

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

THALIANE CARVALHO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NAS
CÉLULAS IMUNOLÓGICAS DURANTE A FASE AGUDA DO PACIENTE CRÍTICO**

Uma coorte prospectiva

Porto Alegre

2024

THALIANE CARVALHO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NAS
CÉLULAS IMUNOLÓGICAS DURANTE A FASE AGUDA DO PACIENTE CRÍTICO**

Uma coorte prospectiva

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Endocrinologia pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: Prof. Dra. Simone Magagnin Wajner

Porto Alegre

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho Oliveira, Thaliane
AVALIAÇÃO NO METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS
NAS CÉLULAS IMUNOLÓGICAS DURANTE A FASE AGUDA DO
PACIENTE CRÍTICO / Thaliane Carvalho Oliveira. --
2024.
47 f.
Orientadora: Simone Magagnin Wajner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,
Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Alteração dos hormônios Tireoidianos . 2.
Células Imunológicas. 3. Expressão e atividade das
desiodases . 4. Síndrome de doença não tireoidiana. I.
Magagnin Wajner, Simone, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

THALIANE CARVALHO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO NO METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NAS
CÉLULAS IMUNOLÓGICAS DURANTE A FASE AGUDA DO PACIENTE CRÍTICO**

Uma coorte prospectiva

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Endocrinologia pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: Profa. Dra. Simone Magagnin Wajner

Aprovada em: Porto Alegre, 12 de abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Daisy Crispim Moreira
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Nome e titulação do orientador
Instituição do orientador

Dr. Felipe Dal Pizzol
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Nome e titulação do membro da banca
Instituição do membro da banca

Dr(a).: Claudia Pellizas
Universidade Nacional de Córdoba Argentina

Nome e titulação do membro da banca
Instituição do membro da banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de sabedoria e guia em todos os momentos da minha jornada acadêmica. Sua graça e orientação foram fundamentais para alcançar este marco em minha vida.

À minha orientadora, Prof. Dra. Simone Magagnin Wajner, cuja paciência, orientação e incentivo foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua paixão pelo conhecimento e comprometimento com a excelência acadêmica foram fontes de inspiração. Muito obrigada pela amizade!

À minha família, cujo apoio incondicional transcendeu todas as distâncias e desafios. Agradeço por estarem ao meu lado, inclusive durante a significativa mudança que empreendi para perseguir este caminho acadêmico. Seu amor, compreensão e encorajamento foram pilares fundamentais para a realização deste trabalho.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos
dia após dia.” (Robert Collier)*

RESUMO

A desregulação das desiodinases tipos 2 e 3 (D2 e D3) altera o metabolismo dos hormônios tireoidianos na síndrome da doença não tireoidiana (NTIS). A função alterada dessas enzimas nas células do sangue periférico pode ser um dos fatores que levam a essa síndrome. O efeito do estresse oxidativo, da colocalização e da expressão de D2 e D3 em células extraídas e purificadas de pacientes doentes é desconhecido. Objetivo: Avaliar a presença e variações da expressão de D2 e D3 em neutrófilos e monócitos de pacientes de terapia intensiva internados em UTI por qualquer doença. Métodos: Noventa e seis pacientes internados em UTI por qualquer causa tiveram seu sangue coletado na admissão e após sete dias. As células do sangue total foram separadas por diferentes gradientes celulares e purificadas por citometria de fluxo. Os teores de carbonila total, sulfidril e GSH foram parâmetros de equilíbrio redox. A expressão e colocalização de D2 e D3 foram determinadas com RNAscope, PCR em tempo real e imunofluorescência. Os níveis celulares de T3 foram medidos. Resultados: A formação de carbonilas, um marcador de dano oxidativo às proteínas, foi aumentada em todos os pacientes (todos $P < 0,0001$), e a sulfidril e GSH foram diminuídas ($P < 0,001$). A expressão de DIO2 e DIO3 foi aumentada em neutrófilos e monócitos de pacientes vivos e falecidos, e sua localização na célula e colocalização de D2 e D3 notavelmente diferentes entre os dois grupos. A imunofluorescência mostrou proteína D2 diminuída e distribuição enzimática distinta em ambos os tipos de células. Os níveis de proteína D3 estavam elevados e também observamos diferentes distribuições da enzima nas células. Os níveis de T3 em cada tipo de célula eram diferentes e relacionados ao destino. O crosstalk diferente de D2 e D3 em neutrófilos e monócitos fornece um novo mecanismo para explicar a redução nos níveis de T3 em pacientes doentes. Além disso, a distribuição distinta da enzima está correlacionada com o prognóstico. Esses novos resultados iluminam a fisiopatologia do NTIS e podem representar uma ferramenta de prognóstico.

