

## Resumo

As patologias auto-imunes da tiróide, incluindo tiroidite linfocítica crónica e doença de Graves, são doenças auto-imunes específicas de órgão, caracterizadas por infiltração linfocítica da tiróide. Auto-anticorpos contra antigénios da tiróide (anticorpos anti-peroxidase tiroideia, anti-tiroglobulina e anti-receptor da tirotropina), são frequentemente encontrados no soro dos doentes.

A gastrite atrófica é uma alteração que afecta a mucosa corporal e quando associada com anemia perniciosa é frequentemente considerada auto-imune, suportada pela presença de anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco. Associações com outras doenças auto-imunes específicas de órgão são frequentes, nomeadamente doenças auto-imunes da tiróide. Gastrite auto-imune e anemia perniciosa são doenças auto-imunes comuns, com uma frequência respectiva de 2 e 0,1-1% na população em geral, aumentando com a idade. Em doentes com doença tiroideia auto-imune a prevalência é igualmente elevada. O ataque auto-imune às células parietais resulta numa diminuição da secreção ácida, hipergastrinemia, anemia ferropénica e anemia perniciosa com défice de vitamina B<sub>12</sub>, conduzindo a um risco aumentado de desenvolvimento de cancro gástrico e tumores carcinóides. Desta forma, o diagnóstico precoce de gastrite atrófica auto-imune será relevante para tratar e prevenir a evolução destas situações.

Dados recentes evidenciam que a infecção por *Helicobacter pylori*, capaz de induzir atrofia da mucosa gástrica, pode ser o iniciador da auto-imunidade gástrica, sendo no entanto difícil distinguir claramente entre atrofia gástrica auto-imune e gastrite atrófica induzida por *Helicobacter pylori*.

Apesar da frequente associação de auto-imunidade tirogástrica, não está bem definido a necessidade de determinações sistemáticas de anticorpos anti células parietais em doentes diagnosticados com doença auto-imune da tiróide, o que justifica desta forma um estudo nesta área, no Centro Hospitalar São João. Dos 463 doentes com doença auto-imune da tiróide, 414 (89%) tinham tiroidite auto-imune classificados pela positividade de anti-peroxidase tiroideia (308 ± 345 UI/mL) e/ou anti-tiroglobulina (139±248 UI/mL) e 49 (11%) tinham doença de Graves classificados com base na presença de anti-receptor da tirotropina positivos e pelos níveis séricos de hormona estimulante da tiróide. O diagnóstico de gastrite auto-imune foi laboratorialmente confirmado em 120 doentes e a prevalência de anti

células parietais positivos (ACPs) foi semelhante nas duas patologias auto-imunes da tiróide. Quanto aos anticorpos anti-factor intrínseco a sua positividade em cada uma das doenças auto-imunes da tiróide é muito inferior à verificada para os ACPs, com distribuição idêntica em ambas as patologias. Cerca de 14% dos doentes com doença auto-imune da tiróide apresentavam anemia. No entanto a prevalência de ACPs é semelhante nos casos com e sem anemia.

Relativamente ao *Helicobacter pylori*, concluímos que no nosso estudo as determinações de serologia são raramente solicitadas nas doenças auto-imunes da tiróide (3 de 471 doentes) e mesmo nos casos de tiroidite que se associam a ACPs positivos (2 de 107 casos), o que sugere que a possível associação a esta infecção, não tem sido considerada clinicamente. Do mesmo modo, a investigação da auto-imunidade gástrica é realizada num número reduzido de casos.

**Palavras-chave:** Tiroidite auto-imune, anticorpos anti-peroxidase tiroideia, anticorpos anti-tiroglobulina, anti-receptor da tirotropina, gastrite atrófica auto-imune, anticorpos anti células parietais, anti factor intrínseco, *Helicobacter pylori*.

## Abstract

The autoimmune thyroid disease, including chronic lymphocytic thyroiditis and Grave's disease are organ-specific autoimmune diseases, characterized by lymphocytic infiltration of the thyroid. Autoantibodies against thyroid antigens (antibodies against thyroid peroxidase, anti thyroglobulin and anti the thyrotropin receptor) are often found in patients' serum.

Atrophic gastritis is a change that affects the gastric body mucosa. When associated with pernicious anemia it is often considered autoimmune, supported by the presence of parietal cell antibodies and anti intrinsic factor. Associations with other autoimmune diseases are common, particularly autoimmune thyroid diseases. Autoimmune gastritis and pernicious anemia are common autoimmune diseases, with a frequency corresponding to 2% and 0.1-1% of the general population, increasing with age. The prevalence in patients with autoimmune thyroid disease is also high. The autoimmune damage of parietal cells results in a reduction of acid secretion, hypergastrinemia, iron deficiency anemia and pernicious anemia, with deficit of vitamin B<sub>12</sub>, leading to an increased risk of developing cancer and gastric carcinoid tumors. Thus, early diagnosis of autoimmune atrophic gastritis is relevant to treat and prevent the progression of these conditions.

Recent data have shown that *Helicobacter pylori* infection, capable of inducing gastric mucosal atrophy, may be the initiator of gastric autoimmunity, being however hard to clearly distinguish between gastric atrophy and autoimmune atrophic gastritis induced by *Helicobacter pylori*.

Despite the frequent association of thyrogastric autoimmunity, it is not well defined the usefulness of systematic determinations of parietal cell antibodies in patients diagnosed with autoimmune thyroid disease, thus justifying a study in this area at Centro Hospitalar São João. Of the 463 patients with autoimmune thyroid disease, 414 (89%) had autoimmune thyroiditis classified by the positivity of anti thyroid peroxidase ( $308 \pm 345$  IU/mL) and/or anti thyroglobulin ( $139 \pm 248$  IU/mL) and 49 (11%) had Grave's disease, classified based on the presence of anti thyrotropin receptor positivity and thyroid stimulating hormone levels.

The diagnosis of autoimmune gastritis was laboratory confirmed in 120 patients and the prevalence of positive anti parietal cells (PCAs) were similar in both autoimmune thyroid disease. As to anti-intrinsic factor, their positivity in each of

autoimmune thyroid diseases is much lower than that for PCAs with identical distribution on both pathologies. About 4% of patients with autoimmune thyroid had anemia. However, the prevalence of PCAs is similar in cases with or without anemia.

With regard to *Helicobacter pylori*, we concluded that serology determinations are rarely required in autoimmune thyroid disease (3 of 471 patients) and even in cases which are associated with positive PCAs (2 of 107 patients), which suggest a possible association of this infection has not been clinically considered. Similarly, the investigation of gastric autoimmunity is performed in a few cases.

**Keywords:** Autoimmune thyroiditis, thyroid antiperoxidase antibodies, thyroglobulin antibodies, anti TSH receptor, autoimmune atrophic gastritis, parietal cell antibodies, anti intrinsic factor, *Helicobacter pylori*.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, terei de agradecer à Cespu, à Professora Doutora Roxana e Professor Doutor Proença pela oportunidade de realizar este mestrado em Análises Clínicas.

Ao Senhor Professor Doutor João Tiago Guimarães, Director do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar São João, por me ter incentivado e proporcionado a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Senhor Professor Doutor José Luís Dias Delgado, Director do serviço e laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina do Porto e regente da cadeira de Imunologia Básica e Imunologia Clínica, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, agradeço reconhecidamente o apoio, a orientação e o rigor que me transmitiu ao longo da elaboração desta dissertação e por todos os conhecimentos científicos e ensinamentos que me transmitiu.

Ao Dr. João Pedro Ramos, médico Patologista do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar São João, pela sugestão do tema de estudo.

Ao Dr. Celestino Neves, médico Endocrinologista do Centro Hospitalar São João, por todos os esclarecimentos relativos à classificação da doença auto-imune da tiróide.

Aos meus pais, irmã e namorado que me incentivaram, apoiaram e auxiliaram nesta etapa académica.

Para finalizar, agradeço o apoio de todos os colegas pela força e conselhos dados.

# Índice

1. Introdução	2
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Doença auto-imune da tiróide	4
2.1.1. Classificação	4
2.1.1.1. Tiroidite auto-imune crónica	4
2.1.1.2. Doença de Graves	6
2.1.2. Epidemiologia	7
2.1.3. Etiopatogenia	7
2.1.3.1. Susceptibilidade genética	10
2.1.3.2. Factores ambientais	10
2.1.3.3. Auto-imunidade	11
2.1.4. Diagnóstico laboratorial	14
2.1.4.1. Testes laboratoriais para a avaliação de hipertiroidismo e hipotiroidismo	15
2.1.4.2. Testes laboratoriais para diagnóstico de doença auto-imune da tiróide	16
2.2. Gastrite crónica	20
2.2.1. Gastrite atrófica auto-imune	20
2.2.1.1. Epidemiologia	23
2.2.1.2. Etiopatogenia	24
2.2.1.2.1. Susceptibilidade genética	24
2.2.1.2.2. Factores ambientais	24
2.2.1.2.3. Factores endócrinos e imunológicos	24
2.2.1.2.4. Auto-imunidade	25
2.2.1.3. Diagnóstico laboratorial	26
2.2.1.3.1. Testes laboratoriais para a avaliação de gastrite auto-imune	26
2.2.1.3.2. Testes laboratoriais para a avaliação de anemia perniciosa	26
2.2.2. Gastrite crónica por <i>Helicobacter pylori</i>	29

2.2.2.1. Diagnóstico laboratorial	31
2.2.2.2. Papel da infecção do <i>Helicobacter pylori</i> no desenvolvimento de auto-imunidade	33
2.3. Associação entre doença auto-imune da tiróide e gastrite crónica	37
3. Objectivos	39
4. Material e Métodos	41
4.1. Identificação da população e da amostra	41
4.2. Metodologia	42
4.2.1. Variáveis estudadas	42
4.2.2. Colheita, preparação e estabilidade da amostra	43
4.2.3. Métodos analíticos	43
4.2.3.1. Pesquisa de auto-anticorpos por Imunofluorescência Indirecta	44
4.2.3.2. Pesquisa de auto-anticorpos por ELISA	45
4.2.3.3. Quimioluminiscência	47
4.2.3.4. Determinação sérica de Ferro e Ferritina	48
4.2.3.5. Hemograma	48
4.2.3.6. Pesquisa de anti <i>Helicobacter pylori</i> IgG e IgA	49
4.3. Métodos estatísticos	51
5. Resultados	53
5.1. Caracterização da amostra	53
5.2. Prevalência de anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco em indivíduos com doença auto-imune da tiróide	58
5.3. Impacto clínico da positividade de anticorpos anti células parietais e factor intrínseco na doença auto-imune da tiróide	63
5.4. Associação entre auto-imunidade da tiróide e gástrica com infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	67
6. Discussão	71
7. Conclusão	81
8. Bibliografia	84

## Índice de figuras

<b>Figura 1-</b> Sequência de passos na patogénese das doenças tiroideias auto-imunes .....	8
<b>Figura 2-</b> Resultados clinicopatológicos distintos após a apresentação do antigénio a diferentes subpopulações de linfócitos.....	14
<b>Figura 3-</b> Diagnóstico diferencial de DAIT, com base na avaliação endócrina e imunológica.....	15
<b>Figura 4-</b> Representação esquemática da imunopatologia e manifestações de gastropatia auto-imune.....	23
<b>Figura 5-</b> Interações do <i>Helicobacter pylori</i> com a patologia gástrica no homem.....	30
<b>Figura 6-</b> Imunofluorescência Indirecta para anti células parietais.....	45

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1-</b> Testes para identificação do <i>Helicobacter pylori</i> .....	31
<b>Tabela 2-</b> Valores de referência para aTPO, aTG, TSH, T4L e T3L e vitamina B <sub>12</sub> .....	47
<b>Tabela 3-</b> Valores de referência dos índices hematológicos.....	49
<b>Tabela 4-</b> Resultados do teste EUROLINE-WB IgA e IgG.....	50
<b>Tabela 5-</b> Classificação dos 414 doentes com tiroidite auto-imune.....	54
<b>Tabela 6-</b> Classificação dos 49 doentes com Doença de Graves.....	55
<b>Tabela 7-</b> Distribuição dos 414 e doentes com tiroidite auto-imune de acordo com a classificação da doença pelos diferentes intervalos etários e sexo.....	56



<b>Tabela 8-</b> Distribuição dos 49 doentes com doença de Graves de acordo com a classificação da doença pelos diferentes intervalos etários.....	57
<b>Tabela 9-</b> Frequência de anticorpos anti células parietais nos três grupos de doentes com tiroidite auto-imune.....	58
<b>Tabela 10-</b> Frequência de anticorpos anti células parietais nos dois grupos com doença de Graves.....	59
<b>Tabela 11-</b> Distribuição dos anticorpos anti células parietais de acordo com a idade nos dois grupos de doentes com patologia auto-imune da tiróide.....	59
<b>Tabela 12-</b> Frequência de anticorpos anti factor intrínseco nos três grupos de doentes com tiroidite auto-imune.....	60
<b>Tabela 13-</b> Distribuição dos anticorpos anti factor intrínseco de acordo com a idade nos dois grupos de doentes com patologia auto-imune da tiróide.....	61
<b>Tabela 14-</b> Associação dos anticorpos anti células parietais com os anticorpos anti factor intrínseco nos doentes com tiroidite auto-imune e doença de Graves.....	61
<b>Tabela 15-</b> Resultados laboratoriais para cada um dos parâmetros hematológicos em cada uma das doenças auto-imunes da tiróide.....	63
<b>Tabela 16-</b> Comparação dos parâmetros hematológicos e vitamina B <sub>12</sub> nos doentes com e sem anemia.....	64
<b>Tabela 17-</b> Associação dos anticorpos anti células parietais com a presença de anemia nos doentes com tiroidite auto-imune e doença de Graves.....	64
<b>Tabela 18-</b> Comparação dos parâmetros hematológicos nos doentes com doença auto-imune da tiróide que têm anemia com os anticorpos anti células parietais.....	65
<b>Tabela 19-</b> Comparação dos parâmetros hematológicos e vitamina B <sub>12</sub> nos doentes com doença auto-imune da tiróide com os anticorpos anti células parietais e/ou anti factor intrínseco.....	65
<b>Tabela 20-</b> Associação dos anticorpos anti células parietais e/ou factor intrínseco positivos nos casos com doença auto-imune da tiróide com anemia.....	66

<b>Tabela 21-</b> Associação dos anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco com a serologia de <i>H. pylori</i> .....	69
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Índice de gráficos

<b>Gráfico 1-</b> Distribuição dos doentes com doença auto-imune da tiróide pelos diferentes intervalos etários e de acordo com o sexo.....	56
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Gráfico 2-</b> Distribuição pelas diferentes áreas médicas das amostras com pedidos de serologia para <i>Helicobacter pylori</i> .....	68
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Lista de abreviaturas

**ACG-** Do inglês, *American College of Gastroenterology*

**ACPs-** Anticorpos anti células parietais

**AP-** Anemia perniciosa

**APCs-** Células apresentadoras de antígenos (do inglês, *antigen presenting cells*)

**APS-** Síndrome poliglandular auto-imune

**aTG-** Anti tiroglobulina

**aTPO-** Anti peroxidase tiroideia

**CA-2-** Antígeno coloidal

**CagA-** Citotoxina proteína A associada

**CMHG-** Concentração média de hemoglobina globular

**CMIA-** Imunoensaio de quimioluminescência de micropartículas (do inglês, *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*)

**CO<sup>2</sup>-** Dióxido de carbono

**CTLA-4-** Do inglês, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*

**DAIT-** Doença auto-imune da tireóide

**DG-** Doença de Graves

**ECL-** Células enterocromafins (do inglês, *enterochromaffin-like*)

**EDTA K3-** Etilenodiaminotetracético-tripotássico

**EHSG-** Do inglês, *Helicobacter European Study Group*

**ELISA-** Ensaio de imunoadsorção enzimático (do inglês, *enzyme linked immunoabsorbent assay*)

**FITC-** Anti imunoglobulina humana fluorescente

**GAI-** Gastrite atrófica auto-imune

**GERD-** Do inglês, *gastroesophageal reflux disease*

**GR-** Glóbulos rubros

***H. pylori-*** *Helicobacter pylori*

**H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase-** Enzima adenosina trifosfatase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-** Peróxido de hidrogénio

**Hgb-** Hemoglobina

**HGM-** Hemoglobina globular média

**HLA-** Antígeno leucocitário humano (do inglês, *Human leukocyte antigen*)

**IFA-** Anti factor intrínseco

**IFN  $\gamma$ -** Interferão gama

**IL2-** Interleucina 2

**MHC-** Antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*)

**NIH-** Do inglês, *National Institutes of Health*

**NK-** Células *natural killer*

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>-** Superóxido

**PBS-** Tampão fosfato salina

**PPIs-** Inibidores da bomba de prótons (do inglês, *Proton pump inhibitors*)

**PTPN22-** Do inglês, *protein tyrosine phosphatase nonreceptor-type 22*

**RLUs-** Unidades relativas de luz

**SPSS-** Do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*

**T3-** Triiodotironina

**T4L-** Tiroxina livre

**TCR-** Receptores de células T (do inglês, *T-cell receptor*)

**TGF- $\beta$ -** Factor de crescimento transformante (do inglês, *Transforming growth factor  $\beta$* )

**TH-** Tiroidite de Hashimoto

**TMB-** Tetrametilbenzidina

**TNF  $\alpha$ -** Factor de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor -  $\alpha$* )

**TPTZ-** Tri-(2-piridil)-5-triazina

**TRAb-** Anti receptor da tirotropina

**Treg-** Células T regulatórias

**TSH-** Hormona estimulante da tiróide

**UBT-** Teste respiratório da Ureia C<sub>13</sub> (do inglês, *urea breath test*)

**VCM-** Volume corpuscular médio

**VPN-** Valor preditivo negativo

**VPP-** Valor preditivo positivo

**VG-** Volume Globular

**WB-** Do inglês, *Western Blot*

**VacA-** Citotoxina vacuolizadoras A

# ***Introdução***

---

# 1. Introdução

As doenças auto-imunes representam actualmente um grupo de patologias que se caracterizam por terem como mecanismo fisiopatológico a presença de determinados auto-anticorpos, ou células, que reagem contra constituintes do próprio organismo (*self*), causando lesão. Estas doenças manifestam-se com quadros clínicos variáveis, podendo atingir desde apenas um órgão, até ao envolvimento multissistémico, em parte dependendo da origem do auto antígeno (Lleo, Invernizzo, Gao, Podda & Gershwin, 2009).

A auto-imunidade surge na sequência de uma falha nos mecanismos de tolerância central e periférica (Hoyne, 2011). As causas da perda de tolerância podem ser intrínsecas, dependentes de características do próprio indivíduo, ou extrínsecas. Factores genéticos responsáveis por codificar moléculas de histocompatibilidade, componentes da imunidade inata, como o sistema do complemento e receptores *Toll-like*, componentes da imunidade adquirida, como linfócitos com actividade reguladora e citocinas, bem como factores hormonais constituem exemplos de causas intrínsecas. Factores ambientais como infecções bacterianas e virais, exposição a agentes físicos e químicos, como ultra violetas, pesticidas e drogas, são exemplos de causas extrínsecas (Limmer *et al.*, 1998).

Dos estudos sobre a associação entre doenças auto-imunes, existe um conjunto de dados que apontam para uma associação clínica e etiopatogénica entre as doenças auto-imunes da tiróide e as gastrites, o que justifica a frequente investigação laboratorial desta área, neste centro hospitalar.

Iniciou-se este trabalho por uma revisão teórica acerca das patologias que são objecto de estudo. A primeira parte versa sobre as doenças auto-imunes da tiróide e gastrites crónicas (auto-imunes e por *Helicobacter pylori*), a sua classificação, patogénese e diagnóstico laboratorial, assim como os elos de associação entre as duas patologias. Na segunda parte da pesquisa, faz-se uma apresentação dos procedimentos metodológicos que suportaram o estudo e a terceira, e quarta parte, inclui a apresentação mais aprofundada dos resultados e a sua discussão.

Nas conclusões expõem-se as limitações do estudo e os contributos para o conhecimento originados pelo trabalho, através da análise e discussão dos seus resultados.

# ***Revisão Bibliográfica***

---



## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Doença auto-imune da tiróide

A doença auto-imune da tiróide (DAIT) é uma das endocrinopatias mais frequentemente encontrada afectando cerca de 2% a 5% da população geral, em especial mulheres adultas e idosos (Sgarbi & Maciel, 2009). Trata-se de uma doença auto-imune específica de órgão e que pode também ocorrer como parte de uma síndrome poliglandular auto-imune (Sterzl, Hrdá, Matucha, Cerovská, & Zamrazil, 2008).

Envolve um largo espectro de fenótipos cujos principais representantes são a doença de Graves (DG) e a tiroidite auto-imune crónica, ambas caracterizadas pela presença de infiltrado linfocítico de intensidade variável e produção de auto-anticorpos tiroidianos - anti-tiroglobulina (aTG), anti-peroxidase tiroideia (aTPO) e anti-receptor da tirotropina (TRAb) - dirigidos a antigénios específicos, determinantes da expressão clínica da doença, que pode variar do hiper ao hipotiroidismo (Melo, 2006; Sgarbi & Maciel, 2009).

Estas síndromes auto-ímmunes podem partilhar a predisposição genética, alterações imunológicas e histológicas da tiróide. Os doentes podem passar de uma a outra categoria, dependendo da fase da doença. Por exemplo, num indivíduo pode ser primeiro observado um aumento da tiróide e presença de anticorpos aTG ou aTPO positivos, e ser, portanto, classificado como tendo tiroidite auto-imune. Numa fase posterior, este indivíduo pode tornar-se hipertiroideu e apresentar-se clinicamente na categoria de DG, ou, o doente pode ter uma progressiva destruição da tiróide e tornar-se hipotiroideu ou desenvolver mixedema (DeGroot, 2012).

#### 2.1.1. Classificação

A tiroidite auto-imune crónica com ou sem bócio, acompanhada ou não de hipotiroidismo, e a DG caracterizada tipicamente pela presença de hipertiroidismo, bócio e exoftalmopatia, representam as duas principais formas de DAIT. A tiroidite linfocítica silenciosa, tiroidite sub aguda, tiroidite pós-parto e a “hashitoxicose” são consideradas variantes ou subtipos de DAIT que costumam evoluir com disfunção transitória da glândula (Weetman, 2003; Swain, Swain & Mohanty, 2005).

### 2.1.1.1. Tiroidite auto-imune crónica

É a tiroidite mais frequente e constitui a causa mais comum de bócio e hipotiroidismo nos países em que a alimentação fornece um aporte suficiente de iodo. Também é designada por tiroidite linfocítica crónica ou tiroidite de Hashimoto (TH), embora classicamente a última designação implique a presença de bócio, o que nem sempre acontece (Vieira, Carrilho, & Carvalheiro, 2008).

Até 95% dos casos ocorre em mulheres afectando pessoas de todas as idades, essencialmente as que se encontram entre os 30 e 50 anos. A sua incidência tem aumentado exponencialmente nos últimos 50 anos, o que pode estar relacionado com o aumento do conteúdo de iodo na alimentação (Vieira *et al.*, 2008).

É caracterizada histologicamente pela infiltração multifocal ou difusa da glândula da tiróide por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A característica imunopatológica predominante da tiroidite é a infiltração celular por linfócitos B e T. Esta infiltração resulta na formação de nódulos linfóides com destruição dos folículos e na substituição progressiva do tecido normal glandular por tecido conjuntivo fibroso (Armengol *et al.*, 2001; Swain *et al.*, 2005). Os folículos remanescentes são pequenos e, podem ser encontrados linfócitos, macrófagos e células degenerativas foliculares dentro dos colóides vacuolizados. Macroscopicamente, a tiróide pode parecer normal ou atrófica (Cunha, Ferreira, Marcello, Vassalo, & Ward, 2011).

A designação de TH deve-se a Hashimoto (Hashimoto, 1912), referindo-se a doentes com bócio e infiltração linfocítica intensa da tiróide. Alguns clínicos reservam esta designação para doentes com bócio e hipotiroidismo. Contudo, muitos doentes não apresentam hipotiroidismo e outros não apresentam bócio podendo apresentar mesmo tiróide atrófica. Estas são consideradas manifestações da mesma doença com fenótipos clínicos diferentes (Vieira *et al.*, 2008).

As principais manifestações clínicas são os sinais e sintomas de hipotiroidismo que apenas se desenvolvem quando aproximadamente 75% da glândula é destruída. Muito raramente pode haver alternância de hiper e hipotiroidismo. Na maioria dos doentes está presente um bócio firme, simétrico e indolor e cerca de 10% têm glândulas atróficas (Melo, 2006).

Assim, são apresentações de TH: eutiroidismo e bócio; hipotiroidismo subclínico e bócio; falha primária da tiróide; hipotiroidismo; bócio adolescente;

tiroidite indolor ou tiroidite silenciosa; tirotoxicose indolor pós parto; alternância de hipo e hipertireoidismo (Akamizu, Amino, & De Groot, 2012).

