocadas em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, as células foram incubadas por 15 minutos com solução de BSA 0,2% para bloqueio de sítios inespecíficos. A incubação por 30 minutos a 4°C foi feita com os anticorpos primários listados na Tabela 4.

Tabela 4 –Anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Concentração	Diluição	Fabricante
Anti-B220	FITC	17-A2	0.5 mg/mL	1:100	BD
Anti-B220	PerCP	RAE3-6B2	0.2 mg/mL	1:100	BD
Anti- CXCR4	APC	L267F12	0.2 mg/mL	1:500	Biolegend
Anti- CXCR4	FITC	2B11	0.5 mg/mL	1:500	BD
Anti-CD11b	FITC	M1/70	0.6 mg/mL	1:500	Biolegend
Anti-CD138	PE	281-2	0.2 mg/mL	1:500	BD
Anti-cKit	APC	ACK2	0.2 mg/mL	1:200	BD
Anti-cKit	PE	ACK2	0.2 mg/mL	1:200	BD
Anti-Ly6G	APC	1A8	0.2 mg/mL	1:500	Biolegend

*todos os anticorpos utilizados são IgG de rato reativas a camundongo.

4.3.2. Aquisição e análise pós-aquisição

As lavagens foram feitas em PBS 1x, para remoção dos anticorpos não ligantes, com subsequente centrifugação a 1400 rpm em temperatura de 4°C. Após a lavagem as células foram ressuspendidas e analisadas no citômetro de fluxo (Tabela 5).

Tabela 5 – Especificações do citômetro

Instrumento: BD FACScalibur				
Laser	Azul(488nm)		Vermelho (635nm)	
Filtros	585/42	530/30	661/16	670
Fluorocromos	PE	FITC	APC	PerCP

Um total de 100000 a 200000 eventos foram adquiridos no citômetro FACScalibur (Becton e Dickison) (Tabela 5). Precusores de neutrófilos foram identificados como cKit⁺CD11b⁺Ly6G⁺. Os neutrófilos foram identificados como cKit⁻CD11b⁺Ly6G⁺ (medula óssea) ou CD11b⁺Ly6G⁺ (baço). Plasmócitos foram identificados como cKit⁻B220⁻CD138⁺

(medula óssea) ou B220⁻CD138⁺ (baço). Plasmablastos foram identificados como cKit⁻B220⁺CD138⁺ (medula óssea) e B220⁺CD138⁺ (baço). Plasmócitos de longa vida foram identificados como cKit⁻B220⁻CD138⁺CXCR4⁺. A análise de dados foi feita com auxílio do programa Kaluza, Beckman Coulter.

4.5. Análise estatística

O teste análise de variância (ANOVA) foi utilizado para avaliar histomorfometria. O teste T não pareado foi empregado para análise dos dados de citometria de fluxo. Os gráficos foram feitos com auxílio do software GraphPad Prism versão 8. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Tratamento com triiodotironina promove fusão folicular no baço de camundongos e análise histomorfométrica de áreas esplênicas

Ao realizarmos a análise histológica do baço de animais tratados com T_3 , observamos que as áreas linfoides esplênicas de camundongos machos e fêmeas se fusionam gerando grandes folículos, efeito não observado no grupo controle (Figura 8A). Ao compararmos o tamanho das áreas linfoides dos camundongos, verificamos que a área de polpa branca teve um tendência de aumento em relação aos animais controles. Este efeito foi mais evidente em fêmeas que em machos tratadas com triiodotironina. A área folicular esplênica também aumentou mais em fêmeas tratadas com triiodotironina em comparação aos machos (Figura 8B). Não houve diferença significativa na área de zona marginal dos animais utilizados. (Figura 8B).

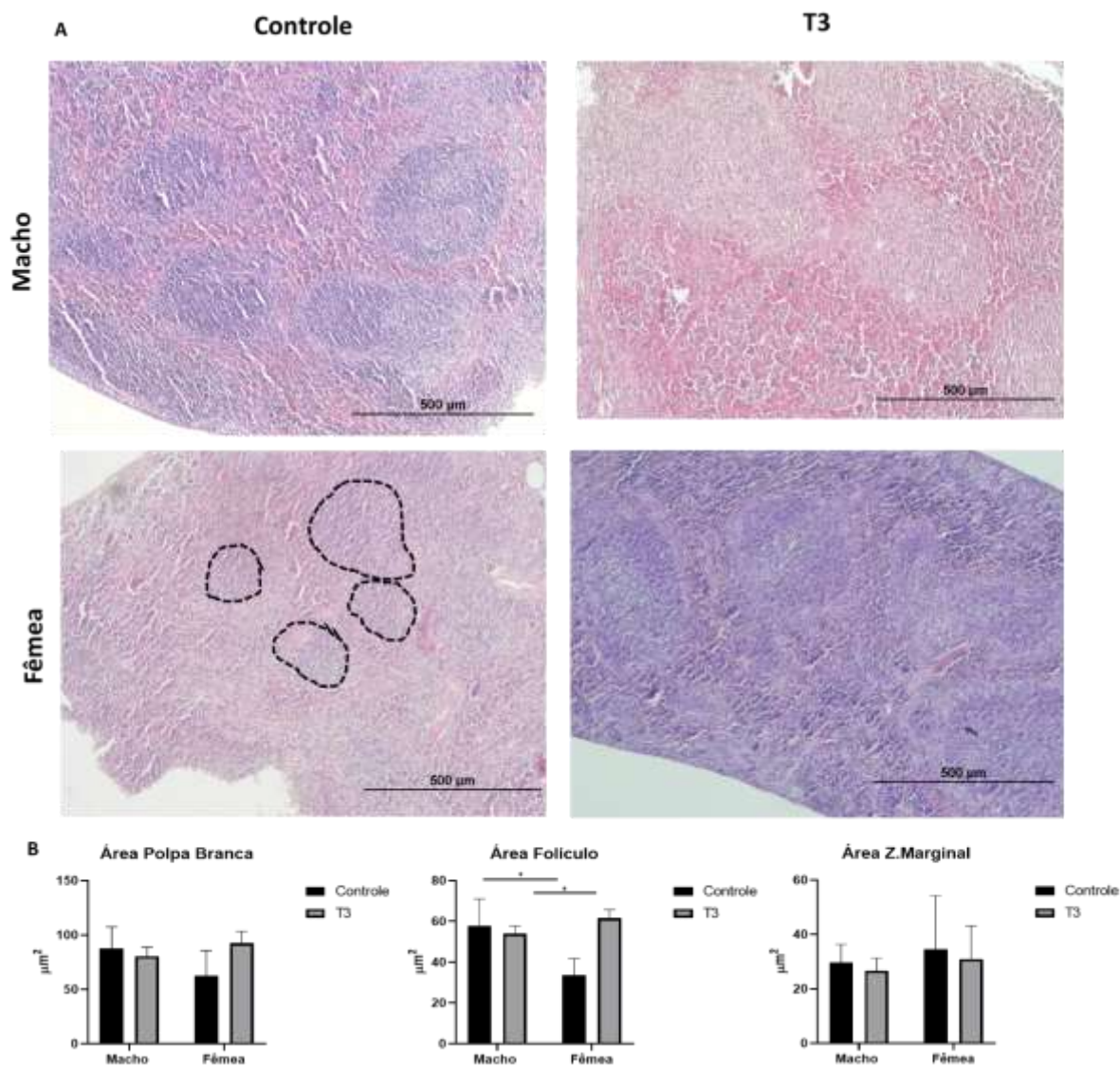


Figura 8. Fotomicrografias do baço de camundongos machos e fêmeas do grupo controle e tratado com triiodotironina e histomorfometria de áreas linfoides. **A)** Baço de animais fêmeas e machos controle e tratado. **B)** Área de polpa branca, folicular e zona marginal. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento de 100x. n=3/grupo. *p<0.05. Preto tracejado: delimitações de áreas de polpa branca.

5.2. Distribuição difusa de leucócitos pela polpa vermelha no baço de camundongos machos tratados com T₃

Animais machos tratados com T₃ apresentaram menos definição da delimitação de áreas de zona marginal e folicular que os animais controles (Figura 9). Verificamos aumento da distribuição difusa de leucócitos na polpa vermelha (Figura 9).

