

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS
CENTRO DE CIRURGIA EXPERIMENTAL**

**AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO TIREOIDIANO APÓS
CRIOPRESERVAÇÃO NO TRATAMENTO DO HIPOTIREOIDISMO PÓS-
OPERATÓRIO. ESTUDO EXPERIMENTAL.**

Marcel Vasconcellos

**Rio de Janeiro
2021**



AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO
TIREOIDIANO APÓS CRIOPRESERVAÇÃO NO TRATAMENTO
DO HIPOTIREOIDISMO PÓS-OPERATÓRIO. ESTUDO
EXPERIMENTAL.

Marcel Vasconcellos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Schanaider

Rio de Janeiro
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Vasconcellos, Marcel

Autotransplante heterotópico de tecido tireoidiano após criopreservação no tratamento do hipotireoidismo pós-operatório. Estudo experimental / Marcel Vasconcellos. – Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Medicina, 2021.

X, 61 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Alberto Schanaider.

Tese (Doutorado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, 2021.

Referências bibliográficas: f. 48-53.

1. Tireoidectomia 2. Autotransplante 3. Criopreservação 4. Ratos Wistar 5. Modelos animais 6. Ciências Cirúrgicas – Tese I. Schanaider, Alberto. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas. III. Título.

AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO TIREOIDIANO APÓS
CRIOPRESERVAÇÃO NO TRATAMENTO DO HIPOTIREOIDISMO PÓS-
OPERATÓRIO. ESTUDO EXPERIMENTAL.

Marcel Vasconcellos

Orientador: Prof. Dr. Alberto Schanaider

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas,
Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de
Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Aprovada por:

Presidente Professor Dr. Alberto Schanaider

Professora Dr^a. Denise Pires de Carvalho

Professor Dr. Carlos Antônio Basilio de Oliveira

Professor Dr. José Eduardo Ferreira Manso

Professora Dr^a. Mônica Roberto Gadelha

Rio de Janeiro
2021

DEDICATÓRIA

À minha esposa Cristiane de Melo Vasconcellos.

AGRADECIMENTOS

Ao Diretor da Faculdade de Medicina e Professor Titular do Departamento de Cirurgia, Prof. Dr. Alberto Schanaider, por seu exemplo moral, profissional e científico.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Prof. Dr. José Eduardo Ferreira Manso e professores do Centro de Cirurgia Experimental, Prof. Dr. Paulo Cesar Silva, Prof. Dr. Manoel Luiz Ferreira e Prof. Dr. Wagner Baetas da Cruz, pela amizade e excelência no exercício do Magistério.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia e docentes da Faculdade de Medicina da UFRJ, Prof.^a Dr.^a Christina Maeda Takiya, Prof. Dr. Gutemberg Leão de Almeida Filho, Prof. Dr. Haroldo Vieira de Moraes Junior, Prof. Dr. João Carlos Machado, Prof. Dr. Joaquim Ribeiro Filho, Prof. Dr. Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza, Prof. Dr. José Marcus Raso Eulálio, Prof.^a Dr.^a Núbia Verçosa Figueiredo, mestres cuja proficiência e amizade, pautaram meu desenvolvimento profissional e científico.

Ao Laboratório de Fisiologia Endócrina do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, representado pela Magnífica Reitora desta Universidade Prof.^a Dr.^a Denise Pires de Carvalho, pelos Prof. Dr. Leandro Miranda Alves e Doutoranda Francisca Diana Paiva Melo, cujas orientações e presteza na laboriosa realização das análises imunohistoquímicas, aduziram informações relevantes a este trabalho.

Ao Chefe do Departamento de Radiologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) Prof. Dr. Sérgio Augusto Lopes de Souza, ao Prof. Dr. Thiago Barboza e à Doutoranda Priscylla da Costa Medeiros, pela amizade e contribuição com o estudo cintilográfico.

Aos mestres Prof. Dr. Maurício de Pinho Gama e Prof. Dr. Fernando Colonna Rosman, pela reiterada demonstração de amizade e solicitude nas análises estatísticas e histológicas.

Aos alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Medicina, Amabile Maran Carra e Olavo Borges Franco, cujo compromisso inabalável com a pesquisa tornaram exequível a consecução do objetivo. Minha gratidão e sinceros votos de sucesso pessoal e profissional.

Aos amigos discentes e funcionários do Centro de Cirurgia Experimental, pelo apoio prestado e amizade.

RESUMO

AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO TIREOIDIANO APÓS CRIOPRESERVAÇÃO NO TRATAMENTO DO HIPOTIREOIDISMO PÓS-OPERATÓRIO. ESTUDO EXPERIMENTAL.

Marcel Vasconcellos

Orientador: Prof. Dr. Alberto Schanaider

Resumo da Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Objetivos: Verificar a viabilidade e funcionalidade do autotransplante de tecido tireoideo criopreservado em ratos submetidos à tireoidectomia total no tratamento do hipotireoidismo pós-operatório. **Métodos:** Trinta e dois ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, machos, foram distribuídos randomicamente, em quatro grupos (G) compostos por oito animais cada: Controle (GC); Simulação (GS); Hipotireoidismo (GHT) e Transplantado (GT). O tecido tireoideo foi implantado na musculatura da coxa direita. Foram aferidas concentrações séricas de T3 total, T4 livre, TSH e cálcio, no início do experimento e na 13ª semana. Na 1ª e 14ª semanas, foram realizados exames cintilográficos. Na 14ª semana também foram efetuados a análise da biodistribuição do radioisótopo pertecnetato-^{99m}Tc, exames histopatológicos e testes imunohistoquímicos para avaliação da expressão dos marcadores moleculares de proliferação (PCNA) e apoptose celular (caspase-3 ativada). **Resultados:** Na 13ª semana, os animais transplantados apresentaram concentrações séricas de T3 total e T4 livre compatíveis com a normalidade. Observaram-se concentrações de TSH aumentadas, porém, mais próximas aos valores basais, obtidos nos grupos Controle e Simulação. Na 14ª semana, os exames cintilográficos evidenciaram a captação do radioisótopo no tecido transplantado, em todos os animais do GT. Os exames histológicos, decorridas 13 semanas do transplante, comprovaram a viabilidade e funcionalidade dos folículos tireoideos. Os testes imunohistoquímicos revelaram no GT aumento estatisticamente significativo na expressão do marcador de proliferação celular no tecido transplantado (PCNA), quando comparado ao GC ($p < 0,001$). Não foi observada diferença na expressão da caspase-3 ativada entre o GC e GT. **Conclusões:** O estudo experimental consubstanciou a viabilidade e funcionalidade do autotransplante heterotópico de tecido tireoideo, implantado em musculatura esquelética, com evidência de proliferação celular e sem apoptose. A estratégia cirúrgica utilizada demonstrou ser eficaz no tratamento do hipotireoidismo pós-operatório. **Descritores:** Tireoidectomia. Criopreservação. Transplante autólogo. Ratos Wistar. Modelos animais.

ABSTRACT

HETEROTOPIC THYROID TISSUE AUTOTRANSPLANTATION AFTER CRIOPRESERVATION IN THE TREATMENT OF POSTOPERATIVE HYPOTHYROIDISM. EXPERIMENTAL STUDY.

Marcel Vasconcellos

Orientador: Prof. Dr. Alberto Schanaider

Abstract da Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Aims: To verify the viability and functionality of cryopreserved thyroid autotransplantation in rats submitted to total thyroidectomy in the treatment of postoperative hypothyroidism. **Methods:** Thirty-two male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were randomly assigned into four groups (G) with eight animals each: Control (CG); Simulation (SG); Hypothyroidism (HTG) and Transplanted (TG). The thyroid tissue was implanted in the right thigh muscle. At the beginning and in the 13th week of the experiment, serum concentrations of total T3, free T4, TSH and calcium were determined. In both first and 14th weeks, scintigraphic analysis were accomplished. In the week 14th, 99m-Tc pertechnetate radioisotope biodistribution, histopathological examinations and immunohistochemical tests to evaluate the expression of molecular markers of proliferation (PCNA) and cellular apoptosis (caspase-3) were also performed. **Results:** In the 13th week, the transplanted animals had serum concentrations of total T3 and free T4 compatible with normality. An increase in TSH concentrations, but closer to the baseline values than in the GHT was observed. In the 14th week, scintigraphic exams displayed graft isotopic uptake in all animals in the TG group. Histological examinations, 13 weeks after transplantation showed the viability and functionality of thyroid follicles. PCNA marker revealed significant immunoreactivity of the graft when the TG was compared to the CG ($p < 0.001$). There was no difference between CG and TG considering the expression of caspase-3 activated. **Conclusions:** The experimental study confirmed the viability and functionality of the heterotopic thyroid tissue autotransplantation, implanted in skeletal muscles with evidence of cell proliferation and without apoptosis. The surgical strategy was effective in the treatment of postoperative hypothyroidism. **Key words:** Thyroidectomy. Cryopreservation. Autologous transplantation. Wistar rats. Animal Models.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO CONDENSADA DA LITERATURA	4
4. MÉTODOS	7
4.1. Caracterização da amostra e desenho do estudo experimental.....	7
4.1.1. Amostra.....	7
4.1.2. Desenho do estudo experimental	7
4.2. Descrição da técnica operatória utilizada na tireoidectomia total	7
4.3. Técnica de criopreservação da glândula tireoide.....	9
4.4. Determinação quantitativa do tecido transplantado.....	9
4.5. Descrição da técnica operatória do transplante tireoidiano	9
4.6. Avaliações pré e pós-operatórias.....	10
4.6.1. Determinação das concentrações séricas de T3, T4L, TSH e cálcio.....	11
4.6.2. Exames cintilográficos.....	12
4.6.3. Biodistribuição do radioisótopo pertecnetato- ^{99m} Tc, <i>ex vivo</i>	13
4.6.4. Exames histológicos.....	14
4.6.5. Exames imunohistoquímicos.....	15
4.7. Análise estatística dos dados.....	15
4.8. Síntese dos procedimentos em linha do tempo.....	15
5.	
RESULTADOS	1616
5.1. Peso absoluto da glândula tireoide e do tecido transplantado.....	16
5.2. Análise das concentrações séricas de T3 total, T4 livre, TSH e cálcio total.....	16
5.3. Exames cintilográficos.....	21
5.4. Análise <i>ex vivo</i> da biodistribuição do radioisótopo pertecnetato- ^{99m} Tc.....	23
5.5. Exames histológicos.....	25
5.6. Exames imunohistoquímicos.....	26
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÕES	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9. APÊNDICES	54
10. ANEXOS	60
10.1. Normatização da Tese	60
10.2. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	61

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

Ca²⁺	Cálcio
DAPI	Marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões de DNA ricas em adenina-timina (4',6'-diamidino-2-fenil-indol)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-padrão da média
GC	Grupo Controle
GHT	Grupo Hipotireoidismo
GS	Grupo Simulação
GT	Grupo Transplantado
H&E	Coloração Hematoxilina-Eosina
KeV	Mil elétrons-volt (10 ³ elétrons-volt)
L-T4	Hormônio sintético Levotiroxina sódica
μCi	Unidade de atividade de radionuclídeos, do francês, <i>microcurie</i>
mmol/L	Milimol por litro
mUI/L	Miliunidades Internacionais por litro
NIS	Co-transportador sódio/iodeto, do inglês <i>Sodium/Iodide Symporter</i>
nmol/L	Nanomol por litro
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate buffer saline</i>
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
pmol/L	Picomol por litro
% μCi/g	Porcentagem de atividade radioativa por grama de órgão/tecido
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio nutritivo de cultura celular (<i>Roswel Park Memorial</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único, do inglês <i>Single photon emission computed tomography</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
T4L	Tiroxina livre
TSH	Hormônio estimulador da tireoide, do inglês <i>Thyroid stimulating hormone</i>
^{99m}Tc	Pertecnetato tecnécio 99 metaestável

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tireoidectomia total.....	8
Figura 2. Transplante de lobo tireoidiano em tecido muscular.....	10
Figura 3. Exame cintilográfico.....	12
Figura 4. Amostra do tecido muscular, contendo o tecido transplantado em seu interior.....	13
Figura 5. Aparelho utilizado na determinação da atividade radioativa no GC e GT.....	13
Figura 6. Linha temporal.....	15
Figura 7. <i>Boxplot</i> das concentrações séricas de T4L nos GC, GS (t0) vs. GHT (2ª semana).....	18
Figura 8. <i>Boxplot</i> das concentrações séricas de TSH nos GC, GS (t0) vs. GHT (2ª semana).....	18
Figura 9. <i>Boxplot</i> das concentrações séricas de T3 total nos diferentes grupos experimentais, (13ª semana).....	19
Figura 10. <i>Boxplot</i> das concentrações séricas de T4L nos diferentes grupos experimentais, (13ª semana).....	19
Figura 11. <i>Boxplot</i> das concentrações séricas de TSH nos diferentes grupos experimentais, (13ª semana).....	20
Figura 12. Variações dos hormônios tireoidianos ao longo do experimento.....	21
Figura 13. Cintilografia dos animais do GC e GS em t0 e na 14ª semana.....	22
Figura 14. Cintilografia dos animais do GHT na 14ª semana.....	22
Figura 15. Cintilografia dos animais do GT na 14ª semana.....	23
Figura 16. <i>Boxplot</i> do percentual de captação isotópica no tecido transplantado do GT <i>versus</i> a captação no músculo bíceps femoral contralateral.....	24
Figura 17. Imagem da captação isotópica do tecido transplantado <i>versus</i> a do músculo bíceps femoral contralateral.....	24
Figura 18. Exame histológico da glândula tireoide no GC, GS e GT.....	26
Figura 19. Imunohistoquímica do PCNA e da caspase-3 ativada na glândula tireoide do GC, GS e GT.....	27
Figura 20. <i>Boxplot</i> da imunorreatividade do PCNA entre o GC e o GT.....	28
Figura 21. <i>Boxplot</i> da diferença percentual de imunorreatividade da caspase-3 ativada entre o GC e o GT.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos experimentais em animais de laboratório (n = 19).....	5
Tabela 2. Pesquisa em <i>anima nobile</i> (n = 13).....	6
Tabela 3. Peso total da tireoide e do lobo transplantado (média ± DP).....	16
Tabela 4. Concentração sérica dos hormônios T3 total, T4L, TSH e do cálcio.....	17
Tabela 5. Atividade radioativa (%) na tireoide, no transplante e no músculo contralateral (GC e GT), 14 ^a semana.....	23
Tabela 6. Biodistribuição do radioisótopo, <i>ex vivo</i> em outros órgãos ou tecidos (%), 14 ^a semana.....	25
Tabela 7. Peso total da tireoide e do tecido transplantado no GT, por animal.....	54
Tabela 8. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GC, por animal.....	55
Tabela 9. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GS, por animal.....	56
Tabela 10. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GHT, por animal.....	57
Tabela 11. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GT, por animal.....	58
Tabela 12. Biodistribuição do radioisótopo no GC (% µCi/g/animal).....	59
Tabela 13. Biodistribuição do radioisótopo no GT (% µCi/g/animal).....	59

1 INTRODUÇÃO

A tireoidectomia total ou subtotal bilateral podem gerar uma condição clínica que demande suplementação hormonal permanente, comprometendo a qualidade de vida do paciente. O hipotireoidismo pós-cirúrgico pode resultar do tratamento do bócio difuso tóxico (doença de Basedow-Graves), dos bócios multinodulares tóxico ou atóxico (bócio endêmico), da abordagem do câncer, incluindo a imprecisão diagnóstica (diferenciação entre o adenoma e o carcinoma folicular/Sistema de Bethesda III a V), ou em face de iatrogenias onde ocorram ressecções mais extensas do que àquelas necessárias.

O hipotireoidismo pós-operatório causa limitações na qualidade de vida pela necessidade de reposição hormonal, de modo permanente, após tireoidectomia total. No entanto, também pode ocorrer depois da tireoidectomia subtotal bilateral, ou mesmo hemitireoidectomia associada à ressecção subtotal do lobo tireoidiano contralateral, com frequência de 0,4 até 33% dos casos (REID, 1987; TSAI, 2019). Após a alta pós-operatória, um acompanhamento prolongado é geralmente conduzido por endocrinologista, sem retorno do paciente ao cirurgião e que, por sua vez, com frequência não tem conhecimento se, de fato, ocorreu evolução clínica para o hipotireoidismo.

A partir da década de 70, o hormônio sintético levotiroxina sódica ou L-tiroxina (L-T4) tornou-se o padrão ouro no tratamento da reposição hormonal, na maioria dos casos, pelo baixo custo, facilidade de administração e boa resposta (DAYAN, 2018). Entretanto, a eficácia do uso da L-T4 pode ser limitada por vários fatores: falta de adesão do paciente e ou apoio da família ao tratamento, administração de dose inadequada, ingestão simultânea do fármaco com alimentos ou dieta rica em fibras e soja, distúrbios gastrointestinais que resultem em má absorção, entre outros. Além disto, a prescrição de L-T4 por tempo prolongado pode desencadear efeitos colaterais deletérios, dentre os quais doenças cardiovasculares, disfunção do metabolismo lipídico, perdas ósseas, além de palpitações, insônia, labilidade emocional, cefaleia, hiperatividade, emagrecimento e tremores (YÜCE, 2015; CENTANNI, 2017; SAKR, 2017). Todavia, a reposição *per si* pode não ter os resultados esperados. Há de ressaltar a interferência de polimorfismos na eficácia da resposta individual à

reposição do T4. Um estudo multicêntrico apurou que, apenas cerca de 50% dos pacientes submetidos à reposição de hormônios tireoidianos apresentaram concentração de hormônio tireotrófico (TSH) dentro da faixa de normalidade (VAISMAN, 2013).