A progressão entre os estadios, de tiroidite subclínica para hipotireoidismo clínico com anticorpos e deste último para o hipotireoidismo clínico sem anticorpos, pode decorrer em 1 a 2 anos. O curso natural da doença é a perda gradual da função tiroideia. Entre os doentes com esta patologia que apresentam aumentos moderados de hormona estimulante da tiróide (TSH) e na presença de anticorpos anti tiroideus, o hipotireoidismo ocorre a uma taxa de 5% ao ano (Vieira *et al.*, 2008). Durante este processo inflamatório são libertados em circulação vários tipos de anticorpos dirigidos a diferentes antigénios. Com efeito, estão identificados diversos anticorpos contra a tiroglobulina, contra o antigénio microssomal da tiroperoxidase, contra o antigénio coloidal (CA-2), contra o transportador Na/I e ainda contra os receptores de TSH (Swain *et al.*, 2005). Analiticamente salienta-se a presença de aTPO fortemente positivos em cerca de 90% dos casos. Estes são o grande marcador da doença e actualmente são usados para definir a existência de uma tiroidite auto-imune. Os aTG estão presentes em 20-50% dos doentes. Os títulos de anticorpos tendem a ser mais elevados nos doentes com a forma atrófica do que nos que apresentam bócio. A TSH encontra-se normal ou aumentada e muito raramente diminuída (Chistiakov & Turakulov, 2003; Vieira *et al.*, 2008).

#### **2.1.1.2. Doença de Graves**

O hipertireoidismo de Graves é causado por anticorpos estimuladores da tiróide que se ligam e activam o receptor TSH nas células da tiróide (anticorpos anti-receptores da TSH). Estes anticorpos não causam apenas hipersecreção da hormona tiroideia, como ainda provocam hiperplasia e hipertrofia dos folículos da tiróide originando bócio. A DG partilha também aspectos imunológicos com a tiroidite auto-imune, nomeadamente a presença sérica de anticorpos anti-tiroglobulina e anti-peroxidase da tiróide (Neves, Alves, Delgado & Medina, 2008).

Um valor de TSH reduzido associado a um valor elevado de tiroxina livre (T4 livre) confirma o diagnóstico clínico de hipertireoidismo. Nos estadios mais precoces da doença poderá haver apenas subida da triiodotironina (T3), pelo que o doseamento de T3 livre deve ser efectuado em doentes com níveis de TSH

reduzidos, mas níveis de T4 livre dentro dos limites normais (Chistiakov & Turakulov, 2003; Neves *et al.*, 2008).

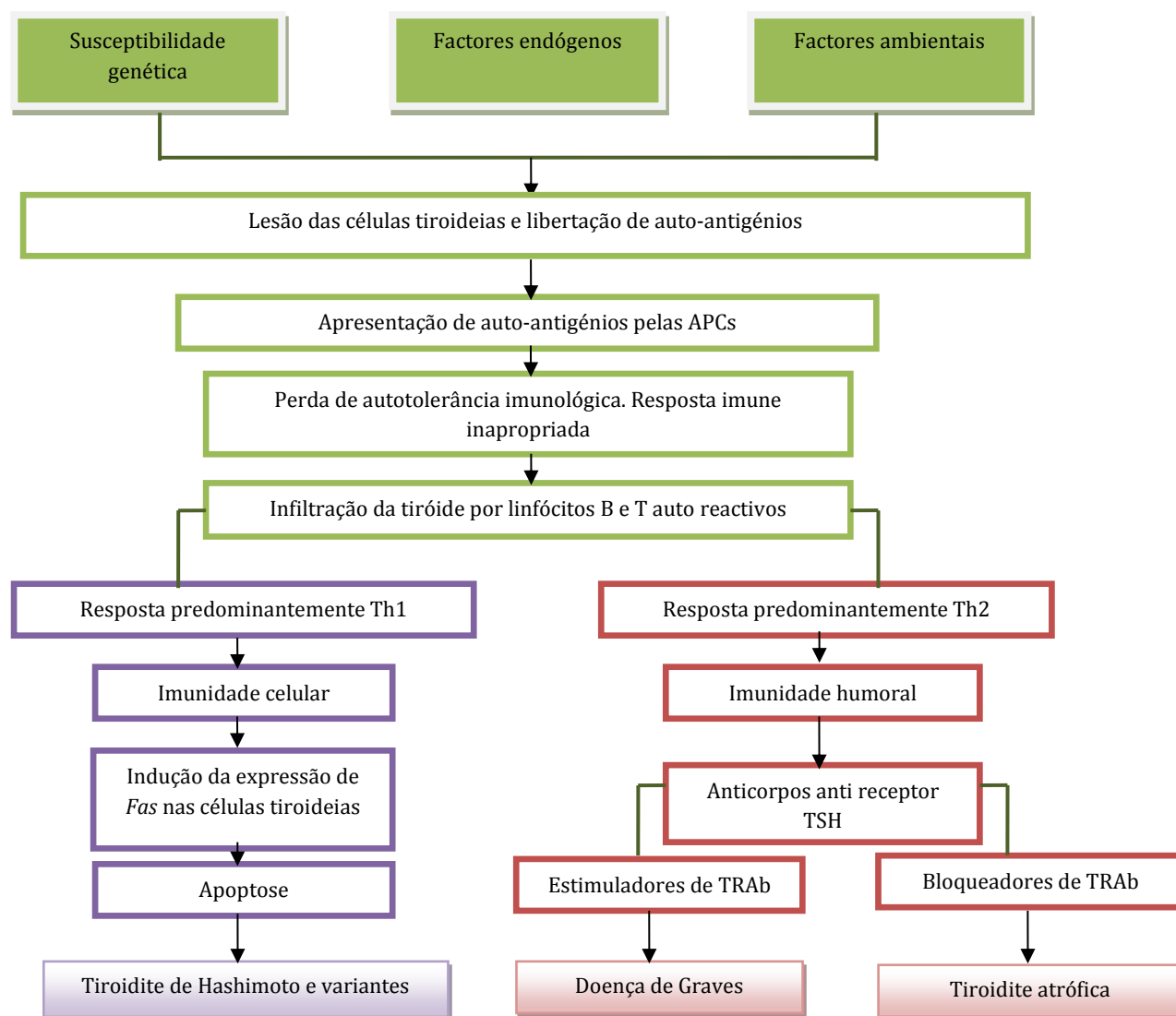
A DG afecta aproximadamente 0,5% da população em geral e é a causa subjacente de 50 a 80% dos casos de hipertiroidismo. Mulheres têm o risco de desenvolver a doença cinco a dez vezes superior aos homens (Neves *et al.*, 2008). Os haplótipos de risco são DQA1\*0501 e DQB1\*0302. A severidade e duração da doença e a idade do doente determinam as manifestações de hipertiroidismo: nervosismo, sono perturbado, fadiga, palpitações e fibrilação atrial, intolerância alimentar, perda de peso e oftalmopatia de Graves (Driessche, Eenkhoorn, Van Gaal, & DeBlock, 2009).

### **2.1.2. Epidemiologia**

A prevalência da doença da tiróide na população geral é elevada, porém variável entre os diversos estudos epidemiológicos. Factores associados a susceptibilidade genética, diferenças ambientais (como a quantidade de iodo consumida na alimentação), distribuição da população estudada quanto ao sexo e idade, e ao método laboratorial usado na definição da doença são os principais responsáveis pela diferença entre os estudos. No entanto existe concordância nos resultados no que se refere à predominância de DAIT no sexo feminino e ao aumento de prevalência da doença com a idade (Bjoro *et al.*, 2000; Hollowell *et al.*, 2002).

### **2.1.3. Etiopatogenia**

A Figura 1 esquematiza os principais passos dos mecanismos de susceptibilidade, desenvolvimento e progressão da auto-imunidade tiroideia.



**Figura 1-** Sequência de passos na patogénese das doenças tiroideias auto-imunes. Figura adaptada de Melo M, 2006.

Os mecanismos exactos responsáveis pelo desenvolvimento da TH ou da DG continuam por esclarecer, ainda que se verifique uma elevada prevalência de TH em humanos, mas admite-se que o sinal inflamatório inicial seria emitido por lesão ou necrose celular desencadeada por diferentes factores. (Sgarbi & Maciel, 2009). Desta forma a patogénese da DAIT é um processo de múltiplas etapas determinado pela perda de tolerância imunológica e da reactividade a auto-antigénios da tiróide, acumulação de linfócitos T auto reactivos na glândula da tiróide, produção de auto-anticorpos e pela expressão clínica de hipertiroidismo na DG e de hipotiroidismo na TH (Chistiakov, 2005; Kondrashova *et al.*, 2008), para o qual contribuem, quer

factores genéticos, quer factores ambientais e endógenos que conjuntamente desequilibram a tolerância imunitária e, deste modo, podem desencadear processos de agressão auto-imune da tiróide (Prummel, Strieder, Wiersinga, 2004; Sterzl *et al.*, 2008).

Tolerância é a capacidade que o sistema imunológico tem de discriminar antigénios próprios de não próprios e desencadear uma resposta imune apenas contra moléculas estranhas, sendo mantida por um complexo conjunto de mecanismos centrais e periféricos. A tolerância central ocorre no timo pela deleção de células T que se ligam com alta afinidade a peptídeos endógenos e onde os linfócitos fetais estão em contacto com células epiteliais que expressam uma variedade de antigénios de tecidos e antigénios do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) classe I e II (Zaletel & Gaberšček, 2011). Quando este processo falha, células T efectoras auto reactivas podem escapar da selecção negativa tímica e migrar para a periferia, onde são inibidas pelas células T CD4<sup>+</sup> regulatórias (*Treg*) (Lichiardopol & Mota, 2009). As *Treg*, geradas no timo, expressam as moléculas CD25 e CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) e são consideradas essenciais para a supressão da resposta imune mediada por células T e na prevenção da doença auto-imune em pessoas saudáveis (Weetman, 2003). Para tal, desempenham efeitos supressores nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> auto reactivos, nas células apresentadoras de antigénios (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) e nos linfócitos B, evitando respostas imunológicas a auto-antigénios e suprimindo respostas imunes excessivas (Sakaguchi, Yamaguchi, Nomura & Ono, 2008; Hoyne, 2011).

Apenas são mantidos os linfócitos T, que têm a capacidade de reconhecer os auto-antigénios do MHC mas, que não fazem ligações suficientemente fortes de modo a iniciarem uma resposta citotóxica (selecção positiva). Estas células tornam-se linfócitos T CD4 ou CD8 e podem ligar-se aos MHC classe II ou I, respectivamente, onde os seus receptores de células T (TCR, do inglês *T-cell receptor*) para antigénios têm especificidade para epítomos estranhos ao organismo.

Vários mecanismos periféricos de tolerância impedem as células que, escapam à tolerância central, de provocar auto-imunidade, nomeadamente, a apoptose e a anergia dos linfócitos T reactivos, a não apresentação de sinais que permitam o reconhecimento de auto antigénios e a supressão por *Treg* activos, já

referida. O TGF- $\beta$  (do inglês *Transforming growth factor*  $\beta$ ), produzido pelos *Tregs*, pelos fibroblastos, macrófagos, pelas células endoteliais e pelos tirócitos, é também um regulador essencial da tolerância imunitária periférica. Este é um inibidor forte da diferenciação das células T e da actividade citolítica dos linfócitos T citotóxicos e das células *natural killer* (NK) (Zaletel & Gaberšček, 2011).

### **2.1.3.1. Susceptibilidade genética**

Actualmente está demonstrada uma forte influência genética nas doenças auto-imunes da tiróide (aproximadamente 80%), sendo conhecida a contribuição de vários genes de susceptibilidade, como genes imunoreguladores do complexo dos antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *Human leukocyte antigen*), CTLA-4 e PTPN22 (*Protein tyrosine phosphatase nonreceptor-type 22*), bem como um gene específico da tiróide – gene da tiroglobulina (Tomer & Amanda, 2009; Cappa, Bizzarri, & Crea, 2011).

O MHC foi o primeiro locus associado à susceptibilidade da DAIT no Homem. O MHC codifica as proteínas HLA que estão localizadas nas células apresentadoras de antígenos, desempenhando assim um importante papel na activação da resposta imune. A região HLA é altamente polimórfica, sendo que a existência de alelos HLA específicos com uma maior afinidade para auto-antígenos tiroideus contribui significativamente para o desenvolvimento da DAIT (Jacobson, Huber, & Tomer, 2008; Zaletel & Gaberšček, 2011).

### **2.1.3.2. Factores ambientais**

O facto de não ocorrer uma concordância de 100% da contribuição genética na etiologia da DAIT entre gémeos monozigóticos suporta uma influência de factores ambientais na doença (Brix, Kyvik, & Hegedüs, 2000).

Em contraste ao que é conhecido acerca da predisposição genética da doença, pouco se conhece relativamente aos agentes ambientais que podem desencadear auto-imunidade num indivíduo geneticamente predisposto (Burek & Talor, 2009). Os factores ambientais que têm sido implicados no desenvolvimento da tiroidite auto-imune são o excesso ou a deficiência de iodo, a deficiência em selénio, o microquimerismo fetal, a infecção, os fármacos e os poluentes ambientais

(Prummel *et al.*, 2004; Zaletel & Gaberšček, 2011), sendo a dieta o factor que mais provavelmente afecta os doentes. Tanto o excesso, como a deficiência de iodo na dieta, podem causar alterações na biossíntese das hormonas tiroideias. Estão descritos vários mecanismos através dos quais o iodo promove o aparecimento da tiroidite, destacando-se entre eles: o aumento da antigenicidade de porções da tiróide através da iodação dos epítomos mais antigénicos; a interacção do iodo com radicais livres de oxigénio como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) ou o superóxido ( $O_2^-$ ), originando radicais de iodo, os quais podem provocar danos na membrana lipídica e nas proteínas; a iodação dos lípidos ou proteínas, para além da tiroglobulina, que podem actuar como activadores imunogénicos (Brown, Zhao, Palmer & Sundick, 1991; Sundick, Bagchi, & Brown, 1992).

Um dos factores que aumenta a predisposição dos indivíduos femininos para a DAIT é o microquimerismo fetal. Este é definido pela presença de células fetais no tecido materno transferido para a circulação materna durante a gravidez. As células imunitárias fetais deslocam-se para a glândula da tiróide, onde podem tornar-se activas no período pós-parto, no momento da suspensão da imunotolerância maternal, podendo ampliar ou iniciar a DAIT (Greer *et al.*, 2011; Zaletel & Gaberšček, 2011).

As infecções causadas por vários agentes como os vírus, as bactérias e os protozoários têm sido implicadas na patogénese da tiroidite auto-imune. Esta hipótese sugere que a activação dos linfócitos T CD4 específicos para antigénios da tiróide possa ser provocada pela presença de agentes infecciosos (Dayan & Daniels, 1996).

### **2.1.3.3. Auto-imunidade**

A auto-imunidade é representada pela perda da autotolerância, na qual o sistema imunitário identifica os auto-antigénios como antigénios estranhos ao organismo, desenvolvendo um ataque aos próprios tecidos. No entanto, no organismo, existem mecanismos que previnem a auto-imunidade da tiróide, mas quando sujeitos a alterações, ocorre o desaparecimento da tolerância imunitária e, conseqüentemente, o desenvolvimento da tiroidite auto-imune (Rioux & Abbas, 2005).



### Desenvolvimento da auto-imunidade na tiróide

Os mecanismos exactos de iniciação e progressão da tiroidite auto-imune, bem como a ausência de supressão desempenhada pelas *Tregs* aquando do desenvolvimento da resposta auto-imune, ainda não estão completamente esclarecidos (Zaletel & Gaberšček, 2011).

Para a iniciação da tiroidite auto-imune é necessária uma interacção entre as células foliculares tiroideias, as APCs, e os linfócitos T auto reactivos, da qual resulta uma resposta auto-imune contra os antigénios da tiróide (Zaletel & Gaberšček, 2011). Esta interacção é desencadeada pela emissão de um sinal inflamatório, produzido por lesões não específicas ou pela necrose das células tiroideias, provocados por múltiplos factores, tais como a susceptibilidade genética, as infecções bacterianas ou virais, o *stress*, o excesso de iodo ou as alterações do microambiente local, como já referido anteriormente (Melo, 2006). Esta lesão inicial atrai uma quantidade expressiva de APCs para o interior da tiróide que, por sua vez, vão apresentar auto antigénios da tiróide aos linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (Melo M, 2006; Sgarbi & Maciel, 2009).

Uma vez dentro da tiróide, os linfócitos organizam-se em centros germinativos, com um padrão distinto de adesão molecular, onde se vão desenvolver vénulas bem formadas e se vão produzir citocinas (Armengol *et al*, 2001; Lichiardopol & Mota, 2009). Durante este processo patogénico o infiltrado linfocítico vai desenvolver respostas Th1 (Linfócitos T auxiliares 1) e Th2 (Linfócitos T auxiliares 2), com um desvio para um padrão de Th1 (Wang & Baker, 2007). Assim, a resposta auto-imune tem um predomínio de produção de citocinas do tipo Th1 como o factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor -  $\alpha$* ), o interferão gama (IFN- $\gamma$ ) e a interleucina 2 (IL-2). As citocinas libertadas, principalmente o IFN- $\gamma$ , podem induzir a expressão de moléculas MHC classe II na superfície das células foliculares tiroideias transformando-as em APCs (Weetman, 2003; Sgarbi & Maciel, 2009).

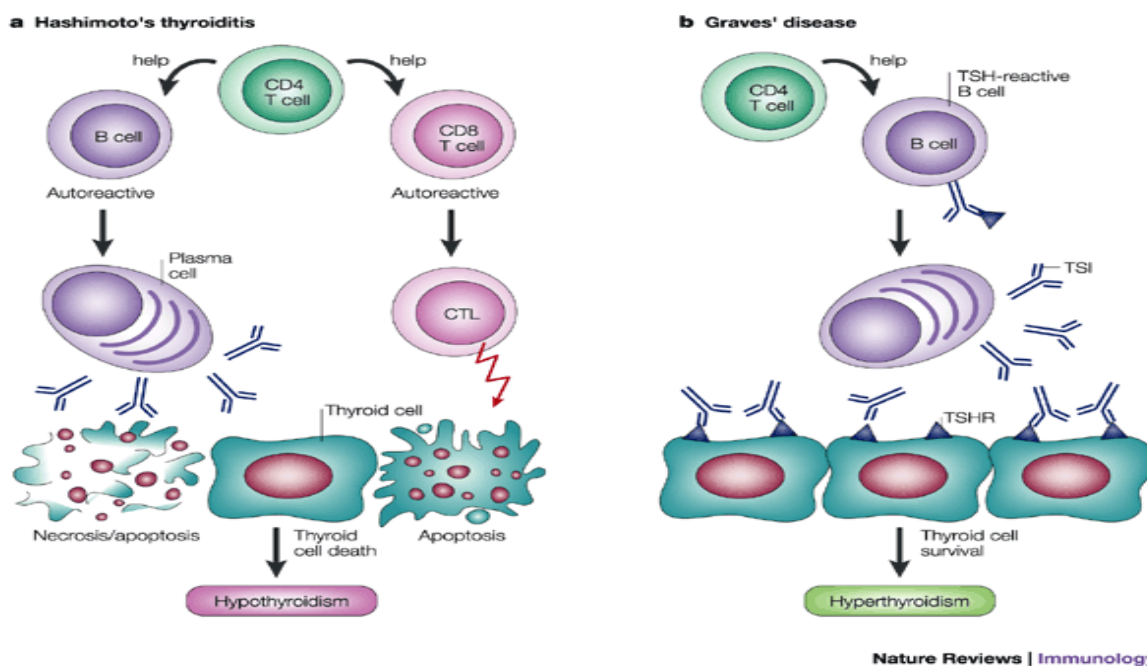
De acordo com o padrão de citocinas produzido pelas células T *helper*, que vai estar dependente de factores individuais e outros ainda não conhecidos, poderemos ter uma evolução no sentido da destruição auto-imune da tiróide, levando a uma tiroidite auto-imune crónica ou de Hashimoto, ou no sentido da estimulação da glândula que levará a uma DG. Assim, no caso de haver uma

polarização Th1, com predomínio de citocinas como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, vai existir um predomínio dos mecanismos de imunidade celular, com infiltração linfocitária da tiróide exuberante e citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8 citotóxicos e pelo complemento. A apoptose, sobretudo através de mecanismos dependentes do receptor *Fas* ou CD95, vai ter também um papel preponderante na destruição tiroideia. Se pelo contrário houver uma polarização Th2, com predomínio de citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-10, vamos assistir a uma dominância dos mecanismos de imunidade humoral, com produção de anticorpos estimuladores dos receptores da TSH e escassa infiltração linfocitária (Melo M, 2006).

Na DG, o infiltrado tiroídiano de células T activa as células B para a produção de TRAb, o qual ocupa e activa o TSHR, estimulando a tiróide e determinando o hipertiroidismo. Por outro lado, na TH, as células T induzem a apoptose das células foliculares e a destruição da arquitectura glandular e hipotiroidismo. Embora inicialmente consideradas como doenças distintas, numa visão mais moderna e actual, DG e TH representariam lados opostos ou finais diferentes de um mesmo processo imunopatológico (Collins & Gough, 2002; Neves C *et al.*, 2008)

Os polimorfismos do gene CTLA-4 ou a mutação do gene CD 25 associam-se com doenças auto-imunes em humanos e a depleção das células *Treg* tem sido relacionada com o desenvolvimento de tiroidite auto-imune, apoptose celular e a progressão do hipertiroidismo da DG ao hipotiroidismo da TH, que ocorre naturalmente em alguns casos (Weetman AP, 2003; Zeitin, Simmonds, & Gough, 2008; Sgarbi & Maciel, 2009).

Na Figura 2 está representado os resultados alternativos (hipotiroidismo ou hipertiroidismo) após a apresentação do antigénio.

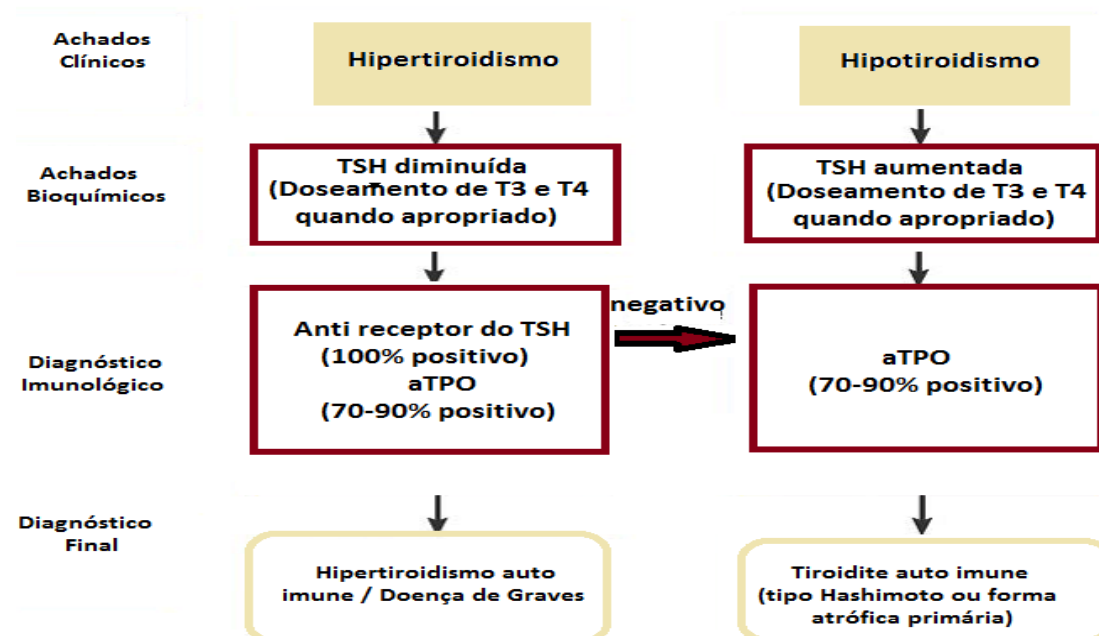


**Figura 2- Resultados clinicopatológicos distintos após a apresentação do antígeno a diferentes subpopulações de linfócitos.** Figura adaptada de Stassi & DeMaria, 2002. **a)** Na tireoidite de Hashimoto, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> auto reactivos recrutam células B e células T CD8<sup>+</sup> para a tireoide. A progressão da doença provoca a morte das células da tireoide e hipotireoidismo. Ambos os auto-anticorpos e linfócitos T citotóxicos específicos da tireoide têm sido propostos como responsáveis pela depleção auto-imune do tireócito. **b)** Na doença de Graves, as células T CD4<sup>+</sup> activadas induzem as células B a secretar imunoglobulinas estimulantes da tireoide, que reconhecem o receptor da hormona estimulante da tireoide, resultando na produção desregulada de hormonas da tireoide e hipertireoidismo.

#### 2.1.4. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de doença auto-imune da tireoide é feito com base em achados clínicos e investigação laboratorial. A avaliação laboratorial tem por base a quantificação de anticorpos aTPO e aTG circulantes. Uma vez que cerca de 98% dos doentes são positivos para estes anticorpos, um teste negativo virtualmente exclui DAIT. O aTPO é mais específico e sensível que o aTG no diagnóstico de tireoidite auto-imune. Níveis de TSH aumentados com presença de aTPO positivos é considerado o “*Gold standard*” para diagnóstico de TH. Os níveis de TRAb que estimulam TSHR são medidos para identificar a doença de Graves (Swain *et al.*, 2005). De acordo com o tipo e estadio da doença o indivíduo pode ser classificado como eutiroideu, hipotiroideu ou hipertiroideu (Swain *et al.*, 2005). Na Figura 3 estão

esquematizadas as etapas laboratoriais no diagnóstico diferencial de doença auto-imune da tiróide.