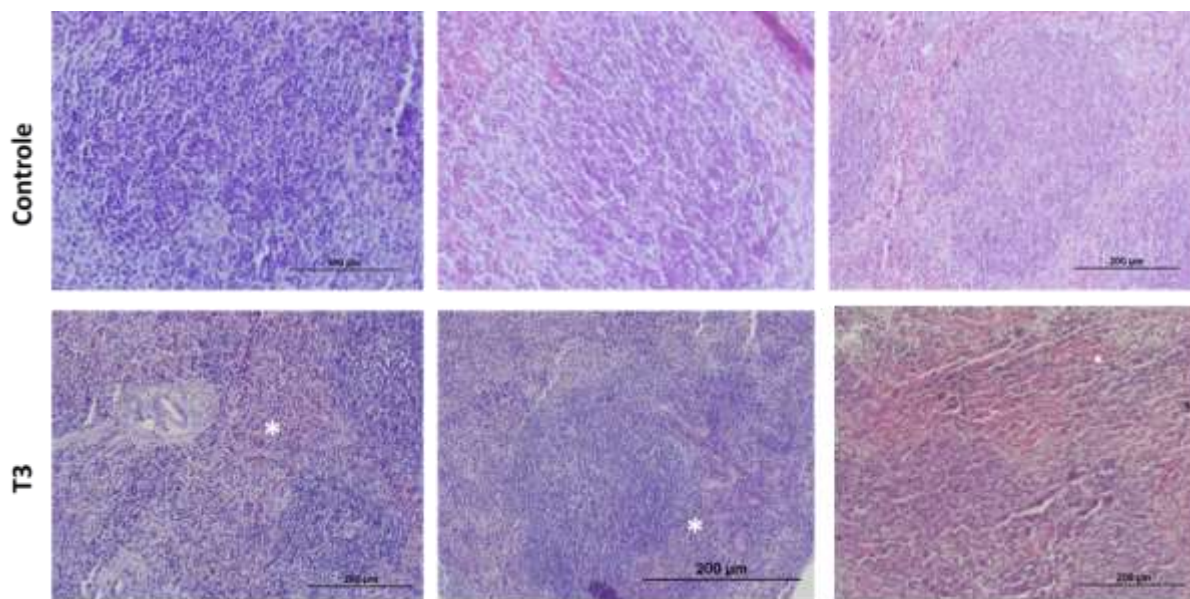


Figura 9 – Fotomicrografias do baço de camundongos machos tratados com triiodotironina. O asterisco branco ressalta áreas da polpa vermelha com presença de leucócitos. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento de 200x. n=3/grupo. Espessura dos cortes: 5μm.

5.3. T₃ aumenta celularidade esplênica e o número de neutrófilos no baço

Avaliamos a população celular do baço por quantificação na câmara de Neubauer e por citometria de fluxo utilizando o marcador Ly6G para identificar a população de neutrófilos (Figura 10). Verificamos que houve uma tendência ao aumento da celularidade total esplênica nos camundongos tratados com T₃ ($37,8 \pm 12,6$; p valor = 0.054) em comparação ao grupo controle ($21 \pm 6,2$) (Figura 10B). Quanto à população total de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺, foi possível observar uma tendência ao aumento do número dessas células no grupo tratado com T₃ (controle: $4,8 \pm 1,15$; T₃: $5,6 \pm 1,7$) (Figura 10C). Quando analisamos a granulosidade na população CD11b⁺Ly6G⁺ esplênica, detectamos tendência a redução do número de neutrófilos mais granulosos (SSC^{hi}) (controle: $0,57 \pm 1,15$; T₃: $0,2 \pm 1,7$) e tendência de aumento dos menos granulosos (SSC^{int}) (controle: $3,96 \pm 1$; T₃: $5,3 \pm 2$) (Figuras 10D e 10E).

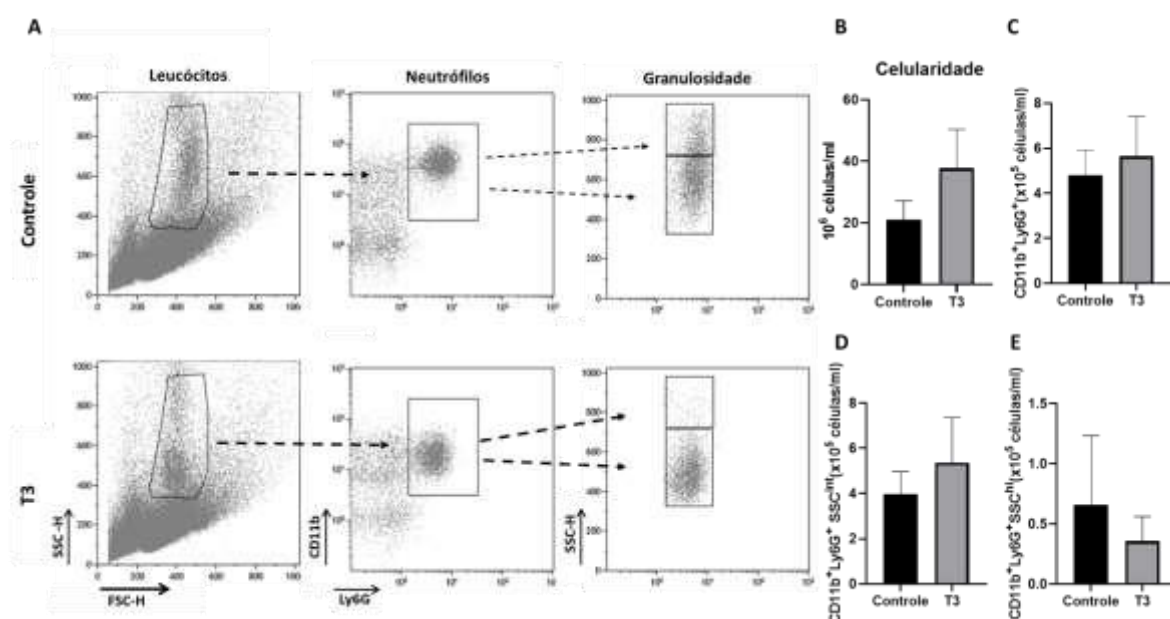


Figura 10 – Efeito de triiodotironina sobre esplenócitos e neutrófilos. **A)** Estratégia de *gate* para análise de neutrófilos. Inicialmente foi feito um *gate* para leucócitos, a partir dele foi feito o *gate* de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺) e por fim foi analisada a granulosidade dessas células por SSC (*side scatter channel*). **B)** Celularidade do baço. **C)** Neutrófilos. **D)** Neutrófilo SSC^{int} e **E)** Neutrófilo SSC^{hi}. n=4/grupo. *p<0.05, **p<0.005.

5.4. T₃ aumenta celularidade e modula granulopoiese na medula óssea

Ao analisarmos a medula óssea, foi possível observar que T₃ promoveu aumento da celularidade total em camundongos tratados com T₃, em comparação ao grupo controle (controle: média $8,7 \pm 2,07$; T₃: $15,4 \pm 1,33$) (Figura 11B). A marcação para identificar neutrófilos e seus precursores de acordo com a expressão de CD11b, Ly6G, FSC e SSC (Figura 11). Não houve diferença significativa no número de precursores de neutrófilos ($cKit^+CD11b^+Ly6G^+$) (controle: $0,6 \pm 0,16$; T₃: $0,54 \pm 0,04$) (Figura 11C) no grupo tratado com T₃ em comparação ao controle (Figura 11C). Porém, o número absoluto de neutrófilos maduros ($cKit^+CD11b^+Ly6G^+$) aumentou significativamente no grupo tratado com T₃ (controle: $2,14 \pm 0,68$; T₃: $3,3 \pm 0,48$) (Figura 11D).