Neste contexto, buscam-se alternativas terapêuticas substitutivas seguras à ingesta de hormônio tireoidiano exógeno. O autotransplante da tireoide, proposto há algumas décadas, tem por objetivo evitar a insuficiência funcional pós-operatória e a necessidade de reposição hormonal permanente, com a expectativa da manutenção do mecanismo autorregulatório do eixo hipotálamo-hipofisário.

Assim, com o objetivo de aprimorar o conhecimento sobre o assunto e agregar aplicabilidade ao autotransplante tireoidiano, os autores propuseram realizar um estudo experimental para testar a viabilidade de um transplante autólogo e heterotópico de tecido glandular tireoidiano íntegro, após um período de sete dias de criopreservação.

A técnica de criopreservação, raramente aventada para o tratamento do hipotireoidismo é revisitada e perscrutada na presente Tese. Além disto, propõe-se, de forma original e inédita, o uso de biomarcadores para a apoptose e de proliferação celular no autotransplante tireoidiano.

O desenvolvimento desta linha de pesquisa agrega um impacto translacional com a perspectiva de se consolidar uma opção terapêutica com potencial para suprimir a reposição hormonal permanente no hipotireoidismo pós-operatório.

2 OBJETIVOS

Verificar a viabilidade, funcionalidade e eficácia do autotransplante heterotópico de tecido tireoidiano criopreservado, em ratos submetidos à tireoidectomia total, no tratamento do hipotireoidismo pós-operatório.

3 REVISÃO CONDENSADA DE LITERATURA

O estudo experimental desenvolvido nessa Tese foi realizado mediante pesquisa prévia sobre o tema com revisão de dados da literatura em artigos indexados. Foram utilizadas as seguintes bases de dados: MEDLINE/PubMed, do Instituto Nacional de Saúde Americano (*National Institutes of Health*); Cochrane/Revisão Sistemática (*Cochrane Library*); SciELO (*Scientific Electronic Library Online*)- Lilacs; Catálogo de Teses e Dissertações da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); Google Acadêmico; Embase e *Science Direct*. Foram escolhidos os seguintes descritores médicos da língua inglesa associados aos operadores booleanos (AND, OR): *autotransplantation, thyroid, total thyroidectomy, thyroid autograft*. Foram selecionadas e validadas 32 publicações científicas.

Na análise crítica dos artigos, as evidências demonstraram que apesar dos estudos *em anima nobile* com transplantes autólogos da tireoide retratarem alguns resultados encorajadores, estes não foram consensuais (Tabela 1). Até mesmo as pesquisas com animais de laboratório (cães, ratos, cobaias e coelhos) (Tabela 2), não tornam exequível uma análise comparativa adequada no que tange a eficácia do procedimento, haja vista a falta de uniformidade das amostras, em especial, no que tange aos métodos utilizados. A topografia dos tecidos transplantados de forma heterotópica variou consideravelmente. Diferentes tempos cirúrgicos para a enxertia tireoidiana (a fresco), foram citados, porquanto alguns efetuaram o transplante imediato e outros o efetivaram em uma segunda intervenção quando totalizam a tireoidectomia, o que ocorreu em diversos intervalos pós-operatórios. Além disto, de modo análogo, foram encontradas descrições de diferentes intervalos para a realização do transplante do tecido tireoidiano, desta feita com os enxertos criopreservados (GÁL, 2005; ISMAILOV, 1980; KITAMURA, 1994; SHILOH, 1987; SHIMIZU, 1991; THUSOO, 2003; YÜCE, 2015).

Tabela 1. Pesquisa em *anima nobile* (n = 13)

Autor(es); ano	Tipo, local do implante e tamanho da amostra (n)	Técnica operatória, momento do implante	Tempo de avaliação pós-operatória	Doença prévia	Dosagem hormonal (T3, T4L, TSH)	Descrição de resultados
Swan e cols. 1952	Autólogo, músculo reto abdominal (n = 1)	Tireoidectomia total, implante imediato	Sem descrição	Tireoide lingual	Sem descrição	Falha Terapêutica
Swan e cols. 1967	Autólogo, músculo reto abdominal (n = 1)	Tireoidectomia total, implante imediato	12 anos	Tireoide lingual	Sem descrição	Falha terapêutica
Pushkar' e cols. 1984	Autólogo, sem descrição	Sem descrição, criopreservação por 4 a 12 meses	18 meses	Sem descrição	Sem descrição	Eficaz; Sem descrição
Okamoto e cols. 1990	Autólogo, músculo esternocleidomastoideo (n = 5)	Tireoidectomia subtotal, implante imediato	2 - 7 anos	Graves	3 pacientes com T3 -T4 normais e discreta elevação do TSH; 2 pacientes eutireoideos	80% funcionais
Shimizu e cols. 1991	Autólogo, sem descrição (n = 1)	Tireoidectomia total, implante criopreservado sem descrição	Sem descrição	Graves	Sem descrição	Sem descrição
Sheverdin, 1992	Autólogo (n = 246)	Tireoidectomia total, sem descrição	6 meses	Tireotoxicose; descrição incompleta	Sem descrição	97% funcionais
Minuto e cols. 1995	Autólogo, músculo reto abdominal e espaço pré-peritoneal (n = 1)	Tireoidectomia subtotal, implante imediato	37 anos	Tireoide lingual	T3, T4 e TSH normais	100% funcionais; Falha terapêutica no espaço pré-peritoneal
Shimizu e cols. 2002	Autólogo, músculo do antebraço (n = 4)	Tireoidectomia subtotal, criopreservação por 1,9; 2,6; 2,8; 3,5 anos	2 a 7 anos	Graves	T3, T4 e TSH normais em 3/4 pacientes	75% funcionais
Roy e cols. 2003	Autólogo, músculo esternocleidomastoideo (n = 15)	Tireoidectomia subtotal, implante imediato	6 meses	7 Graves, 6 bócios multinodulares atóxicos, 2 bócios multinodulares tóxicos	T3, T4 e TSH normais em todos pacientes com bócio multinodular	45% funcionais à captação isotópica
Saleh, 2016	Autólogo, músculo reto da coxa (emulsão), (n = 20)	Tireoidectomia total, implante imediato	2, 4, 6, 8, 10, e 12 meses	13 bócios multinodulares atóxicos, 4 Graves, 3 bócios multinodulares tóxicos	Sem descrição	Graus variáveis de função aos 12 meses
Sakr e cols. 2018	Autólogo, intramuscular (n = 20)	Tireoidectomia total, implante imediato	12 meses	Sem descrição	Sem descrição	33% funcionais
Mohsen e cols. 2017	Autólogo, músculo reto da coxa (emulsão), (5 g, n = 12; 10 g, n = 28)	Tireoidectomia total, implante imediato	2, 6, 12 meses	Bócio multinodular atóxico	T3, T4 e TSH variáveis	T3 = 91 - 100%, T4 = 85%, TSH elevado aos 12 meses
Gamal e cols. 2019	Autólogo, músculo esternocleidomastoideo (n = 30)	Tireoidectomia total, implante imediato	1, 3, 6, 9 e 12 meses	16 bócios nodulares simples, 8 bócios nodulares tóxicos, 4 Graves, 2 Tireoidites de Hashimoto	T3, T4 e TSH normais aos 12 meses em 20 pacientes avaliados	86% funcionais em 15 pacientes avaliados

Tabela 2. Estudos experimentais em animais de laboratório (n = 19)

Autor(es); ano	Espécie e tamanho da amostra (n)	Tipo e local de implante	Técnica operatória, momento do implante	Tempo de avaliação pós-operatória	Dosagem hormonal (T3, T4L, TSH)	Descrição de resultados
Hesselberg (1915)	Cobaias (n = 75)	Autólogo / Homólogo, tecido subcutâneo abdominal	Tireoidectomia total, implante imediato ou preservado em sol. de Zenker	1 - 52 dias	Sem descrição	Caracterização de três estágios histológicos. Melhor vascularização nos autólogos
Hesselberg & Loeb (1929)	Cobaias (n = 15)	Autólogo, sem descrição	Tireoidectomia total e subtotal, sem descrição	36 dias	Sem descrição	Presença de mitoses em até 16 dias após a enxertia
Brawnvald & Hufnagel, 1958	Coelhos, sem descrição	Autólogo, cápsula renal, subserosa do estômago e bainha do reto	Sem descrição	Sem descrição	Sem descrição	Sem descrição
Shorter, 1963	Cães (n = 8)	Autólogo, córtex cerebral	Tireoidectomia total, criopreservação por 14 dias	60 dias	Sem descrição	16% viabilidade histológica aos 45 dias, e 34% aos 60 dias
Chernozemski & Christov, 1967	Cobaias, sem descrição	Autólogo / Homólogo, mucosa jugal, olhos, cérebro e testículos	Sem descrição	Sem descrição	Sem descrição	100% funcional no autólogo; No homólogo: necessário uso de corticosteroides
Nagamine, 1968	Cães (n = 100)	Autólogo, anastomose microvascular; região da virilha e pescoço	Tireoidectomia total, implante imediato	60 dias	Sem descrição	58% funcionais. Os implantes foram avaliados por meio da administração exógena de TSH
Yamane & Kamba, 1970	Sem descrição	Autólogo, medula ósea, lúmen vascular	Sem descrição	Sem descrição	Sem descrição	Sem descrição
Raaf e cols. 1976	Ratos (n = 35)	Isoenxerto / Homólogo, cultura <i>in vitro</i> ou imediato; cápsula renal, músc. isquiotibial	Tireoidectomia total, implante imediato ou preservado por 14 dias	90-120 dias	T4 do isoenxerto na 4ª semana = do GC	Funcional por 30 dias seguido de rejeição (mais rápida nos imediatamente transplantados)
Yoskizaki, 1984	Ratos, sem descrição	Homólogo, cultura <i>in vitro</i> , abaixo da cápsula renal	Tireoidectomia total, implante imediato ou preservado por 8, 16, 24h	7 - 35 dias	Sem descrição	Rejeição aos 35 dias em 65% dos enxertos homólogos
Shimizu e cols. 1996	Ratos, sem descrição	Autólogo, espaço subcapsular renal, musculatura	Tireoidectomia subtotal, implante imediato	45 - 60 dias	Sem descrição	Funcional entre 45 - 60 dias
Mota e cols. 1999	Ratos (n = 52)	Autólogo, mesentério, ovários, músculo esternocleidomastoideo	Tireoidectomia subtotal com implante imediato e após 30 dias, tireoidectomia total	30 dias	T4 e T3 normais. TSH elevado	Arquitetura folicular preservada
Pasteur e cols. 1999	Suínos, sem descrição	Sem descrição, cultura <i>in vitro</i>	Sem descrição, preservado (cultura.30 dias)	45 - 60 dias	Sem descrição	Funcional entre 5 - 10 dias
Papaziogas e cols. 2002	Coelhos (n = 38)	Autólogo, músculo quadríceps femoral, reto abdominal e sacrodorsal	Tireoidectomia total; implante imediato	60 dias	T4 e T3 grupo tratado = grupo controle; TSH elevado aos 60 dias	100% viabilidade funcional e histológica aos 60 dias
Mota e cols. 2004	Ratos (n = 42)	Autólogo, mesentério	Tireoidectomia subtotal com implante imediato e após 10 dias, tireoidectomia total	100 dias	T4 e T3 normais. TSH elevado	As arquiteturas morfológica e ultraestrutura foram preservadas
Charous e cols. 2004	Camundongos, sem descrição	Autólogo, músculo esternocleidomastoideo e tecido subcutâneo	Tireoidectomia total, implante imediato	30 dias	TSH normal após 4 semanas	Viabilidade funcional e histológica entre 21 - 30 dias
Gál e cols. 2005	Cães (n = 12)	Autólogo, omento maior e músculo esternocleidomastoideo	Tireoidectomia total, criopreservação e implante	30 dias	Aos 30 dias T4 e T3 grupo tratados = GC	Viabilidade histológica e funcional aos 30 dias
Dobrinja e cols. 2008	Ratos (n = 60)	Autólogo, cultura <i>in vitro</i> , músculo reto abdominal	Tireoidectomia total, implante imediato ou preservado por 1, 7, 14 dias	30 dias	Aos 30 dias T3, T4 e TSH = GC em 2/3 dos animais	70% funcionais
Karaman e cols. 2011	Cobaias (n = 24)	Autólogo / Homólogo, mucosa jugal	Tireoidectomia total, implante imediato	60 dias	T3 e T4 autólogo e homólogo = GC	100% viabilidade histológica e funcional aos 60 dias (autólogo e heterólogo)
Yüce e cols. 2014	Coelhos (n = 12)	Autólogo, músculo quadríceps femoral	Tireoidectomia total, implante imediato ou criopreservado após 60 dias	60 dias	Aos 60 dias, T3 e T4 do grupo Enxerto = GC	Funcional para o implante imediato. Hipotireoidismo para o criopreservado

4 MÉTODOS

4.1 Caracterização da amostra e desenho do estudo experimental

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em 13 de dezembro de 2017, sob o n.º de referência 111/17 (vide Anexos, pág. 61) e encontra-se de acordo com a Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008 e em conformidade com os princípios sobre a utilização, manutenção e proteção de animais de laboratório estabelecidos internacionalmente.

4.1.1 Amostra

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia* – Berkenhaout, 1769), da linhagem Wistar, machos, com média de idade de três meses, peso de 300 ± 20 g e procedentes do Biotério do Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ.

Os animais foram mantidos em macro e microambiente adequados, compreendendo gabinetes com ventilação e gaiolas apropriadas, iluminação em conformidade com o ciclo circadiano, controle de temperatura (22 ± 2 °C), além de cuidados padronizados de alimentação (ração industrializada), higiene e água *ad libitum*.

4.1.2 Desenho do estudo experimental

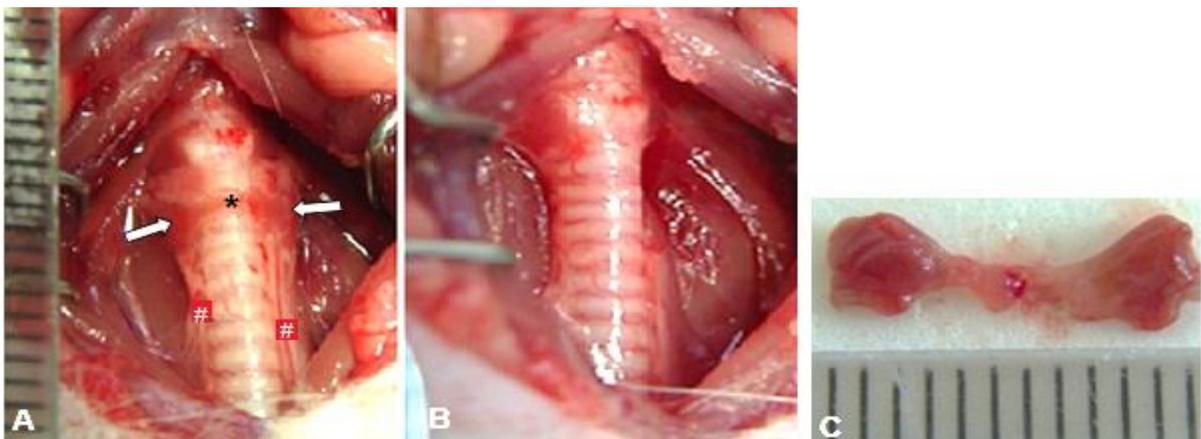
Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos (n = 8 animais cada): Grupo Controle (GC), sem procedimento cirúrgico; Grupo Simulação (GS), apenas com os acessos cirúrgicos; Grupo Hipotireoidismo (GHT), com tireoidectomia total e Grupo Transplantado (GT), com tireoidectomia total acrescida da criopreservação da glândula tireoide por sete dias e do transplante do lobo tireoideano esquerdo na musculatura da coxa direita.

4.2 Descrição da técnica operatória utilizada na tireoidectomia total

O procedimento de tireoidectomia total foi realizado no Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ.

Os animais foram submetidos a 12 horas de jejum seguido pelo procedimento anestésico com uma solução composta por 100 mg/kg de cloridrato de cetamina a 10% (Vetaset®) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2% (Virbaxyl®) e aplicada por via intraperitoneal no quadrante abdominal inferior esquerdo. Em seguida, realizou-se a tricotomia da região infraioidea e após cuidados de assepsia e antissepsia com uso de solução degermante de digluconato de clorexidina a 2% (Riohex®) procedeu-se a infiltração na pele e no tecido subcutâneo da área a ser incisada, com 5 mg/kg de cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet®). Realizou-se uma incisão cutânea longitudinal de 2,5 cm na região cervical ventral, com divulsão do tecido subcutâneo, abertura do platisma na linha média (direção crânio-caudal), exposição e afastamento dos músculos esternocleidomastoideo e esternohioideo. Com auxílio de microscópio cirúrgico binocular de pedestal (CEMAPO®, BR), com magnificação de 100 vezes, procedeu-se a dissecação meticulosa da glândula tireoide com tesoura microcirúrgica e uso de cotonete úmido em solução fisiológica para facilitar a divulsão dos planos em sintopia com estruturas nobres (paratireoides, nervos laríngeos recorrentes e estruturas vasculares) (Figura 1). Após a exérese glandular total, foi realizada a aproximação do plano muscular na linha média compreendendo a fáscia, em sutura contínua em plano único, com fio absorvível de Vicryl™ 4-0 (Ethicon®), além da sutura da pele, em pontos separados, com mononáilon 3-0 (Technofio®).