**Figura 3-** Diagnóstico diferencial de DAIT, com base na avaliação endócrina e imunológica. Figura traduzida e adaptada de Schott & Scherbaum, 2006.

#### 2.1.4.1. Testes laboratoriais para a avaliação de hipertiroidismo e hipotiroidismo

##### Hormonas da tiróide

Os objectivos dos exames laboratoriais para a função tiroideia são: identificar alterações da função tiroideia, classificar as doenças da tiróide e seguir o tratamento destas doenças.

Sob condições fisiológicas normais o mecanismo regulador central da função da tiróide é a libertação pituitária da TSH. A medição dos níveis séricos de TSH são, assim, uma forma indirecta de avaliar a libertação da hormona tiróideia e consequentemente a sua distribuição para os órgãos finais. Em muitos casos, o ensaio isolado de TSH basal constitui uma investigação satisfatória da função tiroideia (Schott & Scherbaum, 2006). Na avaliação funcional da tiróide, o TSH ultra-

sensível (3ª geração) é um teste de 1ª linha, uma vez que não sofre influência de proteínas transportadoras, consegue diferenciar adequadamente os estados clínicos, dá o reflexo das alterações a nível tecidual, é de fácil execução e tem um custo operacional acessível (Romaldini, Sgarbi, & Farah, 2004).

Quando são requeridos os níveis séricos de hormonas tiroideias, devem medir-se os níveis de hormonas livres, uma vez que estas representam um verdadeiro reflexo da hormona perifericamente disponível. O doseamento de T4 total sem referência às proteínas de ligação (mais de 99% da tiroxina é ligado às proteínas) é inútil. Por sua vez, a T3 poderá ser medida como T3 total, dada a reduzida ligação da T3L a proteínas. Uma única medição de T4 aumentada no contexto da DAIT sugere hipertiroidismo destrutivo (Schott & Scherbaum, 2006).

Para avaliar a extensão do hipertiroidismo deve-se analisar os níveis basais de TSH, T4L e, quando necessário, T3L. Desta forma, seguindo a regulação inicial e normalização dos níveis de hormonas livres, o tratamento pode ser aperfeiçoado com base no nível de TSH basal isolado (Schott & Scherbaum, 2006).

#### **2.1.4.2. Testes laboratoriais para diagnóstico de doença auto-imune da tiróide**

##### **Auto-anticorpos da tiróide e TRAb**

Como marcadores serológicos de doença auto-imune da tiróide várias especificidades de anticorpos anti tiroideus foram identificados. Os mais frequentes e melhor caracterizados são os aTPO, aTG e TRAb (Melo, 2006). Na tiroidite auto-imune destaca-se a presença de aTPO fortemente positivos em cerca de 90% dos casos, sendo este o grande marcador da doença e usado actualmente para definir a existência de uma tiroidite auto-imune. Os anticorpos aTG estão presentes em 20 a 50% dos doentes (Melo, 2006).

Os anticorpos aTPO são os que se relacionam mais estreitamente com disfunção clínica da tiróide. A sua presença está fortemente associada com inflamação linfocítica e lesão glandular, sabendo-se que há mais de duzentos epítomos da TPO reconhecidos por linfócitos T nos doentes com tiroidite auto-imune crónica. Estes anticorpos estão presentes no soro em concentrações que variam de micro a miligramas por mililitro e têm a propriedade de fixar o complemento e desta

forma serem citotóxicos. São geralmente os que permanecem positivos mais tempo (Melo, 2006).

Os anticorpos aTG são menos frequentes e o seu papel é menos claro. São na maior parte dos casos da classe IgG, embora também tenham sido detectados anticorpos das classes IgA e IgM. Não fixam o complemento e reagem contra quatro a seis grandes epítomos da tiroglobulina (Melo, 2006).

Os TRAb podem estar presentes quer na DG quer nas outras tiroidites com base auto-imune. Na DG são anticorpos estimuladores (TRAb e) que se ligam a sequências de aminoácidos na região terminal-NH<sub>2</sub> da porção extracelular do receptor. Nas outras tiroidites são anticorpos bloqueadores (TRAb b), que se ligam a sequências mais próximas da superfície. Estes anticorpos estão presentes em cerca de 10% dos doentes com tiroidite auto-imune crónica. Têm um papel importante no desenvolvimento e gravidade do hipotiroidismo, sendo detectáveis frequentemente nos doentes com tiroidites atroficas (Melo, 2006).

A detecção dos anticorpos é suficiente para o diagnóstico de doença auto-imune da tiróide. Estes anticorpos também são encontrados em 10% da população geral sem qualquer manifestação clínica e estes doentes podem ser considerados portadores de tiroidite auto-imune subclínica (Vieira *et al.*, 2008).

### Anticorpos anti-tiroglobulina

A tiroglobulina é quantitativamente a proteína mais importante da tiróide e, desde a descrição pioneira de Roitt e Cols em 1956 (Roitt, Doniach, Campbell, & Hudson, 1956), sabemos estar envolvida no fenómeno da resposta auto-imune. Sendo uma proteína complexa, de alto peso molecular e com variações importantes de estrutura, não é de estranhar que as respostas auto-ímunes observadas em diferentes doentes e em diferentes patologias apresentem variações significativas (Vieira, Kasamatsu, Hauache & Maciel, 2003).

Cerca de 45 dos seus 72 resíduos de tirosina podem ser iodados *in vitro*, mas somente alguns são receptores primários de iodo *in vivo*. Estes estão localizados em sequências de aminoácidos definidas, próximas dos terminais amino e carboxilo da molécula de tiroglobulina. O grau de iodação e as modificações pós-tradução de tiroglobulina são provavelmente as principais determinantes da sua imunogenicidade (Brown, Zhao, Palmer, & Sundick, 1997; Swain *et al.*, 2005).

É sintetizada pelas células foliculares e segregada para o lúmen dos folículos da tiróide, onde é armazenado como colóide (Swain *et al.*, 2005). Quando estimuladas pela TSH, as células foliculares levam a tiroglobulina do colóide e esta é então clivada por peptidases produtoras de tiroxina e triiodotironina, sendo depois libertados para o fluído extracelular (Swain *et al.*, 2005).

Auto-anticorpos para a tiroglobulina são encontrados em menos de 50% dos doentes com tiroidite linfocítica e 30% de doentes com DG. São policlonais e principalmente da classe IgG, com todas as quatro subclasses representadas. Alguma tiroglobulina é detectável no soro de indivíduos normais, podendo a sua concentração estar aumentada em doentes com qualquer patologia da tiróide (Swain *et al.*, 2005).

#### Anticorpos anti-peroxidase tiroidiana

A TPO é uma glicoproteína de membrana composta por 933 aminoácidos e com peso molecular de aproximadamente 107 kD e anteriormente era conhecida com antigénio microssomal da tiróide (Vieira *et al.*, 2003; Swain *et al.*, 2005). É uma molécula complexa e vários epítomos foram descritos na sua estrutura, sendo alguns caracterizados como dominantes. Anticorpos anti-TPO são principalmente da classe IgG com as subclasses IgG1 e IgG4 em excesso (Weetman, 1989). É a enzima chave da tiróide catalisando tanto a iodação como a reacção de acoplamento para a síntese da hormona tiroideia. Está ligada à membrana e é encontrada no citoplasma e, em maior concentração, na superfície microvilar apical dos tirócitos (McLachlan & Rapport, 1992; Swain *et al.*, 2005).

Auto-anticorpos anti-TPO são encontradas em mais de 90% de doentes com hipotiroidismo auto-imune e DG.

#### Anticorpos anti-receptor de TSH

O receptor de TSH é uma glicoproteína localizada na membrana celular dos tirócitos e pertence à família dos receptores transmembranares acoplados à proteína G. É o principal auto-antigénio na DG e tiroidite atrófica e está localizado na superfície basal das células foliculares da tiróide (Vieira *et al.*, 2003; Swain *et al.*, 2005).

O receptor de TSH contém 764 aminoácidos. Os primeiros 415 definem um grande domínio extracelular, codificado por dez exões e os restantes 349 aminoácidos constituem os sete segmentos transmembranares, os segmentos intracitoplasmáticos, e a cauda intracitoplasmática (Prabhakar, Fan, & Seetharamaiah, 1997).

O mRNA do receptor de TSH tem sido detectado em muitos tecidos, nomeadamente, fibroblastos, adipócitos, células musculares cardíacas, células pituitárias, células ósseas e do cérebro. Embora o seu papel em muitos desses tecidos não seja claro, os dados sugerem que a TSH pode modular a função das células ósseas e dos adipócitos. A expressão retro-orbital de TSHR tem sido implicada na oftalmopatia de Graves. (Davies, 2002).



## 2.2. Gastrite crónica

A gastrite crónica é uma das situações inflamatórias mais prevalentes no homem. No entanto, a maior parte das pessoas afectadas não apresentam nenhuma queixa clínica relevante e permanecem assintomáticas por um longo período de tempo (Faller & Kirchner, 2005).

A gastrite crónica compreende duas entidades principais, gastrite por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e gastrite atrófica auto-imune (GAI). Na maior parte dos casos a gastrite crónica por *H. pylori* afecta principalmente a mucosa antral, permanecendo a mucosa corporal com apenas uma leve alteração inflamatória. A GAI, ao contrário afecta predominantemente a mucosa corporal, com atrofia severa da mesma, enquanto o antro gástrico revela apenas uma ligeira inflamação crónica (Faller & Kirchner, 2005).

Devido a uma etiologia e características anátomo patológicas bastante diversas a gastrite crónica foi classificada em tipo A (auto-imune e predominantemente corporal) e tipo B (induzida por *H. pylori* e predominantemente antral) (Crawford, 1999; Faller & Kirchner, 2005).

### 2.2.1. Gastrite atrófica auto-imune

A gastrite atrófica é uma das principais causas de gastrite crónica, correspondendo a cerca de 3 a 4% do total de casos de gastrite (Potet *et al.*, 1993) e quando associada a anemia perniciosa (AP) é considerada de origem auto-imune (Annibale *et al.*, 2005), sendo também referida como gastrite tipo A (Torbenson, Abraham, Boitnott, Yardley, & Wu, 2002). Consiste numa alteração auto-imune específica de órgão, de origem multifactorial compreendendo factores genéticos, imunológicos e, também possivelmente, ambientais e que afecta a mucosa corporal. É caracterizada por atrofia do corpo e fundo gástrico (Tozzoli *et al.*, 2010) e pela presença de anticorpos anti células parietais circulantes (ACPs). Encontra-se frequentemente associada a outras doenças auto-imunes específicas de órgão, nomeadamente tiroidite auto-imune (Faller & Kirchner, 2005; Checchi *et al.*, 2007). Este processo auto-imune resulta numa atrofia da mucosa com redução da secreção do ácido gástrico e factor intrínseco (Annibale *et al.*, 2005) resultando em

hipergastrinemia, anemia ferropénica e anemia perniciosa com défice de vitamina B<sub>12</sub>, conduzindo a um risco aumentado de desenvolvimento de cancro gástrico e tumores carcinóides (Torberson *et al.*, 2002; Faller & Kirchner, 2005; Tozzoli *et al.*, 2010). A prevalência de ACP e anti factor intrínseco (IFA) na população geral é de 3-10% aumentando com a idade desde de 2,5% na terceira década até 12% na oitava década (Tozzoli *et al.*, 2010). Em doentes com GAI e anemia perniciosa a positividade ronda cerca de 60-90% e 50-70%, respectivamente (Annibale *et al.*, 2005). A prevalência é também elevada em indivíduos afectados por outras doenças auto-imunes especialmente tiroidites auto-imunes e diabetes mellitus tipo 1 (Tozzoli *et al.*, 2010).

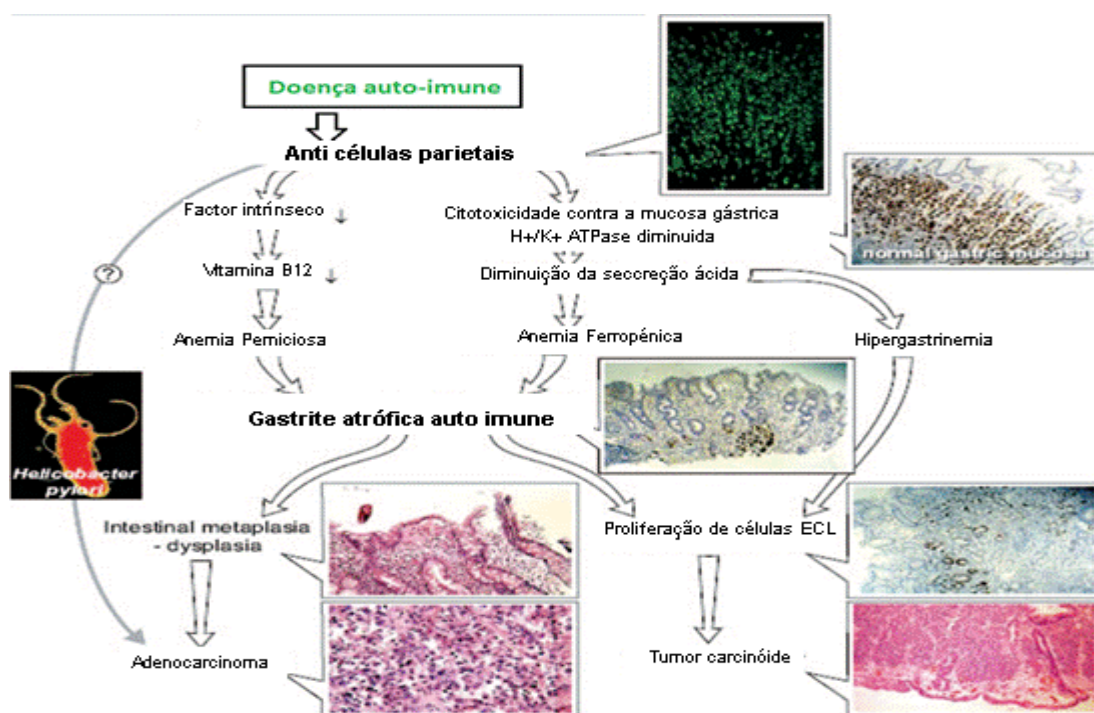
Anticorpos anti factor intrínseco da classe IgG de imunoglobulinas, são considerados altamente específicos em doentes com AP, uma vez que raramente são encontrados em indivíduos sem esta condição (Annibale *et al.*, 2005). As alterações histopatológicas da GAI são essencialmente atrofia glandular e da mucosa. Este processo patológico evolui progressivamente, e pode ser dividido em três estágios: precoce, florido e final (Sepulveda, 2008). O infiltrado mononuclear inclui células plasmáticas e linfócitos T ocupando toda a extensão da lâmina própria da mucosa e acompanham a degeneração e depleção parcial das glândulas ácido pépticas na região média da mucosa. As células parietais remanescentes possuem um citoplasma abundante num estado chamado de pseudo-hipertrofia reaccional causado pela hipergastrinemia. Verifica-se também hiperplasia das células mucosas, dita metaplasia pseudo-antral (Torberson *et al.*, 2002). Na fase florida da gastrite auto-imune, o infiltrado mononuclear está distribuído difusamente e de forma mais compacta, havendo substituição destes componentes por células mucosas e do tipo intestinal (metaplasia intestinal). Como consequência do défice na produção ácida pela mucosa gástrica atrófica há aumento do pH intraluminal e hiperplasia reaccional das células G antrais. Como resultado, a hipergastrinemia exerce estímulo constante às células endócrinas que por sua vez, também se tornam hiperplasiadas. O efeito trófico da gastrina sobre as células endócrinas parece ser o principal factor responsável pela maior incidência de tumores carcinóides em doentes com anemia perniciosa (Hsing, 1996). Na fase final a espessura da mucosa encontra-se diminuída, podendo encontrar-se pólipos hiperplásicos e as células parietais e

principais podem estar ausentes. Da mesma forma, o infiltrado inflamatório está minimamente presente ou ausente.

A principal consequência evolutiva da GAI é a anemia perniciosa, embora o diagnóstico possa ser feito na ausência de anemia, ou dentro do contexto de outras manifestações auto-imunes. A diminuição da massa glandular da mucosa oxíntica leva à deficiência de factor intrínseco, cuja consequência a longo prazo é a eritropoiese megaloblástica. O longo período de latência, de vinte a trinta anos, ocorre porque a reserva hepática de vitamina B<sub>12</sub>, que é de 2.000 a 5.000 mcg, pode demorar até dez anos para ser totalmente esgotada caso nenhuma vitamina B<sub>12</sub> esteja a ser absorvida (Toh, Van Driel, & Glesson, 1997). Assim, estima-se que 10% dos pacientes com GAI desenvolvam AP ao longo da vida. Existem outras causas de deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e, portanto, a definição de anemia perniciosa inclui a demonstração da presença de maturação ineficaz na medula óssea (megaloblástica) decorrente da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> exclusivamente por falta de factor intrínseco (Markle, 1996).

Além da anemia macrocítica por deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, estima-se que uma elevada percentagem de doentes com anemia ferropénica sem queixas gastrointestinais tenham gastrite atrófica do corpo como causa etiológica para a anemia (Annibale *et al.*, 2001). O mecanismo para essa relação causal seria a impossibilidade de mobilização do ferro alimentar em ambiente gástrico com pH elevado decorrente da acloridria resultante da atrofia da mucosa gástrica oxíntica.

Na Figura 3 está representado de forma esquemática a imunopatologia e manifestações de gastropatia auto-imune.



**Figura 4-** Representação esquemática da imunopatologia e manifestações de gastropatia auto-imune. Figura traduzida e adaptada de, De Block *et al*, 2008.

Abreviaturas: ECL, células tipo enterocromafins (do inglês, *enterochromaffin-like*)

### 2.2.1.1. Epidemiologia

Na população em geral, como já referido há um aumento de ACP relacionado com a idade (de 2,5% na terceira década e 12% na oitava) sendo a prevalência também elevada em indivíduos afectados por outras patologias auto-ímmunes (Tozzoli *et al.*, 2010).

A anemia ferropénica está presente em cerca de 20-40% dos doentes com GAI, enquanto a AP pode ser diagnosticada em cerca de 15-25% dos doentes. A progressão de gastrite auto-ímmune a anemia perniciosa pode demorar cerca de 2 a 3 décadas. Tumores carcinóides gástricos são observados em 4,9% dos doentes com GAI/AP. Nestes doentes também se verifica um risco aumentado de desenvolvimento de cancro gástrico (De Block, De Leeuw, & Van Gaal, 2008).

## **2.2.1.2. Etiopatogenia**

### **2.2.1.2.1. Susceptibilidade genética**

A predisposição genética para a GAI/AP tem sido sugerido pela sua ocorrência familiar, e pela presença de anti células parietais e gastrite em 20-30% dos familiares de doentes com anemia perniciosa (De Block *et al.*, 2008).

Haplótipos HLA podem, em parte, determinar o órgão alvo onde se desenvolve o processo auto-imune. No entanto, mesmo havendo relatos de associações de AP com haplótipos HLA DR4, DR2 e DR5 a evidência de ligação entre anemia perniciosa e genes HLA é fraca (De Block *et al.*, 2008).

### **2.2.1.2.2. Factores ambientais**

A infecção por *H. pylori* parece desempenhar um papel importante no início da patogénese da gastrite auto-imune e anemia perniciosa, através da existência de mimetismo molecular entre a bactéria e a bomba de prótons da enzima adenosina trifosfatase ( $H^+/K^+ATPase$ ) ao nível da célula T (D'Elis, Appelmelk, Amedei, Bergman, & Del Prete, 2004).

No entanto, uma correlação entre a *H. pylori* e ACP não foi relatada em todos os estudos (De Block *et al.*, 2008).

### **2.2.1.2.3. Factores endócrinos e imunológicos**

A GAI é frequentemente acompanhada por outras doenças auto-imunes incluindo a diabetes mellitus tipo I e tiroidite auto-imune e faz também parte de um síndrome poliglandular auto-imune (APS) tipo 3.

A anemia perniciosa ocorre em até cerca de 4 dos doentes com diabetes, em 2-12% dos doentes com DAIT, em 6% das pessoas com doença de Addison, em 9% dos doentes com hipo paratiroidismo primário e 3-8% dos doentes com vitiligo (De Block *et al.*, 2008).

#### 2.2.1.2.4. Auto-imunidade

O alvo antigénico dos ACPs são as sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta$  da bomba de prótons da  $H^+/K^+$ ATPase gástrica (Gleeson & Toh, 1991), uma proteína heterodimérica localizada nas membranas intracelular e apical das células parietais gástricas e essencial para a acidificação gástrica (Faller & Kirchner, 2005; Checchi *et al.*, 2007).

Auto-anticorpos para células parietais e o seu produto de secreção, o factor intrínseco estão presentes no soro e suco gástrico e o seu título correlaciona-se com a severidade da atrofia do corpo, sendo inversamente proporcional à concentração de células parietais (De Block *et al.*, 2008).

O reconhecimento da  $H^+/K^+$ ATPase da célula parietal pelas células T CD4 medeia o desenvolvimento de GAI. Durante a normal renovação celular as células parietais libertam  $H^+/K^+$ ATPase, o que pode resultar na sua absorção selectiva e processamento por células apresentadoras de antígenos.

Finalmente, a perda de células parietais da mucosa gástrica pode resultar da citotoxicidade mediada por células T CD4 ou apoptose *Fas-FasL* (De Block *et al.*, 2008).

Independentemente se ACPs são ou não patogénicas, a sua presença favorece um conveniente diagnóstico para gastrite auto-imune.

#### Consequência da gastrite auto-imune: anemia perniciosa

A anemia perniciosa é uma anemia macrocítica devido à deficiência de vitamina  $B_{12}$  (cobalamina), a qual, por sua vez, é o resultado da deficiência de factor intrínseco, uma proteína que se liga avidamente à vitamina  $B_{12}$  na dieta e promove o seu transporte para o íleo terminal para absorção. A deficiência de factor intrínseco é uma consequência da presença GAI, o que resulta na destruição da mucosa oxíntica, e assim, perda de células parietais, que normalmente produzem ácido clorídrico, bem como factor intrínseco.

O termo AP é por vezes usado como sinónimo de deficiência de cobalamina ou de anemia macrocítica, mas para evitar ambiguidade, AP deve ser reservada para condições que resultam da secreção deficiente de factor intrínseco e atrofia da mucosa oxíntica. No entanto o diagnóstico diferencial, pode às vezes ser um desafio devido ao limite de ferramentas de diagnóstico disponíveis. É definida como a

presença de uma concentração de hemoglobina <13 g/ dL para homens e <12 g / dL para mulheres, volume corpuscular médio igual ou superior a 100fL, baixos níveis de vitamina B<sub>12</sub>, juntamente com a concomitante presença de deficiência de factor intrínseco e GAI (Lahner & Annibale, 2009).

### **2.2.1.3. Diagnóstico laboratorial**

#### **2.2.1.3.1. Testes laboratoriais para a avaliação de gastrite auto-imune**

##### **Anticorpos anti células parietais**

Os ACPs estão presentes em cerca de 100% dos doentes com GAI e em cerca de 90% dos doentes com AP. Estes auto-anticorpos têm elevada sensibilidade mas baixa especificidade para o diagnóstico de AP (Weetman, 2005). A presença de ACPs, pode anteceder e antecipar em vários anos (20 a 30 anos), o aparecimento de AP, assim como o da gastrite auto-imune. São úteis no rastreio pré-clínico, mas nem todos os doentes com ACP irão desenvolver AP. Tem uma prevalência de 4% na população em geral e aparecem em cerca de 30% dos doentes com outras patologias auto-imunes (tiroidite auto-imune, anemia por défice ferro, diabetes e insuficiência da supra-renal). No entanto, o facto de esses anticorpos serem encontrados com elevada frequência, em membros da mesma família não afectados, tal como em doentes com outras doenças auto-imunes, sugere que estes anticorpos, só por si, não são causadores da doença (Weetman, 2005).

Muitos doentes com anemia perniciosa têm ACP mas os 10% com AP que são seronegativos para estes anticorpos, podem ser explicados pela possível resposta auto-imune esgotada, por eventuais falsos negativos, por não haver anticorpos livres circulantes no momento da determinação, ou pela insuficiente produção do anticorpo.

#### **2.2.1.3.1. Testes laboratoriais para a avaliação de gastrite auto-imune**

##### **Anticorpos anti factor intrínseco**

Os auto-anticorpos contra o factor intrínseco ocorrem em até cerca de 60% dos doentes com GAI.

Existem duas classes de anticorpos anti factor intrínseco: tipo I ou bloqueantes, que se ligam ao local de ligação da vitamina B<sub>12</sub>, inibindo a fixação da cobalamin ao factor intrínseco, prevenindo desta forma o seu transporte desde o estômago até ao local de absorção no íleo terminal e os anticorpos tipo II ou precipitantes, que não interferem no transporte de vitamina B<sub>12</sub>, mas bloqueiam a ligação do complexo vitamina B<sub>12</sub>-FI ao receptor íleal (Taichiaki & McGuian, 1963; Weetman, 2005).

Os IFA raramente aparecem na gastrite auto-imune que não é acompanhada com AP e por esta razão é considerado mais específico que as ACPs para o diagnóstico de AP. A sua presença pode antecipar em vários anos o aparecimento do quadro clínico (Weetman, 2005) e a sua ausência não exclui o diagnóstico, devendo continuar-se a investigação. Enquanto a prevalência de ACPs decresce no curso da AP, os IFA podem ocorrer quando a anemia já está estabelecida.