Palavras-chave: Deiodinases, metabolismo, hormônio Tireoideano

ABSTRACT

Dysregulation of types 2 and 3 deiodinases (D2 and D3) alter the metabolism of thyroid hormones in the nonthyroidal illness syndrome (NTIS). Altered function of these enzymes in peripheral blood cells can be one of the factors that leads to this syndrome. The effect of oxidative stress, the colocalization and D2 and D3 expression in cells extracted and purified from ill patients is unknown. Objective: Evaluate the presence and variations of D2 and D3 expression in intensive care patients' neutrophils and monocytes admitted in ICU due to any disease. Methods: Ninety-six patients admitted to ICU due to any cause had their blood collected at admission and after seven days. Cells from whole blood were separated by different cell gradients and purified by flow cytometry. The total carbonyl, sulfhydryl contents, and GSH were redox balance parameters. D2 and D3 expression and colocalization were determined with RNAscope, real-time PCR and immunofluorescence. Cellular T3 levels were measured. Results: The formation of carbonyls, a marker of oxidative damage to proteins, was increased in all patients (all $P < 0.0001$), and sulfhydryl and GSH were diminished ($P < 0.001$). Expression of DIO2 and DIO3 was augmented in neutrophils and monocytes from alive and deceased patients, and its localization in the cell and colocalization of D2 and D3 strikingly different between both groups. Immunofluorescence showed diminished D2 protein and distinct enzyme distribution in both cell types. Levels of D3 protein were high, and we also observed different distributions of the enzyme in the cells. T3 levels on each type of cell were different and related to fate. The different crosstalk of D2 and D3 in neutrophils and monocytes provides a novel mechanism to explain the reduction in T3 levels in ill patients. Further, distinct enzyme distribution is correlated with prognosis. These new results illuminate NTIS pathophysiology and might represent an easy prognosis tool.

Keywords: Deiodinases, metabolism, Thyroid hormone

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- a) Figura 1 - Estratégia de gate em células mononucleares e em neutrófilos;
- b) Figura 2 - Biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes.
- c) Figura 3 - RNAscope Dio2 e Dio3 em neutrófilos;
- d) Figura 4 - RNAscope Dio2 e Dio3 em Monócitos;
- e) Figura 5 - Imunofluorescência Dio3 em neutrófilos;
- f) Figura 6 - Imunofluorescência Dio3 em monócitos;
- g) Figura 7 - Imunofluorescência Dio2 em neutrófilos;
- h) Figura 8 - Imunofluorescência Dio2 em monócitos;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D2- Desiodases tipo 2
D3- Desiodases tipo 3
DIO1 - Gene desiodase tipo 1
DIO2 - Gene desiodase tipo 2
DIO3 - Gene desiodase tipo 3
HST - Hormônios da Tireoide
NTIS - Nonthyroidal illness syndrome / SÍNDROME DA DOENÇA NÃO TIREOIDIANA
T3 - triiodotironina
T3L - T3 livre
FT4 - T4 livre
rT3 - T3 reverso
T4 - tiroxina
TSH - Hormônio tireoestimulante
ST3B - síndrome do T3 baixo
IL-6 - Interleucina - 6
ROS - Espécies reativas de oxigênio
NAC - Acetilcisteína
GSH - Glutathiona
ICU - Unidade de terapia intensiva
PMNs - Neutrófilos Polimorfonucleares
TNB - Ácido nitrobenzóico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	ALTERAÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NAS CÉLULAS IMUNES	10
1.2	<i>ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NA DOENÇA CRÍTICA.....</i>	10
1.3	<i>EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS DESIODASES.....</i>	11
1.4	<i>MANUSCRITO ORIGINAL.....</i> ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
1.5	<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</i>	37
1.6	<i>REFERÊNCIAS.....</i>	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 ALTERAÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NAS CÉLULAS IMUNES