Figura 1. Tireoidectomia total



A) Visualização dos lobos tireóideos (setas), região do istmo (*) e do nervo laríngeo recorrente, bilateralmente (#). B) Aspecto pós-tireoidectomia com exposição da traqueia após exérese da glândula tireoide. (C) Cada lobo mediu, aproximadamente, 3 mm de comprimento e o istmo 5 mm. Magnificação 100x. Fonte: Arquivo pessoal.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em sala silenciosa, com baixa luminosidade e permaneceram aquecidos por lâmpada incandescente de 40 W, até a completa recuperação anestésica. A analgesia pós-operatória consistiu na administração de 1 mg/kg de cloridrato de tramadol a 2% (Cronidor®) por via intraperitoneal e de 30 mg/kg de ibuprofeno oral (Alivium®), durante cinco dias, diluído na água do bebedouro. Efetuaram-se, diariamente, a inspeção e a limpeza da ferida cirúrgica.

No grupo Simulação (GS), após anestesia e cuidados de assepsia e antisepsia realizou-se o acesso à tireoide da mesma forma em que foi descrito o procedimento para os grupos GHT e GT seguido da manipulação da loja tireoidiana, sem exérese glandular e com tempo de exposição da região cervical semelhante ao da tireoidectomia. Em seguida, houve a síntese da ferida, de forma idêntica àquela apresentada para os grupos GHT e GT.

4.3 Técnica de criopreservação da glândula tireoide

Após a remoção, a glândula tireoide foi mantida em solução PBS 1x estéril (pH = 7,4). Em câmara de fluxo laminar, acondicionou-se o material em um criotubo previamente resfriado em gelo, contendo uma solução nutritiva a 43% de RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, BR), 50% de Soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e 7% de DMSO (Dimetilsulfóxido). Em seguida, o criotubo foi colocado em freezer (-4 °C) por uma hora. Ao final do processo, a amostra foi identificada e armazenada por sete dias, em nitrogênio líquido a -196 °C.

Para o descongelamento utilizou-se o banho Maria a 37 °C e realização de duas lavagens com PBS estéril (0,001 M/pH = 7,4).

4.4 Determinação quantitativa do tecido transplantado

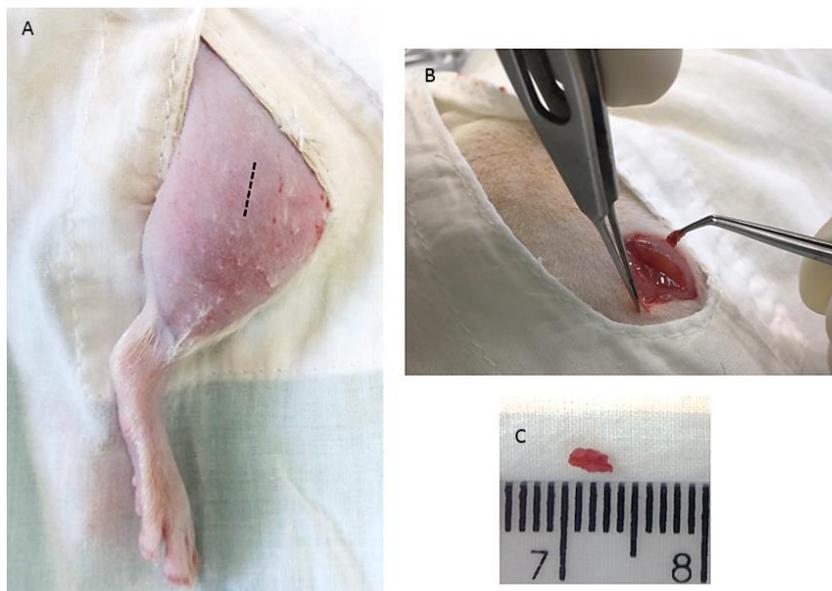
Após o descongelamento, a glândula tireoide inteira foi pesada e depois, isoladamente, ambos lobos, mediante uso de balança digital analítica (Shimadzu AY220®, Kyoto, Japão). Os valores absolutos foram expressos em miligramas (mg).

4.5 Descrição da técnica operatória do transplante tireoidiano

O lobo esquerdo do próprio animal doador foi implantado no terço médio do músculo bíceps femoral da coxa direita (transplante autólogo), por meio de incisão

longitudinal de 1,5 cm (Figura 2). Uma sutura com mononáilon 3-0 (Technofio®) foi colocada na bainha do músculo para marcar o local de enxertia, seguida de síntese, por planos, da aponeurose e da pele, com o mesmo fio.

Figura 2. Transplante do lobo tireoidiano em tecido muscular



Observa-se o membro posterior direito do rato com o local da incisão demarcado (A). Enxertia do tecido tireoidiano e que se encontra na ponta da pinça microcirúrgica atraumática (B). Constata-se o tamanho do tecido enxertado em torno de 3 mm (C). Fonte: Arquivo pessoal.

4.6. Avaliações pré e pós-operatórias

O peso dos animais foi aferido no início do experimento (t_0) e na 13ª semana.

4.6.1. Determinação das concentrações séricas de T3 total (triiodotironina), T4L (tiroxina livre), TSH (Hormônio tireotrófico) e cálcio total

No início do experimento (t_0) e na 13ª semana, foram realizadas coletas de amostras sanguíneas em todos os animais para efetuar provas de função tireoidiana e análise do cálcio. Nos animais do GHT, as coletas também ocorreram na semana seguinte à tireoidectomia total.

Após anestesia com solução de cetamina e xilazina, conforme protocolo descrito para o procedimento cirúrgico, procedeu-se a tricotomia e antissepsia com solução degermante de digluconato de clorexidina (Riohex 2%®). Em seguida, realizou-se coleta de 1 ml de sangue por punção da veia jugular, sempre no mesmo horário. As amostras foram imersas em banho Maria a 37 °C, por 30 minutos e em

seguida, centrifugadas a 3.200 rpm, por 10 minutos. Os tubos contendo soro foram então identificados e enviados para análise laboratorial, sob refrigeração (5 ± 3 °C). Foram determinadas as concentrações de T3 total (nmol/L), T4 livre (pmol/L) e TSH (mUI/L) pelo método de quimioluminescência (LumiQuest[®], Labtest, MG BR). O cálcio total (mmol/L) foi determinado pelo método cinético automatizado (Labtest, MG, BR). Os valores foram expressos segundo o Sistema Internacional de Unidades (*Système International d'unités*).

4.6.2. Exames cintilográficos e estudo da biodistribuição do radioisótopo pertecnetato- ^{99m}Tc

Os exames cintilográficos foram realizados no Serviço de Medicina Nuclear do HUCFF e pelo Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da UFRJ, por intermédio de Tomografia Computadorizada por Emissão de Fótons Único (SPECT) em aparelho detector (GE Millennium MG, Modelo H30002L), com aquisição e processamento das imagens no formato DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*).

Na primeira e na 14^a semana, respectivamente, início (t0) e término do experimento, efetuou-se o estudo da captação do pertecnetato- ^{99m}Tc com varredura do corpo inteiro dos animais, em todos os grupos, após a administração intraperitoneal da associação anestésica de 100 mg/kg de cloridrato de cetamina a 10% (Vetaset[®]) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2% (Virbaxyl[®]) e inserção de um cateter intravenoso 24G (Angiocath[™], BD) na veia lateral da cauda para injeção do material radioativo.

O tecnécio-99m foi previamente diluído em 0,5 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril contendo 0,35 µCi do radioisótopo, aplicado de acordo com as normas de segurança do serviço supracitado. Após a injeção, verificou-se a atividade remanescente na seringa, para proceder à subtração do total mensurado antes da injeção e obter-se o total efetivamente administrado nos animais.

Decorridos 5 minutos, posicionou-se o animal em decúbito dorsal e realizou-se a varredura isotópica (Figura 3). O tempo médio de cada exame foi de 20 minutos. A capacidade seletiva do tecido tireoidiano em captar doses traçadoras do pertecnetato- ^{99m}Tc foi usada como método biológico na determinação da viabilidade do tecido transplantado.

Figura 3. Exame cintilográfico



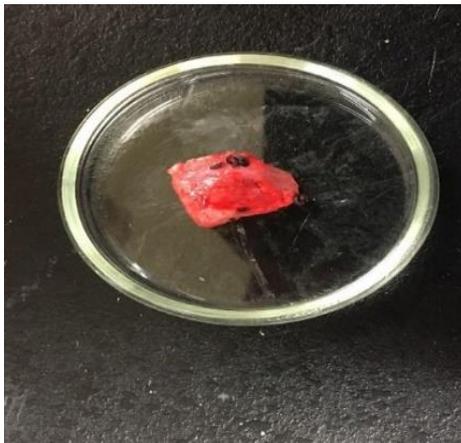
Aquisição de imagens funcionais da tireoide por Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT). Observa-se o animal acomodado no aparelho em decúbito dorsal. Fonte: Arquivo pessoal.

4.6.3. Biodistribuição do radioisótopo pertecnetato - ^{99m}Tc , *ex vivo*

Na 14ª semana, seguiu-se a indução da morte dos animais, sem dor, por sobredose anestésica (quatro vezes a dose recomendada). A biodistribuição foi realizada *ex vivo*, nos animais dos grupos Controle (GC) e Transplantado (GT) e compreendeu as análises das seguintes amostras: glândula transplantada (Figura 4), músculo bíceps femoral esquerdo (contralateral ao local do transplante), coração, pulmões, rins, fígado, baço, pâncreas, estômago, intestinos e a traqueia.

As amostras retiradas após o óbito foram irrigadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%, pesadas em balança analítica (Shimadzu AY220®, Kyoto, Japão) e submetidas ao contador gama 2470 WIZARD²™ (PerkinElmer Inc.®, Waltham, EUA) (Figura 5). Ao final, calculou-se o percentual de atividade radioativa captado por grama de cada órgão ou tecidos analisados nos GC e GT.

Figura 4. Amostra do tecido muscular contendo o tecido transplantado em seu interior



A imagem do material transplantado foi obtida após exérese e colocação em recipiente para realização de captação *ex vivo*. Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. Aparelho utilizado na determinação da atividade radioativa no GC e GT



Espectrômetro de raios gama automático (modelo 2470 WIZARD²™) utilizado no Serviço de Medicina Nuclear do HUCFF. Fonte: Arquivo pessoal.

4.6.4. Exames histológicos

O lobo tireoidiano esquerdo implantado foi fixado em paraformaldeído tamponado a 4% por 48 horas. Após as fases de desidratação e diafanização, as amostras foram imersas em parafina e colocadas em estufa a 60 °C, por 30 minutos. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 4 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica®, RM2125RT, EUA). As amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e os preparados histológicos foram então analisados sob microscopia óptica (E200 Nikon®, BR), com magnificações de 200 e 400 vezes. A

preparação e análise do material foram realizadas no Serviço de Anatomia Patológica do HUCFF da UFRJ.

4.6.5. Exames imunohistoquímicos

Os exames imunohistoquímicos para os marcadores moleculares de proliferação celular (PCNA) e apoptose celular (caspase-3 ativada) foram realizados no Laboratório de Fisiologia Endócrina do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da UFRJ.

Utilizaram-se quatro preparações em lâminas silanizadas StarFrost® (Advanced Polycat, Braunschweig, DE) para cada um dos grupos. Os preparados histológicos da tireoide de ratos dos GC, GS e GT foram levados à estufa a 57 °C, por 12 horas. A seguir, secções de 4 µm foram desparafinizadas com xilol e reidratadas em álcoois decrescentes (100%, 90% e 70%). A recuperação antigênica do PCNA foi realizada com tampão ácido cítrico 0,01M/pH = 6,0 e aquecimento em micro-ondas. A recuperação antigênica da caspase-3 foi realizada com tampão A + B (citrato de sódio + ácido cítrico) no *steamer* à 96 °C, durante 20 minutos. A inativação da peroxidase endógena foi efetuada com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂ a 3%) e metanol. Um segundo bloqueio foi realizado com PBS/BSA 5% + Tween® 0,05% + Triton 0,1% + gelatina 0,01%, pH = 7,4, durante 30 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-PCNA (anti-PCNA F-2 # E0713 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ou anti-caspase-3 (anti-casp 3, p11 mouse monoclonal, Cat # SC-271759 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) nas diluições de 1/100 em câmara escura, overnight, à 4 °C. No dia seguinte, após a lavagem, os cortes foram incubados na câmara escura com o reagente de detecção Histofine® por uma hora e 30 minutos. A atividade da peroxidase foi desenvolvida com o substrato DAB durante 5 e 15 minutos (PCNA e caspase-3, respectivamente) e contracorados com Hematoxilina de Harris por dois minutos. Após lavagens, os cortes foram desidratados em álcoois crescentes, clarificados com xilol e selados em meio de montagem Vectorshield® (Vector Laboratories Inc.®, CA, EUA).

O padrão de positividade foi baseado no cálculo da imunorreatividade percentual em no mínimo 500 células para o GC e GT. Para cada uma das quatro lâminas de cada marcador, foi realizada a contagem células foliculares positivas, com magnificação de 200 vezes.

4.7. Análise estatística dos dados

Para verificação da distribuição normal, utilizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparar as médias entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey (*Tukey Significant Difference*) para identificação das diferenças encontradas entre os grupos.

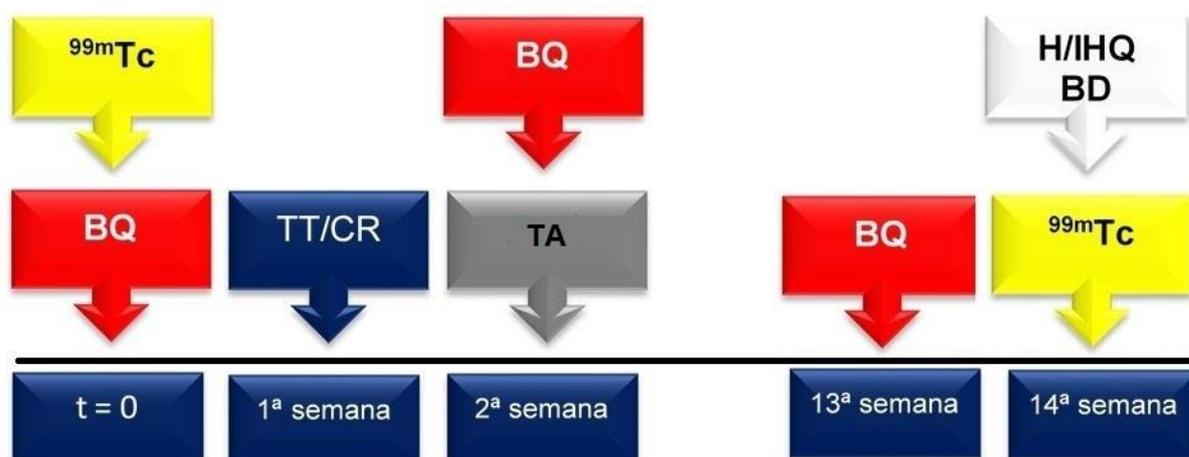
Em todos os testes foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% (IC = 95%) e grau de significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico SPSS versão 22.0® (Belmont, CA, EUA).

4.8. Síntese dos procedimentos em linha do tempo

A figura 6, resume os principais eventos que compuseram o delineamento experimental do estudo, sequenciados em linha temporal.

Figura 6. Linha temporal



Em $t = 0$ e na 13ª semana, exames bioquímicos (BQ) em todos os grupos determinaram as concentrações séricas dos hormônios T3 total, T4 livre e TSH, e de cálcio total (em vermelho). No GHT, a dosagem dos hormônios tireoidianos também foi realizada na 2ª semana, após a tireoidectomia. A tireoidectomia total (TT) e a criopreservação (CR) da glândula tireoide ocorreram ao término da 1ª semana (em azul) do experimento e na 2ª semana, efetuou-se o transplante autólogo (TA) no GT (em cinza). Os exames cintilográficos (^{99m}Tc) foram efetuados em $t = 0$ e na 14ª semana (em amarelo), ocasião em que os exames histológicos (H), imunohistoquímicos (IHQ) e a análise da biodistribuição do radioisótopo (BD) foram igualmente realizados (em branco).

5 RESULTADOS

Os animais do grupo Transplantado apresentaram, à inspeção, aspecto e comportamento compatíveis com a normalidade. Já no grupo com hipotireoidismo, os animais se tornaram letárgicos e com pelos eriçados.

5.1. Peso total da glândula tireoide e do tecido transplantado

Verificou-se que o peso do lobo esquerdo tireoidiano transplantado correspondeu a 43,87% da glândula tireoide (Tabela 3). Na tabela 7 (Apêndices, pág. 54), podem ser encontrados os dados que compuseram as médias e os respectivos desvios-padrão.

Tabela 3. Peso total da glândula tireoide e do lobo transplantado (média \pm DP)

Peso corporal (g)	Peso total da tireoide (mg)	Peso total do material transplantado (mg)	% do material transplantado em relação ao peso total da glândula
296,25 \pm 19,95	13,95 \pm 0,43	6,12 \pm 0,29	43,87

DP = Desvio-padrão da média.

5.2. Análise das concentrações séricas de T3 total, T4 livre, TSH e cálcio total

As médias dos valores séricos da bioquímica hormonal e do cálcio total coletadas em dois momentos distintos do experimento (t0) e 13ª semana em todos os grupos (além da segunda semana no GHT), encontram-se expressas na tabela 4.