Para além disso, a detecção destes anticorpos ajuda a diferenciar AP de outras doenças relacionadas com deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ou má-absorção.

Assim,

- **Se ACPs e IFA positivos-** Evidência imunológica de anemia perniciosa.
- **Se ACPs e IFA negativos-** Sem evidência imunológica de anemia perniciosa.
- **Se ACPs positivos e IFA negativos-** ACP está associado a mais de 90% de indivíduos com gastrite auto-imune.
- **Se ACPs negativos e IFA positivos-** Evidência imunológica de AP (se o doente possui anemia macrocítica e baixos níveis de vitamina B<sub>12</sub> ou apenas níveis de B<sub>12</sub> baixos). O significado clínico deste resultado é incerto na ausência de macrocitose ou anemia. Sugere-se por isso que se repita passado seis meses incluindo doseamento de gastrina sérica, contagem total de células e vitamina B<sub>12</sub>.
- **Se IFA positivo e ACP não foi feito:**
  - **(se >50 anos de idade)-** Evidência imunológica de anemia perniciosa.
  - **(se <50 anos de idade)-** Sugere-se determinar ACP para confirmar o diagnóstico de anemia perniciosa.
- **Se IFA negativo e ACP não foi feito-** Sugere-se determinar ACP porque IFA são encontrados em apenas cerca de 60% dos doentes com anemia



perniciosa, enquanto ACPs são um excelente marcador de gastrite auto-imune associada com anemia perniciosa.

- **Se ACP positivo e IFA não foi feito-** ACPs estão associados com cerca de 90% dos doentes com GAI. Se se suspeita de anemia perniciosa sugere-se dosear IFA.

## Hemograma

O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico mais frequentemente requisitado e permite uma quantificação dos elementos celulares do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Na realidade é o exame de primeira linha no estudo da função hematológica. Contudo uma análise atenta e cuidada dos elementos celulares, implica, para além da quantificação de cada um dos tipos de células sanguíneas, o estudo da sua morfologia.

As indicações para a realização de um hemograma podem envolver qualquer um dos tipos celulares do sangue. Uma das principais indicações é, sem dúvida, o diagnóstico de anemia e por esta razão é importante conhecer a sua forma de apresentação clínica bem como a sua fisiopatologia (George-Gay & Parker).

Um hemograma completo inclui vários parâmetros: contagem de glóbulos rubros (GR) com os índices eritrócitários, contagem de glóbulos brancos, contagem de plaquetas e morfologia celular (Polizopoulou, 2010).

### Contagem de glóbulos rubros

Os glóbulos rubros (GR) definem-se por três parâmetros quantitativos: o hematócrito ou volume globular (VG), a concentração de hemoglobina (Hgb) e a contagem de GR. Três índices adicionais permitem descrever características qualitativas médias e incluem o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina globular média (HGM) e a concentração média de hemoglobina globular (CMHG).

Estes índices avaliam os GR em relação ao tamanho e conteúdo de hemoglobina, auxiliando na caracterização de quadros anémicos. O VCM e hemoglobina são parâmetros de escolha para avaliação de anemia. A anemia classifica-se como **normocítica** quando os valores do VCM se encontram dentro da

normalidade, **macrocítica** quando o VCM está elevado ou **microcítica** quando o VCM se encontra reduzido (Gualandro, 2000).

Para além do hemograma, doentes com GAI devem ser submetidos à avaliação anual do doseamento de vitamina B<sub>12</sub>, cinética do ferro (ferro sérico/ferritina/saturação da transferrina/capacidade total de fixação do ferro) e gastrina.

### **2.2.2. Gastrite crónica por *Helicobacter pylori***

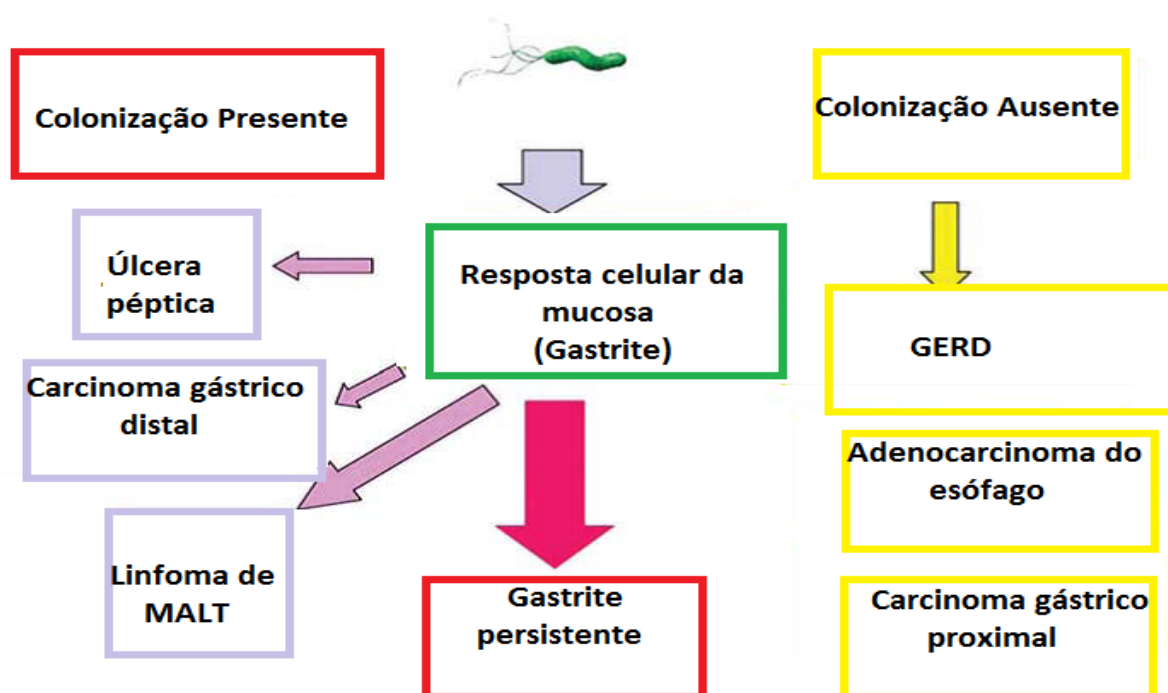
O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa que infecta a mucosa do estômago provocando afecções localizadas de gravidade variável, tais como gastrite, úlceras pépticas e cancro de estômago. Esta bactéria tem como uma das suas principais características a capacidade de interagir com a célula do hospedeiro de forma a garantir a sua permanência por longo tempo. Apesar do *H. pylori* ser a causa de um amplo espectro de doenças, a maioria dos humanos infectados não apresentam qualquer tipo de sintomatologia (Barbosa & Schinonni, 2010).

A gastrite induzida pelo *H. pylori* é uma das infecções mais comuns na espécie humana, comprometendo cerca de metade da população mundial (Blaser & Berg, 2001) e a sua prevalência varia com a idade, nível socio económico e raça. Estudos serológicos demonstraram que a prevalência de infecção aumenta com a idade e é maior nos países em desenvolvimento (Logan & Walker, 2001). Em Portugal, na população adulta com mais de 50 anos a incidência é superior a 90%. Um estudo realizado no Norte de Portugal aponta para uma prevalência na população adulta superior a 80%. Estes dados indicam que Portugal se comporta como um país em desenvolvimento, com prevalência muito superior aos outros países do mundo desenvolvido. O facto de Portugal ser um dos países da Europa com uma das maiores incidências de cancro gástrico apoia a ideia de que a estimativa de uma elevada incidência e prevalência de infecção por *H. pylori* esteja correcta (Soares, Carneiro, Cotter & Pereira, 1993; Quina, 1994).

Como demonstrado na Figura 5, a infecção origina resultados diferentes, incluindo inflamação gástrica transiente e quase assintomática, gastrite crónica,

úlceras pépticas, gastrite atrófica, carcinoma gástrico ou linfoma de células B gástrico. A perda de glândulas gástricas no antro e corpo, que é referido como atrofia, é considerada um precursor no desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (D'Elios, 2004). Tem sido demonstrado que a infecção por *H. pylori* aumenta o risco de cancro gástrico (Uemura *et al.*, 2001).

A capacidade de sobrevivência do *H. pylori* em ambiente tão ácido como o do estômago, característica singular desta bactéria, deve-se à excreção de amónia que a protege neutralizando parcialmente esta acidez (Barbosa & Schinonni, 2010). Esta excreção dá-se pela acção da urease, produzida pela bactéria, que converte a ureia em amónia e dióxido de carbono (CO<sup>2</sup>) e que, segundo Eguchi e Moss (Eguchi & Moss, 2002) favorece a apoptose. Estão também associados à colonização e danos gástricos, os lipolissacrídeos, as citotoxinas vacuolizadoras (Vac A), a mucinase, a lipase, a hemolisina e o factor de virulência da citotoxina proteína A associada (Cag A) (Kuster, van Vliet & Kuipers, 2006).



**Figura 5-** Interações do *Helicobacter pylori* com a patologia gástrica no homem. Algumas têm uma clara ligação à colonização gástrica por este microrganismo. Figura traduzida e adaptada de, Gonzalez, 2010. Abreviaturas: GERD, do inglês, *gastroesophageal reflux disease*.

### 2.2.2.1. Diagnóstico laboratorial

Para a detecção da infecção pelo *H. pylori* são disponibilizados diferentes testes diagnósticos, embora nenhum deles seja eficaz o suficiente a ponto de ser aceite como o “*Gold standard*” (Chey, & Wong, 2007). A escolha do teste depende de várias questões tais como custo, disponibilidade, situação clínica, a prevalência da infecção na população bem como o uso de inibidores da bomba de prótons (PPIs, do inglês *Proton pump inhibitors*) e de antibióticos que podem influenciar os resultados de determinados testes (Nakamura, 2001).

Existe um elevado número de situações clínicas em que o teste para o *H. pylori* é considerado. Recomendações para testes de diagnóstico do *H. pylori* foram propostos pelo *National Institutes of Health* (NIH), em 1994. Orientações mais recentes foram publicadas em 2006 pelo *Helicobacter European Study Group* (EHSG) e em 2007 pelo *American College of Gastroenterology* (ACG).

Os testes de diagnóstico podem ser divididos em invasivos e não invasivos, com base na necessidade de endoscopia e as técnicas podem ser directas ou indirectas. Testes não invasivos incluem: teste respiratório da Ureia C<sub>13</sub> (UBT, do inglês *urea breath test*), pesquisa de antígeno nas fezes e testes imunológicos (Malfertheiner *et al.*, 2007). A Tabela 1 resume os diferentes testes disponíveis para identificação do *H. pylori*.

**Tabela 1-**Testes para identificação do *Helicobacter pylori*.

		Teste	Sensibilidade/Especificidade
<b>Testes Directos</b>	<b>Não invasivos</b>	Teste respiratório (C <sup>13</sup> ;C <sup>14</sup> )	>90%/>90%
		Pesquisa do antígeno de <i>H.pylori</i> nas fezes	90%/90%
	<b>Invasivos</b>	Exame histológico	>90%/>90%
		Exame cultural	50%/100%
		Teste rápido da urease	>90%/>90%
<b>Testes Indirectos</b>	<b>Serologia</b>	Doseamento de anticorpos IgG e IgA anti <i>H.pylori</i>	80-90%/80-90%

Tabela adaptada de Chey *et al.*, 2007 (*American College of Gastroenterology*).

A precisão diagnóstica da UBT é 0,95% nos estudos, o que faz dele um teste preciso, prático, e prontamente disponível. O teste do antígeno fecal é apropriado quando várias amostras são testadas. No entanto, é necessário armazenar as amostras de fezes a -20° C antes do teste. Numa revisão sistemática de 89 estudos onde se avaliou o teste do antígeno fecal, a sensibilidade e especificidade foram de 91% e 93%, respectivamente (Gisbert, 2004).

A serologia é um teste não invasivo amplamente disponível e barato. No entanto tem uma precisão baixa (80-84%) (Malfertheiner *et al.*, 2007). Em áreas com baixa prevalência de *H. pylori* isso significa que o valor preditivo positivo (VPP) irá ser tão baixo quanto 50% (metade dos resultados positivos são falsos positivos), pelo que um resultado positivo necessita ser confirmado por outros métodos. A serologia também pode permanecer positiva durante meses ou anos após erradicação. No entanto, o valor preditivo negativo (VPN) é excelente e um resultado negativo quase exclui infecção actual. Portanto, a serologia é útil quando outros testes de diagnóstico podem originar falsos negativos, tais como em doentes com úlceras hemorrágicas, atrofia gástrica, linfoma MALT e uso recente de PPIs ou antibióticos (Ho & Marshall, 2000).

Segundo as recomendações do ACG quando a endoscopia é indicada, o teste de primeira escolha é o da urease na biópsia antral. Se este for negativo, a infecção por *H. pylori* pode ser diagnosticada por histologia ou serologia. Histologia não é, geralmente, necessária e é cara. Quando a endoscopia não é realizada, o teste serológico é o meio mais barato de avaliar para a evidência de infecção por *H. pylori*. O teste respiratório da ureia é o melhor exame para documentar a infecção pela bactéria (Howden & Hunt, 1998).

### O papel da serologia

A resposta imune desenvolvida contra *H. pylori* tem componentes agudas/crónica e inatas/adaptativas que envolvem a produção de anticorpos a nível sistémico e da mucosa, assim como a secreção de citocinas tais como a IL 12 e 18, que orientam a resposta imune tipo Th1 (Harris, Serrano, & Gonzales, 2005).

Os indivíduos infectados apresentam níveis elevados de anticorpos IgG e IgA no sangue e um aumento na secreção de IgA e IgM no estômago. Níveis de IgM podem ser detectados logo após a infecção ter ocorrido, no entanto, os níveis de

anticorpos IgA e IgG indicam o carácter crónico da mesma. A resposta imune do hospedeiro é ineficaz na eliminação das bactérias, e é provável que contribua para a patogénese de infecção (Harris *et al.*, 2005).

Utilizando o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA, do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay*) é possível detectar anticorpos anti *H. pylori* das diferentes classes de imunoglobulinas, assim como obter resultados quantitativos. Actualmente os teste disponíveis para detectar os anticorpos da classe IgG possuem uma sensibilidade e especificidade superior a 90%. A determinação dos anticorpos IgA cujo nível é elevado em aproximadamente dois terços dos doentes infectados, tem interesse num reduzido número de doentes para os quais o nível de anticorpos IgG não é significativo. Por outro lado, os anticorpos IgM têm sido descritos em 5-10% dos doentes, mas apenas quando anticorpos da classe IgG estão igualmente presentes. Através da determinação conjunta dos níveis de anticorpos tipo IgG e IgA, praticamente a totalidade dos doentes infectados podem ser identificados.

No entanto, a serologia possui as suas limitações. Por ser um exame não invasivo, tem sido utilizado em estudos epidemiológicos, mas por ser uma infecção restrita à mucosa, em alguns casos, a estimulação antigénica pode ser lenta e resultados falso-negativos podem ocorrer em poucas semanas ou meses após infecção (Portorreal & Kawakami, 2002).

#### **2.2.2.2. Papel da infecção do *Helicobacter pylori* no desenvolvimento de auto-imunidade**

Dos vários tipos de bactérias e vírus propostos como agentes de activação da auto imunidade, o *H. pylori* é um dos mais amplamente estudados, devido em parte aos seus atributos únicos como a sobrevivência prolongada no hospedeiro, a prevalência a nível mundial, e as suas interacções complexas com o sistema imune do hospedeiro (Hasni, 2012). Vários mecanismos têm sido propostos para a forma como patogénios podem induzir a activação e expansão de células T auto reactivas e desta forma iniciar doença auto-imune.

Os organismos microbianos são considerados prováveis desencadeantes de auto-imunidade por causa da sua presença constante no meio ambiente e a sua interacção com o sistema imunitário. Existem vários mecanismos propostos pelos

quais os organismos microbianos podem levar à perda de autotolerância. Estes incluem, mimetismo molecular (quando as sequências de aminoácidos partilhados entre antígenos microbianos e proteínas hospedeiras conduzem a uma activação generalizada da resposta imune contra ambas as proteínas do hospedeiro e antígenos microbianos), a activação policlonal, a activação “*by-stander*” e fenómenos de superantígenos (Hasni, 2012).

A activação de células T auto reactivas pode ser conseguida através de super antígenos bacterianos e virais que se ligam a moléculas MHC classe II e activam um grande número de células T, independentemente da sua especificidade (Amedei *et al.*, 2003).

### **Auto-imunidade gástrica**

Em doentes infectados com *H. pylori* que desenvolvem atrofia gástrica do corpo, tem sido relatado um aumento da incidência de ACP positivas, que diminui significativamente após erradicação da bactéria. Com base nas semelhanças entre a atrofia provocada por *H. pylori* e GAI clássica, pensa-se que, em alguns indivíduos geneticamente predispostos ao desenvolvimento de auto-imunidade específica de órgão devido à presença de um determinado haplótipo do MHC classe II, a infecção por *H. pylori* desempenha um papel na indução ou exacerbação da auto-imunidade gástrica (Appelmelk, Faller, Claeys, Kirchner, & Vandenbroucke-Grauls, 1998).

A H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase gástrica é também o principal auto-antígeno na gastrite atrófica crónica induzida por *H. pylori* (Claeys, Faller, Appelmelk, Negrini & Kirchner, 1998, Desai & Gupte, 2007).

A infecção por *H. pylori* pode causar uma reacção auto-imune pelo fenómeno de mimetismo molecular com o grupo sanguíneo Lewis (Appelmeck *et al.*, 1996) no qual o *H. pylori* apresenta epítomos bacterianos semelhantes à estrutura do epitélio gástrico do hospedeiro, induzindo-o a desenvolver uma resposta auto-imune contra a mucosa gástrica (Faller *et al.*, 1999, Desai & Gupte, 2007). Sabe-se ainda que a emissão de vesículas membranosas externas possibilita um mecanismo adicional de patogenicidade, pois a sua interacção com as células epiteliais da mucosa gástrica resulta em apoptose (Ayala *et al.*, 2006).

Negrini e colegas (Negrini *et al.*, 1996) descreveram a presença de anticorpos dirigidos contra os canalículos secretores das células parietais e contra a superfície

luminal das células glandulares gástricas do corpo de doentes com gastrite associada ao *H. pylori*.

### **Auto-imunidade da tiróide**

Como já referido inicialmente, a patogénese de DAIT é multifactorial, incluindo tanto factores genéticos como ambientais. Entre estes, agentes bacterianos e virais, também têm sido suspeitos de desempenhar um importante papel (Wei, 2009).

Existe uma elevada controvérsia nos relatos que relacionam a infecção por *H. pylori* com alterações da tiróide, incluindo doenças auto-imunes da tiróide, como tiroidite atrófica auto-imune e tiroidite de Hashimoto, linfoma da tiróide ou de MALT (Bassi, Marino, Iengo, Fattoruso & Santinelli, 2012).

Alguns estudos têm relatado um aumento da prevalência de infecção por *H. pylori* em adultos e crianças com o DAIT e uma relação entre infecção por *H. pylori* e a presença de altos títulos de auto-anticorpos da tiróide, aTG e aTPO, resultando em alterações da função secretora gástrica. Também tem sido sugerido que as estirpes CagA<sup>+</sup> de *H. pylori* aumentam o risco de DAIT, principalmente em mulheres, e estão envolvidos na patogénese da doença de Hashimoto. Isto baseia-se no facto de anticorpos monoclonais contra estirpes CagA<sup>+</sup> de *H. pylori* poderem reagir de forma cruzada com as células foliculares da glândula da tiróide (Papamichael, Papaioannou, Karga, Roussos & Mantzaris, 2009).

Além disso, a forte correlação entre os anticorpos anti *H.pylori* IgG e auto-anticorpos da tiróide, assim como a observação de que a erradicação da infecção por *H. pylori* é seguida por um decréscimo gradual nos níveis de auto-anticorpos da tiróide sugerem que antigénios *H. pylori* podem estar envolvidos no desenvolvimento de tiroidite auto-imune atrófica ou que a função auto-imune nesta doença pode aumentar a probabilidade de infecção por *H. pylori*. Um estudo, demonstrou uma diminuição significativa de T3L e T4L em indivíduos *H. pylori* positivos em comparação com os controlos (Papamichael, Papaioannou, Karga, Roussos & Mantzaris, 2009).

Pelo contrário, outros estudos não demonstraram diferenças nos níveis séricos de hormonas ou auto-anticorpos da tiróide em doentes com e sem infecção por *H. pylori*, enquanto que a infecção por esta bactéria parece não aumentar o risco de DAIT em indivíduos com sintomas dispépticos. Tendo em conta estes resultados, foi



proposto que o rastreio de DAIT em doentes com teste respiratório da ureia positivo não é indicado (Papamichael, Papaioannou, Karga, Roussos & Mantzaris, 2009)

Além disso, a prevalência semelhante de infecção por *H. pylori*, com ou sem estirpes CagA<sup>+</sup>, em doentes com tiroidite de Hashimoto e controlos, argumenta contra uma verdadeira associação entre infecção por *H. pylori* e tiroidite de Hashimoto. No entanto, para explorar melhor a relação entre DAIT e infecção por *H. pylori* mais ensaios clínicos são necessários (Papamichael, Papaioannou, Karga, Roussos & Mantzaris, 2009).

## 2.3. Associação entre doença auto-imune da tiróide e gastrite crónica

A associação entre DAIT e outras doenças auto-imunes, nomeadamente gastrite atrófica foi primariamente sugerido no início de 1960 (Lahner *et al.*, 2008).

O termo de doença ou auto-imunidade tirogástrica foi descrito nos anos setenta, em doentes em que o soro reagia com os antigénios parietais gástricos e antigénios da tiróide TPO (Centanni *et al.*, 1999). No entanto, considerando que poliendocrinopatias auto-imunes do tipo 1 e 2 são raras, a verdadeira prevalência da síndrome tirogástrica auto-imune é desconhecida (Socin, 2012).

Por sua vez a associação de AP com outras doenças auto-imunes, tais como diabetes tipo1 (3-4%), vitiligo (2-8%) e, em particular DAIT (3-32%) tem sido relatada. Num estudo realizado em 2009 por Edith Lahner (Lahner & Annibale, 2009), verificou-se que numa série de 177 doentes com AP, 41% tinham associação com DAIT e 10% com vitiligo ou alopecia, o que indica que um subgrupo de doentes com AP pode ser considerado como tendo uma síndrome poli-endócrina tipo II auto-imune. Estes dados sugerem que, em indivíduos com doenças auto-imunes, em particular DAIT, uma possível associação com AP deve ser verificada e excluída (Lahner & Annibale, 2009).

O diagnóstico de tiroidite auto-imune concomitante e AP pode ter uma importante implicação clínica, em particular, naqueles doentes que requerem terapia de reposição com tiroxina. Recentemente, tem sido relatado que os doentes com a secreção ácida alterada podem apresentar má absorção da tiroxina o que requer uma dose aumentada do fármaco, e em doentes com AP a hipocloridria está sempre presente, devido à perda oxíntica da mucosa (Lahner & Annibale, 2009).

## ***Objetivos***

---

### 3. Objectivos

São objectivos deste estudo:

- Determinar a prevalência de anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco em indivíduos com doença auto-imune da tiróide.
- Avaliar a utilidade clínica e laboratorial das determinações analíticas de anticorpos anti células parietais e factor intrínseco em indivíduos com doença auto-imune da tiróide, de forma a determinar o valor da pesquisa destes anticorpos nestes doentes.
- Avaliar a associação entre auto-imunidade da tiróide e gástrica com infecção por *H.pylori*.
- Efectuar uma revisão bibliográfica sobre a utilidade e fiabilidade destes marcadores para o diagnóstico e seguimento de doentes com patologias gástrica e tiroideia auto-imunes.

## ***Material e Métodos***

---

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Identificação da população e da amostra

#### Grupo I

A amostra consistiu no conjunto de todos os doentes com o diagnóstico laboratorial de doença auto-imune da tiróide, comprovado pela presença de auto-anticorpos tiroideus duas vezes acima do limite superior de referência (aTG: 5,65 UI/mL, 2x valor de referência=11,3 UI/ml; aTPO: 4,11 UI/mL, 2x valor de referência= 8,22 UI/ml) na tiroidite auto-imune e TRAb >1,8 IU/L na doença de Graves, seguidos na consulta de Endocrinologia do Centro Hospitalar São João, no período de 2008 a 2011. Seguindo estes critérios, os doentes foram seleccionados da base de dados do Serviço de Patologia Clínica do presente hospital: CLINIDATA<sup>®</sup> XXI, versão 5.1.3SP11.

O levantamento das determinações analíticas de anti factor intrínseco e anti células parietais foi realizado pela pesquisa dos resultados registados na mesma base de dados CLINIDATA<sup>®</sup> XXI, que até à data contava com 463 doentes com patologia auto-imune da tiróide, dos quais 120 tinham anticorpos anti células parietais positivos e 17 tinham anti factor intrínseco positivos ou ambos.

Para a mesma data e população avaliou-se ainda as determinações analíticas de T4L, T3L, TSH e vitamina B<sub>12</sub> em todos os doentes, assim como hemograma completo para pesquisa de volume globular, hemoglobina e volume corpuscular médio.

#### Grupo II

Foram seleccionados, prospectivamente, e durante um ano (2012) um grupo de doentes com pedidos de serologia de *H. pylori* e, nestes, pesquisou-se os marcadores imunológicos (determinações analíticas de anticorpos anti células parietais e factor intrínseco e anticorpos aTPO e aTG e TRAb) e bioquímicos (TSH, T4L e vitamina B<sub>12</sub>), de forma a verificar a sua prevalência nestes doentes. Recorreu-se novamente à mesma base de dados.