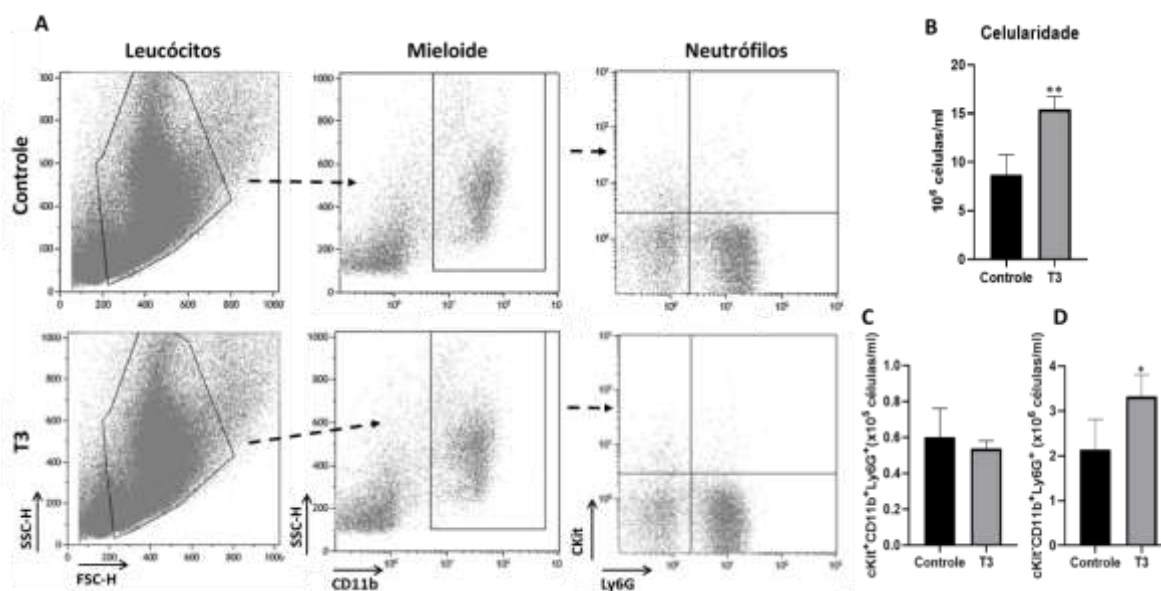


Figura 11 – Aumento da celularidade e de neutrófilos na medula óssea de camundongos tratados com triiodotironina. **A)** Estratégia de demarcação de área para progenitores de neutrófilos e células maduras. Inicialmente a demarcação de área de leucócitos foi definida por SSC (*side-scatter channel*) e FSC (*forward scatter channel*). A seguir definiu-se a área de células mieloides (CD11b⁺). Para distinção entre neutrófilos maduros e seus progenitores realizou-se análise gráfica considerando os marcadores cKit e Ly6G. **B)** Celularidade da medula óssea. **C)** Número de precursores de neutrófilos ($cKit^+CD11b^+Ly6G^+$) e **D)** Neutrófilos maduros ($cKit^+CD11b^+Ly6G^+$). n=4. *p<0.05, **p<0.005.

5.5. A expressão de CD11b parece reduzir em neutrófilo da medula óssea e do baço após tratamento dos animais com T₃.

Ao avaliarmos o efeito de excesso de T₃ circulante sobre a expressão de CD11b por neutrófilos Ly6G⁺, verificamos que houve uma tendência a diminuição de intensidade de fluorescência para CD11b tanto nos progenitores de neutrófilos (controle: 34,8 ±4,6; T₃: 31,1±1,17) quanto nos neutrófilos maduros da medula óssea (controle: 35,2±5,5; T₃: 29,5, ±3,63) como nos esplênicos (controle: 28,9±10; T₃: 20,90±6,15) (Figura 12).

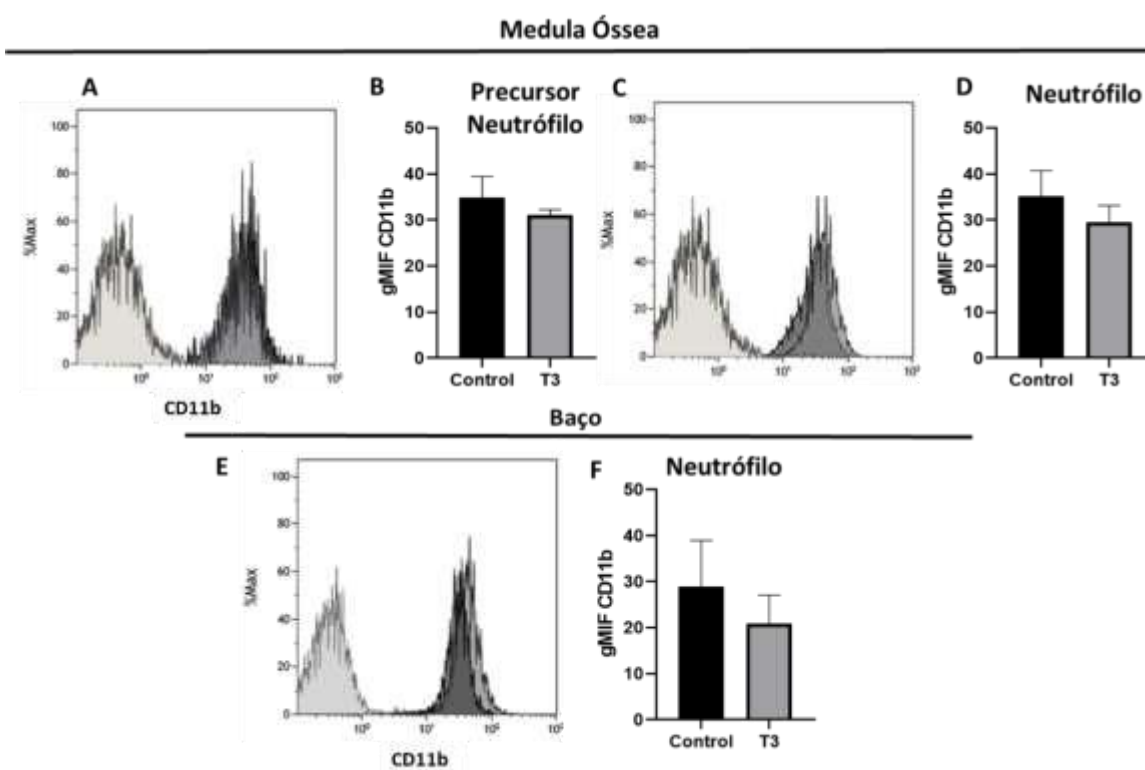


Figura 12 – Modulação da expressão de CD11b em camundongos tratados com triiodotironina. Histogramas representativos da expressão de CD11b e gráficos da média da intensidade de fluorescência geométrica (gMIF) de CD11b em (A, B) precursores de neutrófilos; e em neutrófilos maduros da (C, D) medula óssea e (E, F) do baço. Nos histogramas, cinza claro representa controle negativo, sem anticorpo primário; cinza médio, células do animal injetado com solução veículo tratadas com anticorpo primário; e cinza escuro: animal tratado com T₃ que recebeu anticorpo primário (n=4/grupo).

5.6. Aumento de plasmablastos e plasmócitos na medula óssea e no baço de camundongos tratados com T₃

As análises de citometria de fluxo realizadas tanto na medula óssea como no baço mostram que ambas as populações de plasmablastos (cKit⁻B220⁺CD138⁺) e plasmócitos (cKit⁻B220⁻CD138⁺) aumentaram na medula óssea plasmablastos (controle: $3,86 \pm 1,93$; T₃: $8,215, \pm 2,323$) plasmócitos (controle: $0,71 \pm 0,28$; T₃: $1,41 \pm 0,35$) e no baço (plasmablastos controle: $0,12 \pm 0,051$; T₃: $0,38 \pm 0,17$) plasmócitos (controle $0,4 \pm 0,14$; T₃: $0,84 \pm 0,177$) mediante o tratamento hormonal (Figura 13).