Os hormônios da tireoide (HTs) desempenham um papel essencial no crescimento, desenvolvimento e metabolismo energético[1]. Recentemente, as células imunes foram identificadas como alvos dos HTs[2]. Os monócitos e macrófagos, que são células imunes inatas importantes, juntamente com os neutrófilos desempenham funções essenciais na homeostase e na imunidade dos tecidos. A disfunção dessas células tem sido associada a uma variedade de condições fisiopatológicas, incluindo câncer, diabetes, doença inflamatória intestinal e aterosclerose[3].

A triiodotironina (T3), a forma ativa dos HTs, desempenha um papel crucial na função adequada dos macrófagos[4]. Os hormônios da tireoide são produzidos principalmente pela glândula tireoide na forma de pró-hormônio tiroxina (T4). Após ser absorvida pela célula, o T4 precisa ser convertido em T3, o hormônio ativo, para exercer suas funções. Para realizar essa conversão, as células imunes possuem a enzima desidase tipo 2 (D2), que faz parte de uma família de enzimas chamadas desidases, responsáveis por ativar ou inativar as diferentes formas moleculares dos hormônios tireoidianos dentro da célula. A D2 é especialmente crucial como ativador dos hormônios tireoidianos. A desidase tipo 2 que converte T4 em T3[5].

Sabe-se que o metabolismo dos hormônios tireoidianos passa por alterações significativas durante doenças e infecções, que são coletivamente conhecidas como síndrome da doença não tireoidiana[6, 7].

1.2 ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NA DOENÇA CRÍTICA

A doença crítica é caracterizada por um desajuste uniforme de todo o eixo hipotalâmico-hipofisário. Estas alterações neuroendócrinas contribuem para o maior risco de morbidade e mortalidade nas unidades de terapia intensiva. A resposta hormonal é caracteristicamente diferente nas fases aguda e crônica das doenças graves, com alterações do metabolismo periférico predominando na fase aguda e supressão do eixo neuroendócrino contribuindo de forma adicional na fase prolongada da doença

crítica[8].

A síndrome do T3 baixo (ST3B), também conhecida como doença não tireoidiana ou síndrome do eutireoideo doente, refere-se a alterações nos níveis séricos dos hormônios tireoidianos (HT) presentes em quase todas as formas de doença aguda e crônica[9]. A fase aguda da doença grave é caracterizada por níveis baixos de T3 e T3 livre (T3L) e níveis elevados de T3 reverso (rT3). Os níveis séricos de T4 podem ser normais ou reduzidos. A redução dos níveis de T4 está associada com a gravidade da doença, enquanto níveis baixos de T3L são um marcador de mau prognóstico[10, 11]. Embora os níveis de TSH permaneçam dentro dos limites normais, o pico noturno de TSH observado no estado fisiológico normal é ausente[12].

1.3 *EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS DESIODASES*

A desiodação é um passo crítico na regulação da disponibilidade periférica dos HTs, permitindo mudanças rápidas no perfil hormonal tireoidiano intracelular de um modo tecido-específico. As iodotironinas desiodases - D1, D2 e D3 - constituem uma família de oxirredutases que remove uma molécula de iodo do anel externo (tirosil) e / ou o interno (fenólico) dos HTs, levando à ativação e inativação dos mesmos, respectivamente. Assim, é possível controlar os níveis de T3 intracelulares independentemente dos níveis plasmáticos de T3[13].