## 4.2. Metodologia

### 4.2.1. Variáveis estudadas

Observação dos dados clínicos, com levantamento da situação clínica de cada um dos doentes e recolha dos seguintes dados: idade, sexo, diagnósticos, marcadores imunológicos, hematológicos e bioquímicos. Todas as determinações laboratoriais foram realizadas nos Laboratórios de Imunologia, Hematologia, Bioquímica ou Microbiologia, do Serviço de Patologia Clínica do Centro hospitalar de São João, Porto.

#### ❖ Variáveis quantitativas:

Idade

Marcadores imunológicos: aTG, aTPO e TRAb

Marcadores hematológicos: Hemoglobina, VG e VCM

Marcadores bioquímicos: T4L, T3L, TSH, vitamina B<sub>12</sub>, ferro e ferritina

#### ❖ Variáveis qualitativas:

Diagnósticos: foram incluídos nesta variável todos os doentes com doença auto-imune da tiróide que motivaram o clínico a pedir a determinação dos marcadores imunológicos tendo sido categorizados em 2 grupos: tiroidite auto-imune com ou sem alteração da função da tiróide e doença de Graves com ou sem aTPO/aTG positivos

Sexo: masculino ou feminino

Células Parietais: positivo ou negativo

Factor Intrínseco: positivo ou negativo

Intervalos etários: < 18; 18-50; >50 anos de idade

Anemia: com anemia (hemoglobina <12 g/dL e VG <37%) ou sem anemia (hemoglobina e VG normais)

*Helicobacter pylori*: positivo ou negativo.

#### 4.2.2. Colheita, preparação e estabilidade da amostra

Para a pesquisa de células parietais e TRAB, o sangue é colhido por venipunctura para tubos sem anticoagulante e esterilizados. Para as ACP as amostras podem ser armazenadas a +2<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C se forem testadas no espaço de 24-48 horas, caso contrário, devem ser conservadas congeladas a - 20<sup>o</sup>C; para os TRAB, as amostras de soro do doente devem ser armazenadas a +2<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C durante 14 dias e não devem ser usadas amostras hemolisadas nem lipémicas.

Para os restantes parâmetros, o sangue é colhido por venipunctura para tubos contendo o anticoagulante heparina ou para tubos secos. Assim, podem ser usadas amostras de soro ou plasma que podem ser armazenadas a +2<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C durante 14 dias no caso dos IFA, 21 dias para o ferro, 7 dias para a ferritina e 72 horas no caso dos aTG e aTPO. Se no final desse período não for efectuado o teste, as amostras devem ser congeladas a -20<sup>o</sup>C durante 30 dias a 12 meses. Para as hormonas da tiróide e vitamina B<sub>12</sub> amostras podem ser armazenadas a +2<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C durante 6 dias. As amostras para pesquisa de *H.pylori* podem ser armazenadas a +2<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C durante 14 dias.

O sangue é colhido por venipunctura para tubos contendo anticoagulante, sendo o mais utilizado ácido etilenodiaminotetracético-tripotássico (EDTA-K3). O EDTA-K3 remove o cálcio necessário à coagulação e é o anticoagulante mais indicado para contagens de células sanguíneas porque induz uma anticoagulação completa com efeitos mínimos sobre as células. Após a colheita, o sangue pode ser armazenado a 4<sup>o</sup>C durante 24 horas mas, deverá ser analisado o mais rapidamente possível.

#### 4.2.3. Métodos analíticos

No laboratório de Imunologia, as amostras de soro foram investigadas, por técnica de imunofluorescência indirecta, para a presença dos auto-anticorpos anti células parietais gástricas. A pesquisa de anti factor intrínseco foi determinada por ELISA, no equipamento automático Mago<sup>®</sup> Plus (Diamedix Corporation, Miami, Florida). A pesquisa de TRAb foi igualmente determinada por ELISA, no equipamento automático Triturus<sup>®</sup> (Diagnostic Grifols, Barcelona-Espana).



No laboratório de Bioquímica, a determinação de anti tiroideus, hormonas da tiróide e vitamina B<sub>12</sub> foi efectuada por Quimioluminiscência no equipamento automático ARCHITECT PLUS i2000sr (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). A determinação quantitativa de ferro e ferritina foi efectuada no autoanalizador Olympus<sup>®</sup> AU5400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg).

O hemograma completo foi realizado no laboratório de Hematologia, por contagem automatizada através de citometria de fluxo no autoanalizador de marca Sysmex<sup>®</sup>, modelo XE-2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Por sua vez a pesquisa de anticorpos anti *H. pylori* IgG e IgA foi efectuada no laboratório de microbiologia por *Western Blot* (WB).

#### **4.2.3.1. Pesquisa de auto-anticorpos por Imunofluorescência Indirecta**

Os anticorpos anti células parietais, foram determinados por técnica de imunofluorescência indirecta em lâminas com substrato triplo: rim, fígado e estômago de rato, por recurso ao reagente “CT3 Immunoscreen Fluoro-Kit”, da DIASORIN, ref<sup>a</sup>1740 (DIASORIN Inc., USA). O anticorpo anti célula parietal tem como antigénio alvo as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da H/K ATPase gástrica e cora o citoplasma das células parietais da mucosa gástrica fúndica. As amostras foram diluídas a 1:40 em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. As amostras, controlos positivos e negativos foram aplicados sobre as lâminas contendo o substrato específico para anti células parietais, e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente (20°C a 26°C). Após incubação e lavagem das lâminas três vezes com PBS, incubou-se novamente com conjugado anti-imunoglobulina humana fluorescente (FITC) durante 30 minutos. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas com PBS, e em seguida procedeu-se à montagem das mesmas com glicerina alcalina.

#### Interpretação dos resultados

A leitura foi realizada no microscópio de fluorescência Nikon Labophot (Nikon Instruments Inc., USA), por um observador treinado do laboratório de Imunologia, do Serviço de Patologia Clínica do Centro hospitalar de São João. Foram consideradas positivas as reacções com títulos iguais ou superiores a 1:40.



**Figura 6-** Imunofluorescência Indirecta para anti células parietais. FONTE: Informação técnica do *kit* DIASORIN.

#### 4.2.3.2. Pesquisa de auto-anticorpos por ELISA

##### Princípio do teste de ELISA:

- Tiras de microplacas de poliestireno revestidos com antigénios, são utilizados como fase sólida contendo antigénios acoplados.
- Se a amostra for positiva, os anticorpos IgG específicos na amostra de soro diluída ligam-se aos antigénios acoplados à fase sólida.
- Num segundo passo, os anticorpos ligados são detectados por anticorpos marcados com enzima anti-IgG humana.
- Num terceiro passo, os anticorpos ligados são tornados visíveis utilizando uma solução de substrato/cromogéneo que é capaz de promover uma reacção de cor. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de soro.

A reacção consiste em diluir as amostras 1:101 e adicionar 100  $\mu$ L de cada amostra e controlos aos micropoços de poliestireno revestidos com o antigénio purificado e incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, faz-se uma lavagem com a solução de lavagem (solução tampão Tris) num total de três repetições. De seguida adiciona-se 100  $\mu$ L do conjugado em cada poço, os quais são novamente lavados após incubação de 30 minutos. Acrescenta-se 100  $\mu$ L de substrato cromogéneo tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço e incuba-se novamente por 30 minutos. Para finalizar adiciona-se a solução de paragem (ácido sulfúrico 0,344M) e procede-se à leitura a 450nm de densidade óptica.

### **Anti factor intrínseco**

O anti factor intrínseco foi determinado com recurso ao *kit* de diagnóstico- Anti-Intrinsic Factor ELISA (IgG), ref<sup>a</sup> EA 1362-9602 G, EUROIMMUN (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany). Consiste num ensaio quantitativo para os auto-anticorpos humanos da classe IgG contra o factor intrínseco no soro ou plasma. O teste contém tiras de microplacas contendo cada uma 8 poços individuais revestidos com factor intrínseco. Num primeiro passo da reacção, as amostras diluídas do doente são incubadas nos poços. No caso de uma amostra positiva, os anticorpos IgG específicos irão ligar-se ao antigénio. Para detectar os anticorpos ligados, uma segunda incubação é realizada utilizando uma enzima anti-IgG humana marcada, que é capaz de promover uma reacção de cor.

Os resultados das amostras são classificados como negativo e positivos.

### **TRAb**

O TRAb foi determinado com recurso ao *kit* de diagnóstico- Anti TSH Receptor (TRAb) ELISA (IgG), ref<sup>a</sup> EA 1015-9601 G, EUROIMMUN (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany). Consiste num ensaio quantitativo para os auto-anticorpos humanos contra o receptor da tirotropina no soro. O teste contém tiras de microplacas contendo cada uma 8 poços individuais revestidos com receptor do TSH. Num primeiro passo da reacção, as amostras do doente são incubadas nos poços. No caso de uma amostra positiva, os anticorpos específicos irão ligar-se ao receptor do TSH. Os anticorpos ligados são capazes de inibir a ligação da biotina marcada com TSH, que é adicionada numa segunda incubação. Para detectar os níveis de biotina-TSH ligada, uma terceira incubação é realizada utilizando uma enzima marcado com avidina (conjugado), promovendo uma reacção de cor. A intensidade da cor formada é inversamente proporcional à concentração de anticorpos contra o receptor de TSH. Os resultados das amostras são classificados como negativo quando  $< 0,5$  U/L e positivos quando  $> 1,8$  U/L.

### 4.2.3.3. Quimioluminiscência

#### Pesquisa de anti-TPO e anti-TG, hormonas tiroideias e vitamina B<sub>12</sub>

Os anti-TPO e anti-TG, TSH, T4 livre e T3 livre e vitamina B<sub>12</sub>, foram quantificados utilizando o *kit* de diagnóstico - ARCHITECT aTPO, ref<sup>a</sup> 2K47 e aTG, ref<sup>a</sup> 2K46, TSH, ref<sup>a</sup> 7K62, T4L, ref<sup>a</sup> 7K65 e T3L, ref<sup>a</sup> 7K64 e vitamina B<sub>12</sub>, ref<sup>a</sup> 7K61 Reagent (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), no equipamento ARCHITECT PLUS i2000sr (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). Consiste num imunoensaio de dois passos para determinação quantitativa de anti-TPO e anti-TG, TSH, T4 livre e T3 livre e vitamina B<sub>12</sub> no soro e plasma humanos, usando a tecnologia Imunoensaio de Quimioluminiscência de Micropartículas (CMIA, do inglês, *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*). Num primeiro passo, amostra, diluente e micropartículas paramagnéticas revestidas com TPO, TG, TSH, T4 livre e T3 livre ou vitamina B<sub>12</sub> são combinados e incubam e os anticorpos presentes na amostra ligam-se às micropartículas revestidas. Num segundo passo, após a lavagem é adicionado um conjugado anti-IgG humana e após uma nova incubação e lavagem, as soluções “*pre-trigger*” e “*trigger*” são adicionadas à mistura de reacção. A reacção de quimioluminiscência resultante é medida como unidades relativas de luz (RLUs). Existe uma relação directa entre a quantidade de anticorpo na amostra e os RLUs detectados pelo sistema óptico do equipamento.

Na tabela 2 encontram-se os valores de referência para cada um dos parâmetros.

**Tabela 2:** Valores de referência para aTPO e aTG, TSH, T4L e T3L e vitamina B<sub>12</sub>

	Unidades
aTPO	<4,11 UI/mL
aTG	<5,65 UI/mL
TSH	0,35-4,94 UI/mL
T4L	0,71-1,48 ng/dL
T3L	1,7-3,71 pg/mL
Vit. B <sub>12</sub>	157 e 1059 pg/mL

FONTE: Informação técnica do equipamento ARCHITECT PLUS i2000sr (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA).

#### 4.2.3.4. Determinação sérica de Ferro e Ferritina

A determinação quantitativa de ferro e ferritina foi efectuada no autoanalisador Olympus® AU5400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg).

**Ferro-** ensaio de cor fotométrico: o método utilizado pelo equipamento Olympus® utiliza o 2, 4, 6-Tri-(2-piridil)-5-triazina (TPTZ) como cromogéneo. Num meio acidificado, o ferro ligado à transferrina dissocia-se em iões de ferro livres e apo-transferrina. O ácido clorídrico e ascorbato de sódio reduzem os iões férricos ao estado ferroso que então reagem com TPTZ para formar um complexo de cor azul que pode ser medido bicromaticamente a 600/800 nm. O aumento da absorção é directamente proporcional à quantidade de ferro ligado à transferrina presente. São valores de referência para o homem: 70-180 µg/dL e mulher: 60-180 µg/dL.

**Ferritina-** ensaio imuno-turbidimétrico: o reagente anti-ferritina do Olympus® consiste numa suspensão de partículas de látex de poliestireno, de tamanho uniforme, revestida com anticorpo policlonal de coelho anti-ferritina. Quando o soro contendo ferritina é misturado com o reagente anti-ferritina, ocorre a aglutinação da mistura, que é medida espectrofotometricamente nos analisadores químicos da Olympus. São esperados valores entre 12-150 ng/mL para as mulheres e para 15-200 ng/mL homens.

#### 4.2.3.5. Hemograma

O hemograma completo foi realizado por contagem automática no autoanalisador Sysmex®, modelo XE-2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), que realiza análises com base na técnica de citometria de fluxo com fluorescência aos múltiplos canais para fornecer a contagem diferencial, que incluem laser, corrente contínua para impedância e corrente de rádio frequência para determinar a estrutura interna das células. A contagem global dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas é feita através do método de resistência, que detecta o tamanho da célula (corrente directa) e a densidade da célula (corrente de rádio frequência). A hemoglobina é determinada pelo método de lauril sulfato espectrofotometricamente.

- Hemoglobina- a Hgb é uma proteína dotada de coloração forte, o que permite a quantificação por métodos colorimétricos e espectrofotométricos. As várias

formas de Hgb patentes no sangue incluem a oxihemoglobina, a carboxihemoglobina, entre outras. Podem ser convertidas num único componente estável comum, a cianohemoglobina. O doseamento desta permite a determinação da concentração de hemoglobina. Expressa-se em g/dL do sangue total.

- Volume Globular ou Hematócrito- proporção do volume de amostra de sangue que é ocupado pelos glóbulos rubros. Expressa-se em %.
- Volume corpuscular médio - índice útil na classificação das anemias. É calculado a partir do VG e o número de GR e expressa-se em fL.

#### Interpretação dos resultados

Considera-se anemia o valor de hemoglobina abaixo dos valores normais segundo a idade e sexo (<12 g/dL para mulheres e <13 g/dL para homens) e/ou VG inferior a 42% nos homens e 37% nas mulheres. Para além disso a anemia pode classificar-se em função do tamanho dos glóbulos vermelhos estabelecido pelo volume corpuscular médio, considerando-se macrocíticas as que tem um VCM > 100 fL.

**Tabela 3-** Valores de referência dos índices hematológicos

	Unidades
Hemoglobina	Homem:13-18 g/dL; Mulher:12-16 g/dL
VG	Homem: 45-52%; Mulher 37- 49%
VCM	87-103 fL

FONTE: Informação técnica do equipamento Sysmex® XE-2100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

#### **4.2.3.6. Pesquisa de anti *Helicobacter pylori* IgG e IgA**

O anti *Helicobacter pylori* foi determinado com recurso ao *kit* de diagnóstico- Antibodies against *Helicobacter pylori* (IgG), ref<sup>a</sup> DY 2080-1601-1 G e (IgA), ref<sup>a</sup> DY 2080-1601-1 A, EUROLINE-WB, EUROIMMUN (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany). Consiste num ensaio qualitativo (*western*

*blot*) para anticorpos humanos de classe IgG ou IgA para *Helicobacter pylori* em soro ou plasma. Cada *kit* contém tiras teste com os antígenos recombinantes de *H.pylori* (VacA e CagA) electroforeticamente separados. As tiras *blot* são incubadas com as amostras diluídas no primeiro passo da reacção e em caso de uma amostra positiva, os anticorpos específicos de IgG e IgA, vão ligar-se aos antígenos. Para detectar os anticorpos ligados, uma segunda incubação é realizada utilizando uma enzima anti-IgG ou anti-IgA humana marcada (enzima conjugado) catalisando uma reacção de cor.

#### Interpretação dos resultados

Os resultados do teste EUROLINE-WB podem ser divididos em negativos, *borderline* e positivos, com base na presença ou ausência de bandas classificadas em 3 categorias: **categoria 1**- banda com reacção cruzada e antígenos indefinidos de peso molecular 41 kDa, 50 kDa, 54 kDa, 57 kDa, 67 kDa e 75 kDa; **categoria 2**- banda com antígeno de peso molecular de 66 kDa; **categoria 3**- bandas com antígenos altamente específicos de peso molecular 17 kDa, 19 kDa, 26 kDa, 29 kDa, 30 kDa, 33 kDa, Vac A e CagA (Tabela 4).

**Tabela 4-** Resultados do teste EUROLINE-WB IgA e IgG.

Resultados	Características
<b>Negativo</b>	Nenhuma banda reconhecível de antígeno ou uma banda das categorias 1 e 2 fraca ou uma única banda fraca da categoria 3.
<b>Borderline</b>	Um mínimo de duas bandas fracas da categoria de antígeno 3 ou uma banda distinta para a categoria 3.
<b>Positivo</b>	Um mínimo de duas bandas das categorias de antígeno 2 ou 3 distintas.

FONTE: Informação técnica do *Kit* Antibodies against *Helicobacter pylori* IgG/ IgA, EUROIMMUN (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany).

### 4.3. Métodos estatísticos

Para efeitos de análise e tratamento estatístico dos dados obtidos, utilizou-se o programa informático Microsoft® Excel 2002 e *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para o Windows™ versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

Por se tratar de uma distribuição essencialmente não normal e assimétrica foram usados testes não paramétricos para estabelecer associações entre grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como indicando significância estatística.

As variáveis qualitativas foram descritas com distribuição de frequências e as análises de associação foram realizadas através de tabelas de contingência 2x2, aplicando-se o teste do qui-quadrado ou teste exacto de Fisher, conforme adequado, com o fim de testar se os grupos diferiam relativamente às características em análise.

As variáveis quantitativas foram descritas como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (Percentil 25-75) e foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou Kruskal Wallis H de acordo com os pressupostos à sua utilização. Com o fim de fazer a verificação dos pressupostos do teste-t foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e ANOVA, para testar a normalidade e a homogeneidade das variâncias, respectivamente. Como a aplicação do teste-t não foi possível, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que se destina a avaliar se duas amostras independentes são significativamente diferentes.



# ***Resultados***

---

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização da amostra

Com base na pesquisa realizada na base de dados “CLINIDATA® XXI” durante um período de 4 anos (2008 a 2011), avaliaram-se as determinações analíticas que nos permitiram chegar a um pressuposto diagnóstico de tiroidite auto-imune ou doença de Graves.

#### Tiroidite auto-imune

O diagnóstico baseia-se na presença no soro de auto-anticorpos dirigidos contra os vários componentes da tiróide, aTG e aTPO, e nos níveis de TSH, T4L e T3L normais ou reduzidos. Desta forma, a identificação dos doentes com tiroidite auto-imune foi feita com base na evidência de níveis séricos de anticorpos anti tiroideus aTG e/ou aTPO duas vezes acima do limite superior de referência (aTG > 11,3 UI/mL; aTPO > 8,22 UI/mL).

Os 414 doentes identificados (de 34328 amostras testadas no mesmo intervalo) foram depois classificados em três subgrupos: um com valores de TSH aumentados ou diminuídos representando hipo ou hipertiroidismo respectivamente, e outro grupo com T4L, T3L e TSH normais representando tiroidite auto-imune “Eutiroideia” a maioria dos casos (Tabela 5). De referir que 3 doentes com níveis de TSH normal mas com valores de T4L aumentados foram incluídos no grupo com hipertiroidismo.

**Tabela 5- Classificação dos 414 doentes com tiroidite auto-imune.** Foram classificados pela positividade de aTPO ( $308\pm 345$  UI/ml) e/ou aTG ( $139\pm 248$  UI/ml) e pelos níveis séricos de hormonas da tiróide. Os níveis séricos de TSH são significativamente diferentes nos três grupos ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal Wallis H).

		n=414	TSH (UI/mL) mediana (Percentil 25-75)
Classificação da tiroidite auto-imune	<b>Eutiroidia</b> (T4L,T3L e TSH normais)	341 (82,4%)	1,60 (0,78-2,40)
	<b>Hipotiroidismo</b> (TSH>4,94 UI/mL)	31 (7,5%)	6,70 5,30-9,20)
	<b>Hipertiroidismo</b> (TSH<0,35 UI/mL)	42 (10,1%)	0,06 (0,02-0,15)

\*Inclui 3 doentes com T4L aumentada mas TSH normal

Nestes doentes, também se verificou que os títulos de aTPO se correlacionavam com o grau de disfunção endócrina da tiróide, isto é verificou-se uma correlação positiva com os níveis de TSH ( $r_s=0,162$ ,  $p<0,05$ ) e uma correlação negativa com os níveis de T4L ( $r_s=-0,143$ ,  $p<0,05$ ). O mesmo não se verificou para os títulos de aTG (TSH  $r_s = 0,04$ ,  $p>0,05$  e T4L  $r_s =0,08$ ,  $p>0,05$ ).

### Doença de Graves

A classificação dos casos com doença de Graves foi feita com base na presença de TRAb positivos ( $>1,8$  IU/L) com ou sem aTG e aTPO positivos, constituindo um total de 49 doentes. Destes, 22 (44,9%) tinham evidência laboratorial de diminuição de TSH ( $<0,35$  IU/mL) sendo classificados como pertencendo ao subgrupo de doentes com DG “activa”; 27 (55,1%) tinham níveis de TSH normais e corresponderiam ao subgrupo de doentes que classificamos como DG “controlada”. Neste subgrupo verificamos níveis de TRAb significativamente mais baixos (Tabela 6). Por outro lado, o subgrupo com DG “activa” apresenta níveis significativamente mais elevados de T4L-mediana:1,4 (Percentil 25-74:1,0-1,8) ng/dL *versus* 1,1 (1,1-1,2) ng/dL;  $p<0,05$ , Teste de Mann Whitney- e de T3L- 4,3 (3,0-6,4) pg/mL *versus* 2,9 (2,2-3,2) pg/mL;  $p<0,05$ , Teste de Mann Whitney.

**Tabela 6- Classificação dos 49 doentes com Doença de Graves.** Foram classificados pelos níveis séricos de TSH que são significativamente mais elevados no subgrupo de doentes que classificamos como DG “activa” (com níveis de TSH diminuídos).

		n=49	TSH (UI/mL) mediana (Percentil 25-75)	TRAb (UI/L) mediana (Percentil 25-75)
Classificação da doença de Graves	Doença de Graves “activa”	22 (44,9%)	0,007 (0,003-0,58)	6,62 (2,68-22,55)*
	Doença de Graves “controlada”	27 (55,1%)	1,60 (0,80-2,60)	2,90 (2,28-4,90)*

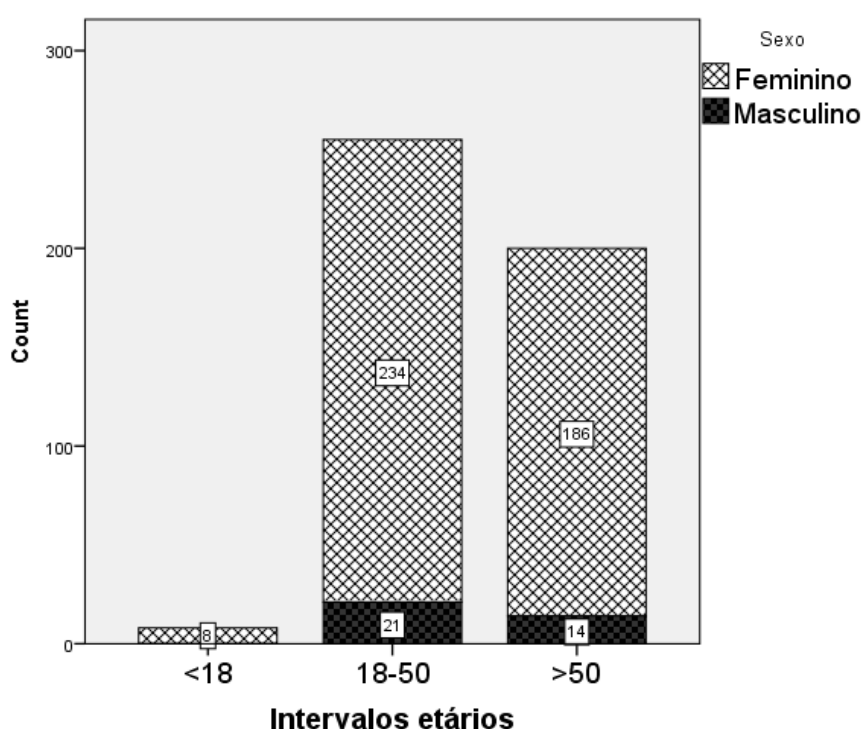
\*p<0,05, Teste de Mann-Whitney

De notar que 47% dos doentes com DG eram positivos para aTG, assim como 72% dos doentes com tiroidite. Nestes (tiroidites) verificou-se que a positividade era ligeiramente mais prevalente no subgrupo funcional de tiroidite eutiroideia (72%) (248 em 341) *versus* 68% no subgrupo com hipotiroidismo (21 em 31) e 67% no subgrupo com hipertiroidismo (30 em 42), não se verificando no entanto diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos ( $p>0,05$ , Teste de Kruskal Wallis). Também nos doentes com DG não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (aTG positivo no subgrupo “controlada” (41%) *versus* subgrupo “activa” (57%),  $p>0,05$ , Teste de Qui Quadrado).