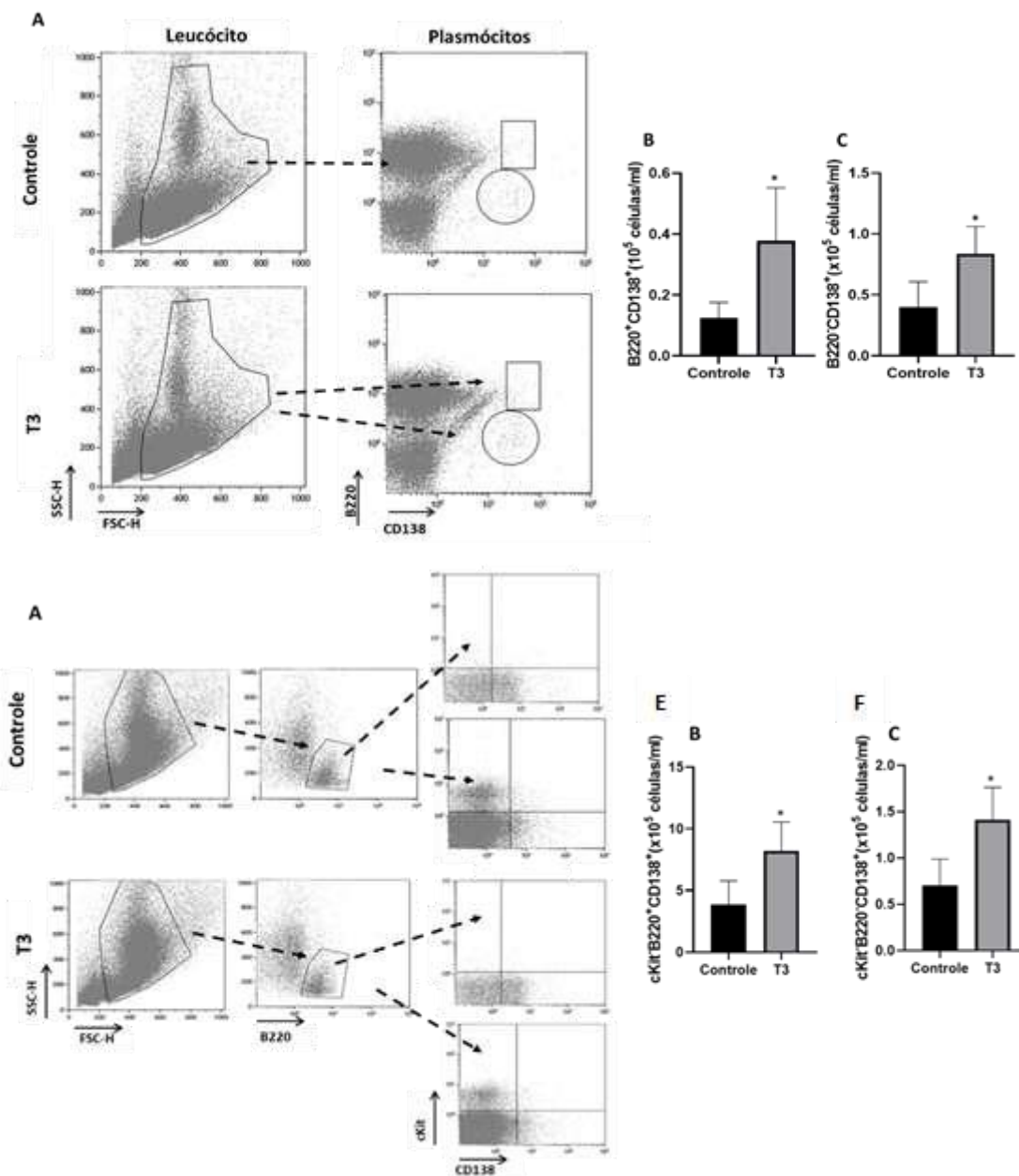


Figura 13 – Aumento do número de células CD138⁺ na medula óssea e no baço de camundongos tratados com T3. Estratégias de gate e identificação das populações de plasmablastos e plasmócitos na medula óssea (**A-C**) e no baço (**D-F**). Inicialmente foi feito um gate de leucócitos e, a partir deste, fez-se a separação de células marcadas ou não para cKit, CD138 e B220. Os plasmablastos foram identificados como cKit⁺B220⁺CD138⁺ (**B, E**) e os plasmócitos como cKit⁺B220⁺CD138⁺. (**C, F**). n=4/grupo.*[∧]p<0.05.

5.7. População $CD138^+CXCR4^+$ diminui na medula óssea e aumenta no baço de camundongos tratados com T_3

Ainda não foi descrito na literatura o efeito de triiodotironina sobre a população de plasmócitos $CXCR4^+$ de vida longa. Ao analisarmos por citometria de fluxo, verificamos que ocorreu um aumento no número de plasmablastos ($B220^+CD138^+CXCR4^+$) (controle: $0,48 \pm 0,29$; T_3 : $0,95 \pm 0,19$) e plasmócitos ($B220^-CD138^+CXCR4^+$) (controle: média $0,02 \pm 0,03$; T_3 : $0,3724 \pm 0,3473$) no baço dos animais tratados com T_3 . Entretanto, na medula óssea a população de plasmócitos $B220^-CD138^+CXCR4^+$ houve uma tendência de redução (controle: $0,42 \pm 0,35$; T_3 : $0,17 \pm 0,14$) após tratamento com o hormônio (Figura 14).

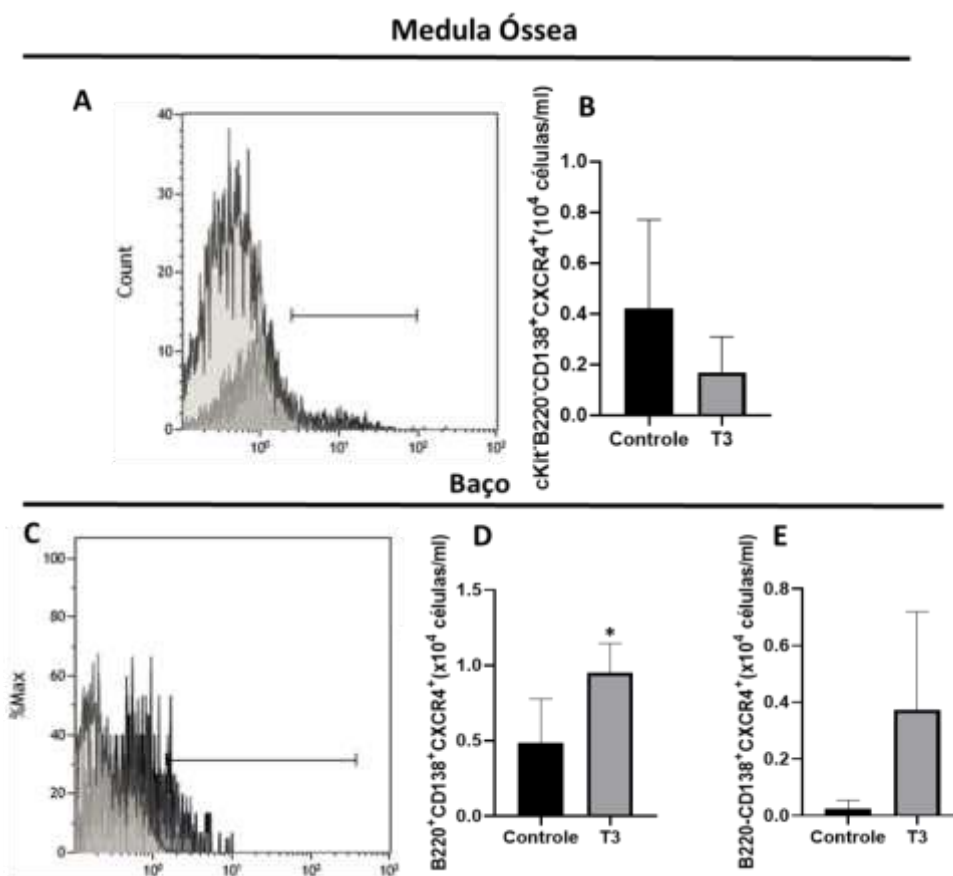


Figura 14 – Plasmablastos e plasmócitos $CXCR4^+$ da medula óssea e do baço são modulados por T_3 . **(A-B)** Histogramas representativos de células $CD138^+$ e gráfico mostrando a média do número de células $ckit^+B220^-CD138^+CXCR4^+$ na medula óssea. **(C, D, E)** Histogramas representativos de células $CD138^+$ e gráfico mostrando a média do número de plasmablastos $B220^+CD138^+CXCR4^+$ e plasmócitos $B220^-CD138^+CXCR4^+$ no baço dos animais. Nos histogramas, cinza claro representa controle negativo, sem anticorpo primário; cinza médio, células do animal injetado com solução veículo tratadas com anticorpo primário; e cinza escuro: animal tratado com T_3 que recebeu anticorpo primário ($n=4$ /grupo)

6. DISCUSSÃO

Inicialmente, investigamos o efeito do excesso de triiodotironina sobre o baço. Verificamos um aumento da celularidade do baço, o que está de acordo com dados prévios da literatura. Inclusive, no hipertireoidismo, já havia sido descrito um aumento do tamanho do baço (Baldrige e Peterson, 1927) e da polpa branca de camundongos tratados com triiodotironina (Bloise *et al.*, 2014). Entretanto, a possível diferença na morfologia esplênica de camundongos machos e fêmeas ainda não tinha sido investigada. No presente estudo foi possível verificar que T_3 em excesso promove alterações distintas na disposição da polpa branca em machos e fêmeas. Em machos, verificamos uma redução da polpa branca que ocorreu devido a uma distribuição difusa de leucócitos que invadiram a polpa vermelha do baço. Desarranjo tecidual afetando a distribuição de células nesse órgão já foram descritas em situações de desequilíbrio provocadas em doenças autoimunes (Goltsev *et al.*, 2018), durante o envelhecimento (Aw *et al.*, 2016) ou por infecções (Hermida *et al.*, 2018).