Na síndrome do T3 baixo, as alterações observadas nos parâmetros dos hormônios circulantes sugerem que a diminuição da conversão de T4 para T3 e o aumento da inativação de T4 em rT3 pelas desiodases poderiam estar envolvidos no mecanismo da doença. A análise de tecidos obtidos de pacientes criticamente enfermos imediatamente após a morte documentam que as concentrações da D1 hepática estão reduzidas em comparação com controles saudáveis, enquanto sua atividade foi positivamente correlacionada com a relação T3/rT3 sérica[14]. O papel de D2, que converte T4 em T3, é ainda indefinido na síndrome do T3 baixo, uma vez que a análise da atividade da D2 em humanos tem mostrado resultados contraditórios. Enquanto alguns estudos não encontraram diferença na atividade da D2 no músculo esquelético de pacientes graves comparados a controles saudáveis, outros estudos não identificaram atividade da D2 no músculo ou fígado na fase crônica da doença crítica[14, 15]. Outros autores, no entanto, identificaram um aumento da expressão e da atividade da D2 em biópsias de músculo esquelético de pacientes com doença crítica prolongada[16]. Esta grande variação nos resultados pode ser explicada por dificuldades na aferição da atividade

da enzima.

Sob condições fisiopatológicas associadas à doença grave, a atividade da D3, responsável pela inativação de T4, é induzida. Análise post-mortem de tecidos adultos documentou a reativação da D3 no fígado e no músculo esquelético de pacientes criticamente enfermos. Demonstrou-se que a atividade de D3 hepática está associada com os níveis séricos de rT3 e negativamente correlacionada com a relação T3 / rT3[17, 18].

A identificação de D3 em neutrófilos favorece a hipótese de uma participação dessa enzima na resposta imune inata, uma vez que desempenha papel na função bactericida dos neutrófilos, seja por disponibilizar iodeto para a ativação do sistema mieloperoxidase ou por modulação da biodisponibilidade de hormônios tireoidianos e controle do estresse oxidativo[19, 20].

1.4 *MANUSCRITO ORIGINAL*

1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo explora prospectivamente o crosstalk das desidases no metabolismo do hormônio tireoidiano dentro de neutrófilos e monócitos em pacientes gravemente enfermos. Demonstramos uma variação na expressão da quantidade proteica e localização das desidases nessas células, o que pode ser pelo menos um dos fatores potencialmente correlacionados com o desfecho do paciente. Além disso, as desidases tipos 2 e 3 apresentam distribuição diferente nas células, o que também foi associado ao desfecho do paciente. A incubação com T3, NAC ou GSH mostrou que a expressão da D3 é regulada pelo antioxidante GSH, sem resposta ao T3 ou NAC. Esta correção relativa da expressão da DIO3 sugere acesso da enzima ao exterior da membrana celular, uma vez que o GSH não cruza a membrana.

Em conclusão, nosso estudo revelou que níveis baixos de T3 combinados com medições simples de DIO2 e DIO3 no sangue, medidos na admissão na UTI, podem ser marcadores independente da evolução para o óbito. Contrariamente à crença comum de que as alterações de TH na fase inicial da doença são adaptativas e apresentam vantagens de sobrevivência, os pacientes com níveis mais baixos de T3 apresentam uma disfunção significativamente maior no metabolismo dos hormônios tireoidianos, inclusive nas células sanguíneas. Desta forma, podemos afirmar que níveis baixos de T3 nas células do sistema imunológico, por disfunção das desidases, representam uma medida integrativa de múltiplos processos patológicos prejudiciais que ocorrem em pacientes com doenças críticas e estão associados ao prognóstico.