Relativamente ao aTPO, 89% (367 em 414) dos doentes com tiroidite eram positivos para este anticorpo, assim como 76% (35 de 49) dos doentes com DG. Nos doentes com tiroidite a positividade era ligeiramente mais prevalente no subgrupo funcional com hipotiroidismo (97%) (30 em 31) *versus* 88% na eutiroideia (299 em 341) e 91% no subgrupo com hipertiroidismo (38 em 42), não se verificando também diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos ( $p>0,05$ , Teste de Kruskal Wallis). No entanto, nos subgrupos de doentes com DG, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas nos níveis de aTPO positivos (63% na “DG controlada” *versus* 91% na “DG activa”,  $p<0,05$ , Teste exacto de Fisher’s).

Desta forma, foram incluídos neste estudo 463 doentes com patologia auto-imune da tiróide dos quais 414 (89,4%) tinham tiroidite auto-imune e 49 (10,6%) tinham doença de Graves. 428 (92,4%) eram mulheres com uma idade média de  $47 \pm 16$  anos e 35 (7,6%) eram homens com uma idade média de  $45 \pm 18$  anos. No Gráfico 1 podemos verificar a distribuição dos doentes com doença auto-imune da tiróide pelos diferentes intervalos etários e de acordo com o sexo.

**GRÁFICO 1-** Distribuição dos doentes com doença auto-imune da tiróide pelos diferentes intervalos etários e de acordo com o sexo. De notar um franco predomínio nas mulheres (92,4%) e com idades entre os 18-50 anos (55,1%).



Na Tabela 7 está demonstrada a distribuição dos 414 doentes com tiroidite auto-imune pelos diferentes subgrupos e de acordo com a idade e sexo. A maior parte dos casos apresentavam tiroidite auto-imune “eutiroideia” e independentemente do estado endócrino, verifica-se sempre um predomínio do sexo feminino.

**Tabela 7- Distribuição dos 414 doentes com tiroidite auto-imune de acordo com a classificação da doença pelos diferentes intervalos etários e sexo.**

<b>Classificação da tiroidite auto-imune</b>	<b>Intervalos etários</b>			<b>Sexo</b>	
	<b>&lt;18</b>	<b>18-50</b>	<b>&gt;50</b>	<b>Feminino</b>	<b>Masculino</b>
	(n=7)	(n=230)	(n=177)	(n=383)	(n=31)
<b>Eutiroidia</b> (n=341)	7 (2,1%)	190 (55,7%)	144 (42,2%)	316 (92,7%)	25 (7,3%)
<b>Hipotiroidismo</b> (n=31)	0	18 (58,1%)	13 (41,9%)	30 (96,8%)	1 (3,2%)
<b>Hipertiroidismo</b> (n=42)	0	22 (52,4%)	20 (47,6%)	37 (88,1%)	5 (11,9%)

Na Tabela 8 encontra-se a distribuição dos 49 doentes com doença de Graves pelos diferentes subgrupos e de acordo com a idade e sexo. Apenas 4 (8,2%) doentes eram do sexo masculino, havendo também predomínio no grupo de doentes com idades entre os 18-50 anos (51%).

**Tabela 8- Distribuição dos 49 doentes com doença de Graves de acordo com a classificação da doença pelos diferentes intervalos etários e sexo.**

<b>Classificação da doença de Graves</b>	<b>Intervalos etários</b>			<b>Sexo</b>	
	<b>&lt;18</b>	<b>18-50</b>	<b>&gt;50</b>	<b>Feminino</b>	<b>Masculino</b>
	(n=1)	(n=25)	(n=23)	(n=45)	(n=4)
<b>Doença de Graves “activa”</b> (n=22)	0	15 (68,2%)	7 (31,8%)	19 (86,4%)	3 (13,6%)
<b>Doença de Graves “controlada”</b> (n=27)	1 (3,7%)	10 (37%)	16 (59,3%)	26 (96,3%)	1 (3,7%)

## 5.2. Prevalência de anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco em indivíduos com doença auto-imune da tiróide

### Células Parietais

Na tiroidite auto-imune, dos 414 doentes com determinação efectuada, 107 (25,8%) tinham presença de anticorpos anti células parietais, enquanto que na doença de Graves 13 (27,1%) apresentavam positividade para o mesmo anticorpo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição dessa positividade nas duas patologias auto-imunes da tiróide ( $p > 0,05$ ; Teste de qui-quadrado).

Na Tabela 9 está demonstrada a distribuição dos anticorpos anti células parietais nos três subgrupos funcionais de doentes com tiroidite auto-imune e na Tabela 10 encontra-se resumida a mesma distribuição para os doentes com doença de Graves “activa” ou “controlada”. Não foram encontradas diferenças na frequência de anti células parietais entre os diferentes subgrupos.

**Tabela 9- Frequência de anticorpos anti células parietais nos três grupos de doentes com tiroidite auto-imune.** Não se verifica diferença estatisticamente significativa na positividade de anticorpos anti células parietais nos três subgrupos ( $p > 0,05$ ; Teste de qui-quadrado).

		Anti células parietais	
		Positivo (n=107)	Negativo (n=307)
Tiroidite auto-imune	Eutiroideia (n=341)	82 (24%)	259 (76%)
	Hipotiroidismo (n=31)	10 (32%)	21 (68%)
	Hipertiroidismo (n=42)	15 (36%)	27 (64%)

**Tabela 10- Frequência de anticorpos anti células parietais nos dois grupos de doentes com doença de Graves.** Não se verifica diferença estatisticamente significativa na positividade de anticorpos anti células parietais nos dois subgrupos ( $p > 0,05$ ; Teste exacto de Fisher's).

		Anti células parietais	
		Positivo (n=13)	Negativo (n=35)
Doença de Graves	Doença de Graves "activa" (n=21)	8 (38%)	13 (62%)
	Doença de Graves "controlada" (n=27)	5 (19%)	22 (82%)

Como se pode observar na Tabela 11, na nossa população de doentes com tiroidite auto-imune a prevalência de anti células parietais positivas aumenta com a idade.

**Tabela 11- Distribuição dos anticorpos anti células parietais de acordo com a idade nos dois grupos de doentes com patologia auto-imune da tiróide.** A presença de anti células parietais apenas difere nos diferentes intervalos etários nos doentes com tiroidite auto-imune.

		Intervalos etários (média $\pm$ desvio padrão)					
		Tiroidite auto-imune* (n=414)			Doença de Graves** (n=48)		
		<18 (16 $\pm$ 4)	18-50 (36 $\pm$ 8)	>50 (62 $\pm$ 8)	<18	18-50 (35 $\pm$ 9)	>50 (64 $\pm$ 9)
Anti células parietais	Positivo	0	51 (47,7%)	56 (52,3%)	0	9 (69,2%)	4 (30,8%)
	Negativo	7 (2,3%)	179 (58,3%)	121 (39,4%)	1 (2,9%)	16 (45,7%)	18 (51,4%)

\* $p < 0,05$ , Teste qui quadrado. \*\* $p > 0,05$ , Teste qui quadrado



### Factor Intrínseco

No que respeita aos anticorpos anti factor intrínseco a prevalência de positividade em cada uma das doenças auto-imunes da tiróide é muito menor que o verificado para os anti células parietais. Assim, na doença de Graves apenas um doente do subgrupo “controlado” apresenta positividade para este anticorpo. Na tiroidite auto-imune, apenas 16 (3,9%) apresentam anticorpos anti factor intrínseco positivos. Não foram encontradas diferenças na distribuição destes auto-anticorpos nas duas patologias auto-imunes da tiróide (tiroidite auto-imune- $\chi^2=3,1$ ,  $p > 0,05$ ; doença de Graves-  $\chi^2=0,8$ ,  $p > 0,05$ ).

Na Tabela 12 está demonstrada a distribuição dos anticorpos anti factor intrínseco nos três subgrupos funcionais de doentes com tiroidite auto-imune. Tal como para os anti células parietais não foram encontradas diferenças significativas entre estes subgrupos.

**Tabela 12- Frequência de anticorpos anti factor intrínseco nos três grupos de doentes com tiroidite auto-imune.** Como  $p > 0,05$ , a presença de anti factor intrínseco não difere nos subgrupos.

		Anti factor intrínseco	
		Positivo (n=16)	Negativo (n=391)
Tiroidite auto- imune	Eutiroideia (n=334)	12 (4%)	322 (96%)
	Hipotiroidismo (n=31)	3 (10%)	28 (90%)
	Hipertiroidismo (n=42)	1 (2%)	41 (98%)

$p > 0,05$ ; Teste de qui-quadrado

No caso dos IFA, não existe uma diferença de distribuição significativa pelos diferentes grupos etários nas duas patologias auto-imunes da tiróide (Tabela 13).

**Tabela 13- Distribuição dos anticorpos anti factor intrínseco de acordo com a idade nos dois grupos de doentes com patologia auto-imune da tiróide.** A presença de anti factor intrínseco não difere nos diferentes intervalos etários em ambas as patologias.

		Intervalos etários (média ± desvio padrão)					
		<u>Tiroidite auto-imune*</u> (n=407)			<u>Doença de Graves**</u> (n=49)		
		<18 (16 ± 4)	18-50 (36 ± 8)	>50 (62 ± 8)	<18	18-50 (35 ± 9)	>50 (64 ± 9)
Anti factor intrínseco	Positivo	0 (16 ± 4)	7 (43,8%)	9 (56,2%)	0	1 (4%)	0
	Negativo	7 (1,8%)	219 (56%)	165 (42,2%)	1 (100%)	24 (96%)	23 (100%)

\*p>0,05, Teste qui quadrado. \*\*p>0,05, Teste qui quadrado

Na Tabela 14 está demonstrada a associação entre os anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco nos doentes com tiroidite auto-imune e doença de Graves.

**Tabela 14- Associação dos anticorpos anti células parietais com os anticorpos anti factor intrínseco nos doentes com tiroidite auto-imune e doença de Graves.** Apenas se verifica associação significativa nos doentes com tiroidite auto-imune. Agregando as duas patologias continua a existir associação significativa dos anticorpos anti células parietais com os anticorpos anti factor intrínseco (p<0,05, Teste qui quadrado).

		Anti factor intrínseco				
Anti células parietais		Tiroidite auto-imune* (n=407)			Doença de Graves** (n=48)	
		Positivo (n=16)	Negativo (n=391)		Positivo (n=1)	Negativo (n=47)
	Positivo (n=101)	9 (8,9%)	92 (91,1%)		Positivo (n=13)	1 (7,7%)
Negativo (n=306)	7 (2,3%)	299 (97,7%)		Negativo (n=35)	0	35 (100%)

\*P<0,05, Teste qui quadrado. \*\* p>0,05, Teste exacto de Fisher's.

Como se verificou que cerca de 1/4 dos doentes com tiroidite auto-imune ou doença de Graves tinham anti células parietais positivas pretendeu-se verificar se essa positividade se acompanha de uma maior intensidade de auto-imunidade tiroideia. Desta forma, foi-se verificar se havia diferença no título de anticorpos da tiróide nos doentes com células parietais positivas e conferiu-se que para as tiroidites não havia diferença significativa no título de aTG (anti ACP positivo – mediana 28 (Percentil 25-75 8,5-145) UI/mL *versus* anti ACP negativo 31,6 (9,4-131,5) UI/mL,  $p > 0,05$ , Teste de Mann Whitney), mas os títulos de aTPO eram significativamente superiores (anti ACP positivo 281 (59-757) UI/mL *versus* anti ACP negativo 119 (26-424) UI/mL,  $p < 0,05$ , Teste de Mann Whitney). Nos níveis de hormonas da tiróide, não se verificaram diferenças significativas – T4L (anti ACP positivo – 1,2 (1,0-1,3) ng/dL *versus* anti ACP negativo 1,1 (1,0-1,2) ng/dL); T3L (anti ACP positivo 2,9 (2,7-3,2) pg/mL *versus* anti ACP negativo 2,9 (2,6-3,4) pg/mL); TSH (anti ACP positivo 1,7 (0,4-2,8) UI/mL *versus* anti ACP negativo 1,5 (0,7-2,4) UI/mL;  $p > 0,05$ , Teste de Mann Whitney).

Em contraste no caso da doença de Graves, não houve diferenças estatisticamente significativas nem nos títulos de TRAb nem nos níveis séricos de TSH e T4L entre os 13 (6,4%) casos de anti células parietais positivas *versus* os 35 (17,1%) casos de anti células parietais negativas (dados não apresentados).

Verificou-se que nos doentes com tiroidite auto-imune com ou sem aTG positivos, a prevalência de anti células parietais positivas era semelhante (26%). Na doença de Graves verificou-se uma prevalência de ACP positivos de 35% nos doentes com aTG positivo *versus* 21% nos negativos, não se verificando nenhuma associação significativa em ambas as patologias ( $p > 0,05$ , Teste do qui quadrado). De referir que no entanto, a prevalência de ACP positivos é superior nos doentes com aTPO positivos em ambas as patologias auto-imunes da tiróide, não se verificando contudo diferenças estatisticamente significativas (na TH, ACP positivos de 28% nos doentes com aTPO positivo *versus* 11% nos negativos e na DG, ACP positivos de 31% nos doentes com aTPO positivo *versus* 17% nos negativos;  $p > 0,05$ , Teste do qui quadrado).

### 5.3. Impacto clínico da positividade de anticorpos anti células parietais e factor intrínseco na doença auto-imune da tiróide

Para avaliar o impacto clínico da possível coexistência de uma gastrite auto-imune associada à tiroidite, avaliou-se essencialmente os parâmetros hematológicos, incluindo a hemoglobina, volume globular, índices hematimétricos e os níveis de vitamina B<sub>12</sub>. Em casos de anemia pesquisou-se também os níveis séricos de ferro e ferritina. Os resultados laboratoriais destes parâmetros para os dois grupos de doença auto-imune da tiróide encontram-se resumidos na Tabela 15.

**Tabela 15- Resultados laboratoriais para cada um dos parâmetros hematológicos em cada uma das doenças auto-imunes da tiróide.**

	Tiroidite auto-imune (n=413)				Doença de Graves (n=49)			
	Hgb* (g/dL)	VG** (%)	VCM*** (fL)	Vit. B <sub>12</sub> (pg/mL)	Hgb (g/dL)	VG (%)	VCM (fL)	Vit. B <sub>12</sub> (pg/mL)
Média	12,7	39,3	88,3	442	12,9	39,4	85,7	720
D. padrão	1,2	3,2	4,7	250,9	1,2	3,2	5,3	542,5
Mediana	13	39	89	404	13	39	86	488
Mínimo	7	23	68	83	10,8	34	69,6	90
Máximo	16	50	102	2000	46	46	98	2000

\*Hemoglobina; \*\*Volume globular; \*\*\*Volume corpuscular médio

A anemia foi então classificada segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) com base na evidência de valores de hemoglobina (<12 g/dL) e VG diminuídos (<37%). Verificou-se que 58 (14,0%) dos 414 doentes com tiroidite auto-imune tinham anemia, assim como 7 (14,3%) dos 49 doentes com doença de Graves, não havendo diferenças significativas de prevalência entre as duas patologias ( $p > 0,05$ , Teste de qui quadrado). Na Tabela 16 estão resumidos os resultados laboratoriais dos parâmetros hematológicos e vitamina B<sub>12</sub> para os doentes com doença auto-imune da tiróide com e sem anemia.

**Tabela 16- Comparação dos parâmetros hematológicos e vitamina B<sub>12</sub> nos doentes com e sem anemia (mediana, Percentil 25-75).** De acordo com a definição, os valores de hemoglobina, volume globular e volume corpuscular médio significativamente mais baixos nos doentes com anemia ( $p < 0,05$ , Teste de Mann Whitney), mas não os níveis de vitamina B<sub>12</sub>.

Doença auto-imune da tiróide				
	Hgb	VG	VCM	Vit B <sub>12</sub>
<b>Com anemia</b>	11 (11-12)	35 (34-36)	87 (82-90)	404 (309-564)
<b>(n=65)</b>	(n=65)	(n=65)	(n=65)	(n=53)
<b>Sem anemia</b>	13 (12-14)	40 (38-42)	89 (86-91)	412 (306-525)
<b>(n=398)</b>	(n=398)	(n=398)	(n=398)	(n=309)
<b>P</b>	<0,05	<0,05	<0,05	0,92

Na tiroidite auto-imune verificou-se que dos 107 casos com anti células parietais positivas, 17 (16%) tinham anemia. No entanto, não se verificam associações significativas entre os doentes com ou sem anti células parietais no que respeita à anemia ( $\chi^2=0,42$ ;  $p > 0,05$ ). Também nos 49 casos com doença de Graves não se verificam associações significativas entre os doentes com ou sem anti células parietais no que respeita à anemia (Tabela 17).

**Tabela 17- Associação dos anticorpos anti células parietais com a presença de anemia nos doentes com tiroidite auto-imune e doença de Graves.** Não se verifica associação significativa em ambas as patologias (avaliando as DAIT em conjunto, a prevalência de ACP positivos foi de 31,3% nos doentes com anemia e 25,2% nos doentes sem anemia).

		<u>Tiroidite auto-imune*</u>		<u>Doença de Graves**</u>	
		(n=414)		(n=48)	
		Com anemia	Sem anemia	Com anemia	Sem anemia
		(n=58)	(n=356)	(n=6)	(n=41)
<b>Anti células parietais</b>	<b>Positivo</b>	17	90	3	10
	(n=107)	(16%)	(84%)	(23%)	(77%)
<b>Anti células parietais</b>	<b>Negativo</b>	41	266	3	32
	(n=307)	(13%)	(87%)	(9%)	(91%)

\* $P > 0,05$ , Teste qui quadrado

\*\*  $p > 0,05$ , Teste exacto de Fisher's

Quando se compararam os parâmetros hematológicos com a distribuição dos anticorpos anti células parietais nos 65 doentes com doença auto-imune que têm anemia (58 com tiroidite auto-imune e 7 com doença de Graves), verificou-se que os doentes com anti células parietais positivos tinham uma concentração de hemoglobina e volume globular menor que os doentes com anti células parietais negativos ( $p < 0,05$ , teste de Mann Whitney) (Tabela 18).

**Tabela 18- Comparação dos parâmetros hematológicos nos doentes com doença auto-imune da tiróide que têm anemia com os anticorpos anti células parietais- mediana (Percentil 25-75).**

Doentes com doença auto-imune da tiróide e anemia (n=65)					
Anti células parietais		Hgb	VG	VCM	Vit B <sub>12</sub>
	Positivo	11 (10-11) (n=20)	35 (33-35) (n=20)	89 (80-92) (n=20)	371 (232-580) (n=17)
	Negativo	11 (11-12) (n=44)	36 (35-36) (n=44)	88 (82-89) (n=44)	404 (310-562) (n=35)
	P	0,02	0,002	0,44	0,48

Comparando os mesmos parâmetros no total de doentes com DAIT verificaram-se, nos que têm anti células parietais e/ou factor intrínseco positivos, níveis de volume corpuscular médio e vitamina B<sub>12</sub> significativamente inferiores ( $p < 0,05$ , Teste de Mann Whitney) (Tabela 19).

**Tabela 19- Comparação dos parâmetros hematológicos e vitamina B<sub>12</sub> nos doentes com doença auto-imune da tiróide com os anticorpos anti células parietais e/ou anti factor intrínseco (mediana (Percentil 25-75)).**

Doentes com doença auto-imune da tiróide (n=463)					
Anti células parietais e/ou factor intrínseco		Hgb	VG	VCM	Vit B <sub>12</sub>
	Positivo	13 (12-13) (n=127)	39 (37-41) (n=127)	87 (83-90) (n=127)	379 (235-503) (n=103)
	Negativo	13 (12-14) (n=336)	39 (37-41) (n=336)	89 (86-91) (n=336)	415 (329-539) (n=259)
	P	0,20	0,20	0,001	0,005

Na tabela 20 encontra-se descrita a mesma associação mas apenas para os 65 casos com anemia. Nestes doentes verificaram-se ainda os níveis de ferro e ferritina para avaliar a co-existência de uma eventual anemia por carência de ferro.

**Tabela 20- Associação dos anticorpos anti células parietais e/ou anti factor intrínseco positivos nos casos com doença auto-imune da tiróide com anemia (mediana (Percentil 25-75)).** Verifica-se que os doentes com anemia e anti células parietais e/ou factor intrínseco positivos têm níveis de volume globular e hemoglobina significativamente menores ( $p < 0,05$ , Teste de Mann Whitney).

Doença auto-imune da tiróide (65 casos com anemia)						
	Hgb	VG	VCM	Vit B <sub>12</sub>	Ferro	Ferritina
<b>Anti célula parietais e/ou anti factor intrínseco positivos</b>	10 (10-11) (n=22)	35 (33-35) (n=22)	87 (80-91) (n=22)	365 (236-573) (n=18)	64 (37-84) (n=10)	48 (17-87) (n=10)
<b>Anti célula parietais e anti factor intrínseco negativos</b>	11 (11-12) (n=43)	36 (35-36) (n=43)	88 (82-89) (n=43)	405 (316-562) (n=35)	52 (35-92) (n=17)	24 (13-38) (n=17)
<b>p</b>	0,02	0,01	0,59	0,29	0,84	0,09

#### **5.4. Associação entre auto-imunidade da tiróide e gástrica com infecção por *Helicobacter pylori***

No grupo de doentes com suspeita de auto-imunidade da tiróide e gástrica (com anticorpos anti células parietais, factor intrínseco e anticorpos aTPO e aTG e TRAb positivos), verificou-se que raramente é efectuada a determinação de anti *H.pylori*. Dos 471 doentes com doença auto-imune da tiróide, apenas 3 (0,6%) tinham serologia de *H.pylori* efectuada com resultado negativo para ambos os anticorpos IgA e IgG e nos 107 com tiroidite auto-imune que tinham ACPs positivos 2 (1,9%) tinham serologia efectuada com resultado positivo.

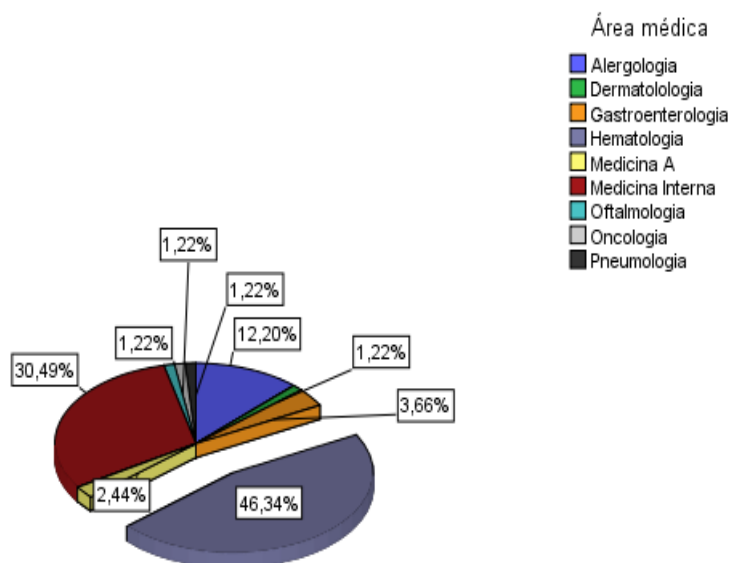
Desta forma, seleccionou-se prospectivamente um segundo grupo de doentes com base nos pedidos de serologia de *H.pylori* num período de 12 meses; nestes pesquisaram-se os marcadores imunológicos (determinações analíticas de anticorpos anti células parietais, factor intrínseco e anticorpos aTPO e aTG e TRAb), de forma a verificar a sua prevalência nestes doentes. Verificou-se que a amostra era proveniente de vários serviços deste Hospital.

#### **Caracterização da amostra**

Relativamente à amostra estudada (n=82), 54 eram do sexo feminino com idades compreendidas entre os 12 e 84 anos e 28 eram do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 4 e 86 anos; 66 casos (80%) tinham IgA e/ou IgG anti *H.pylori* positivo (43 mulheres e 23 homens). No período a que se refere esta pesquisa (ano de 2012) a proveniência das amostras com pedido de serologia para o *H.pylori* foi prioritariamente a Hematologia, totalizando quase metade da amostra. As restantes áreas médicas encontram-se descritas no Gráfico 2.



**GRÁFICO 2-** Distribuição pelas diferentes áreas médicas das amostras com pedidos de serologia para *Helicobacter pylori*



### **Resultados laboratoriais**

Para todos os doentes foi verificado na base de dados “CLINIDATA® XXI” se tinham efectuadas as determinações analíticas de anticorpos anti tiroideus, e bioquímicos (TSH, T4L e vitamina B<sub>12</sub>). Verificou-se que, no que respeita aos auto-anticorpos, 34 (41,4%) doentes tinham determinação de aTG e aTPO, com valores de mediana (Percentil 25-75)- 0,9 (0,6-1,4) UI/mL e 0,2 (0,0-0,6) UI/ml-respectivamente. Dois doentes tinham doseamentos de aTPO acima do limite superior de referência (210 UI/ml e 21,4 UI/ml), sendo no entanto negativos para a presença de *H.pylori*. Nenhum tinha determinação sérica de TRAb. Relativamente aos parâmetros bioquímicos, 53 (64,6%) doentes tinham doseamento de TSH com níveis de 1,6 (1,2-2,4) UI/ml, dos quais um tinha o valor aumentado (14 UI/mL), 51 (62,2%) tinham valores de T4L de 1,0 (0,9-1,1) g/dL e 46 (56,1%) tinham níveis de

vitamina B<sub>12</sub> de 503 (367-823) pg/mL. Todos tinham doseamentos de T4L, aTG e vitamina B<sub>12</sub> dentro dos valores normais de referência.