Tabela 4. Concentração sérica dos hormônios T3 total, T4L, TSH e do cálcio

Bioquímica sérica	Período	GC	GS	GHT	GT
		média ± DP	média ± DP	média ± DP	média ± DP
T3 (nmol/L)	t = 0	0,93 ± 0,06	1,01 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,85 ± 0,28
	2ª semana			0,83 ± 0,16	
	13ª semana	0,95 ± 0,07	0,88 ± 0,03	0,57 ± 0,11**	0,88 ± 0,10
T4L (pmol/L)	t = 0	36,52 ± 5,66	34,95 ± 3,18	31,99 ± 6,71	32,45 ± 8,62
	2ª semana			12,59 ± 4,84*	
	13ª semana	30,34 ± 7,92	34,95 ± 4,36	0,89 ± 0,65**	22,25 ± 7,72
TSH (mUI/L)	t = 0	18,43 ± 1,82	17,72 ± 0,79	17,87 ± 1,24	17,05 ± 0,84
	2ª semana			23,69 ± 5,10*	
	13ª semana	18,49 ± 1,90	16,65 ± 0,75	56,11 ± 5,25**	38,87 ± 9,72*&
Ca ²⁺ (mmol/L)	t = 0	1,90 ± 0,13	1,83 ± 0,11	1,87 ± 0,14	1,82 ± 0,20
	2ª semana			1,76 ± 0,23	
	13ª semana	1,90 ± 0,11	1,83 ± 0,15	1,85 ± 0,17	1,91 ± 0,08

GC = Grupo Controle, GS = Grupo Simulação, GHT = Grupo Hipotireoidismo, GT = Grupo Transplantado, DP = Desvio-padrão da média, IC = Intervalo de Confiança (95%). t0 = Início do experimento;

T4L: GC (t0) e GS (t0) vs. GHT (2ª semana) = *p < 0,05; TSH: GC (t0) e GS (t0) vs. GHT (2ª semana) = *p < 0,05;

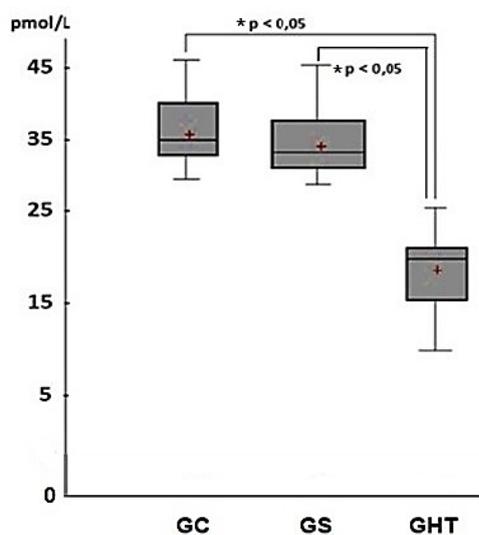
13ª semana, T3 total: GC, GS e GT vs. GHT = **p < 0,001; 13ª semana, T4L: GC, GS e GT vs. GHT = *p < 0,001; 13ª semana, TSH: GC, GS vs. GHT e GT = **p < 0,001; GT vs. GHT = &p < 0,05.

No início do experimento (t0), não houve diferenças entre os quatro grupos estudados, para as médias das concentrações de hormônios tireoidianos e do cálcio (T3 total, p = 0,27; T4L, p = 0,51; TSH, p = 0,24 e cálcio total, p = 0,78).

Na 2ª semana, ou seja, uma semana após a tireoidectomia, no GHT evidenciou-se redução significativa das concentrações do T4L e elevação do TSH na comparação com os valores encontrados em t0 para os GC e GS (p < 0,05), os quais não diferiram entre si, estatisticamente (Figuras 7 e 8). Em relação ao T3 total, não houve diferenças estatisticamente significantes entre o GHT na 2ª semana vs. os GC e GS, ambos no início do experimento, ou seja, t0 (p = 0,23).

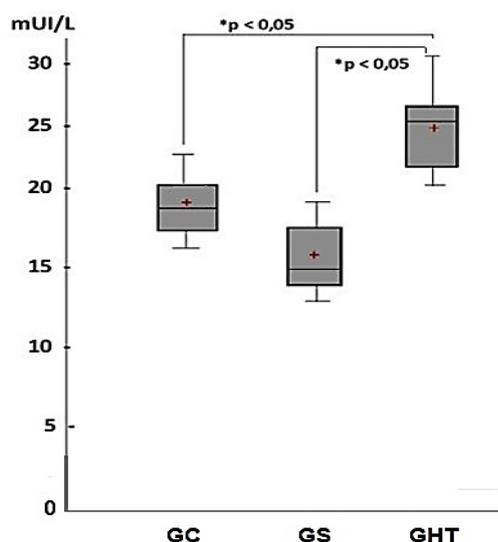
Na 13ª semana, foi observada uma redução na concentração de T3 total no GHT, quando comparada àquelas do GC, GS e do GT (*p < 0,001) (Figura 9).

Figura 7. *Boxplot* das concentrações séricas de T4 livre nos GC, GS (t0) vs. GHT (2ª semana)



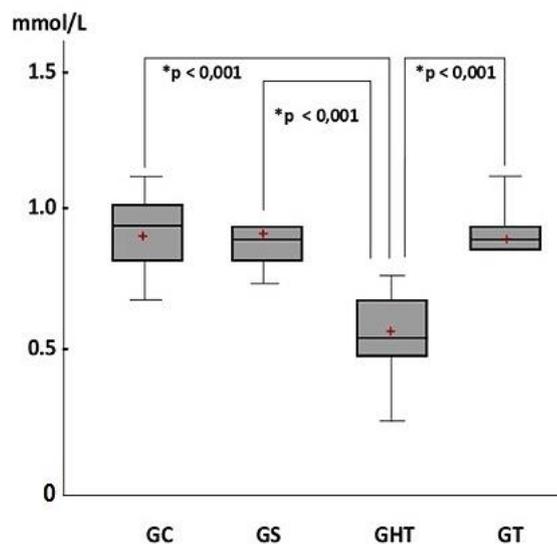
Constatou-se uma redução significativa das concentrações do T4L no GHT na segunda semana, se comparada aos resultados dos demais grupos no início do experimento ($p < 0,05$).

Figura 8. *Boxplot* das concentrações séricas de TSH nos GC, GS (t0) vs. GHT (2ª semana)



Constatou-se aumento significativo das concentrações do TSH no GHT na segunda semana, se comparado aos resultados dos demais grupos no início do experimento ($*p < 0,05$).

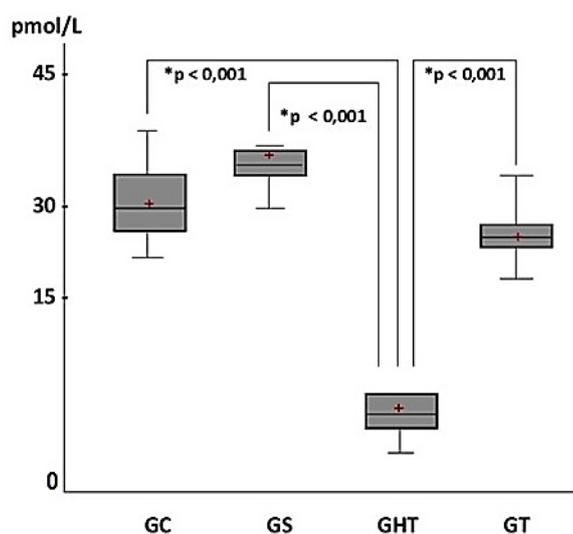
Figura 9. *Boxplot* das concentrações séricas de T3 total nos diferentes grupos experimentais (13ª semana)



Houve redução significativa das concentrações T3 total no GHT (* $p < 0,001$), se comparada aos resultados dos demais grupos, os quais não apresentaram diferenças.

Na 13ª semana, as concentrações do T4L no GHT foram significativamente inferiores às dos demais grupos (* $p < 0,001$), os quais não diferiram entre si, estatisticamente.

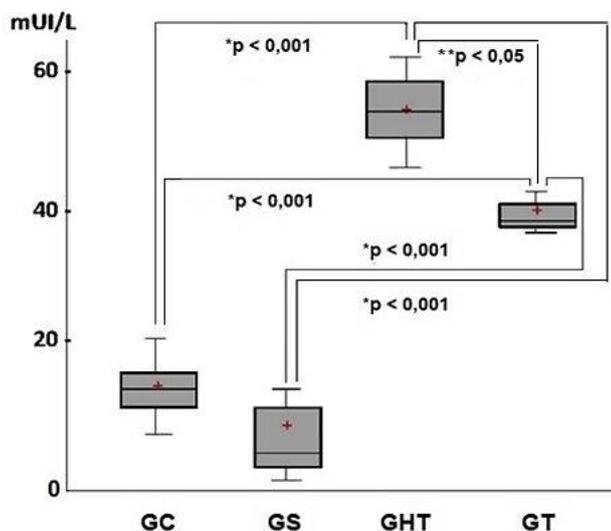
Figura 10. *Boxplot* das concentrações séricas de T4L nos diferentes experimentais, (13ª semana)



Na 13ª semana, houve redução significativa do GHT para a concentração do T4L quando comparada àquelas encontradas no GT, GC e GS.

Na 13ª semana, observou-se aumento significativo das concentrações do TSH no grupo Hipotireoidismo, maior do que os resultados encontrados no grupo Transplantado (* $p < 0,05$). O GT apresentou, porém, resultados mais próximos aos encontrados para os grupos Controle e Simulação (Figura 11).

Figura 11. *Boxplot* das concentrações séricas de TSH nos diferentes grupos experimentais (13ª semana)

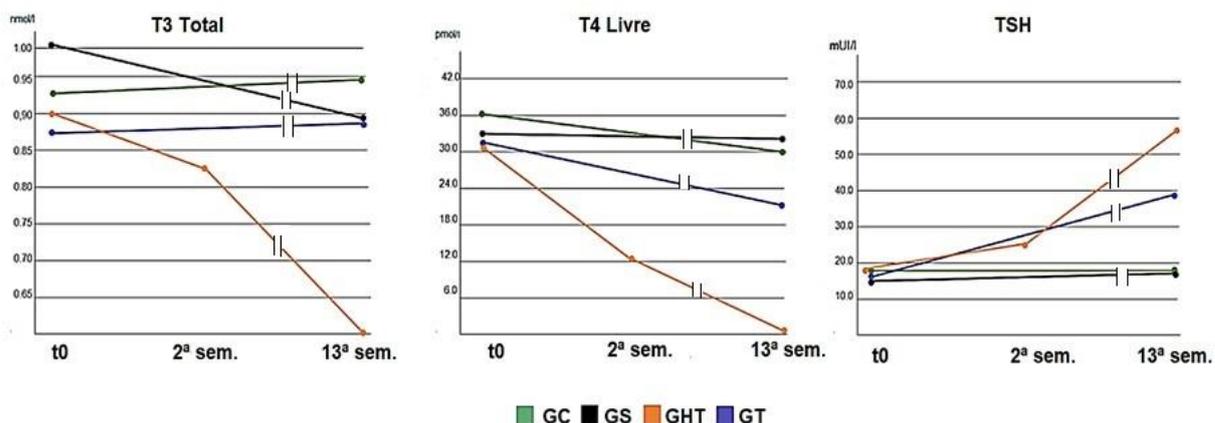


Verificou-se um aumento do TSH no GHT em relação aos demais grupos (* $p < 0,001$), com exceção para o GT cuja diferença foi menor (** $p < 0,05$). O GT também apresentou elevação das concentrações do TSH, mas com valores mais próximos aos dos GC e GS.

A concentração de cálcio não se alterou ao longo do experimento entre os grupos ($p > 0,05$).

A evolução das concentrações hormonais (T3 total, T4L e TSH) podem ser, também, visibilizadas na figura 12.

Figura 12. Variações dos hormônios tireoidianos ao longo do experimento



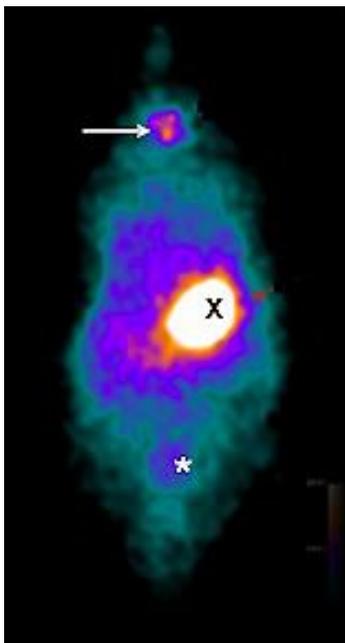
Houve redução significativa do T4L, além de elevação do TSH no GHT, na 2ª e 13ª semanas (respectivamente, $p < 0,05$ e $p < 0,001$) quando os resultados foram comparados àqueles dos demais grupos. Na 13ª semana o TSH no GT, ainda que tenha se elevado, manteve uma diferença significativa para o GHT ($p < 0,05$). t0 = Início do experimento, 2ª sem. = segunda semana e 13ª sem. = décima terceira semana.

Nas tabelas 8, 9, 10 e 11 (vide Apêndices, respectivamente nas págs. 55, 56, 57, 58), encontram-se os resultados individuais dos dados bioquímicos e que compuseram as médias e desvios-padrão.

5.3. Exames cintilográficos

Em t0 e na 14ª semana, a cintilografia de varredura de corpo inteiro realizada nos animais dos GC, GS evidenciou captação do radioisótopo tecnécio em topografia da glândula tireoide e eliminação pelos sistemas digestório e renal, em padrão compatível com a normalidade (Figura 13).

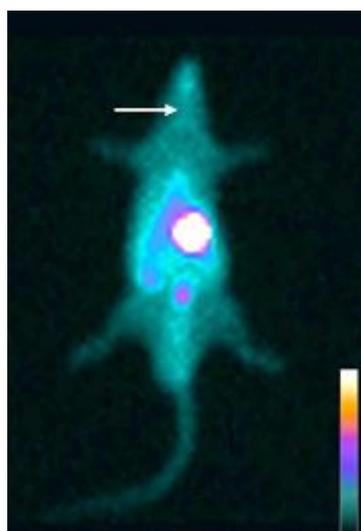
Figura 13. Cintilografia dos animais do GC e GS em t0 e na 14ª semana



Varredura de corpo inteiro evidenciando captação isotópica do radioisótopo em topografia da glândula tireoide (seta), região epigástrica (X) e bexiga (*). Fonte: Arquivo pessoal.

No GHT, os exames cintilográficos efetuados na 14ª semana evidenciaram ausência de captação do tecnécio em topografia tireoidiana (Figura 14).

Figura 14. Cintilografia dos animais do GHT na 14ª semana

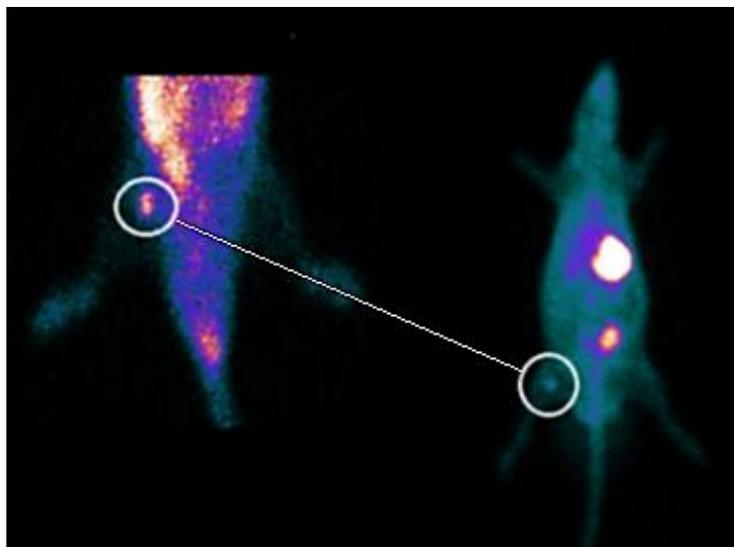


Ausência de captação isotópica do tecnécio em topografia cervical (seta). Fonte: Arquivo pessoal.

Na 14ª semana, foi evidenciada a captação pelo autotransplante heterotópico na coxa direita do animal, decorridas 13 semanas de seu implante e ausência de

captação na região cervical (Figura 15).

Figura 15. Cintilografia dos animais do GT na 14^a semana



Captação isotópica do tecnécio pelo tecido transplantado na coxa direita (seta), 13 semanas após o transplante. Fonte: Arquivo pessoal.

5.4. Análise *ex vivo* da biodistribuição do radioisótopo pertecnetato-^{99m}Tc

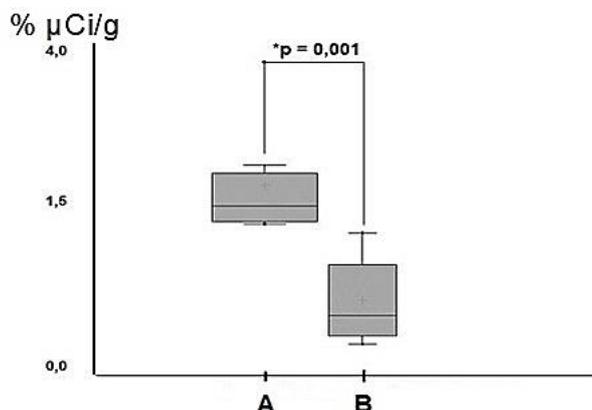
Na 14^a semana efetuou-se estudo, *ex vivo*, da biodistribuição do ^{99m}Tc. Em cada animal do GT, a taxa de captação do transplante tireoidiano localizado no músculo bíceps femoral direito foi maior do que a encontrada na amostra do músculo contralateral (*p = 0,001), com pesos iguais (Tabela 4) (Figuras 16 e 17). A análise da captação isotópica entre a amostra retirada do músculo bíceps femoral esquerdo dos GC e GT (contralateral a topografia do transplante tireoidiano) não demonstrou diferenças significantes (p > 0,05).