Apesar da desorganização tecidual, observamos aumento no número de plasmócitos no baço de animais tratados com T_3 . Uma possível explicação para esse dado seria a interação de neutrófilos e linfócitos B descritos por Puga *et al.* (2011) em camundongos eutireoideos. Puga e colaboradores demonstraram a ocorrência de disruptura da microestrutura esplênica em doenças autoimunes (Lupus eritematoso sistêmico) e infecções com a presença de neutrófilos em áreas originalmente de linfócitos. Assim, não podemos descartar a possibilidade de que as citocinas secretadas por neutrófilos, como APRIL, BAFF e IL-6, possam estar atuando para estimular a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos.

Pesquisas sobre a influência dos hormônios tireoideanos em neutrófilos vem desde a década de 70. Nesta época provou-se a existência de sítios nucleares de ligação de T_3 (Woeber, 1977) e a capacidade de deiodinar tanto T_3 quanto T_4 em humanos (Klebanoff e Green, 1973; Woeber, 1978). Mais recentemente, estudos mostraram a expressão de transportadores de hormônios tireoideanos de MT8 (Boelen *et al.*, 2005) em camundongos e MT10 em humanos (van der Spek *et al.*, 2016), e presença de deiodinase do tipo 3, enzima responsável pela inativação dos hormônios (Boelen *et al.*, 2005; van der Spek *et al.*, 2016). Logo neutrófilos podem ser susceptíveis a variação da produção hormonal.

No presente estudo, verificamos ampliação do número de neutrófilos na medula óssea assim como uma tendência ao aumento dessas células no baço, o que está relacionado ao aumento da produção de outros leucócitos em camundongos hipertireoideos, conforme

mostrado na Tabela 3. Curiosamente, foi ainda possível observar uma tendência a diminuição da expressão de CD11b em camundongos machos tratados com triiodotironina. Uma maior expressão de CD11b está associado com a ativação de neutrófilos (Weirich *et al.*, 1998; Siddiqi *et al.*, 2001). Por outro lado, a redução da expressão de CD11b está relacionado à indução de apoptose de neutrófilos (Coxon *et al.*, 1996; Atallah *et al.*, 2012). Neste contexto, vale ressaltar que um sintoma presente em pacientes com Doença de Graves é a neutropenia. As hipóteses para a ocorrência neutropenia variam desde a baixa produção ou retenção de neutrófilos na medula óssea (Ponassi *et al.*, 2015) até o encurtamento do tempo de meia vida dessas células na periferia (Eakin, Peake e Weiss, 1983). Entretanto, quando pacientes com Graves são tratados com drogas tireostáticas, a contagem de neutrófilos é normalizada, fortalecendo que hormônios tireoidianos modulam a fisiologia dessa população granulocítica (Eakin, Peake e Weiss, 1983; Aggarwal *et al.*, 2016). Outra hipótese para a redução do número desses granulócitos surgiu a partir do soro de alguns pacientes que apresentaram anticorpos anti-neutrófilos, essas células poderiam ser alvos da imunidade humoral induzindo redução de sua população (Kyritsi *et al.*, 2015). Conjuntamente com nossos dados, podemos sugerir que a diminuição da expressão de CD11b seria um possível mecanismo responsável pela neutropenia encontrada em indivíduos hipertireoideos.

Neste estudo verificamos também um aumento do número de plasmócitos, tanto na medula óssea quanto no baço dos animais tratados com T₃. Corroborando com nossos dados, já foi descrito o aumento da diferenciação plasmocitária *in vitro* (Paavonen, 1982) e *in vivo* (Bloise *et al.*, 2014,) mediante tratamento com triiodotironina. Além disso, mostramos aqui que o tratamento com T₃ aumentou no baço o número de células CD138⁺CXCR4⁺, as quais correspondem aos plasmócitos de vida longa. Essas células são importantes para manutenção da imunidade humoral e permanecem em sítios de sobrevivência produzindo anticorpos de forma contínua (Manz *et al.*, 1998). Porém, verificamos que houve uma redução da população de células CD138⁺CXCR4⁺ na medula óssea, local a qual deveriam retornar devido a interação de CXCR4 com células CXCL12⁺ no nicho hematopoético de sobrevivência de plasmócitos de vida longa (Brynjolfsson *et al.*, 2018). Uma das hipóteses para explicar esse fenômeno seria considerar que pudesse estar ocorrendo uma redução da produção de CXCL12 pelas células da medula óssea, e outra quimiocina pudesse estar atuando como mecanismo de compensação para promover a migração de plasmócitos de vida longa para os seus sítios de sobrevivência na medula óssea, visto que observamos que o número total de plasmócitos aumenta na medula óssea dos animais tratados com T₃. Isto não deixa de ser um indicativo de que os plasmablastos continuam migrando para a medula óssea.

Outra hipótese seria baseada em dados que demonstram como o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) é capaz de atuar no eixo CXCL12/CXCR4 diminuindo a expressão de CXCR4 em neutrófilos e promovendo a saída e circulação sanguínea (Kim *et al.*, 2006); e reduzindo a liberação de quimiocinas por osteoblastos (Semerad *et al.*, 2005). O G-CSF é responsável por estimular a granulopoiese e o comprometimento com a linhagem mieloide (Lord *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 2013). No hipertireoidismo um estudo mostrou aumento dos níveis séricos de G-CSF em pacientes com Doença de Graves antes e depois do tratamento, e ainda demonstrou ausência de correlação entre os níveis dessa citocina e os níveis hormonais (Iitaka *et al.*, 1998). Todavia, o hormônio utilizado no estudo foi apenas T4. Assim, é possível hipotetizar que G-CSF poderia ser o mecanismo modulador da expressão de CXCL12 em nosso modelo.

As hipóteses geradas a partir das análises dos resultados desse estudo estão apresentadas na figura 15.