Também se pesquisou a prevalência de anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco, verificando-se que apenas 26 (31,7%) tinham doseamentos do primeiro anticorpo, dos quais apenas 2 (8,7%) eram positivos. Relativamente aos IFA, 8 (9,7%) tinham o doseamento efectuado (com resultado negativo) embora destes, 7 (87,5%) tivessem serologia de *H.pylori* positiva (Tabela 21). 7 doentes tinham simultaneamente o doseamento dos dois anticorpos, sendo ambos negativos, não havendo diferenças estatísticas significativas entre os doentes com *H.pylori* positivo e negativo. ( $p>0,05$ ).

**Tabela 21- Associação dos anticorpos anti células parietais e anti factor intrínseco com a serologia de *H. pylori*.**

	Anti células parietais positivos	Anti células parietais negativos		Anti factor intrínseco positivo	Anti factor intrínseco negativo
<b><i>H. pylori</i> positivo</b>	2 (8,7%)	21 (91,3%)		0	7 (87,5%)
<b><i>H. pylori</i> negativo</b>	0	3 (100%)		0	1 (12,5%)

De forma a avaliar-se o possível impacto de uma serologia positiva para *H.pylori*, nos parâmetros hematológicos, na hipótese de uma associação a gastrite, analisou-se a hemoglobina, volume globular e volume corpuscular médio e os níveis de vitamina B<sub>12</sub>, ferro e ferritina nesta população. Na amostra em geral não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em cada um dos parâmetros nos grupos com serologia positiva e negativa (dados não apresentados).

## ***Discussão***

---

## 6. Discussão

As doenças auto-imunes são resultado da activação anómala de linfócitos T e B que reconhecem e destroem componentes do próprio (denominados auto antígenos). A presença de uma resposta auto-imune é assinalada pelo aparecimento de auto-anticorpos em circulação, constituindo assim a presença de um auto-anticorpo com determinada especificidade o caminho para reconhecer uma doença auto-imune. Podem ser divididas em doenças específicas de órgão, como a doença auto-imune da tiróide e a gastrite auto-imune, ou doenças sistémicas (Cojocarú *et al*).

O presente trabalho trata-se de um estudo transversal cujo objectivo era relacionar a auto-imunidade da tiróide e gástrica, bem como a sua possível interacção com a presença de uma resposta imune ao *Helicobacter pylori*, agente que se associa à gastrite atrófica. Por outro lado, a gastrite atrófica é também um dos padrões histopatológicos da gastrite auto-imune (Sepulveda, 2008). Foram estudados, 463 casos com doença auto-imune da tiróide, 414 (89%) doentes com tiroidite auto-imune e 49 (11%) com doença de Graves, em seguimento num Serviço Endocrinologia de um Hospital central, universitário, e diagnosticados por critérios essencialmente laboratoriais. Como a doença auto-imune da tiróide é uma doença específica de órgão, neste trabalho foi usado para definição de tiroidite auto-imune o doseamento dos anticorpos tiroideus no sangue, pelo ensaio de quimioluminiscência, e TRAb, pelo método de ELISA, para a doença de Graves. São métodos considerados como tendo boa especificidade e elevada sensibilidade no diagnóstico de DAIT.

Está descrito na literatura que na tiroidite auto-imune se destaca a presença de aTPO fortemente positivos em cerca de 90% dos casos, sendo actualmente este o grande marcador da doença, usado para definir a existência de uma tiroidite auto-imune. Também neste estudo, se verifica uma prevalência de aTPO positivos em cerca de 89% dos doentes com tiroidite auto-imune e 76% nos casos com doença de Graves. Os anticorpos aTG, por sua vez, estão presentes em 20 a 50% dos doentes (Melo, 2006), em aproximadamente 60% dos doentes com tiroidite linfocítica e 30% de doentes com DG (Swain *et al.*, 2005). De notar que neste estudo, a prevalência de aTG era ligeiramente superior ao verificado em outros

estudos: 47% nos doentes com DG e 72% nos doentes com tiroidite. O facto dos nossos critérios de selecção dos diferentes grupos ter sido, essencialmente, laboratorial, poderá contribuir para essas diferenças de prevalência.

Os anticorpos aTPO são os que se relacionam mais estreitamente com disfunção clínica da tiróide. A sua presença está fortemente associada com inflamação linfocítica e lesão glandular, sabendo-se que há mais de duzentos epítomos da TPO reconhecidos por linfócitos T nos doentes com tiroidite auto-imune crónica. Estes anticorpos estão presentes no soro em concentrações que variam de micro a miligramas por mililitro e têm a propriedade de fixar o complemento e, desta forma, serem citotóxicos (Melo, 2006). Neste estudo, também se verificou que os títulos de aTPO se correlacionavam com o grau de disfunção endócrina da tiróide, uma vez que uma correlação positiva com os níveis de TSH ( $r_s=0,162$ ,  $p<0,05$ ) e uma correlação negativa com os níveis de T4L ( $r_s=-0,143$ ,  $p<0,05$ ) foi observada, sugerindo que existe uma relação entre os níveis de aTPO e o grau de disfunção da tiróide. O mesmo não se verificou para os títulos de aTG.

Como a principal manifestação clínica de DAIT é a disfunção tiroideia, a sua frequência foi também avaliada. Desta forma subdividiu-se os doentes com tiroidite auto-imune de acordo com os níveis de T4L, T3L e TSH e verificou-se que 83% doentes tinham auto-imunidade “Eutiroideia”, 8% tinham hipotiroidismo e 10% tinham hipertiroidismo (Tabela 5). Nos doentes diagnosticados com DG, avaliaram-se os níveis séricos de TSH e verificamos que 22 (45%) tinham doença “activa” e 27 (55%) tinham doença “controlada” (Tabela 6).

Os TRAb podem estar presentes quer na DG quer nas outras tiroidites com base auto-imune. Na DG são anticorpos estimuladores (TRAb e) que se ligam a sequências de aminoácidos na região terminal-NH<sub>2</sub> da porção extracelular do receptor. Nas outras tiroidites são anticorpos bloqueadores (TRAb b), que se ligam a sequências mais próximas da superfície. Estes anticorpos estão presentes em cerca de 10% dos doentes com tiroidite auto-imune crónica. Têm um papel importante no desenvolvimento e gravidade do hipotiroidismo, sendo detectáveis frequentemente nos doentes com tiroidites atróficas (Melo, 2006). No nosso estudo, não foi encontrado nenhum destes casos com hipotiroidismo em que os TRAb poderiam funcionar como anticorpos bloqueadores.

Nos doentes com doença “activa”, a presença de aTPO e/ou aTG positivos não parece associar-se a um maior impacto imunológico ou endócrino. De facto quando se comparam os títulos de TRAb com os níveis de T4L e TSH, com ou sem aTPO e/ou aTG positivos, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (dados omitidos).

É bem conhecido que as doenças da tiróide e outras doenças auto-imunes são altamente prevalentes entre doentes do sexo feminino. Com uma idade média de  $47 \pm 16$  anos, nos doentes com tiroidite auto-imune também se verificou um predomínio do sexo feminino em todos os estados endócrinos, no presente estudo. O mesmo se verificou nos doentes com doença de Graves.

A gastrite auto-imune é uma doença comum mas subdiagnosticada, com uma prevalência de cerca de 4% na população geral. Além disso, será relevante fazer um diagnóstico precoce, pois estes doentes podem ter um risco até 3 vezes maior de neoplasia gástrica. É uma doença inflamatória crónica do corpo e fundo gástrico que provoca atrofia da mucosa e má absorção de nutrientes essenciais, particularmente vitamina B<sub>12</sub> e ferro. É caracterizada pela presença de auto-anticorpos no soro para as células parietais (dirigidos contra a bomba de prótons H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase) e de auto-anticorpos para o factor intrínseco (Tozzoli *et al*, 2010). Tem uma prevalência de 2-5% na população em geral e que aumenta com a idade, a partir de 2,5% na terceira década e de 12% na oitava década. Aparecem em cerca de 30% dos doentes com outras patologias auto-imunes, nomeadamente doença auto-imune da tiróide (Tozzoli *et al*, 2010). Neste nosso estudo, a tiroidite auto-imune representava a grande maioria das DAIT (89,4%) associada com GAI, com uma prevalência de células parietais positivas de 26%, semelhante à encontrada por Tozzoli e colegas (25%), mas menor que a encontrada no trabalho de Centanni (35%). Também como no nosso estudo, onde cerca de 1/4 dos doentes com tiroidite auto-imune ou doença de Graves tinham anti células parietais positivas (25,8% para TH e 27,1% para GD), Tozzoli e colegas encontraram apenas uma subtil diferença na prevalência de ACP entre os dois grupos de doentes (25,3% para HT e 28,6% para GD), sugerindo que não existe uma associação preferencial de ACP com qualquer uma das duas doenças. Além disso, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na positividade de anti células parietais nos três subgrupos endócrinos da tiroidite auto-

imune e nos dois subgrupos dos doentes com doença de Graves, no presente estudo.

Tal como relatado na literatura, também se verificou um ligeiro aumento da positividade de anticorpos anti células parietais com a idade nos doentes com tiroidite auto-imune (Tabela 7).

Como se verificou que cerca de 1/4 dos doentes com tiroidite auto-imune ou doença de Graves tinham anti células parietais positivas, pretendeu-se avaliar se essa positividade se acompanha de uma maior expressão da auto-imunidade tiroideia. Desta forma, fomos verificar se havia diferença no título de anticorpos para a tiróide nos doentes com anti células parietais positivas e conferiu-se que, para as tiroidites, não havia diferença significativa no título de aTG, mas os títulos de aTPO eram significativamente superiores. Também não se verificaram alterações significativas nos níveis séricos de TSH, T4L e T3L nos casos com e sem anti células parietais positivas. Já no caso da doença de Graves, não houve diferenças estatisticamente significativas nem nos títulos de TRAb, nem nos níveis séricos de TSH e T4L nos casos com e sem anti células parietais positivas.

Por outro lado, verificou-se que, quer nos doentes com tiroidite auto-imune quer com doença de Graves, a prevalência de anti células parietais positivas é semelhante nos doentes com aTG positivos ou negativos. Assim, parece encontrar-se uma associação da auto-imunidade gástrica (ACPs positivos) e a extensão da auto-imunidade nas tiroidites, no caso dos anticorpos aTPO.

Dois mecanismos são geralmente considerados como indutores de atrofia da mucosa do corpo gástrico. Por um lado, a patogénese auto-imune da gastrite atrófica é bem aceite, sendo a anemia perniciosa considerada como a sua apresentação clínica característica, embora o diagnóstico possa ser feito na ausência de anemia ou dentro do contexto de outras manifestações auto-imunes. Por outro lado, tem sido reconhecido que a infecção prolongada por *H.pylori* pode induzir atrofia da mucosa oxíntica, que pode apresentar-se clinicamente com uma longa história de dispepsia ou anemia por deficiência de ferro (Annibale *et al*, 2001).

Os anti células parietais estão presentes em 100% dos doentes com gastrite auto-imune e em cerca de 90% dos doentes com anemia perniciosa. Estes auto-anticorpos têm elevada sensibilidade mas baixa especificidade, para o diagnóstico de anemia perniciosa e a sua presença, pode anteceder em vários anos (20 ou 30

anos), o aparecimento de anemia perniciosa, assim como o da gastrite auto-imune. São úteis no rastreio pré-clínico, mas nem todos os doentes com anti células parietais irão desenvolver anemia.

Os anti factor intrínseco raramente aparecem na gastrite auto-imune que não é acompanhada com anemia perniciosa e, por esta razão, são considerados mais específicos que os anti células parietais para o diagnóstico de anemia perniciosa. A sua presença pode antecipar em vários anos o aparecimento do quadro clínico. No entanto, a sua ausência não exclui o diagnóstico e deve-se continuar a investigação, uma vez que enquanto a prevalência de ACP decresce no curso da anemia perniciosa, os IFA podem ocorrer quando a anemia já está estabelecida (Weetman, 2005).

Está descrito que muitos doentes com anemia perniciosa têm ACP mas os 10% com AP que são seronegativos para estes anticorpos, podem ser explicados pela possível resposta auto-imune esgotada, por eventuais falsos negativos, por não haver anticorpos livres circulantes no momento da determinação, ou pela insuficiente produção do anticorpo.

Neste estudo, a prevalência de positividade para o anti factor intrínseco em cada uma das doenças auto-imunes da tiróide é muito inferior à positividade verificada para os ACPs, não havendo diferenças na distribuição de IFA em ambas as patologias auto-imunes da tiróide (Tabela 12). Também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos vários subgrupos endócrinos, bem como nos diferentes intervalos etários (Tabela 13). No entanto, nos doentes com tiroidite existe associação significativa entre os títulos de ACP e IFA (Tabela 14).

De forma a estabelecer se os auto-anticorpos gástricos tinham alguma relação específica com qualquer das apresentações endócrinas, os doentes foram avaliados com base na positividade de ACP sozinho, IFA sozinho e positividade e negatividade para ambos os anticorpos e apesar da prevalência de ACP ser muito superior à dos IFA, nenhum dos dois auto-anticorpos se parece relacionar com a repercussão endocrinológica da doença auto-imune da tiróide (isto é TH com ou sem hipotiroidismo e doença de Graves “activa” ou “controlada”). Assim nenhum padrão específico de anticorpos foi relacionado com as várias apresentações endócrinas.

A associação observada entre doença auto-imune da tiróide e gastrite auto-imune sugere uma etiopatogenia comum, como fenómenos auto-imunes em ambos



os órgãos, provavelmente devido a uma resposta imune alterada em indivíduos geneticamente predispostos. A presença de anemia tem sido descrita em doentes com a homeostase da tiróide prejudicada (Centanni *et al.*, 1999) e constitui um dos métodos indirectos que nos pode sugerir a presença de gastrite em indivíduos com DAIT. A mais conhecida é a anemia macrocítica por deficiência de vitamina B<sub>12</sub> (Garcia *et al.*, 2012). Desta forma, a bem conhecida associação entre GAI e anemia perniciosa deve-se à diminuição da secreção de IFA com a consequente diminuição da absorção de vitamina B<sub>12</sub>. No entanto níveis séricos desta vitamina abaixo do normal não devem ser utilizados como único critério para o diagnóstico de anemia perniciosa, pois podem ocorrer em indivíduos com dieta estritamente vegetariana, idade avançada, má absorção induzida por drogas e deficiência de transcobalamina II (Cohen *et al.*, 2000) e, portanto, a definição de anemia perniciosa inclui a demonstração da presença de maturação ineficaz na medula óssea (megaloblástica) decorrente da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> exclusivamente por falta de factor intrínseco (Markle, 1996), bem como a presença de uma concentração de hemoglobina <13 g/ dL para homens e <12 g / dL para mulheres, volume corpuscular médio igual ou superior a 100fL (Lahner & Annibale, 2009).

A evolução da gastrite auto-imune é lenta e assintomática, com o aparecimento das manifestações hematológicas ocorrendo ao longo de 2 a 3 décadas. Neste estudo também se estudaram os valores de hemoglobina, volume corpuscular médio e volume globular por serem alguns dos referidos como indicadores de anemia e verificou-se que cerca de 14% doentes com DAIT apresentavam valores de Hgb inferiores a 12 g/dL e/ou VG <37%) apenas 0,6% tinham valores de MCV superiores a 100 fL.

Observou-se a presença de anemia em 16% dos indivíduos com tiroidite auto-imune e anti células parietais positivos, não se verificando no entanto associações significativas dos doentes com anemia e ACP. De facto, 13% das tiroidites com ACP negativos têm também anemia (Tabela 17). Por outro lado, ao avaliarmos os níveis de vitamina B<sub>12</sub>, na DAIT, apesar de se encontrarem níveis mais baixos nos casos com ACPs e/ou IFA positivos (Tabela 19), não existem diferenças significativas nos doentes com ou sem anemia (Tabela 16) nem, dentro dos que têm anemia, os que associam ACPs e/ou IFA positivo (Tabela 20). Assim, neste estudo não se encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa entre doença auto-imune da

tiróide e anemia perniciosa, apesar dos casos com auto-imunidade gástrica (ACPs e/ou IFA positivos) terem menor níveis de vitamina B<sub>12</sub> séricos e os casos com anemia e ACP positivos terem níveis de Hgb e VG significativamente mais baixos (Tabela 18).

Além da anemia macrocítica por deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, estima-se que uma elevada percentagem de doentes com anemia ferropénica sem queixas gastrointestinais tenham gastrite atrófica do corpo como causa etiológica para a anemia (Annibale *et al.*, 2001).

Semelhante a este estudo, também no trabalho de Irvine (Irvine, 1975) não foi encontrada nenhuma relação estatística entre o diagnóstico clínico de doença da tiróide e a presença de GAI, contrariando o que Tozzoli e colegas reportaram no seu estudo, onde numa serie de 208 adultos com DAIT, a prevalência de ACP encontrada foi de 24,5%. No entanto, foi no trabalho de Lahner e colegas onde foi encontrada uma maior associação entre alterações da tiróide e doentes histologicamente diagnosticados com gastrite atrófica (53%). Os resultados obtidos no seu estudo sugeriam que a positividade das células parietais eram indicadores não só de dano gástrico mas constituía também um risco para a auto-imunidade da tiróide (Lahner *et al.*, 2008).

No presente estudo, os ACPs foram detectados pelo método de imunofluorescência indirecta e no estudo de Tozzoli, foram detectados pelo método de ELISA, o que pode justificar a ausência de associação neste estudo, uma vez que o método de IFI é um método com bastantes inconvenientes, não é muito sensível, e apenas fornece um valor semi-quantitativo resultante da diluição em serie do soro do doente. A interpretação dos resultados é também dependente da experiência do observador. Tozzoli demonstrou que o método de ELISA é mais sensível para detectar anticorpos H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase gástricos que a imunofluorescência indirecta, e tem uma elevada especificidade, podendo representar uma importante ferramenta para monitorizar o aparecimento e evolução clínica da GAI (Tozzoli *et al.*, 2010). Outra limitação do nosso estudo, de base laboratorial, foi não dispormos de informação de eventuais gastroscopias realizadas para confirmar a presença de GAI, pelo que não podemos determinar a especificidade da presença de ACP na nossa população. Neste estudo também não foi efectuado o doseamento da gastrina, cujo aumento plasmático constitui um marcador fiável de gastrite. No

trabalho de Centanni, foi mostrado que a determinação dos níveis de gastrina constitui uma importante ferramenta no diagnóstico de GAI em doentes com DAIT e representa um melhor marcador de diagnóstico que os usados actualmente (Centanni *et al.*, 1999). A importância de obter uns marcadores fiáveis para o diagnóstico e seguimento de GAI deve-se ao facto de ser uma doença que cursa de modo assintomático e aumenta a probabilidade de desenvolvimento de neoplasias gástricas.

O evento patogénico responsável pela relação clínica entre DAIT e GAI permanece por esclarecer. Muitos factores ambientais têm sido sugeridos para desencadear auto-imunidade. No entanto, a progressão clínica depende de deficiência na tolerância imune. Para um agente ser considerado capaz de provocar a auto-imunidade, tem que fornecer certas condições, como estar presente na fase inicial da doença e ser capaz de perturbar o mecanismo de tolerância em pessoas susceptíveis.

A infecção por *H.pylori* é uma das mais comuns em seres humanos e os seus resultados clínicos são altamente variáveis. Nos doentes infectados que desenvolvem atrofia gástrica do corpo, foi reportado um aumento na incidência de ACPs positivos que diminui significativamente após erradicação da bactéria. Com base na semelhança entre a gastrite induzida por *H.pylori* e a gastrite auto-imune clássica inferiu-se que em alguns indivíduos geneticamente predispostos, a infecção por *H.pylori* desempenha um papel na indução de auto-imunidade gástrica (D'Elis, Bergman, Amedei, Appelmelck & Del Prete, 2004). Vários estudos foram realizados para investigar qualquer possível relação do *H.pylori* com auto-imunidade tiorogástrica mas, até à data, nenhuma relação definitiva foi determinada (Perez-Perez, 1997; Kaptan *et al.*, 2000; Veijola, Oksanen, Sipponen & Rautelin, 2010).

O objectivo inicial do presente estudo era investigar a prevalência de *H.pylori* na nossa população de doentes com patologia auto-imune da tiróide e gástrica. No entanto, conferiu-se que no nosso estudo as determinações de serologia para *H.pylori* são raramente solicitadas nas doenças auto-imunes da tiróide (3 de 471 doentes) e mesmo nos casos de tiroidite que se associam a ACP positivos (2 de 107 casos), o que sugere que a possível associação a esta infecção, (suportada por dados do mimetismo antigénico) não tem sido considerada clinicamente. Por isso, foi seleccionado prospectivamente um novo grupo de 82 doentes com serologia de

*H.pylori* efectuada durante o ano de 2012, dos quais 66 (80%) tinham serologia positiva e 16 (20%) tinham negativa. Nestes casos verificou-se que, relativamente aos auto-anticorpos gástricos, 26 (32%) doentes com serologia de *H.pylori* tinham também doseamentos de anticorpos contra as células parietais (dos quais apenas 2 eram positivos para ambos os anticorpos, *H.pylori* e ACP) e 8 (10%) tinham doseamentos de IFA, embora fossem todos negativos para este anticorpo. Apesar da avaliação de auto-imunidade gástrica num número limitado de casos, não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre *H.pylori* e ACP/IFA na nossa série, de acordo com o que tem sido descrito em outros estudos (Veijola, Oksanen, Sipponen & Rautelin, 2010).

Para avaliar o possível impacto de uma serologia positiva para *H.pylori*, nos parâmetros hematológicos, na hipótese de uma associação a gastrite, analisou-se a hemoglobina, volume globular e volume corpuscular médio e os níveis de vitamina B<sub>12</sub> ferro e ferritina nesta população verificando-se que a serologia positiva para *H.pylori* não revelou, nesta amostragem, impacto nos parâmetros hematológicos.

Alguns estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre a presença de *H.pylori* e tiroidite auto-imune, embora outros estudos não encontrem tal associação (Papamichael *et al.*, 2009). Recentemente, uma correlação significativa entre estirpes CagA, independentemente do estado hormonal foi demonstrado (Bassi *et al.*, 2012). No que respeita aos marcadores de auto-imunidade da tiróide, avaliados em 34 (41,4%) da nossa amostra com serologia para *H.pylori*, apenas 2 (5,8%) doentes tinham valores de aTPO aumentados (com serologia de *H.pylori* negativa) e outro tinha TSH aumentada, sugerindo hipotireoidismo.

O uso de diferentes técnicas para avaliar a infecção por *H.pylori* poderia explicar estas divergências. Neste estudo, o *H.pylori* foi detectado por testes serológicos. A serologia pode ser significativa apenas para mostrar infecção por *H.pylori* activa em doentes com gastrite atrofica e histologicamente negativos. As directrizes de Maastricht II (Malfertheiner *et al.*, 2007) não referenciam a serologia como método de primeira escolha para a detecção de infecção por *H.pylori* enquanto actualizações posteriores reservam a serologia para situações especiais, incluindo situações em que outros testes podem ser enganosos por uma baixa densidade bacteriana (Sudraba *et al.*, 2011).

## ***Conclusão***

---

## 7. Conclusão

Neste estudo, em que partimos do universo de uma base de dados com quatro anos de determinações serológicas de anticorpos anti-tiroideus, identificamos 463 doentes com auto-imunidade tiroideia, sendo que a tiroidite auto-imune representava a grande maioria deles 414 (89%) e a doença de Graves 49 (11%) dos casos. Verificou-se que 83% doentes tinham auto-imunidade “eutiroideia”, 8% tinham hipotiroidismo e 10% tinham hipertiroidismo. Relativamente à doença de Graves, 45% tinham doença “activa” e 55% tinham doença “controlada”.

A prevalência de ACPs positivos foi semelhante nas duas patologias (25,8% *versus* 27,1%, respectivamente) e a prevalência de positividade não se associou a repercussão endócrina da doença (i.e. eu-, hipo- ou hiper-tiroidismo nas tiroidites, e doença de Graves “activa” ou “controlada”). Nas tiroidites auto-ímmunes encontra-se um aumento de prevalência de ACPs com a idade e uma associação da auto-imunidade gástrica (ACP positivos) com a extensão da auto-imunidade tiroideia avaliada pelos anticorpos aTPO. Os anticorpos aTPO foram os que se relacionaram mais estreitamente com a disfunção endocrinológica nas tiroidites auto-ímmunes.

Quanto aos anticorpos anti-factor intrínseco a sua positividade em cada uma das doenças auto-ímmunes da tiróide é muito inferior à verificada para os ACPs, com distribuição semelhante em ambas as patologias e nos seus diferentes subgrupos clínicos. No entanto, nos doentes com tiroidite existe associação significativa entre os ACPs e IFA.