Tabela 5. Atividade radioativa (%) na tireoide, no transplante e no músculo contralateral (GC e GT), 14^a semana

ÓRGÃOS / TECIDOS	GRUPO CONTROLE média ± DP (%)	GRUPO TRANSPLANTADO média ± DP (%)
Tireoide	4,41 ± 0,51	-
Transplante tireoidiano	-	1,43 ± 0,91*
Músculo bíceps femoral esquerdo	0,45 ± 0,16	0,60 ± 0,11

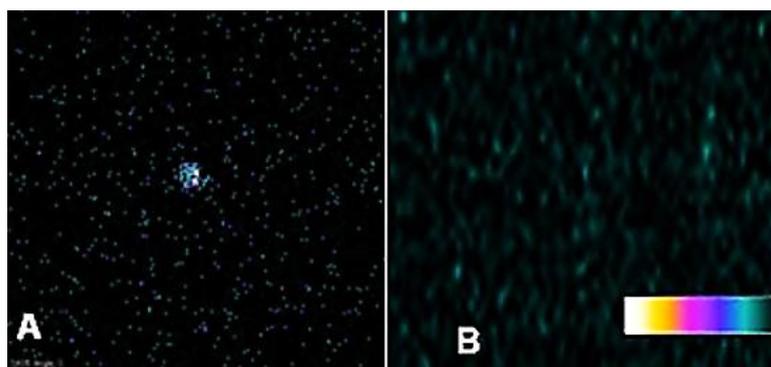
DP = Desvio-padrão da média. Transplante tireoidiano vs. amostras do músculo bíceps femoral esquerdo nos grupos Controle e Transplantado = *p < 0,001.

Figura 16. Boxplot do percentual de captação isotópica no GT do tecido transplantado *versus* a captação no músculo bíceps femoral contralateral



Captação isotópica do tecido transplantado (A) significativamente superior à do músculo bíceps femoral contralateral (B) (* $p = 0,001$).

Figura 17. Imagem da captação isotópica do tecido transplantado *versus* a do músculo bíceps femoral contralateral



A) Captação do tecido transplantado *ex vivo*. B) Ausência de captação radioativa do tecido *ex vivo* retirado da porção do músculo bíceps femoral contralateral correspondente à topografia do tecido autólogo transplantado. Fonte: Arquivo pessoal.

Além das amostras da tireoide no GC, do tecido transplantado (situadas no músculo bíceps femoral direito) e da porção de tecido contendo o músculo bíceps femoral esquerdo, a análise da biodistribuição *ex vivo*, no GC comparada à do GT, na 14^a semana, realizada em outros órgãos e tecidos não evidenciaram diferenças significantes ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Biodistribuição do radioisótopo, *ex vivo* em outros órgãos ou tecidos (%), 14ª semana

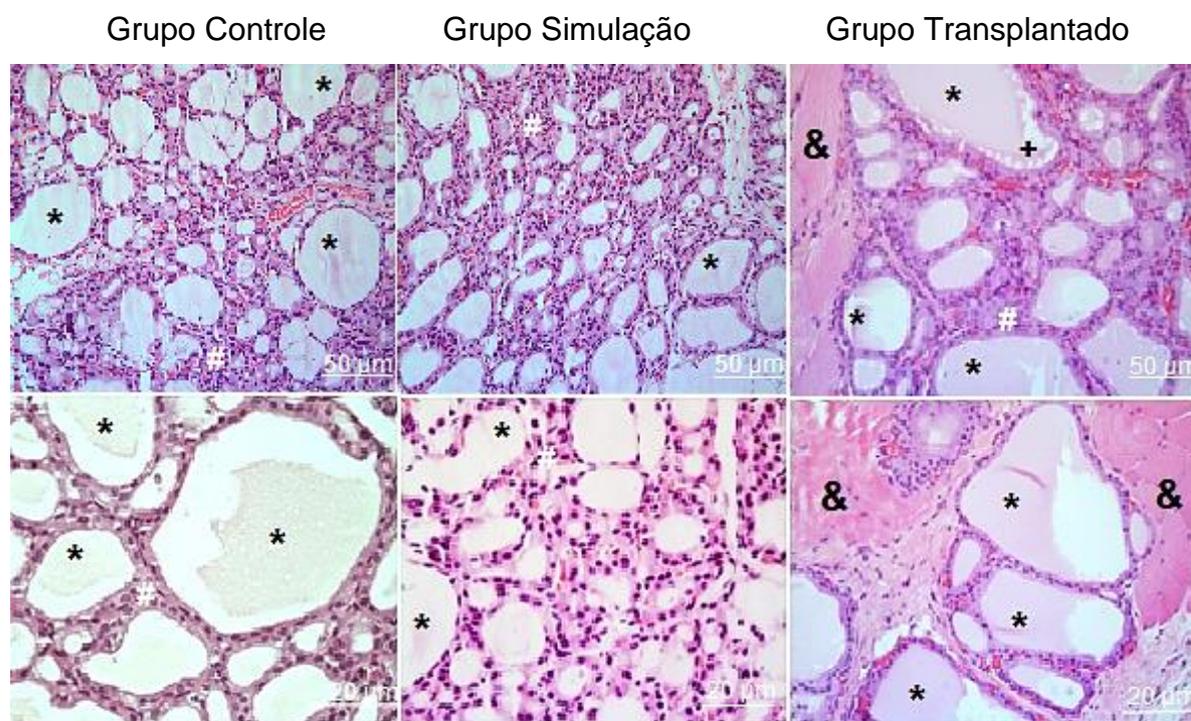
ÓRGÃOS / TECIDOS	CONTROLE média ± DP	TRANSPLANTADO média ± DP
Sangue	2,16 ± 0,63	1,72 ± 0,64
Coração	1,79 ± 0,24	1,70 ± 0,28
Pulmão direito	1,76 ± 0,50	1,66 ± 0,49
Pulmão esquerdo	1,76 ± 0,47	1,63 ± 0,34
Fígado	1,79 ± 0,45	1,82 ± 0,32
Baço	0,85 ± 0,29	0,80 ± 0,20
Pâncreas	2,44 ± 0,76	2,55 ± 0,60
Estômago	13,51 ± 0,87	11,63 ± 1,09
Intestino	10,02 ± 1,66	9,74 ± 1,67
Rim direito	4,36 ± 0,29	4,50 ± 0,55
Rim esquerdo	4,84 ± 0,59	4,33 ± 0,60
Traqueia	0,88 ± 0,26	1,00 ± 0,20

DP= Desvio-padrão da média

5.5. Exames histológicos

Na 14ª semana, o exame histológico da glândula tireoide dos animais dos GC e GS evidenciaram padrão compatível com a normalidade (Figura 18). O istmo e lobo glandular da tireoide, do GHT na 2ª semana, preservados após a remoção, também foram compatíveis com o padrão de normalidade. Nestas amostras, nos três grupos, verificou-se a presença de folículos tireoidianos revestidos por epitélio simples colunar e que armazenavam os hormônios sob forma de coloide. No GT, os folículos recobertos por epitélio colunar demonstraram secreção hormonal compatível com o padrão coloidal encontrado nos GC e GS. No GT, também foram encontradas vesículas de endocitose.

Figura 18. Exame histológico da glândula tireoide no GC, GS e GT



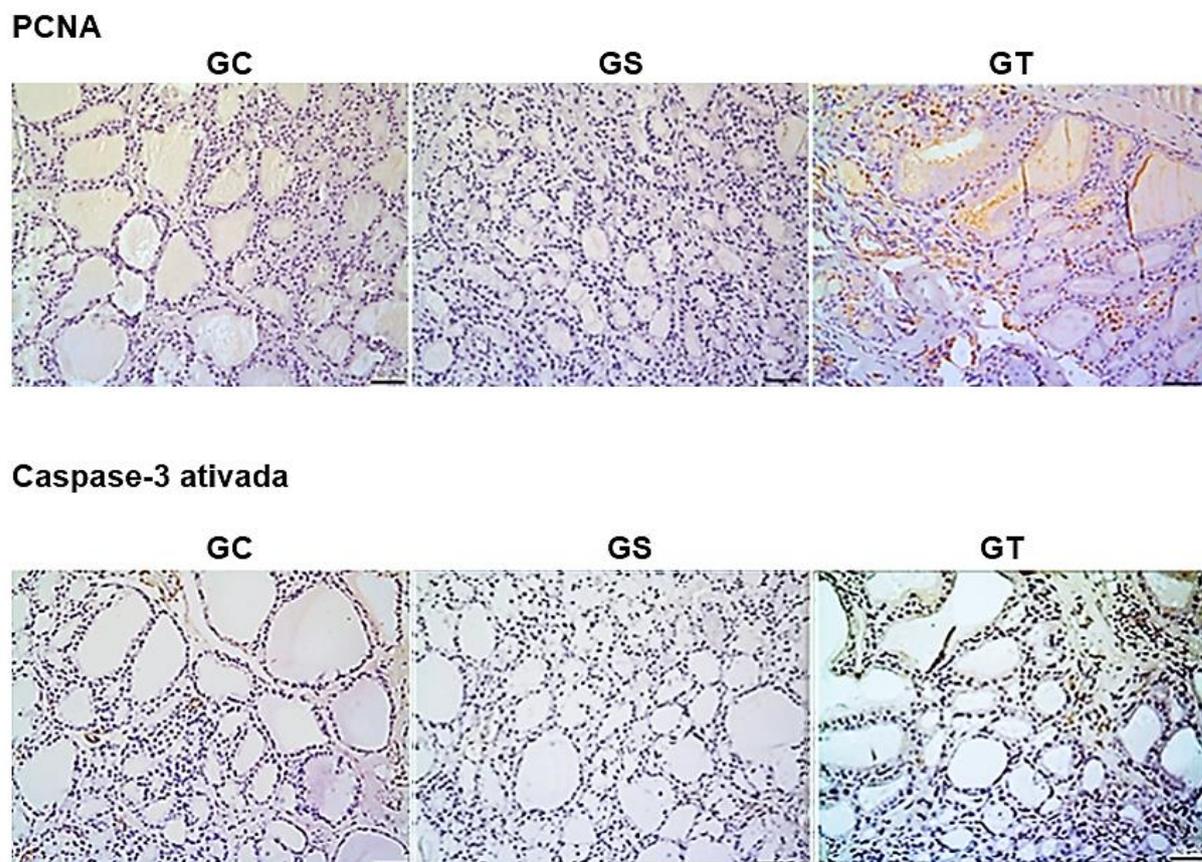
Nas fotomicrografias do GC e GS, foi possível observar folículos tireoidianos íntegros, constituídos por uma camada epitelial simples (#), cujo conteúdo se encontrava preenchido por colóide (*). Nas imagens dos animais transplantados (GT), observaram-se tecido tireoidiano entremeado por tecido muscular esquelético (&), folículos contendo colóide e presença de vesículas de endocitose (+) (H&E, na parte superior magnificação de 200x e na inferior de 400x). Barra de escala = 50 e 20 µm.

5.6. Exames imunohistoquímicos

A reação das amostras com os anticorpos monoclonais anti-PCNA, identificou uma elevação significativa ($*p < 0,001$) na marcação da proliferação celular no GT, se comparada ao GC (Figuras 19 e 20). Não houve diferenças significantes entre os GC e GS.

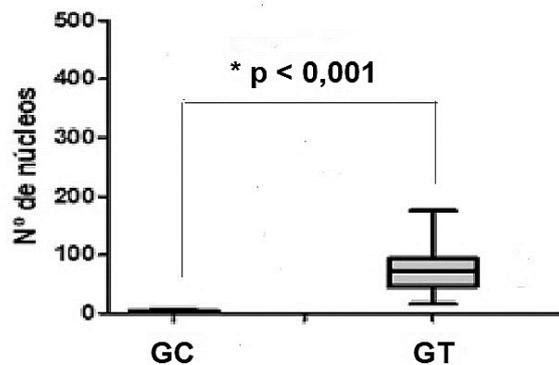
Na reação das amostras com o anticorpo monoclonal caspase-3, não foi identificada diferença entre o GT e o GC ($*p > 0,05$) (Figura 21).

Figura 19. Imunohistoquímica do PCNA e da caspase-3 ativada na glândula tireoide dos grupos GC, GS e GT



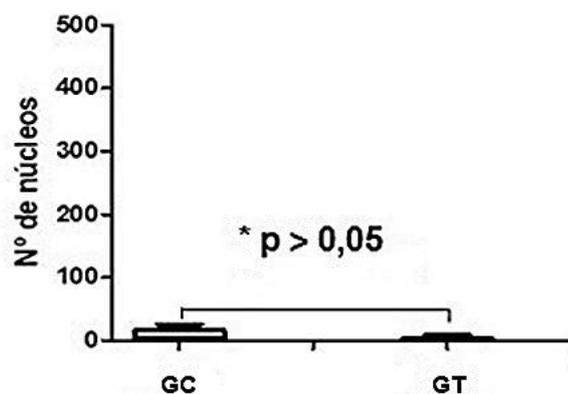
Verificou-se a presença de maior imunomarcagem do PCNA no GT se comparado ao GC ($p < 0,001$), correspondente à proliferação celular (células em cor acastanhada). Magnificação de 200x. Barra de escala: 50 μm . Não houve diferenças significantes entre o GT e GC quanto à caspase-3 ativada. Observa-se a produção de colóide no GT. Magnificação de 200x. Barra de escala: 50 μm .

Figura 20. *Boxplot* da imunorreatividade do PCNA entre o GC e GT



O gráfico evidencia elevação estatisticamente significativa ($*p < 0,001$) na expressão do PCNA no GT, se comparado ao GC.

Figura 21. *Boxplot* da diferença percentual de imunorreatividade da caspase-3 ativada entre o GC e GT



O gráfico mostra a ausência de diferença na contagem dos núcleos marcados com o anticorpo para caspase-3 ativada, entre o GC e GT ($*p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O hipotireoidismo pós-operatório causa limitações na qualidade de vida pela necessidade de reposição hormonal, de modo permanente, após tireoidectomia total. No entanto, também pode ocorrer depois da tireoidectomia subtotal bilateral, ou mesmo hemitireoidectomia associada à ressecção subtotal do lobo tireoidiano contralateral, com frequência de 0,4 até 33% dos casos (REID, 1987; TSAI, 2019). Após a alta pós-operatória, um acompanhamento prolongado é geralmente conduzido por endocrinologista, sem retorno do paciente ao cirurgião e que, por sua vez, com frequência não tem conhecimento se, de fato, ocorreu evolução clínica para o hipotireoidismo.

Nos estudos experimentais, em animais de laboratório, constatou-se a utilização de várias espécies (cães, camundongos, coelhos, ratos, suínos e hamster). Porém, a falta de identificação do quantitativo destes animais, em diversas amostras, interferiu com a análise dos dados (BRAUNWALD, 1958; CHAROUS, 2004; CHERNOZEMSKI, 1967; PASTEUR, 1999; SHIMIZU, 1996; YAMANE, 1970). Algumas outras variáveis também foram constatadas tais como: momento do transplante (imediate, a fresco, ou criopreservado), topografia do enxerto (tecido subcutâneo; musculatura esquelética pré, intra ou retroperitoneal; intravascular, entre outros órgãos e sistemas), intervalo de acompanhamento pós-operatório (um dia até décadas) e tipo de material tireoidiano (cultura, emulsão, ou fragmentos de tamanhos variáveis). Portanto, a pouca uniformidade nos dados científicos disponíveis tende a dificultar, sobremaneira, comparações com significância estatística e com melhores indicadores quanto ao nível de evidência científica.

No que tange a anatomia, a histologia e a fisiologia da tireoide do rato, espécie escolhida na presente pesquisa, os achados no grupo Controle (GC) se assemelham àqueles compatíveis com a normalidade, encontrados na espécie humana. A estrutura da tireoide no rato é composta por dois lobos e um istmo e situa-se no terço superior da traqueia, de forma idêntica ao homem. No rato, seu maior diâmetro tem, em média, 1 a 1,2 cm. O lobo esquerdo, com cerca de 3 mm e peso médio de 6,12 mg, transplantado no estudo experimental, correspondeu, em média, a 44% do peso glandular total. As paratireoides são pareadas e guardam sintopia antero-lateral com

os lobos superiores da tireoide. Paratireoides acessórias são muito raras no rato. Os nervos laríngeo recorrentes são bilaterais e se localizam no sulco traqueoesofágico em região latero-posterior aos lobos tireoidianos, em topografia correspondente àquela da espécie humana. Não foram observadas complicações respiratórias ou intercorrências no local da ferida operatória tais como infecção, hemorragia, seroma ou hematoma durante o estudo experimental definitivo.

Com efeito, viabilizou-se o desenvolvimento de uma pesquisa em um modelo experimental (em animal de laboratório), seguro, uniforme, reprodutível, com aplicabilidade translacional, ao qual foi aduzida, de modo inédito, a avaliação de marcadores moleculares. Dessa forma, visou-se aprimorar o conhecimento sobre o transplante autólogo de tireoide criopreservado e consubstanciar mais uma opção ao tratamento do hipotireoidismo pós-operatório.

Na maior parte dos estudos experimentais e clínicos sobre o tema, obtidos nos bancos de dados pesquisados, foi realizada tireoidectomia total e poucos autores utilizaram a tireoidectomia subtotal (MINUTO, 1995; MOTA, 2004 e 1999; OKAMOTO, 1990; ROY, 2003; SHIMIZU, 1996 e 2002). A exceção de Shimizu, em 2002, nos demais casos a ressecção glandular parcial prejudicou a comparação com os resultados da presente Tese, haja vista que os efeitos funcionais do remanescente tireoidiano poderiam se sobrepor aos do tecido glandular transplantado e causar um possível fator confusional. A tireoidectomia total foi realizada, nessa Tese, com o auxílio de microscópio cirúrgico de pedestal. Apesar de não ser considerada uma operação complexa em roedores, as dimensões das estruturas anatômicas demandam técnica meticulosa no intuito de se evitar iatrogenias e preservar as paratireoides e a integridade dos nervos laríngeo recorrentes. Durante a curva de aprendizado, foi verificada baixa taxa de mortalidade e no estudo definitivo, o tempo médio operatório foi reduzido de 75 minutos para cerca de 30 minutos.