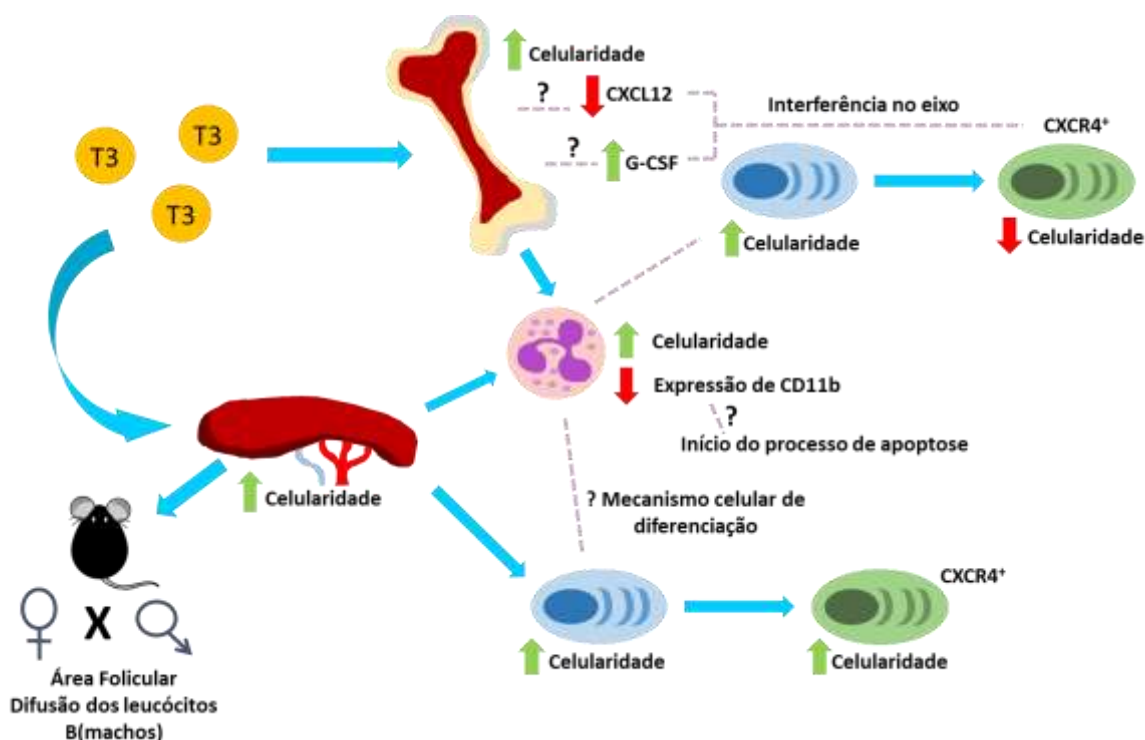


Figura 15 – Resumos dos resultados obtidos e hipóteses elaboradas. Célula em rosa e roxo: neutrófilo; azul: plasmócito; verde: plasmócitos de longa vida CXCR4⁺. Setas azuis: órgãos e células analisadas. Tracejado roxo: hipóteses.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram que o excesso de T_3 regula fisiologia de neutrófilos e plasmócitos de vida longa e fortalece a hipótese de que possa haver interação entre tais células em condições de hipertireoidismo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aggarwal N., Tee S.A., Saqib W., Fretwell T., Summerfield G.P e Razvi S. (2016). Treatment of hyperthyroidism with antithyroid drugs corrects mild neutropenia in Grave's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 85(6), 949-953.
2. Akashi K., Traver D., Miyamoto T. e Weissman I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404(6774):193-7.
3. Aktas G., Sit M., Dikbas O., Erkol H., Altinordu R., Erkus E. e Savli H. (2017). Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio in the diagnosis of Hashimoto's thyroiditis. *Assoc Med Bras*. 63(12), 1065-1068.
4. Alamino V.A., Mascanfroni I.D., Montesinos M.M., Gigena N., Donadio A.C. Blidner A.G. Milotich S.I., Cheng S.Y., Masini-Repiso A.M., Rabinovich G.A. e Pellizas C.G. (2015). Antitumor responses stimulated by dendritic cells are improved by triiodothyronine binding to the thyroid hormone receptor beta. *Cancer Res*. 75(7), 1265-74.
5. Allman D. e Pillai S. (2008). Peripheral B cell subsets *Curr Opin Immunol*. 20(2), 149-57.
6. Anderson, J. M. (2001). Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research*. 31(1), 81–110.
7. Ansel K.M., Ngo V.N., Hyman P.L., Luther S.A., Förster R., Sedgwick J.D., Browning J.L., Lipp M. e Cyster J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. 406(6793), 309-14.
8. Anthony B.A. e Link D.C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol*. 35(1), 32-7.
9. Arpaci D., Gurol G., Ergenc H., Yazar H., Tocoglu A.G., Cifti I.H. e Tamer A. (2016). A controversial new approach to adress hematological parameters in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Lab*. 62(7),1225-1231.
10. Arnon T.I. e Cyster J.G. (2014). Blood, sphingosina and lymphocyte migration dynamics in the spleen. *Curr Top Microbiol Immunol*. 378, 107-28.
11. Atallah M., Krispin A., Tratemberg U., Bem-Hamron S., Grau A., Verbovetski I. e Mevorach D. (2012). Constitutive neutrophil apoptosis: regulation by cell concentration via S100 A8/9 and the MEK-ERK pathway. *PLoS One*. 7(2), e29333.
12. Aw D., Hilliard L., Nishikawa Y., Cadman E.T., Lawrence R.A e Palmer D.B. (2016). Disorganization of splenic microanatomy in ageing mice. *Immunology*. 148(1), 92-101.
13. Bagchi N., Brown T.R. e Parish R.F. (1990). Thyroid dysfunction in adults over age 55 years a study in an urban US community. *Arch Intern Med*. 150, 785–787.
14. Balázs C., Leövey A., Szabó M. e Bakó G. (1980). Stimulating effect of triiodothyronine on cell-mediated immunity. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 17(1), 19-23.
15. Baldrige C.W. e Peterson F.R. (1927). Splenic enlargement in hyperthyroidism. *J. Am. med. Ass*. 88, 1701-1702.
16. Baumgarth N. (2011). The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11, 34–46.
17. Bayles I. e Milcarek C. (2014). Plasma cell formation, secretion and persistence: the short and the long of it. *Crit Rev Immunol*. 2014. 34(6), 481-99.
18. Benseñor I.M., Goulart A.C., Lotufo P.A., Menezes P.R. e Scazufca M. (2011). Prevalence of thyroid disorders among older people: results from the *São Paulo Ageing & Health Study*. *Cad. Braz J Med Biol Res. Saúde Pública* vol.27 no.1.
19. Besedovsky H.O. e del Rey A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17, 64–102.
20. Boelen A.1., Kwakkel J., Alkemade A. Renckens R., Kaptein E., Kuiper G. e Wiersinga W.M. e Visser T.J. (2005). Induction of type 3 deiodinase activity in inflammatory cells of mice with chronic local inflammation. *Endocrinology*. 146(12), 5128-34.
21. Bonilla F.A. e Oettgen H.C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2 suppl 2)

22. Bloise F., De Oliveira F.L., Nobrega A.F., Vasconcellos R., Cordeiro A., De Paiva L.S. e Taub D.D., Borojevic R., Pazos-Moura C.C. e Coelho V.M. (2014). High levels of circulating triiodothyronine induce plasma cell differentiation. *Journal of Endocrinology*. 220,3 305–317.21.
23. Brent,G. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*. 122(9), 3035-3043.
24. Bronte V. e Pitter M.J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 39(5), 806-818.
25. Bruhn K.W., Dekitani K., Nielsen T.B., Pantapalangkoor P. e Spellberg B. (2016). Ly6G – mediated depletion of neutrophils is dependent on macrophages. *Results Immunol*. 6, 5–7.
26. Brynjolfsson S.F., Berg, L.P., Ekerhult T.O., Rinkute I., Wick M.J.Mårtensson I.L. e Grimsholm O. (2018). Long-Lived Plasma Cells in Mice and Men. *Front Immunol*. 9, 2673.
27. Cataldi M., Vigliotti C., Mosca T., Cammarota M.R. e Capone D. (2017). Emerging role of the spleen in pharmacokinetics of monoclonal antibodies, nanoparticles and exosomes. *Internacional Journal of Molecular Science*. 18(6), 1249.
28. Cerruti A., Puga I. e Magri G. (2013). The B helper side of neutrophils. *J Leukoc Biol*.94 (4), 677-682.
28. Chaplin D.D. (2010). Overview of immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 125 (2 Suppl 2), S3-23.
29. Cinnamon G., Matloubian M., Lesneski M.J., Xu Y., Low C., Lu T., Proia R.L e Cyster J.G. (2004). Sphingosine 1-fostato receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol*. 5(7), 713-20.
30. Coxon A., Rieu P., Barkalow F.J., Askari S., Sharpe A.H., Von Andrian U.H., Arnaout M.A. e Mayadas T.N. (1996). A novel role for the beta 2 intregrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 5(6), 653-66.
31. Daley J.M., Thomay A.A., Connolly M.D., Reichner J.S. e Albina J.E. (2008). Use of Ly6G – specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*. 83(1), 64-70.
32. Dincey J.T., Deubelbeiss K.A., Harker L.A. e Finch C.A. (1976). Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*. 68(3), 705-15.
33. De Kleer I., Willems F., Lambrecht B. e Goriely S. (2014). Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol*. 5: 423.
34. De Leo S., Lee S.Y.e Braverman L.E. (2016). Hyperthyroidism. *Lancet*. 388(10047), 906-918.
35. De Vito P., Incerpi S., Pedersen J.Z., Luly P., Davis F.B. e Davis P.J. (2011). Thyroid hormone as modulators of immune activities at cellular level. *Immunology, autoimmunity, and graves' ophthalmopathy*. (8), 879-90.
36. Dorgalaleh A., Mahmoodi M., Varmaghani B., Kiani Node F., Saaeidi Kia O., Alizadeh Sh., Tabibian Sh., Bamedi T., Momemi M., Abbasian S. e Kashani Khatib Z. (2013). Effect of thyroid dysfunctions on blood cell count and red blood cell indice. *Iran J Ped Hematol Oncol*. 3, 73-77.
37. Dzierzak, E. & Speck, N. A. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature Immunol*. 9, 129–136.
38. Eakin D.L., Peake R.L. e Weiss G.B. (1983). Effect of therapy on the neutropenia of hyperthyroidism. *South Med J*. 76(3), 335-7, 340.
39. Eash K.J., Greenbaum A.M., Gopalan P.K. e Link D.C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 120(7), 2423-31.
40. Fandrey J., Pagel H., Frede S., Wolff M., Jelkmann W. (1994). Thyroid hormones enhance hypoxia-induced erythropoietin production in vitro. *Exp Hematol*. 22, 272-277.
41. Fernandez V. e Videla L.A. (1995). On the mechanism of thyroid hormone-induced respiratory burst activity in rat polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic.Biol Med*. 19, 359–63.