Verificamos que cerca de 14% dos doentes com DAIT apresentavam anemia mas apenas 0,6% tinham macrocitose. Cerca de um terço (31%) destes casos de doença auto imune da tiróide com anemia têm ACPs positivos, acompanhando-se de níveis de Hgb e VG significativamente mais baixos. No entanto, a prevalência de anticorpos ACPs é semelhante nos casos sem anemia (25%). Independentemente da repercussão hematológica, a co-existência de anticorpos anti células parietais e/ou anti-factor intrínseco nas DAITs acarretam níveis séricos mais baixos de Vitamina B<sub>12</sub>.

Relativamente ao *H.pylori*, concluímos que no nosso estudo as determinações de serologia são raramente solicitadas nas doenças auto-ímmunes da tiróide (3 de 471 doentes) e mesmo nos casos de tiroidite que se associam a ACP positivos (2 de 107

casos), o que sugere que a possível associação a esta infecção, (suportada por dados do mimetismo antigénico) não tem sido considerada clinicamente.

No mesmo sentido, quando se analisaram prospectivamente os resultados laboratoriais dos pedidos de serologia para o *H. pylori*, durante 12 meses, a prevalência de auto-imunidade tiroideia é igualmente baixa (5,8% dos 41,4% de amostras em que é solicitada). Do mesmo modo, a investigação da doença auto-imune gástrica é realizada num número reduzido (26 casos - 32% - ACPs e 8 casos - 10% - de IFA) e a positividade ainda mais baixa, sugerindo que a associação entre *H.pylori* e auto-imunidade gástrica não tem sido clinicamente valorizada. Na nossa série de doentes a serologia positiva para *H. pylori* não revelou, impacto nos parâmetros hematológicos.

Neste estudo, a elevada prevalência de anti células parietais (cerca de 25%) nos doentes com doença auto-imune da tiróide sugere que estes doentes devem ser investigados para a presença de uma possível gastrite, especialmente em mulheres e naqueles com elevados títulos de aTG e aTPO.

Por outro lado, o facto de um elevado número de doentes apresentarem anti células parietais positivos, coloca em causa a utilidade clínica destes resultados, uma vez que a sua presença não limita aquele diagnóstico. Assim a associação deste pedido a patologias onde o seu resultado é de utilidade clínica discutível pode permitir especular sobre a pouca utilidade clínica da sua determinação. Tal facto poderá ter alguma relevância no impacto económico-financeiro que é desejável no âmbito das solicitações dos parâmetros laboratoriais.

No entanto sabemos que o nosso estudo possui limitações, uma vez que o grupo de doentes era bastante heterogéneo. O modelo ideal para avaliação da importância da gastrite na indução de auto-imunidade tiroideia seria o acompanhamento a longo prazo desses doentes, com observações dos parâmetros clínicos e serológicos de auto-imunidade.

## ***Bibliografia***

---



## 8. Bibliografia

- Annibale, B., Capurso, G., Chistoli, A., D'Ámbra, G., DiGiulio, E., Monarca, B., & DelleFave, G. (2001). Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms. *The American Journal of Medicine*. **111(6)**:439- 445.
- Annibale, B., Lahner, E., Negrini, R., Baccini, F., Bordi, C., Monarca, B., & DelleFave, G. (2005). Lack of specific association between gastric autoimmunity hallmark sand clinical presentations of atrophic body gastritis. *World J Gastroenterol*. **11(34)**:5351-535.
- Amedei, A., Bergman, M.P., Appelmelk, B.J., Azzurri, A., Benagiano, M., Tamburini, C., Van Der Zee, R., Telford, J.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M., D'Elis, M.M., & Del Prete, G. (2003). Molecular Mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> Adenosine Triphosphatase in Human Gastric Autoimmunity. *J Exp Med*. **198(8)**: 1147–1156.
- Appelmeck, B.J., Simoons-Smith, I., Negrini, R., Moran, A.P., Aspinall, G.O., Forte, J.G., DeVries, T., Quan, H., Verboom, T., Maaskant, J.J., Ghiara, P., Kuipers, E.J., Bloemena, E., Tadema, T.M., Townsend, R.R., Tyagarajan, K., Crothers, J.M., Monteiro, M.A., Savio, A., & DeGraaff, J. (1996). Potential role of molecular mimicry between H. pylori lipopolysaccharide and Host Lewis Blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun*. **64(6)**:2031-40.
- Appelmelk, B.J., Faller, G., Claeys, D., Kirchner, T., & Vandenbroucke-Grauls, C.M. (1998). Bugs on trial: the case of Helicobacter pylori and autoimmunity. *Immunol Today*. **19(7)**:296– 299.
- Armengol, M.P., Juan, M., Lucas-Martín, A., Fernández-Figuera, M.T., Jaraquemada, D., Gallart, T., & Pujol-Borrell, R. (2001). Thyroid Autoimmune Disease. *Am J Pathol*. **159(3)**:861– 873.
- Ayala, G., Torres, L., Espinosa, M., Fierros-Zarate, G., Maldonado, V., & Melendez-Zaigla, J. (2006). External membrane vesicles from *Helicobacter pylori* induce apoptosis in gastric epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*. **260(2)**:178-85.
- Akamizu, T., Amino, N., & De Groot, L.J. Hashimoto's Thyroiditis. (2012). [Versão electrónica]. *Thyroid Disease Manager*. Recuperado em 01 Fevereiro de 2013, de: <http://www.thyroidmanager.org>.

- Barbosa, J.A., & Schinonni, M.I. (2011). *Helicobacter pylori*: association with gastric cancer and new insights into the virulence factors. *R. Ci. med. biol., Salvador*. **10(3)**:254-262.
- Bassi, V., Marino, G., Iengo, A., Fattoruso, O., & Santinelli, C. (2012). Autoimmune thyroid diseases and *Helicobacter pylori*: The correlation is present only in Graves's disease. *World J Gastroenterol*. **18(10)**: 1093-1097.
- Blaser, M.J., & Berg, D.E. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J. Clin. Invest*. **107(7)**:767-73.
- Bjoro, T., Holmen, J., Kruger, O., Midthjell, K., Hunstad, K., Schreiner, T., Sandnes, L., & Brochman, H. (2000). Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. *The Health Study of Nord Trøndelag (HUNT). European Journal of Endocrinology*. **143(5)**:639-647.
- Brix, T.H., Kyvik, K.O., & Hegedüs, L. (2000). A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab*. **85(2)**:536-539.
- Brown, T.R., Sundick, R.S., Dhar, A., Sheth, D., & Bagchi, N. (1991). Uptake and metabolism of iodine is crucial for the development of thyroiditis in obese strain chickens. *J Clin Invest*. **88(1)**: 106-111.
- Brown, T.R., Zhao, G., Palmer, K.C., & Sundick, R.S. (1997). Thyroid injury, autoantigen availability and the initiation of autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity*. **27(1)**:1-12.
- Burek, C.L., & Talor, M.V. (2009). Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun*. **33(3-4)**: 183-189.
- Cançado, R., D., & Chiattoni, C., S. (2010). Anemia ferropénica no adulto-causas, diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Hematol Hemoter*. **32(3)**:240-246.
- Cappa, M., Bizzarri, C., & Crea, F. (2011). Autoimmune Thyroid Diseases in Children. *Journal of Thyroid Research*. **2011**: 675-703.
- Centanni, M., Marignani, M., Gargano, L., Corleto, V.D., Casini, A., DelleFave, G., Andreoli, M., & Annibale, B. (1999). Atrophic Body Gastritis in Patients with Autoimmune Thyroid Disease. An Underdiagnosed Association. *Arch Intern Med*. **159(15)**:1726-1730.
- Checchi, S., Montanaro, A., Pasqui, L., Ciuoli, C., Ceveni, G., Sestini, F., Fioravanti, C., & Pacini, F. (2007). Serum Ghrelin as a Marker of Atrophic Body Gastritis in

- Patients with Parietal Cell Antibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **92(11)**:4346–435.
- Chey, W.D., & Wong, B.C. (2007). American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol*. **102(8)**:1808–1825.
- Chistiakov, D.A. (2005). Immunogenetics of Hashimoto's Thyroiditis. *Journal of Autoimmune Diseases*. **2(1)**:1-21.
- Chistiakov, D.A., & Turakulov, R.I.(2003).CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *Journal of Molecular Endocrinology*. **31(1)**:21–36.
- Claeys, D., Faller, G., Appelmelk, B.J., Negrini, R., & Kirchner, T. (1998). The gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- ATPase is a major autoantigen in chronic *Helicobacter pylori* gastritis with body mucosa atrophy. *Gastroenterology*. **115(2)**: 340-347.
- Cojocaru, M., Cojocaru, M.I., & Silosi, I. The predictive significance of autoantibodies in autoimmune diseases. [Versão electronica]. Acedido em 18 Jun 2012, em: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)
- Collins, J., & Gough, S. (2002). Autoimmunity in thyroid disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **29(2)**:17-24.
- Cohen, H., Weinstein, W.M., & Carmel, R. (2000). Heterogeneity of gastric histology and function in food cobalamin malabsorption: absence of atrophic gastritis and achlorhydria in some patients with severe malabsorption. *Gut*. **47(5)**:638-645.
- Crawford, J.M. (1999). The gastrointestinal tract. In: Robbins Pathologic Basis of Diseases. *Philadelphia: WB Saunders*.**6ed. Cap.17**.
- Cunha, L.L., Ferreira, R.C., Marcello, M.A., Vassalo, J., & Ward, L.S. (2011). Clinical and Pathological Implications of Concurrent Autoimmune Thyroid Disorders and Papillary Thyroid Cancer. *Journal of Thyroid Research*. Recuperado em 10 de Agosto de 2012, de: <http://www.hindawi.com/journals/jtr/2011/387062/>
- Dayan, C.M., & Daniels, G.H. (1996). Chronic Autoimmune Thyroiditis. *N Eng J Med*. **335(2)**: 99-107.
- Davies, T. F. (2002). Pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis (chronic autoimmune thyroiditis): up to date clinical reference library. Versão 10.2. Washington. Recuperado em 11 de Setembro de 2012, em: <[www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)>.

- D'Elíos, M.M., Appelmelk, B.J., Amedei, A., Bergman, M.P., & Del Prete, G. (2004). Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends in Molecular Medicine*. **10(7)**:316-323.
- D'Elíos, M.M., Bergman, M.P., Amedei, A., Appelmelck, B.J., & Del Prete, G. (2004). *Helicobacter pylori* and gastric autoimmunity. *Microbes and Infection*. **6**: 1395-1401.
- De Block, C.E., De Leeuw, I.H., & Van Gaal, L.F. (2008). Autoimmune Gastritis in Type 1 Diabetes: A Clinically Oriented Review. *J Clin Endocrinol Metab*. **93(2)**:363–371.
- De Goot, L.J. (2012). *Grave's Disease and the manifestations of Thyrotoxicosis*. In: De Groot, L.J. [Versão electrónica]. *Thyroid Disease Manager*. Recuperado em 01 Fevereiro de 2013, de: <http://www.thyroidmanager.org>
- Desai, H.G., & Gupte, P.A. (2007). *Helicobacter pylori* Link to Pernicious Anaemia. *JAPI*. **55**: 857-859.
- Driessche, V.A., Eenkhoorn, V., Van Gaal, L., & DeBlock, C. (2009). Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *The Netherlands Journal of Medicine*. **67 (11)**:376-87.
- Eguchi, H., & Moss, S.F. (2002). *Helicobacter pylori*. *Molecular Pathology*. **55(5)**: 284-285.
- Faller, G., Winter, M., Steininger, H., Lehn, N., Meining, A., Bayerdorffer, E., & Kirchner, T. (1999). Decrease of Antigastric Autoantibodies in *Helicobacter pylori* Gastritis after Cure of Infection. *Pathol Res Pract*. **195(4)**: 243-246.
- Faller, G., & Kirchner, T. (2005). Immunological and morphogenic basis of gastric mucosa atrophy and metaplasia. *Virchows Arch*. **446(1)**:1-9.
- García, G.B., Gimeno, O.A., Aguillo, G.E., Altemir, T.J., Cabrejas, G.C., Ilundaín, G.A., Lázaro, P.F., Ocon, B.J., & Faure, N.E. (2010). Prevalencia y factores predictivos de la presencia de anticuerpos anticélula parietal gástrica en la enfermedad tiroidea autoinmune. *Endocrinol Nutr*. **(57)**:49-53.
- George-Gay, B., & Parker, K. (2003). Understanding the Complete Blood Count With Differential. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*. **18(2)**:96-117
- Gleeson, P.A., & Toh, B.H. (1991). Molecular targets in pernicious anemia. *Immunology Today*. **12(7)**: 233-238.

- Gisbert, J.P., & Pajares, J.M. (2004). Review article: C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a critical review. *Aliment Pharmacol Ther.* **20**:1001–1017.
- Greer, L.G., Casey, B.M., Halvorson, L.M., Spong, C.Y., McIntire, D.D., & Cunningham, M.D. (2011). Antithyroid antibodies and parity: further evidence for microchimerism in autoimmune thyroid disease. *Am J Obstet Gynecol.* **205(5)**: 471e1-4.
- González, C. R., & Jiménez, V.R.C. (2010). *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas.* **15(4)**: 242-251. Recuperado em 18 Jun. 2012, em: <http://www.nietoeditores.com.mx>
- Gualandro, S.F.M. (2000). Diagnóstico diferencial das anemias. *J Bras Nefrol.* **22(5)**:7-10.
- Hashimoto, H. (1912). Kenntniss der lymphomatosen veränderung der schilddrüse (Struma lymphomatosen). *Arch Klin Chir.* **97**:219-248.
- Hasni, S.A. (2012). Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.* **24(4)**:429-434.
- Harris, P., Serrano, C., & Gonzales C.G. (2005). Serological diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Rev Chil Pediat.* **76(3)**: 241-251
- Hoyne, G.F. (2011). Mechanisms that regulate peripheral immune responses to control organ specific autoimmunity. *Clinical and developmental immunology.* doi:10.1155/2011/294968
- Hsing, A.W., Hansson, L.E., McLaughlin, J.K., Nyren, O., Blot, W.J., Ekblom, A., & Fraumeni, J.F. (1993). Pernicious anemia and subsequent cancer. *Cancer.* **71(3)**: 745-750.
- Ho, B., & Marshall, B.J. (2000). Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Serologic testing. *Gastroenterol Clin North Am.* **29(4)**: 853–62.
- Hollowell, J.G., Staehling, N.W., Flanders, W.D., Hannon, W.H., Gunter, E.W., Spencer, C.A., & Braverman L. E. (2002). Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* **87(2)**: 489–499.
- Howden, C.W., & Hunt, R.H. (1998). Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *American Journal of Gastroenterology.* **93(12)**: 2330-8.

- Irvine, W.J. (1975). The association of atrophic gastritis with autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol Metab.* **4**:351-377.
- Jacobson, E.M., Huber, A., & Tomer, Y. (2008). The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. *J Autoimmun.* **30(1-2)**:58-62.
- Kaptan, K., Beyan, C., Ural, A.U., Cetin, T., Avcu, F., Gulsen, M., Finci, R., & Yalcin A. (2000). *Helicobacter pylori*-Is It a Novel Causative Agent in Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency?. *Arch Intern Med.* **160**:1349-1353.
- Kondrashova, A., Viskari, H., Haapala, A.M., Seiskari, T., Kulmala, P., Ilonen, J., Knip, M., & Hyoty, H. (2008). Serological Evidence of Thyroid Autoimmunity among School children in Two Different Socioeconomic Environments. *J Clin Endocrinol Metab.* **93(3)**:729–734.
- Kuster, J.G., van Vliet A. H.M., & Kuiper, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology. Reviews.* **19(3)**:449-490.
- Lahner, E., Centanni, M., Agnello, G., Gargano, L., Vannella, L., Iannoni, C., DelleFave, G., & Annibale, B. (2008). Occurrence and Risk Factors for Autoimmune Thyroid Disease in Patients with Atrophic Body Gastritis. *The American Journal of Medicine.* **121(2)**:136-141.
- Lahner, E., & Annibale, B. (2009). Pernicious anemia: New insights from a gastroenterological point of view. *World J Gastroenterol.* **15 (41)**:5121-5128.
- Lleo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M., & Gershwin, M.E. (2010). Definition of human autoimmunity-autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews.* **9**: A259-266
- Lichiardopol, C., & Mota, M. 2009. The thyroid and Autoimmunity. *Rom J Intern Med.* **47(3)**: 207-215.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kreschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B., & Hammerling, G.J. (1998). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur. J. Immunol.* **28**:2395-2406.
- Lleo, A., Invernizzo, P., Gao, B., Podda, M., & Gerswin, M.E. (2009). Definition of human autoimmunity-autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews.* **9(5)**:259-66

- Logan, R.P., & Walker, M.M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract: epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Brit Med J.* **323(7318)**: 920-3.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., & Kuipers, E.J. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut.* **56(6)**:772-781.
- Markle, H.V., & Greenway, D.C. (1996). Cobalamin. *Critical Reviews in Clinical Laboratorial Sciences, Scarborough.* **33(4)**:247-356.
- McLachlan, S.M., & Rapoport, B. (1992). The molecular biology of thyroid peroxidase: Cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev.* **13(2)**:192-206.
- Melo, M. (2006). Tiroidites autoimunes. *Acta Med Port.* **19**:387-394.
- Nakamura, R.M. (2001). Laboratory Tests for the Evaluation of *Helicobacter pylori* Infections. *J Clin Lab Ana.* **15(6)**: 301-7.
- Negrini, R., Savio, A., Poresi, C. Appelmelk, B.J., Buffoli, F., Paterlini, A., Casari, P., Massimo, G., Vaira, D., & Franzin G. (1996). Antigenic Mimicry between *Helicobacter pylori* and gastric mucosa in the pathogenesis of body atrophic gastritis. *Gastroenterology.* **111(3)**:655-65.
- Neves, C., Alves, M., Delgado, J.L., & Medina, J.L. (2008). Doença de Graves. *ARQUIVOS DE MEDICINA.* **22(4-5)**:137-46.
- Papamichael, K.X., Papaionnou, G., Karga, H., Roussos, A., & Mantzaris, G.J. (2009). *Helicobacter pylori* infection and endocrine disorders: Is there a link? *World J Gastroenterol.* **15(22)**:2701-2707.
- Perez-Perez, G. I. (1997). Role of *Helicobacter pylori* Infection in the Development of Pernicious Anemia. *Clinical Infectious Diseases.* **25**:1020–2.
- Polizopoulou, Z., S. (2010). Haematological tests in sheep health management. *Small Ruminant Research.* 92: 88– 91.
- Portorreal, A., & Kawakami E. (2002). Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes. *Arq Gastroenterol.* **39(3)**: 198-203.
- Potet, F., Florent, C., Benhamou, E., Cabrieres, F., Bommelaer, G., Hostein, J., Bigard, M.A., Bruley De Varannes, S., Colombel, J.F., & Rampal, P. (1993).

- Chronic gastritis: prevalence in the French population. *Gastroentérologie Clinique et Biologique, Paris*. **17(2)**: 103-108.
- Prabhakar, B.S., Fan, J.L., & Seetharamaiah, G.S. (1997). Thyrotropin-receptor-mediated diseases: A paradigm for receptor autoimmunity. *Immunol Today*. **18(9)**:437-442.
- Prummel, M.F., Strieder, T., & Wiersinga, W.M. (2004). The environment and autoimmune thyroid diseases. *European Journal of Endocrinology*. **150(5)**: 605–618.
- Quina, M.G. (1994). Helicobacter pylori: the Portuguese scene. Grupo de Estudo Português do Helicobacter pylori (GEPHP). *Eur J Cancer Prev*. **(2)**:65-7.
- Rioux, J.D., & Abbas, A.K. (2005). Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature*. **435**:584-589.
- Roitt, I.M., Doniach, D., Campbell, P.N., & Hudson, R.V. (1956). Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet*. **268(6947)**:820-1.
- Romaldini, J.H., Sgarbi, J.A., & Farah, C.S. (2004). Disfunções Mínimas da Tiróide: Hipotiroidismo Subclínico e Hipertiroidismo Subclínico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. **48(1)**:147-158.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. **133(5)**: 775–787.
- Sepulveda, A.R., & Patil, M. (2008). Practical Approach to the Pathologic Diagnosis of Gastritis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. **132(10)**: 1586-1593.
- Schott, M., & Scherbaum, W.A. (2006). Autoimmune Thyroid Disease. [Versão electrónica]. *Dtsch Arztebl*. **103(45)**: 3023-32. Recuperado em 18 de Outubro de 2012, de: [www.aerzteblatt.de](http://www.aerzteblatt.de)
- Sgarbi, J.A., & Maciel, M.B. (2009). Pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Arq Bras Endocrinol Metab*. **53(1)**: 5-14.
- Soares, J., Carneiro, F., Cotter, J., & Pereira, F. (1993). Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* e características da mucosa gástrica em doentes dispépticos sujeitos a endoscopia no norte de Portugal. *Rev Gastroenterologia*. **(10)**:119-31.
- Socin Valdes. THE THYRO-GASTRIC SYNDROME: FROM THYROID AUTOIMMUNITY TO NEUROENDOCRINE GASTRIC TUMORS. Acedido em 15 Junho de 2012, em: <http://orbi.ulg.ac.be/>



- Stassi, G., & DeMaria, R. (2002). Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*. **2(3)**:195-204.
- Sterzl, I., Hrdá, P., Matucha, P., Cerovská, J., & Zamrazil, V. (2008). Anti-*Helicobacter Pylori*, Anti-Thyroid Peroxidase, Anti-Thyroglobulin and Anti-Gastric Parietal Cells Antibodies in Czech Population. *Physiol Res*. **57(1)**:135-141.
- Sudraba, A., Daugule, I., Rudzite, D., Funka, K., Tolmanis, I., Engstrand, L., Janciauskass, D., Jonaitis, L., Kiudelis, G., Kupcinskas, L., Ivanauskass, A., & Lela, M. (2011). Performance of routine *Helicobacter pylori* tests in patients with atrophic gastritis. *J Gastrointestin Liver Dis*. **20(4)**:349-354.
- Sundick, R.S., Bagchi, N., & Brown, T.R. (1992). The role of iodine in thyroid autoimmunity: from chickens to humans: a review. *Autoimmunity*. **13 (1)**: 61-68.
- Swain, M., Swain, T., & Mohanty, B.K. (2005). Autoimmune Thyroid Disorders - An Update. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. **20(1)**:9-17.
- Taichiaki & McGuian J.E. (1963). Immunologic studies in pernicious anemia. *Blood*. **34(1)**:63-71
- Toh, B. H., Van Driel, I.R., & Glesson, P.A. (1997). Pernicious anaemia. *The New England Journal of Medicine*. **337(20)**:1441-1448.
- Tomer, Y., & Huber, A. (2009). The etiology of autoimmune thyroid disease: A story of genes and environment. *Journal of Autoimmunity*. **32(3-4)**:231–239.
- Torbenson, M., Abraham, S.C., Boitnott, J., Yardley, J.H., & Wu, T.T. (2001). Autoimmune gastritis: distinct histological and immunohistochemical findings before complete loss of oxyntic glands. *Modern Pathology*. **15(2)**:102-9.
- Tozzoli, R., Kodermaz, G., Perosa, A.R., Tampoaia, M., Zucano, A., Antico, A., & Bizzaro, N. (2010). Autoantibodies to parietal cells as predictors of atrophic body gastritis: A five-year prospective study in patients with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity Reviews*. **10(2)**: 80–83.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., & Schlemper, R.J. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med*. **345(11)**:784–789.
- Veijola, L.I., Oksanen, A.M., Sipponen, P.I., & Rautelin, H.I.K. (2010). Association of autoimmune type atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. **16(1)**: 83-88.

- Vieira, J.G.H., Kasamatsu, T.S., Hauache, O.M., & Maciel, R.M.B. (2003). Anticorpos Anti Tiróide: Aspectos Metodológicos e Importância Diagnóstica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* **47(5)**:612-621.
- Vieira, A., Carrilho, F., & Carvalheiro, M. (2008). Tiroidites auto-imunes: apresentação clínica e tratamento. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.* 45-56.
- Wang, S.H., & Baker Jr, J.R. (2007). The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. *Thyroid.* **17 (10)**: 975-979.
- Weetman, A.P., Black, C.M., Cohen, S.B., Tomlinson, R., Banga, J.P., & Reimer, C.B. (1989). Affinity purification of IgG subclasses and the distribution of thyroid autoantibody reactivity in Hashimoto's thyroiditis. *Scand J Immunol.* **30(1)**:73-82.
- Weetman, A.P. (2003). Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *European Journal of Endocrinology.* **148(1)**:1-9.
- Weetman, A.P. (2005). Non-thyroid autoantibodies in autoimmune thyroid disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* **19(1)**:17-32.
- Wei, J.I.A. (2009). Risk factor in autoimmune thyroid disease-*Helicobacter pylori*. *Journal of Chinese Clinical Medicine.* **4(6)**. Recuperado em 10 Maio de 2012, de: <http://old.cjmed.net>
- Zaletel, K., & Gaberšček, S. (2011). *Hashimoto's Thyroiditis: From genes to the disease.* *Curr Genomics.* **12 (8)**: 576-588.
- Zeitlin, A.A., Simmonds, M.J., & Gough S.C.L. (2008). Genetic developments in autoimmune thyroid disease: an evolutionary process. *Clin Endocrinol.* **68(5)**:671-82.