Nas diversas espécies de animais de laboratório, à exceção de um estudo com enxerto homólogo em ratos (RAAF, 1976), onde todos evoluíram com rejeição em período de um mês; predominou a utilização do tecido tireoidiano autólogo, a exemplo do que ocorreu nessa Tese. Em *anima nobile*, todos os tecidos transplantados foram provenientes de tireoides autólogas.

Eventualmente foi utilizado um meio de cultura de células para preservação do tecido tireoidiano (DOBRINJA, 2008; PASTEUR, 1999; RAAF, 1976), e dentre esses raros trabalhos, apenas dois foram realizados com ratos (DOBRINJA, 2008;

RAAF, 1976). A cultura de tecido tireoidiano preserva o epitélio folicular e a produção de coloide por um tempo limitado e as condições de manutenção demandam mais vigilância do que a criopreservação. Além disto, a cultura é constituída de monocamada com ausência de um citoesqueleto e não apresenta uma matriz vascularizada, fatos estes que poderiam determinar diferenças morfoestruturais e das propriedades de sinalização química intercelular (PASTEUR, 1999; SACKR, 2017). Em dois estudos com seres humanos foi utilizada uma emulsão, de um macerado do tecido tireoidiano injetado no ventre muscular da coxa após tireoidectomia total, para tratar bócios multinodulares atóxicos durante o ato operatório (MOHSEN, 2017; SALEH, 2016). Além de não preservar o arcabouço tecidual, em ambos, a administração foi imediata ao contrário da técnica de criopreservação da presente Tese.

Na maior parte dos estudos pesquisados, predominou a técnica de fatiamento do tecido tireoidiano (número variável de fragmentos de 2,5 a 5 gramas, em *anima nobile*) para inserção muscular heterotópica. Em relação à quantidade de tecido transplantado, Mohsen e colaboradores compararam o efeito terapêutico da suspensão de macerado tireoidiano aplicada em *anima nobile* em duas concentrações (5 e 10 g). Com 10 g houve captação isotópica significativamente maior e uma concentração de T3 mais elevada do que com a suspensão de 5 g. Assim, os autores concluíram que enxertos com peso igual ou superior a 10 g e, portanto, cerca de 40 a 66% do peso absoluto médio da glândula humana, apresentaram os melhores resultados funcionais ao longo de 12 meses (MOHSEN, 2017). Não obstante o volume da glândula humana variar em seu peso, de modo análogo, a quantidade de tecido tireoidiano transplantado em nosso estudo correspondeu à 44% do peso absoluto da glândula murina, situando-se dentro da faixa ideal do estudo de Mohsen. Há relato de taxa de sucesso em torno de 50% de autotransplante de 5 a 10 g de tecido de tireoide lingual, inserido no músculo reto abdominal sem reposição hormonal no período pós-operatório (NEINAS, 1973). Entretanto, Swan e colaboradores descreveram, em dois casos, a ausência de eficácia do autotransplante com cerca de 2 g de tireoide lingual implantada no músculo reto abdominal dos pacientes. Atribuíram esta falha terapêutica à pouca quantidade de tecido, estimado, de forma comparativa, ao equivalente a menos de 10% da glândula humana (SWAN, 1952 e 1967). Minuto e colaboradores, referiram, também, um outro caso de implante de três fragmentos de tireoide lingual no músculo reto abdominal direito e que, 21 anos após a tireoidectomia

total, em dois deles evidenciou-se captação cintilográfica (MINUTO, 1995).

Quanto ao detalhamento da topografia dos transplantes, os ensaios clínico-cirúrgicos em *anima nobile* e os estudos experimentais evidenciaram locais variados, tais como: tecido subcutâneo; musculatura esquelética da região cervical, do antebraço, da coxa e da bainha do reto; espaço pré-peritoneal, regiões intra-abdominal (subserosa do estômago, omento maior, capsular ou subcapsular renal) e extracavitária (testículos); córtex cerebral e medula óssea; olho; mucosa jugal e lúmen vascular (BRAUNWALD, 1958; GÁL, 2005; KARAMAN, 2011; MINUTO, 1995; MOTA, 2004; RAAF, 1976; SHIMIZU, 1996; SHORTER, 1963; YAMANE, 1970). No entanto, enfatiza-se a reduzida aplicabilidade clínico-cirúrgica do transplante de tecido tireoidiano em cavidades orgânicas, ou órgãos sólidos, ou mesmo na corrente sanguínea, pelos riscos inerentes aos procedimentos. Conseqüentemente e em face da aplicabilidade recomenda-se que a escolha da topografia para o transplante de tireoide atenda aos requisitos de simplicidade na execução técnica, mediante procedimento pouco invasivo de fácil acesso e de baixo risco, o que não se concretiza via cavidades abdominal e pélvica, vísceras intra-abdominais, ou espaços que comportem o líquido cefalorraquidiano. Já a administração por via venosa, além do risco de embolização, ou da migração aleatória das células para outros tecidos e órgãos distancia-se do escopo do nosso estudo e, portanto, não foi considerada. De forma análoga à rotina nos transplantes de paratireoide, a maior parte das informações sobre os transplantes de tireoide acessíveis à consulta, refere-se à implantação heterotópica na musculatura esquelética (DOBRINJA, 2008; GAMAL, 2019; MOHSEN, 2017; PAPAZIOGAS, 2002; ROY, 2003; SALEH, 2016; SHIMIZU, 2002; YÜCE, 2014).

Em *anima nobile*, há preferência pela musculatura do antebraço, cuja área receptora pode ser facilmente preparada para procedimento cirúrgico minimamente invasivo. Quando o tecido tireoidiano é implantado no músculo esternocleidomastoideo, geralmente pela mesma incisão cirúrgica para acesso à loja tireoidiana, há a possibilidade do mapeamento cintilográfico causar um viés de interpretação em face da sobreposição com algum resíduo glandular. Além disto, uma reoperação para retirada do tecido transplantado, em face de complicações, recidiva da doença primária e ou suspeita de doença neoplásica, trará mais dificuldades técnicas haja vista a formação inevitável de fibrose tecidual na região e entorno da cicatriz cirúrgica, além de resultados estéticos indesejáveis, porquanto situada em

área corporal comumente exposta. Assim, também é aconselhável a manutenção de uma vigilância evolutiva pós-operatória constante do local da implantação dos tecidos tireoidianos.

Contrapondo diversos estudos experimentais (CHAROUS, 2004; DOBRINJA, 2008; KARAMAN, 2011; NAGAMINE, 1968; PAPAZIOGAS, 2002; RAAF, 1976; SHIMIZU, 1996; YÜCE, 2015), e ensaios clínicos-cirúrgicos (GAMAL, 2019; MOHSEN, 2017; SACKR, 2018; SALEH, 2016; SWAN, 1952 e 1967), que comportaram a execução de um transplante autólogo imediato (ou seja, em um mesmo tempo cirúrgico), na Tese utilizou-se o transplante autólogo de um dos lobos do tecido tireoidiano, após um período de criopreservação de uma semana. Esta conduta tem o potencial de tornar exequível exames macroscópico e histológico do tecido transplantado antes de se efetivar o transplante. Ademais, a criopreservação do tecido tireóideo comporta a execução de mais de um transplante, caso o enxerto inicial não se torne totalmente funcional. Cumpre ressaltar que, ao contrário da criopreservação, a secção da glândula em fragmentos com inserção imediata não permite avaliar, de forma segura, a presença de doença residual no material implantado. Além disso, a análise peroperatória por técnica de congelamento para casos em que haja necessidade de diferenciação, por exemplo, entre o adenoma e o carcinoma folicular, com frequência é inconclusiva. Há que se considerar, ainda, o tempo dispendido para o preparo dos fragmentos e que pode comprometer a integridade tecidual em face da autólise tecidual tempo dependente. Nos ratos, pelo fato dos lobos e istmo da tireoide terem dimensões muito pequenas, a manipulação a fresco para o preparo de fragmentos em micrótomo poderia comprometer a qualidade e integridade das amostras. Logo, optou-se pelo congelamento de um lobo inteiro (com dimensões de cerca de 3 mm), para posterior transplante.

A técnica de criopreservação tem sido mais utilizada para embriões, sêmen, óvulos e/ou tecido ovariano e a paratireoide. Nestas circunstâncias, o efetivo transplante do tecido ocorre em um segundo tempo cirúrgico e os desfechos variam consideravelmente, no que tange ao êxito dos procedimentos (KIM, 2018; MANDWALA, 2016; MOORE, 2019; SHEPET, 2013).

Nos textos encontrados nos bancos de dados, destaca-se que o processo de criopreservação da glândula tireoide foi utilizado em poucos estudos com animais (GÁL, 2005; SHORTER, 1963; YÜCE, 2014) e apenas três ocorreram em *anima nobile* (PUSHKAR', 1984; SHIMIZU, 1991 e 2002). Diferentemente da Tese, onde se

utilizaram ratos, os três estudos com criopreservação em laboratórios experimentais foram efetuados em cães e coelhos e apenas dois enxertos autólogos foram implantados em músculo (GÁL, 2005; YÜCE, 2014). Shorter encontrou viabilidade histológica em apenas 34% dos enxertos aos 60 dias após a implantação e Yüce relatou hipotireoidismo em 85% dos animais decorridos 60 dias do enxerto tireoidiano. Apenas Gál obteve êxito, à semelhança dos resultados observados nesta Tese, e descreveu funcionalidade glandular, aos 30 dias de pós-operatório.

O material criopreservado, diferente da cultura de células, propicia uma viabilidade tecidual por períodos mais longos e que seriam mais compatíveis com a evolução do hipotireoidismo pós-operatório em seres humanos e, por conseguinte, com maior aplicabilidade. Desta forma, no estudo experimental da Tese, optou-se pela utilização do autotransplante criopreservado em detrimento da cultura de células. Nos estudos clínicos de Shimizu, em 1991, houve o relato de caso cujo paciente com doença de Basedow-Graves foi submetido à tireoidectomia total seguida de criopreservação e enxertia. Entretanto, não foram encontrados detalhamentos acerca do local onde o tecido tireoidiano foi transplantado, o período pós-operatório em que foi efetuado e tão pouco sobre o desfecho clínico. Já em 2002, o mesmo autor e seus colaboradores, não obstante efetuarem uma tireoidectomia subtotal, relataram a evolução para o hipotireoidismo em quatro pacientes, decorridos períodos de latência de 1,9 a 3,5 anos, quando então foram submetidos ao transplante dos tecidos criopreservados. Constataram a funcionalidade dos enxertos, implantados no antebraço, em 75% dos casos, acompanhados entre dois à sete anos após o transplante. Tais resultados positivos motivaram aprimorar o conhecimento sobre o assunto nesta Tese.

É digno de nota que a preservação de tecidos em longo prazo requer temperaturas muito mais baixas e protocolos elaborados para potencializar o resfriamento e o aquecimento sempre na presença de agentes crioprotetores. No processo de criopreservação do tecido tireoidiano optou-se pela técnica de congelamento lento (taxa de -1 °C por minuto). Tal escolha expôs as células às baixas temperaturas, de modo gradual, impedindo a formação de cristais de gelo no citoplasma celular (ISMAILOV, 1989; SOLVES, 2008; THUSOO, 2003). Para manter um padrão de qualidade, utilizou-se o meio nutritivo de Roswel (RPMI 1640), comumente aplicado na cultura de células humanas. Todo o processo de criopreservação foi realizado em câmara de fluxo laminar, evitando-se a contaminação

e perda das amostras. Para maximizar a viabilidade celular durante e após o processo de congelamento, usou-se o dimetilsulfóxido (DMSO) com atuação crioprotetora e que não obstante associar-se à uma suposta toxicidade celular, apresenta características higroscópicas que agem na extração de água do interior das células (BERZ, 2007). Ao final do período de sete dias, repetidas lavagens com PBS estéril reduziram a probabilidade de toxicidade por DMSO, o que não afetou a arquitetura e a viabilidade foliculares, conforme atestado pelos exames histológicos, na 14ª semana.

De fato, as propriedades físicas únicas dos tecidos e órgãos (densidade, morfologia, estrutura) comprometem, significativamente, a resposta biológica ao congelamento e descongelamento (TAYLOR, 2019). Nos três estudos em seres humanos encontrados na literatura científica, o período de criopreservação da glândula tireoide variou de quatro meses até 3,5 anos (PUSHKAR', 1984; SHIMIZU, 1991 e 2002). Nos três estudos obtidos das bases de dados com animais de experimentação, o período de observação pós-operatória após a criopreservação estendeu-se de um a dois meses, mas foram realizados em cães (dois dentre os estudos) e coelhos. Na ausência de referências prévias sobre criopreservação com transplante de tireoide em músculo de ratos, os autores desta Tese optaram por utilizar um intervalo de sete dias para criopreservação do tecido glandular. Naturalmente, há de se fazer uma correlação de proporcionalidade entre o tempo de vida de ratos em uso em laboratórios, mantidos em macro e microambientes controlados (cerca de dois anos, em média), e a expectativa de vida humana, no século XXI, em locais com melhor infraestrutura e condições ambientais e socioeconômicas mais favoráveis (em torno de 80 anos). Há estudos cujas evidências atestam que cerca de 12 dias em um rato adulto corresponderiam a um ano de vida na espécie humana (ANDREOLLO, 2012). Analogamente, há de se considerar, no rato, que o tempo de uma semana decorrido entre a tireoidectomia e o transplante corresponderia, no homem adulto, a um período de sete meses, ou seja, se adequaria a um possível cenário da evolução para um quadro de hipotireoidismo pós-operatório. No que tange ao período de acompanhamento pós-operatório dos ratos no presente estudo, este se estendeu por 13 semanas, o que, proporcionalmente, corresponderia em torno de sete anos e meio no homem, intervalo considerável para se comprovar a viabilidade do tecido transplantado. Apesar de um número substancial de relatos científicos sobre a eficácia terapêutica do transplante de diversos tipos de tecidos após longos períodos de congelamento, resta esclarecer se há um limite de tempo

para o armazenamento hipotérmico do tecido tireoidiano, dentro do qual poder-se-ia garantir a preservação da integridade e funcionalidade celulares.

No que concerne às provas de função tireoidiana, no início do experimento (t0) não foram evidenciadas diferenças estatísticas na comparação entre as médias dos diferentes grupos estudados em relação às concentrações séricas de T3 total, T4 livre, TSH e cálcio total ($p > 0,05$). Assim, comprovou-se a necessária homogeneidade e uniformidade amostrais para a condução da pesquisa.

Já na segunda semana, o grupo Hipotireoidismo (GHT) comparado ao grupo Controle (GC) apresentou redução do T4L e aumento do TSH, o que demonstrou efetividade do ato cirúrgico para causar o hipotireoidismo. Os valores encontrados para o T3 ainda não apresentavam variações significantes, mas o controle do TSH hipofisário é exercido, principalmente, pelo T4. O TSH é o padrão ouro para avaliação da função tireoidiana, com sensibilidade de 98% e especificidade de 92% para definição do diagnóstico de hipotireoidismo (BROKHIN, 2019). A mensuração da triiodotironina (T3) tem baixa acurácia para o diagnóstico do hipotireoidismo, haja vista que a conversão periférica aumentada do T4 para T3 pode manter a concentração sérica de T3 nos limites normais até o hipotireoidismo se tornar grave. Ressalta-se que a dosagem do T3 pode ser normal em 30% a 40% de pacientes com hipotireoidismo (CARVALHO, 2013). Esta condição fisiopatológica poderia explicar o resultado encontrado nos ratos do GHT, considerando o intervalo de apenas uma semana após a tireoidectomia total.

Em relação às concentrações dos hormônios tireoidianos na 13ª semana ocorreram diferenças significantes nos grupos GC e GS quando comparadas àquelas do grupo submetido à tireoidectomia (GHT). Neste, foram observadas expressivas reduções das concentrações do T4L e T3 total, além da elevação do TSH ($p < 0,001$). Tais achados confirmaram a presença do hipotireoidismo. Ainda na 13ª semana, quando os resultados dos grupos Controle (GC) e Simulação (GS) foram comparados aos do grupo Transplantado (GT) não foram verificadas diferenças significantes para as dosagens de T4L e T3 total. Observou-se, também, uma redução da concentração sérica do TSH no grupo Transplantado (GT) quando comparado ao grupo Hipotireoidismo (GHT), com tendência a valores mais próximos da normalidade ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram descritos em *anima nobile* após criopreservação (SHIMIZU, 2002) e em ratos com a utilização de criopreservado ou cultura de células (GÁL, 2005; DOBRINJA, 2008). Nos transplantes da glândula tireoide em seres

humanos, a maioria dos pacientes mantiveram altas concentrações de TSH por vários meses atribuída à hiperatividade hipofisária. Porém, ao longo do tempo (em até um ano), houve tendência à normalização da prova de função tireoidiana nos pacientes, à semelhança dos nossos achados em animais de laboratório. É digno de nota que, o seguimento das dosagens hormonais tireoidianas por 12 semanas após o transplante (o equivalente a um período de cerca de sete anos em *anima nobile*, considerando a expectativa de vida proporcional de ambas as espécies) permitiu acompanhar as respostas hormonais em período superior ao de estudos anteriores com outros animais de laboratório cujo acompanhamento se estendeu até oito a nove semanas (DOBRINJA, 2008; GÁL, 2005; KARAMAN, 2011; PAPAZIOGAS, 2002; SHIMIZU, 1996; SHORTER, 1963; YÜCE, 2014). Mohsen e colaboradores relataram a evolução pós-operatória de 40 pacientes com transplante autólogo de emulsão tireoidiana. Entretanto, aos 12 meses, o TSH permanecia elevado, apesar das concentrações de T3 e T4L, em mais de 83% dos casos, situarem-se na faixa de normalidade (MOHSEN, 2017). Com efeito, alguns autores recomendaram o seguimento, em longo prazo, para pacientes com transplantes autólogos cujo resultado da concentração do TSH tenha se mantido elevado (SAKR, 2018). Outros autores aduziram que as concentrações de TSH ainda elevadas, com T4L compatível com a normalidade, a exemplo do que foi constatado no presente estudo após o transplante, não poderiam ser prontamente interpretadas como um distúrbio da função tireoidiana, haja vista que o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide atua como um sistema dinâmico e adaptativo (FLIERS, 2015; HOERMANN, 2015 e 2017). Ademais, a dosagem do TSH poderia não indicar adequadamente o estado tireoidiano em pacientes com hipotireoidismo, mantendo-se elevada por vários meses ou mesmo anos, apesar da normalização das concentrações de hormônios tireoidianos (ANDERSEN, 2002).