1.6 REFERÊNCIAS

1. Brent GA. Mecanismos de ação dos hormônios tireoidianos. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3035–3043.
2. van der Spek AH, Fliers E, Boelen A. Metabolismo do hormônio da tireóide em células imunes inatas. *J Endocrinol.* 2017;232(2):R67–R81.
3. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Biologia de macrófagos no desenvolvimento, homeostase e doença. *Natureza.* 2013;496(7446): 445-455.
4. Kwakkel J, Surovtseva OV, de Vries EM, Stap J, Fliers E, Boelen A. Um novo papel para a enzima ativadora do hormônio da tireoide tipo 2 deiodinase na resposta inflamatória dos macrófagos. *endocrinologia.* 2014;155(7):2725–2734
5. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. Bases celulares e moleculares da sinalização do hormônio tireoideano regulado pela desiodase. *Endoc Rev.* 2008;29(7):898–938.
6. Docter R, Krenning EP, de Jong M, Hennemann G. A síndrome do eutireoideo doente: alterações nos parâmetros séricos dos hormônios tireoidianos e metabolismo hormonal. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993;39(5):499-518.
7. Boelen A, Kwakkel J, Fliers E. Além do baixo T3 plasmático: metabolismo local do hormônio tireoideano durante inflamação e infecção. *Endocr Rev.* 2011;32(5):670–693
8. Vanhorebeek I, Langouche L, Van den Berghe G. Endocrine aspects of acute and prolonged critical illness. *Nat Clin Prac EndocrinolMetab* 2006; 2: 20-31.
9. Maldonado LS, Murata GH, Hershman JM, Braunstein GD. Do Thyroid Function Tests Independently Predict Survival in the Critically Ill? *Thyroid* 1992; 2(2): 119-123
10. Wang F, Pan W, Wang H, Wang S, Pan S. Relationship between thyroid function and ICU mortality: a prospective observation study. *Critical Care* 2012, 16:R11
11. Romijn JA, Wiersinga WM. Decreased nocturnal surge of thyrotropin in nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70(1):35 –42
12. Mebis L, Van den Berghe G. Thyroid axis function and dysfunction in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;25(5):745-57.
13. St. Germain D, Galton VA, Hernandez A. Defining the Roles of the Iodothyronine Deiodinases: Current Concepts and Challenges. *Endocrinology* 2009;150: 1097–1107
14. Peeters RP, Wouters PJ, Kaptein E, van Toor H, Visser TJ, Van den Berghe G. Reduced

- activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7): 3202–3211.
15. Rodriguez-Perez A, Palos-Paz F, Kaptein E, et al. Identification of molecular mechanisms related to nonthyroidal illness syndrome in skeletal muscle and adipose tissue from patients with septic shock. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:821–827
 16. Mebis L, Langouche L, Visser TJ, Van den Berghe G. The Type II Iodothyronine Deiodinase Is Up-Regulated in Skeletal Muscle during Prolonged Critical Illness. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8): 3330–3333.
 17. Peetrons P. Ultrasound of muscles. *Eur Radiol.* 2002;12:35–43.
 18. Abe T, Loenneke JP, Thiebaud RS. Morphological and functional relationships with ultrasound measured muscle thickness of the lower extremity: a brief review. *Ultrasound.* 2015;23:166–73.
 19. Peeters RP, Wouters PJ, van Toor H, Kaptein E, Visser TJ, Van den Berghe G. Serum 3,3,5-triiodothyronine (rT3) and 3,5,3-triiodothyronine/rT3 are prognostic markers in critically ill patients and are associated with postmortem tissue deiodinase activities. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(8): 4559–4565
 20. Boelen A, Boorsma J, Kwakkel J, Wieland CW, Renckens R, Visser TJ, Fliers E, Wiersinga WM. Type 3 deiodinase is highly expressed in infiltrating neutrophilic granulocytes in response to acute bacterial infection. *Thyroid.* 2008 Oct;18(10):1095-103