42. Fliedner T.M., Graessle D., Paulsen C. e Reimers K. (2002). Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother Radiopharm.* 17(4), 405-26.
43. Fucs E. e Chen T. (2013). A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* 14(1): 39–48.
44. Furusawa C. e Yamaguchi T. (2016). Robust and accurate discrimination of self/non-self antigen presentations by regulatory t cell supression. *Plos One.* 11(9), e0163134.
45. Furze R.C. e Rankin S.M. (2008). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology.* 125(3), 281-288.
46. Garmendia Madariaga, A., Santos Palacios, S., Guillen-Grima, F. e Galofre, J. C. (2014). The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 923–931.
47. Genestier L., Taillardet M., Mondiere P., Gheit H., Bella C. e Defrance T. (2007). TLR agonist selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol.* 178(12), 7779-86.
48. Gradien A., Fucs R., Nobrega A., Andresson J. e Coutinho A. (1994). Negative selection of multireactive B cell clones in normal adult mice. *Eur J Immunol.* 24(6), 1345-52.
49. Golde D.W., Bersch N., Chopra I.J. e Cline M.J. (1977). Thyroid hormones stimulate erythropoiesis in vitro. *Br J Haematol.* 37, 173-177.
50. Goltsev Y., Samusik N., Darling J.K., Bhate S., Hale M., Vasquez G., Black S. e Nolan G.P. (2018). Deep profiling of mouse splenic architecture with CODEX multiplexed imaging. *Cell Press.* 174(4), 968-981.e15.
51. Goodnow C.C., Crosbie J., Adelstein S., Lavoie T.B., Smith-Gill S.J., Brink R.A., Pritchard-Briscoe H., Wotherspoon J.S., Loblay R.H. e Raphael K. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* 334(6184), 676-82.
52. Gunn M.D., Kyuwa S., Tam C., Kakiuchu T., Matsuzawa A., Williams L.T. e Nakano H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med.* 189(3), 451-60.
53. Hardy R.R. e Hayakawa K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol.* 19, 595-621.
54. Hartley S.B., Cooke M.P., Fulcher D.A., Harris A., Cory S., Basten A. e Goodnow CC. (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell.* 72(3), 325-35.
55. Hermida M.R., Melo C.V.B., Lima I.S., Oliveira G.G.S. e Dos Santos W.L.C. (2018). Histological disorganization of spleen compartments and several visceral leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 8, 394.
56. Hodkinson C.F., Simpson E.E., Beattie J.H., O'Connor J.M., Campbell D.J., Strain J.J. e Wallace J.M. (2009). Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy man and woman aged 55–70 years. *J Endocrinol* 202, 55–63.
57. Hoffman W., Lakkis F.G. e Chalasani G. (2015). B cells, antibodies and more. *Clin J Am Soc Nephrol.* 11(1), 137-154.
58. Iitaka M., Noh J.Y., Kitahama S., Fukasawa N., Miura S., Kawakami Y., Kawasaki S., Yamanaka K., Ishii J., Katayama S. e Ito K. (1998). Elevated serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 48(3), 275-80.
59. King, L.B., Sandel, P., Sater, R.A., and Monroe, J.G. (1998). *Molecular mechanisms regulating negative selection in immature-stage b cells.* Totowa, NJ: Humana Press, Inc.
60. Klebanoff S.J. e Green W.L. (1973). Degradation of thyroid hormones by phagocytosing human leukocytes. *Journal of Clinical Investigation.* 52, 60–72.
61. Kim H.K., Siera M.L., Williams C.K. Gulino A.V. e Tosato G. (2006). G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood.* 108(3), 812–820.
62. Kondo M. (2010). Lymphoid and myeloid commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev.* 238 (1), 37-46.
63. Kyritsi E.M.A., Yiakoumis X., Pangalis G.A., Pontikoglou C., Pyrovolaki K., Kalpadakis C., Mavroudi I., Koutala H., Mastrodermou S., Vassilakopoulos T.P., Vaiopoulos G., Diamanti-Kandarakis E., Papadaki H.A. e

64. Leung A.M. e Braverman L.E. (2014). Consequences of excess iodine. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10(3), 136-142
65. Liu Y.J., Malisan F., de Bouteiller O., Guret C., Lebecque S., Banchereau J., Mills F.C., Max E.E. e Martinez-Valdez H. (1996). Within germinal center, isotypes switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity.* 4(3), 241-50.
66. Loh K. (2000). Amiodarone-induced thyroid disorders: a clinical review. *Postgrad Med J.* 76(893), 133–140.
67. Lopes-Carvalho, T. e Kearney, J. F. (2004). Development and selection of marginal zone B cells. *Immunological Reviews.* 197(1), 192–205.
68. Lord B.I., Bronchud M.H., Owens S., Chang J., Howell A., Souza L. e Dexter T.M. (1989). The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(23), 9499-503.
69. Manji N., Carr-Smith J.D., Boelaert K., Allahabadi A., Armitage M., Chatterjee V.K., Lazarus J.H., Pearce S.H., Vaidya B., Gough S.C e Franklyn J.A. (2006). Influences of age, gender, smoking, and family history on autoimmune thyroid disease phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(12), 4873-80.
70. Malgor L.A., Blanc C.C., Klainer E., Irizar S.E., Torales P.R. e Barrios L. (1975). Direct effect of thyroid hormones of bone marrow erythroid cells of ratas. *Blood.* 45(5), 671-9.
71. Manz, R. A., Löhning, M., Cassese, G., Thiel, A. e Radbruch, A. (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int. Immunol.* 10, 1703–1711
72. Manz R.A., Thiel A. e Radbruch A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature.* 388, 133–4.
73. Mascanfroni I, Montesinos M.M, Susperreguy S., Cervi L., Illarregui J.M., Ramseyer V.D., Mansini-Repiso A.M., Targovnik H.M., Rabinovich G.A. e Pellizas C.G. (2008). Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *FASEB J.* 22, 1032–1042.
74. Mazor R., Shurtz-Swirski R., Farah R., Kristal B., Shapiro G., Dorlehter F., Cohen-Mazor M., Meilin E., Tamara S. e Sela S. (2008). Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis.* 197(2), 937-43.
75. Mebius R.E. e Kraal G. (2005). Structure and function of spleen. *5,* 606-616.
76. McLeod D.S. e Cooper D.S. (2012). The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine.* 42(2), 252-65.
77. Mooij P., Simons P.J., de Haan-Meulman M. e de Wit H.J. e Drexhage H.A. (1994). Effect of thyroid hormones and other iodinated compounds on the transition of monocytes into veiled/dendritic cells: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumour-necrosis factor-alpha and interleukin-6. *J Endocrinol.* 140, 503–12.
78. Monroe, J. G., Bannish, G., Fuentes-Panana, E. M., King, L. B., Sandel, P. C., Chung, J., e Sater, R. (2003). Positive and negative Selection during B Lymphocyte development. *Immunologic Research.* 27(2-3), 427–442.
79. Mostardinha P. e Vistulo de Abreu F. (2012). Positive and negative selection, self-nonsel discrimination and the roles of costimulation and anergy. *Scientific Reports.* 2(769).
80. Montecino-Rodriguez E. e Dorshkind K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36, 13–21.
81. Mullur R., Liu Y.Y. e Brent G.A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Ver.* 94(2), 355-82.
82. Nardelli B., Belvedere O., Roschke V., Moore P.A., Olsen H.S., Migone T.S., Sosnovtseva S., Carrel J.A., Feng P., Giri J.G e Hilbert D.M. (2001). Synthesis and release of B-lymphocytes stimulator from myeloid cells. *Blood.* 97, 198-2004.
83. Nicholson L.B. (2016). The immune system. *Essays Biochem.* 60(3), 275-301.
84. Ng P.C e Lam H.S. (2006). Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr.* 18(2), 125-31.
85. Nossal G.J. e O. Makela. (1962). Autoradiographic studies on the imune response.I. The kinetics of plasma cells proliferation. *J.Exp.Med.* 115, 209-230.