Considerando o fato da manipulação peroperatória eventualmente desencadear lesões parenquimatosas das paratireoides, isquêmicas ou necróticas, os autores dessa Tese, por precaução, avaliaram a funcionalidade destas glândulas por intermédio da mensuração da concentração do cálcio sérico no pós-operatório imediato e tardio. Evidenciaram-se nos grupos tireoidectomizados, GHT (2^a e 13^a semanas) e GT (13^a semana), valores para o cálcio compatíveis com a normalidade e sem diferenças significantes para os demais grupos, ao longo do experimento ($p > 0,05$). Cumpre ainda esclarecer que, no pós-operatório também não foram observadas evidências clínicas de hipocalcemia, em especial disfunções neuromusculares, a

exemplo de postura rígida, tremores, contrações musculares tônico-clônicas, convulsões, tetania, entre outras. Assim, a normocalcemia nos animais submetidos à tireoidectomia comprovou a integridade estrutural das glândulas paratireoides com a utilização de uma técnica cirúrgica metódica.

No que diz respeito à distribuição do radioisótopo, esta ocorre mais rapidamente do que sua excreção (RÊGO, 2010) e há uma elevada taxa metabólica basal nos roedores. Após ponderações sobre essa dinâmica, foi necessário proceder investigações relacionadas ao tempo e à via de administração para a obtenção máxima de contraste nas imagens geradas. Para tanto, foram estabelecidos protocolos preliminares quanto à melhor opção dentre as vias de administração do radioisótopo, intraperitoneal ou intravenosa e quanto à algumas variáveis temporais (5, 15, 30 e 60 minutos) na aquisição de imagens. Concluiu-se, após esses estudos “piloto”, que a aplicação intravenosa de 0,35 μCi de pertecnetato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, diluído em 0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%, com varredura isotópica, cinco minutos após a administração, deveria ser considerada o padrão ouro na obtenção de imagens de alto contraste no modelo experimental escolhido. O pertecnetato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta vantagens em relação aos demais radioisótopos, principalmente no que tange ao $^{131}\text{Iodo}$, pelo fato de não ser uma substância organificada, ou seja, de não permanecer no interior da glândula interferindo com os valores hormonais, apesar da presença do *sodium-iodide symporter* (NIS), uma glicoproteína transmembrana que transporta ativamente ânions para o interior das células (BOSCHI, 2013). Portanto, o pertecnetato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ propiciou imagem de melhor qualidade, com menor dose de radiação. Órgãos com maior expressão dessa glicoproteína são a tireoide, o estômago e as glândulas salivares (RÊGO, 2010). Rêgo ressaltou que, o radioisótopo pertecnetato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ao entrar na corrente sanguínea, é simultaneamente distribuído por todo o corpo, após o que passa a ser eliminado, principalmente, pelos sistemas digestório e renal (RÊGO, 2010). Esses achados foram semelhantes aos encontrados após varredura de corpo inteiro em t_0 e na 14ª semana, em todos os grupos de animais.

O tecnécio, utilizado nesta Tese, apresenta sensibilidade satisfatória e elevado valor preditivo positivo (VPP), respectivamente, 79 e 100%, para o rastreamento de tecido remanescente após a tireoidectomia total (LOU, 2008). A varredura de corpo inteiro nos animais do GHT, na 14ª semana, atestou a ausência de captação na topografia da loja tireoidiana. Esta constatação foi corroborada pelos

achados da biodistribuição na traqueia e que não evidenciaram diferenças significantes entre o GC e o GT, o que comprovou a ausência de remanescente tireoidiano e a eficácia do procedimento cirúrgico efetuado (tireoidectomia total).

Ao ser realizada a extração do material para o estudo *ex vivo* do lobo tireoidiano transplantado, houve o cuidado de não causar dano e, portanto, também foram removidas poucas gramas de tecido muscular circunvizinho. Na 14ª semana, verificou-se com a análise da biodistribuição *ex vivo*, que todos os animais do GT apresentaram captação isotópica do tecido tireoidiano no local em que foi implantado (coxa direita). Este resultado superou aqueles relatados por Dobrinja em ratos, o qual citou uma taxa de sucesso do tecido implantado no músculo reto abdominal, de apenas 70% na 4ª semana (DOBRINJA, 2008). Constatou-se, ainda, diferença significativa na porcentagem de atividade radioativa por grama de tecido transplantado (GT) quando comparada à obtida no músculo bíceps femoral contralateral esquerdo do próprio GT e do GC ($p = 0,001$). Estas comparações foram realizadas no intuito de se afastar uma captação falso positiva, atribuída ao próprio tecido muscular e que poderia gerar um viés de interpretação. Logo, o que se verificou na biodistribuição foi a captação de uma pequena quantidade de radioisótopo no tecido muscular contralateral, fisiológica, porém significativamente menor do que a encontrada no local do lobo transplantado, cuja captação foi expressiva ($p = 0,001$), o que configurou a presença de tecido tireoidiano funcional. Roy descreveu seis pacientes com bóciós multinodulares atóxicos submetidos ao transplante autólogo imediato após tireoidectomia subtotal dos quais apenas 45% se tornaram funcionais à captação radioisotópica e se mantiveram eutireoideos aos seis meses de pós-operatório (ROY, 2003). Mohsen, após aplicar emulsão de tecido tireoidiano na musculatura da coxa de 40 pacientes, em um mesmo tempo cirúrgico para uma tireoidectomia total, relatou captação do radioisótopo ^{99m}Tc em todos os implantes, mas com TSH elevado após 12 meses de pós-operatório (MOHSEN, 2017). Estes resultados apresentam limitações para efeito comparativo, porquanto não utilizaram a glândula criopreservada, técnica esta, cuja casuística acumula menos de uma dezena de pacientes em apenas três artigos localizados na literatura científica. Todavia, os resultados da captação radioisotópica obtidos nessa Tese sinalizam uma efetiva viabilidade e funcionalidade do tecido tireoidiano transplantado após a criopreservação.

A escassez de dados histológicos oriundos de estudos pregressos com tecido tireoidiano transplantado, para fins comparativos com a atual pesquisa experimental, se torna evidente porquanto foram encontrados apenas quatro estudos em ratos (DOBRINJA, 2008; RAAF, 1976; SHIMIZU, 1996; YOSHIZAKI, 1994). Além disso, em somente um artigo, o material transplantado originou-se de tecido criopreservado, mas nesse não foi possível encontrar a descrição histopatológica (SHIMIZU, 1996). Os demais tratavam de implantação de células preservadas em cultura, *in vitro*, de oito horas a 14 dias, com alguma descrição histológica.

Em estudos preliminares, os lobos foram preservados e examinados separadamente, de modo aleatório e optou-se pelo transplante do lobo esquerdo para fins de uniformidade das amostras, considerando a ausência de diferenças histológicas entre os lobos direito e esquerdo. Portanto, os lobos esquerdos dos GC e GS foram utilizados como a amostra padrão para fins comparativos dos exames histológicos e imunohistoquímicos. Apenas o lobo esquerdo do GT foi criopreservado e transplantado por inteiro.

No GT, na 14^a semana, nosso estudo evidenciou tecido transplantado com arquitetura tireoidiana compatível com a normalidade, à semelhança daquela verificada nos GC e GS. Os folículos tireoidianos estavam preenchidos por coloide e havia vesículas de endocitose, indicativo de atividade secretória hormonal. Tais achados histológicos foram encontrados por Yoshizaki, Raaf e Dobrinja, em ratos, ao efetuarem o transplante com tecido preservado em meio de cultura (DOBRINJA, 2008; RAAF, 1976 e YOSHIZAKI, 1994). Yoshizaki e Dobrinja descreveram a presença de tecido tireoidiano com arquitetura normal e funcional em 35% a 70% dos animais, respectivamente, após sete e 14 dias, caracterizado por estruturas foliculares preservadas contendo coloide e por uma vascularização periférica recém-desenvolvida (DOBRINJA, 2008; YOSHIZAKI, 1994). No estudo de Yoshizaki, na primeira semana, 65% das amostras apresentaram intenso infiltrado linfocitário, mesmo percentual de rejeição encontrado após 35 dias. Este resultado apresentou certa correspondência aos de Raaf e colaboradores e que, além de grande infiltração por linfócitos na primeira semana, mencionou, após 30 dias, rejeição dos implantes da glândula tireoide na mesma topografia (abaixo da cápsula renal), em cultura ou a fresco, além de aludir à substituição do tecido tireoidiano por fibrose, transcorridos 90 a 120 dias (RAAF, 1976; YOSHIZAKI, 1994). No trabalho de Dobrinja, com transplante de 0,5 mm de fragmentos do tecido tireoidiano no músculo reto abdominal, em 30%

das amostras constatou-se a presença de áreas necróticas cercadas por tecido de granulação e com células gigantes devido a granuloma caracterizado como um corpo estranho (DOBRINJA, 2008). Ressalta-se que o coloide não é reconhecido imunologicamente. A probabilidade de necrose microscópica central também foi observada por Raaf decorridas 14 semanas, após isoenxertos ou homoenxertos em ratos. Nestes, o exame histológico da tireoide preservada em cultura demonstrou maior viabilidade celular na periferia tecidual, justificada pela melhor difusão de nutrientes nas bordas (RAAF, 1976). Em outra pesquisa, dessa feita com coelhos, Papaziogas observou o desenvolvimento de gigantócitos na periferia do implante muscular de tireoide autólogo, a fresco, em 35,7% dos casos (PAPAZIOGAS, 2002). Nos estudos supracitados, esses autores não esclareceram se alguns dos achados estariam relacionados ao método de preservação dos enxertos. Corroborando nossos resultados, Karaman, aos 60 dias, descreveu folículos tireoidianos funcionais em todos os animais (hamsters), dos grupos submetidos ao transplante, porém de forma imediata (KARAMAN, 2011). Na presente Tese, reitera-se que houve normalidade morfoestrutural em 100% dos tecidos transplantados, resultados esses que se equipararam ou superaram outros descritos na literatura sobre o tema, em animais de laboratório, mas todos após um período de seguimento menor do que 13 semanas (CHAROUS, 2004; CHERNOZEMSKI, 1967; GÁL, 2005; KARAMAN, 2011; PAPAZIOGAS, 2002; SHIMIZU, 1996).

Não foram encontradas avaliações histológicas de seres humanos durante o acompanhamento pós-operatório, por razões éticas óbvias. Os relatos evolutivos dos ensaios clínicos se restringiram ao monitoramento do hipotireoidismo e sem qualquer descrição de recidiva de alguma doença.

No que se refere ao uso de marcadores moleculares utilizados no presente estudo, esta abordagem pode ser considerada inédita, pois, não foram encontradas na literatura científica, narrativas acerca de seu uso em transplantes autólogos.

O ciclo de proliferação celular é controlado por diversos estímulos ou fatores inibitórios e o recrutamento de células quiescentes (fase G₀) requer estímulos à proliferação celular (fase G₁, de síntese de RNA), capazes de sobrepujar a inibição fisiológica. No atual estudo, ao se comprovar no GT, na 14^a semana, a maior positividade com a imunomarcagem do PCNA, ou seja, do antígeno nuclear de proliferação celular, atestou-se um ciclo celular com replicação e reparo do DNA e que permaneceu ativado. No entanto, cumpre ressaltar que não há como prever por

quanto tempo essa hiperatividade persistiria, ou quais mecanismos moleculares estariam associados a hiperlabilidade observada nos tecidos transplantados humanos e eventualmente, de outros animais.

Os sinais pró-apoptóticos podem ser mediados por ligantes específicos e receptores de superfície (via extrínseca de regulação), capazes de enviar um sinal de morte celular e ativar esse mecanismo no citoplasma e em outras organelas celulares. No entanto, a apoptose também pode ser ativada no interior da célula por meio de sensores celulares específicos situados no núcleo ou citoplasma (via intrínseca de regulação) (ROSSI, 2003). A imunomarcagem da caspase-3 ativada auxilia na identificação de células apoptóticas e é considerada mais eficaz do que o método de TUNEL (CHANG, 2010; DUAN, 2003). Nessa Tese, a reação das amostras com os anticorpos monoclonais caspase-3 não identificou imunorreatividade do marcador de apoptose celular nos tecidos transplantados, quando comparada às do GC ($p > 0,05$). O resultado corroborou com o fato de que a homeostase celular no GT se equiparou, na 14ª semana, àquela dos animais cujas células tireoidianas se encontravam em condições fisiológicas (GC).

No contexto cirúrgico, há de se considerar, que a ocorrência do hipotireoidismo não pode ser negligenciada após tireoidectomia subtotal bilateral, em especial quando alargada, geralmente indicada para doença de Basedow-Graves (FEROCI, 2014). Obviamente, o hipotireoidismo poderá advir das tireoidectomias totais para tratamento de neoplasias malignas, de bóciós multinodulares tóxicos ou atóxicos volumosos e compressivos (a exemplo do bócio endêmico por carência de iodo), ou de bóciós mergulhantes com sintomas compressivos. Além dessas circunstâncias, há que se considerar o hipotireoidismo decorrente da indicação de tireoidectomias em gestantes que não obtenham controle com fármacos antitireoidianos, pacientes com intolerância ou alergia a essas medicações, ou que se recusaram a ser tratados com ¹³¹Iodo (ASBAN, 2020).

Um grande desafio para o cirurgião no tratamento do hipertireoidismo reside na quantificação visual subjetiva peroperatória do tamanho de tecido remanescente necessário para manter o estado eutireoideo, quando indicada tireoidectomia que não seja total. Neste cenário, a evolução para o hipotireoidismo pode decorrer de uma iatrogenia em face de conduta não intencional independente da etiologia, com ressecção excessiva do tecido tireoideo vinculado à experiência pessoal (SCHANAIDER, 2019). Até mesmo em operações mais conservadoras, dependendo

da estimativa efetuada para o tecido residual, o hipotireoidismo poderá advir em 5 a 20% dos casos (MICOLLI, 1996). Lin, relatou em um estudo com 415 pacientes portadores da doença de Graves submetidos a tireoidectomia subtotal onde o hipotireoidismo se desenvolveu em mais de 50% dos casos e a condição eutiroidiana foi obtida em apenas 19,3% dos casos (LIN, 2017). Okamoto, há três décadas, utilizou o autotransplante tireoidiano imediato no músculo esternocleidomastoideo após tireoidectomia subtotal, em cinco pacientes com doença de Graves e os acompanhou por dois a sete anos. Em todos houve normalização do T3 total e T4L, porém com TSH discretamente elevado, em três. Em 80% dos pacientes houve captação do radioisótopo pelos materiais implantados (OKAMOTO, 1990). No entanto, há de se considerar um viés confusional neste trabalho, porquanto o transplante, a fresco, ocorreu durante o ato cirúrgico e o remanescente glandular poderia ser o responsável pela normalidade funcional pós-operatória. Por conseguinte, caso haja dúvida quanto à existência de tecido glandular capaz de preservar o estado eutiroidiano, por suposto seria oportuno o congelamento de uma parte da glândula para utilização futura, na dependência da etiologia. Logo, sobressai a relevância da potencial indicação do autotransplante tireoidiano na iatrogenia pós-operatória resultante da imprecisão para se quantificar, adequadamente, o tecido residual capaz de garantir a integridade da função endócrina.

Os trabalhos com maior similaridade à concepção da presente Tese foram desenvolvidos por Shimizu e colaboradores, em 1991 e 2002, com um e quatro pacientes, respectivamente. Eles realizaram tireoidectomia total e subtotal e utilizaram material glandular criopreservado para prevenir o hipotireoidismo no tratamento da doença de Basedow-Graves (SHIMIZU, 1991 e 2002). Em 2002, no único estudo onde foi possível obter informações detalhadas de quatro pacientes submetidos à tireoidectomia subtotal, acompanhados por dois a sete anos, todos evoluíram para o hipotireoidismo no intervalo de 1,9 a 3,5 anos. Em três deles (75% dos casos), houve funcionalidade do tecido glandular criopreservado e implantado no antebraço, com normalização da concentração de hormônios tireoidianos (SHIMIZU, 2002). Trata-se, de uma casuística exitosa, mas cuja rara descrição e tamanho da amostra não permitem a obtenção de evidências com poder estatístico relevante.

O autotransplante tireoidiano criopreservado também poderia ser relacionado dentre as opções terapêuticas para minimizar o hipotireoidismo pós-operatório e agregar uma melhor qualidade de vida ao portador de doença de Basedow-Graves.

Apesar dessa afecção ter um substrato autoimune e comprometimento difuso, os artigos encontrados na pesquisa da literatura e com a utilização de autotransplante tireoidiano demonstraram que os pacientes não evoluíram com recidiva da tireotoxicose (GAMAL, 2019; OKAMOTO, 1990; ROY, 2003; SALEH, 2016; SHIMIZU, 1991 e 2002).