86. Nut S.L., Hodgkin P.D., Tarlinton D.M. e Corcoran L.M. (2015). The generation of antibody secreting plasma cells. *Nat Ver Immunol.* 15(3), 160-171.87.
87. Nutt S.L. Tarlinton. (2011). Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, couplings or just good friends? *Nat Immunol.* 12(6), 472-7.
88. Ogawa M., Matsuzaki Y., Nishikawa S., Hayashi S., Kunisada T., Sudo T., Kina T., Nakauchi H. e Nishikawa S. (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med.* 171(1), 63-71.
89. Ogawa M., ten Boekel E. e Melchers F. (2000). Identification of CD19(-)B220(+)cKit(+)Flt3/Flk-2(+)cells as early B lymphoid precursors before pre-B-I cells in juvenile mouse bone marrow. *Int. Immunol* 12,313–24
90. Olmos R.D., Figueiredo R.C., Aquino E.M, Lotufo P.A. e Benseñor I.M. (2015). Gender, race and socioeconomic influence on diagnosis and treatment of thyroid disorders in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* vol.48 no.8.
91. Orkin S.H e Zon L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell. 132(4), 621-644.
92. Ortiga-Carvalho T.M, Chiamolera M.I., Pazos-Moura C.C. e Wondjsford F.E. (2016). Hypothalamus – Pituitary – Thyroid Axis. 6(3), 1387-428.
93. Ortiga-Carvalho T.M, Sidhaye A.R. e Wondjsford F.E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol.* 10(10), 582-591.
94. Pappu R., Schwab S.R., Cornelissen I., Pereira J.P., Regard J.B., Xu Y., Camerer E., Zheng Y.W., Huang Y., Cyster J.G. e Coughlin S.R. (2007). Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosina-1-phosphate. *Science.* 316(5822), 295-8.
95. Paavonen T. (1982). Enhancement of human B lymphocyte differentiation in vitro by thyroid hormone. *Scand J Immunol.* 15(2), 211-5.
96. Perrota C., Buldorini M., Assi E., Cazzato D., De Palma C., Clementi E. e Cervia D. (2014). The thyroid hormone triiodothyronine controls macrophage maturation and functions: protective role during inflammation. *The American Journal of Pathology.*184(1), 230-247.
97. Phan T.G., Paus D., Chan T.D., Turner M.K., Nutt S.L., Basten A. e Brink R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med.* 203(22), 2419-24.
98. Pillai S. e Cariappa A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 9, 767–777.
99. Pillai S. (1999). The chosen few? Positive selection and the generation of naive B lymphocytes. *Immunity* 10, 493–502.
100. Ponassi A., Morra L., Cariosto G., Parodi G.B., Biassoni P. e Sacchetti C. (1983). Disorder's of granulopoiesis in patients with untreated Grave's disease. *Acta Haematol.* 70(1), 19-23
101. Puga I., Montserrat C. e Cerruti A. (2012). Emerging Role of Granulocytes. *Imunologia.* 32, 25-34
102. Puga I., Cols M., Barra C.M., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L., Chorny A., Shan M., Xu W., Magri G., Knowles D.M., Tam W., Chiu A., Bussel J.B., Serrano S., Lorene J.A., Bellosillo B., Lloreta J., Juanpere N., Alameda F., Baró T de Heredia C.D., Silvestri G., Cunningham-Rundles C., Calvillo M., Dufour C., Notarangelo L.D., Lougaris V., Plebani A., Casanova J.L., Ganal S.C., Diefenbach A., Aróstegui J.L., Juan M., Yagüe J., Mahlaoui N., Donadieu J., Chen K. e Cerruti A. (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* 13(2), 170-80.
103. Ribeiro-Carvalho M.M., Farias-de-Oliveira D.A., Villa-Verde D.M. e Savino W. (2002). Triiodothyronine modulates extracellular matrix-mediated interactions between thymocytes and thymic microenvironmental cells. *Neuroimmunomodulation.* 10(3), 142-52.
104. Richards M.K., Liu F., Iwasaki H., Akashi K. e Link D.C. 2003. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood.* 102(10), 3562-8.
105. Rosales C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types. *Front Physiol.* 9,113.
106. Rosa L.F., Safi D.A., Curi R. (1995). Effect of hypo- and hyperthyroidism on the function and metabolism of macrophages in rats. *Cell Biochem Funct.* 13, 141–7.

107. Ruddle N.H. e Akirav E.M. (2009). Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune responses. *J Immunol.* 183(4), 2205-2212.
108. Ruytinx P, Proost P, Van Damme J, Struyf S. (2018). Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions. *Front Immunol.* 9,1930. 108. Rydzewska M., Jaromin M., Pasierowska I.E., Stożek K. e Bossowski A. (2018). Role of T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Thyroid Res.* 11:2.
109. Seita J. e Weissman I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Ver Syst Biol Med.* 2(6), 640-53.
110. Semerad C.L., Christopher M.J., Liu F., Short B., Simmons P.J., Winkler I., Levesque J.P., Chappel J., Ross F.P. e Link D.C. (2005). G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood.* 106(9), 3020-7
111. Siddiqi M.I., Garcia Z.C., Stein D.S., Denny T.N. e Spolarics Z. 2001. Relationship between oxidative burst activity and CD11b expression in neutrophils and monocytes from healthy individuals: effects of race and gender. *Cytometry.* 46 (4), 243-6.
112. Shapiro-Shelef M. e Calame K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* 5(3), 230-42.
113. Shlomchik M.J e Weisel F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev.* 247(1), 52-63.
114. Stark M.A., Huo T., Burcin T.L., Morris M.A., Olson T.S. e Ley K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 22(3), 285-94.
115. Steiniger B., Bette M. e Schwarzbach H. (2011). The open microcirculation in human spleens: A three-dimensional approach. *J. Histochem. Cytochem.* 59, 639–648
116. Sugiyama T., Kohara H., Noda M. e Nagasawa T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 25(6), 977-88.
117. Szabo J, Foris G, Mezosi E, Nagy EV, Paragh G, Sztojka I, Leövey A. (1996). Parameters of respiratory burst and arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear granulocytes from patients with various thyroid diseases. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 104, 172–6.
118. Tangye S.G., Avery D.T., Deenick E.K. e Hodgkin P.D. (2003). Intrinsic differences in the proliferation of naïve and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol.* 170(2), 686-94.
119. Taylor P.N., Albrecht D., Scholz A., Gutierrez-Buey G., Lazarus J. H., Dayan C.M. e Onyebuchi O.E. (2018). Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nat. Rev. Endocrinology.* 14 (5), 301-316.
120. Tokoyoda, K., Hauser, A. E., Nakayama, T. and Radbruch, A. (2010). Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 193–200.
121. Thompson E.C. (2012). Focus issue: Structure and function of lymphoid tissue. *Trends in immunology.* 33(6), 255.
122. van der Spek A.H., Bloise F.F., Tichgelaar W., Dentice M., Salvatore D., van der Wel N.N., Fliers E. e Boelen A. (2016). The thyroid hormone inactivating enzyme type 3 deiodinase is present in bactericidal granules and the cytoplasm of human neutrophils. *Endocrinology.* 157, 3293–3305.
123. Villa-Verde D.M., de Mello-Coelho V., Farias-de-Oliveira D.A., Dardenne M. e Savino W. (1993). Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology.* 133(2), 867-75.
124. Zhang Y., Gao S., Xia S. e Liu F. (2018). Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. Review special issue: stem cell biology. *28(12), 976-988.*
125. Zhao E., Xu H., Wang L., Kryczek I., Wu K., Hu Y., Wang G. e Zou W. (2012). Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol.* 9(1), 11–19.
126. Warrington R., Watson W., Kim H.L. e Antonetti F.R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology.* 7 (Suppl 1), S1
127. Weetman A.P. (2003). Grave's disease 1835-2002. *Horm Res.* 59 Suppl 1, 114-8.

128. Weiskopf K., Schonorr P.J., Pang W.W., Chao M.P., Chhabra A., Seita J., Feng M. e Weissman I.L. (2016). Myeloid cell origins, differentiation and clinical implications. *Microbiol Spectr.* 4(5)129.
129. Weirich E., Rabin R.L., Maldonado Y., Benitz W., Modler S., Herzenberg L.A. e Herzenberg L.A. (1998). Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *J Pediatr* .132(3 Pt 1), 445-51.
130. Wiersinga W.M. (2013). Smoking and thyroid. *Clin Endocrinol.* 79(2), 145-5.
131. Wilson A1, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 135(6):1118-29.
132. Woeber K.A. (1977). Observations concerning the binding of L-triiodothyronine in the human polymorphonuclear leukocyte. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 44, 62–68.
133. Woeber K.A. (1978). L-triiodothyronine and L-reverse-triiodothyronine generation in the human polymorphonuclear leukocyte. *Journal of Clinical Investigation.* 62, 577–584.