Nos bóciós multinodulares atóxicos, situação semelhante pode ocorrer, especialmente para os casos oriundos de áreas endêmicas onde sobressaia a carência de iodo. As indicações cirúrgicas geralmente acontecem pela presença de sintomas compressivos (disfagia, falta de ar) associados ou não a bócio mergulhante, em decorrência de preocupações cosméticas, ou mais raramente, na suspeição de malignidade. Por conseguinte, tais pacientes também poderão ser candidatos ao autotransplante tireoidiano, na dependência da extensão da ressecção parenquimatosa ou da evolução pós-operatória. Roy, descreveu seis pacientes com bóciós multinodulares atóxicos submetidos à tireoidectomia subtotal e ao transplante autólogo e síncrono de tireoide, que se mantiveram eutireoideus aos seis meses de pós-operatório, sem que houvesse captação cintilográfica, em apenas dois, por igual período de observação (ROY, 2003). Em 40 pacientes com bócio multinodular atóxico submetidos à tireoidectomia total, onde foi aplicada emulsão de tecido tireoidiano na musculatura da coxa no mesmo tempo cirúrgico, houve captação do radioisótopo ^{99m}Tc pelos enxertos. Porém, aos 12 meses de evolução, o TSH permaneceu elevado, apesar das concentrações de T3 e T4L, em quase 85% dos casos, permanecerem na faixa de normalidade (MOHSEN, 2017).

Outra conjuntura que requer atenção para um possível uso do autotransplante da tireoide diz respeito às operações indicadas para tratar o carcinoma diferenciado, a exemplo do tipo papilífero com variantes menos agressivas e de baixo risco. Revisões sistemáticas e metanálises, incluindo estudos da Associação Americana de Tireoide (*American Thyroid Association*), admitem, para tais casos, a realização de tireoidectomia subtotal ou de lobectomia geralmente associada à com istmectomia (MATSZUKU, 2014; VARGAS-PINTO, 2019). Evidentemente, a tireoidectomia subtotal ou parcial no carcinoma tireoidiano diferenciado não abrange condutas consensuais, pois, outros autores advogam que a doença neoplásica maligna da tireoide teria característica multicêntrica e deste modo, indicariam, rotineiramente, a tireoidectomia total para evitar a doença residual (CRAIG, 2020). Contudo, é digno de nota que, nestas circunstâncias há muita imprecisão na análise do material no

peroperatório (a exemplo da diferenciação do adenoma *versus* carcinoma folicular) e assim, a criopreservação poderia ter alguma utilidade para *a posteriori* efetuar-se a identificação de partes doadoras íntegras da glândula, sem doença, o que objetiva futuro uso desse tecido, caso o paciente evolua com hipotireoidismo. Ademais, a criopreservação do tecido tireóideo comporta a possibilidade da execução de mais de um transplante, caso o material implantado inicialmente não se torne totalmente funcional.

Reitera-se que, estudos sobre a aplicação do autotransplante de tireoide criopreservado após tireoidectomia em *anima nobile* ainda são muito raros, pouco uniformes e com amostras reduzidas. Isso pode ser atribuído à uma série de fatores, dentre os quais: a imprecisão para a indicação cirúrgica desse procedimento; a heterogeneidade na técnica do transplante no que tange a localização e a quantidade mínima de tecido necessária à manutenção de um estado eutiroideu; a efetiva falta de comprovação de viabilidade funcional por biomarcadores moleculares, exames bioquímicos, imunohistoquímicos, cintilográficos e ou de imagem; a impossibilidade de avaliação histológica pós-operatória por razões éticas óbvias e a ausência de acompanhamento evolutivo adequado por períodos prolongados. Os autores da presente Tese não encontraram referências, na literatura científica, para apoptose ou para a identificação de marcadores de proliferação celular em tecidos tireoidianos criopreservados, de forma que ambas as análises empreendidas são inéditas. Tais resultados poderão aprimorar o conhecimento sobre o assunto e fundamentar a ampliação desta técnica na profilaxia ou na terapêutica do hipotireoidismo pós-operatório.

Algumas limitações, porém, podem ser aventadas no presente estudo. No modelo experimental foram utilizados animais saudáveis quando da indicação cirúrgica da tireoidectomia total. A quantidade de tecido transplantado não corresponde, macroscopicamente àquela utilizada na prática clínica. A definição do tempo ideal e máximo para o armazenamento hipotérmico do tecido tireoidiano ainda não foi estabelecida. Além disso, faz-se pertinente acompanhamento pós-operatório por prazos maiores. A ausência de dados sobre apoptose ou o uso de marcadores de proliferação celular na literatura científica não permite estudos comparativos.

Novas alternativas terapêuticas que compreendam o autotransplante criopreservado da tireoide, o uso de células pluripotentes induzidas com produção de tireócitos que se encontra em estudos preliminares e recursos da proteômica poderão

contribuir significativamente para melhor evolução clínica dos pacientes que apresentarem hipotireoidismo pós-operatório.

Esta Tese objetivou avaliar a eficácia do autotransplante criopreservado heterotópico de tireoide. As perspectivas, com nítido impacto translacional são promissoras, pois, evidenciou-se que esta estratégia operatória poderá ser útil e agregar potencial terapêutico às opções que os cirurgiões já dispõem para prevenir ou tratar o hipotireoidismo pós-operatório.

7 CONCLUSÕES

O estudo experimental comprovou a viabilidade e funcionalidade do autotransplante tireoidiano implantado em musculatura esquelética com evidências de proliferação celular e sem apoptose.

A estratégia cirúrgica utilizada demonstrou ser eficaz no tratamento do hipotireoidismo pós-operatório, em modelo experimental.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersen S, Pedersen KM, Bruun NH, Laurberg P. Narrow individual variations in serum T(4) and T(3) in normal subjects: a clue to understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1068-72.
2. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig.* 2012;25(1):49-51.
3. Asban A, Anue A, Xie R, Chen H. Increasing use of thyroidectomy as definitive treatment for hyperthyroidism. *J Surg Res.* 2020;246:435-41.
4. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol.* 2007;82(6):463-72.
5. Boschi F, Pagliuzzi M, Rossi B, Cecchini MP, Gorgoni G, Salgarello M, Spinelli AE. Small-animal radionuclide luminescence imaging of thyroid and salivary glands with Tc^{99m}-pertechnetate. *J Biomed Opt.* 2013;18(7):76005.
6. Braunwald NS, Hufnagel CA. The effect of the site of transplantation and presence of glandular deficiency on the success of thyroid autografts. *Surgery.* 43(3):428-34. 1958.
7. Brokhin M, Danzi S, Klein I. Assessment of the adequacy of thyroid hormone replacement therapy in hypothyroidism. *Front Endocrinol. (Lausanne).* 2019;20:10:631.
8. Carvalho GA, Perez CLS, Ward LS. Utilização dos testes de função tireoidiana na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2013;57(3):193-204.
9. Centanni M, Benvenga S, Sachmechi I. Diagnosis and management of treatment-refractory hypothyroidism: an expert consensus report. *J Endocrinol. Invest.* 2017;40(12):1289-301.
10. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-46.
11. Charous DP, Heffelfinger R, Ambro BT, Pribitkin EA, Keane WM, Rothstein JL. Thyroid autotransplantation following total thyroidectomy restores function in mice. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;131(2):183.
12. Chernozemski I, Christov K. Autotransplantation and homotransplantation of thyroid gland in the hamster cheek pouch. *Nature.* 215,70.1967.
13. Craig SJ, Bysice A, Nakoneshny SC, Pasiaka JL, Chandarana SP. The identification of intra-operative risk factors can reduce, but not exclude, the need for completion thyroidectomy in low-risk papillary thyroid cancer patients. *Thyroid.* 2020; 30(2):222-8.

14. Dayan C, Panicker V. Management of hypothyroidism with combination thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) hormone replacement in clinical practice: a review of suggested guidance. *Thyroid Res.* 2018;11:1.
15. Dobrinja C, Trevisan R, Trevisan G, Liguori G. Autotransplantation of thyroid tissue in rats. An experimental study. *Ann Ital Chir.* 2008;79(5):389-95.
16. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003;199(2):221-8.
17. Feroci F, Rettori M, Borrelli A, Coppola A, Castagnoli A, Perigli G, Cianchi F, Scatizzi M. A systematic review and meta-analysis of total thyroidectomy versus bilateral subtotal thyroidectomy for Graves' disease. *Surgery.* 2014;155(3):529-40.
18. Fliers E, Bianco AC, Langouche L, Boelen A. Thyroid function in critically ill patients. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(10):816-25.
19. Gál I, Mikó I, Furka I, Nagy D. Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue in dogs. *Magy Seb.* 2005;58(2):93-9.
20. Gamal AM, Elnaga NEA, Ayoub MT, Farghally ARAS. Thyroid autotransplantation following total thyroidectomy in benign thyroid disorders: a new technique to avoid postoperative hypothyroidism. *Int Surg J.* 2019;6(7):2267-71.
21. Hesselberg C. A comparison of autoplasmic and homeoplastic transplantation of thyroid tissue in the guinea pig. *J Exp Med.* 1915;21(2):164-78.
22. Hesselberg C, Loeb L. Successive Transplantation of Thyroid Tissue into the Same Host. *J Med Res.* 1918;38(1):33-53.
23. Hoermann R, Midgley JEM, Larisch R, Dietrich JW. Homeostatic control of the thyroid-pituitary axis: perspectives for diagnosis and treatment. *Front Endocrinol.* 2015;6:177.
24. Hoermann R, Midgley JEM, Larisch R, Dietrich JW. Recent advances in thyroid hormone regulation: toward a new paradigm for optimal diagnosis and treatment. *Front Endocrinol.* 2017;8:364.
25. Ismailov SI, Turakulov IaKh, Tashkhodzhaeva TP, Shakhizirov D, Burikhanov RB. The effect of cryopreservation and transplantation factors on the morphofunctional state of the thyroid in dogs. *Bull Exp Biol Med.* 1989;108(12):727-30.
26. Karaman M, Tuncel A, Sheidaei S, Karabulut MH, Tatlipnar A. Functional capacity of the autograft and heterograft: an experimental study. *Head Neck.* 2012;34(5):702-8.
27. Kim S, Lee Y, Lee S, Kim T. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. *Obstet Gynecol Sci.* 2018; 61(4):431-42.

28. Kitamura Y, Shimizu K, Nagahama M, Shoji T. Cryopreservation of thyroid pieces-optimal freezing condition and recovery. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1994; 95(1):14-20.
29. Lin YS, Lin JD, Hsu CC, Yu MC. The long-term outcomes of thyroid function after subtotal thyroidectomy for Graves' hyperthyroidism. *J Surg Res*. 2017;220:112-8.
30. Lou K, Gu Y, Hu Y, Wang S, Shi H. Technetium-99m-pertechnetate whole-body SPET/CT scan in thyroidectomized differentiated thyroid cancer patients is a useful imaging modality in detecting remnant thyroid tissue, nodal and distant metastases before ¹³¹I therapy. A study of 416 patients. *Hell J Nucl Med*. 2018;21(2):121-4.
31. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*. 2016; 15;86(7):1637-44.
32. Matsuzaki K, Sugino K, Masudo K, Nagahama M, Kitagawa W, Shibuya H, Ohkuwa K, Uruno T, Suzuki A, Magoshi S, Akaishi J, Masaki C, Kawano M, Sukanuma N, Rino Y, Masuda M, Kameyama K, Takami H, Ito K. Thyroid lobectomy for papillary thyroid cancer: long-term follow-up study of 1,088 cases. *World J Surg*. 2014;38(1):68-79.
33. Miccoli P, Vitti P, Rago T, Iacconi P, Bartalena L, Bogazzi F, et al. Surgical treatment of Graves' disease: subtotal or total thyroidectomy? *Surgery*. 1996;120(6):1020-4.
34. Minuto FM, Fazzuoli L, Rollandi GA, Derchi LE, Biassoni P. Successful autotransplantation of lingual thyroid: 37-year follow-up. *Lancet*. 1995 30;346(8979):910.
35. Mohsen AA, Nada AA, Ibrahim MY, Ghaleb AH, Abou-Gabal Ma, Mohsen AA, Wassef AT. Technique and outcome of autotransplanting thyroid tissue after total thyroidectomy for simple multinodular goiters. *Asian J of Surg*. 2017;40(1):17-22.
36. Moore EC, Siperstein A, Gupta S. Cryopreservation of parathyroid tissue: a white paper on establishing a local service. *Endocr Pract*. 2019;25(6):605-11.
37. Mota JCN, Silva AL, Andrade ZA, Barbosa Junior AA. Aspectos morfológicos dos autotransplantes de tireoide da rata. *Rev. Col. Bras. Cir*. 1999;(26)3:135-39.
38. Mota JCN, Silva AL, Barbosa Junior AA, Nascimento M. Aspectos funcionais e imunológico do transplante autólogo da tireoide em ratos. *Acta Cir. Bras*. 2004;19(6): 630-6.
39. Nagamine S. Experimental studies on the autotransplantation of thyroid gland using microvascular anastomoses. *Nihon Geka Hokan*. 1968;37(1):32-57.
40. Neinas FW, Gorman CA, Devine KD, Woolner LB. Lingual thyroid. Clinical characteristics of 15 cases. *Ann Intern Med*. 1973;79:205-10.

41. Okamoto T, Fujimoto Y, Obara T, Ito Y, Kodama T, Kusakabe K. Trial of thyroid autotransplantation in patients with Graves' disease whose remnant thyroid has unintentionally been made too small at subtotal thyroidectomy. *Endocrinol Jpn.* 1990;37(1):95-101.
42. Papaziogas B, Antoniadis A, Lazaridis Ch, Makris J, Kotakidou R, Paraskevas G, Papaziogas T. Functional capacity of the thyroid autograft: an experimental study. *J Surg Res.* 2002;103(2):223-7.
43. Pasteur IP, Tronko M, Drozdovich II, Turchin IS, Balla IA. Thyroid transplantation: possibility of application for the treatment of persistent hypothyroidism and study of mechanisms of interaction between graft and hypothalamic-pituitary axis of recipient. In: *Animal cell technology: basic & applied aspects.* vol. 10. Editors: Kitagawa Y, Matsuda T, Iijima S. Dordrecht, Netherlands: *Kluwer Academic Publishers.* 1999;289-93.
44. Pushkar' NS, Makedonskaia VA, Utevskii AM, Chuiko VA, Karpenko LG. Autoimplantation of cryopreserved (-196 degrees °C) thyroid gland parenchyma as a treatment method in postoperative hypothyroidism. *Probl Endokrinol. (Mosk).* 1984; 30(5):42-6.
45. Raaf JH, Pilsum JFV, Good RA. Fresh and cultured thyroid gland: survival and function after implantation. *Ann Surg.* 1976;183(2):146-56.
46. Rêgo ACM, Araújo-Filho I, Azevedo IM, Jácome DT, Ramalho RAO, Medeiros AC. Biodistribution of technetium-99m pertechnetate after Roux-en-Y gastric bypass (Capella technique) in rats. *Acta Cir Bras.* 2010;25(1):9-12.
47. Reid DJ. Hyperthyroidism and hypothyroidism complicating the treatment of thyrotoxicosis. *Br J Surg.* 1987;74(11):1060-2.
48. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica.* 2003;88(2):212-8.
49. Roy PG, Saund MS, Thusoo TK, Roy D, Sankar R. Fate of human thyroid tissue autotransplants. *Surg Today.* 2003;33(8):571-6.
50. Sakr M, El-kerm Y, Abo-Elwafa W, Mahmoud A, Fathi I. Heterotopic thyroid autotransplantation: A preliminary clinical study. *Head Neck.* 2018;40(1):34-45.
51. Sakr M, Mahmoud A. Review of heterotopic thyroid autotransplantation. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2017;10(4):289-95.
52. Saleh AM. Survival and functional capacity of heterotopic thyroid autograft after total thyroidectomy for benign goiters [dissertation]. Alexandria, Egypt: Faculty of Medicine, Alexandria University; 2016.
53. Schanaider A. Complicações da Tireoidectomia. In: *Clínica Cirúrgica: teoria e prática.* vol 1. Ed: Schanaider A e cols. Atheneu, 2019, 411-22.

54. Shepet K, Alhefdhi A, Usedom R, Sippel R, Chen H. Parathyroid cryopreservation after parathyroidectomy: a worthwhile practice? *Ann Surg Oncol*. 2013;20(7):2256-60.
55. Sheverdin IuP. The results of a 15-year observation of patients with an autotransplant of thyroid gland fragments performed to prevent postoperative hypothyroidism. *Vestn Khir Im I I Grek*. 1992;148(2):152-6.
56. Shiloh H, Iancu TC, Sheinfeld M, Kraiem Z. The influence of cryopreservation on the ultrastructural morphology of human thyroid cells. *Cryobiology*. 1987;24(4):303-10.
57. Shimizu K, Kitamura Y, Nagahama M, Shoji T. A fundamental study of the thyroid transplantation for the patient with irreversible hypothyroidism (the first report: an autotransplantation of cryopreserved thyroid): preliminary report. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1991;92(12):1728.
58. Shimizu K, Kumita S, Kitamura Y, Nagahama M, Kitagawa W, Akasu H, Oshina T, Kumasaki T, Tanaka S. Trial of autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue for postoperative hypothyroidism in patients with Graves' disease. *J Am Coll Surg*. 2002;194(1):14-22.
59. Shimizu K, Nagahama M, Kitamura Y, Igarashi T, Aida N, Tanaka S. Improvement of thyroid function after autotransplantation of cryopreserved thyroid tissues in rats: clinical application of the procedure to patients with persistent hypothyroid Graves' disease after thyroidectomy. *Thyroidol Clin Exp*. 1996;8:55-62.
60. Shorter RG, Titus JL, Kerr FWL, Campbell JC. Effects of freezing and storage on survival of thyroid autografts. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963;113:73-5.
61. Solves P, Mirabet V, Planelles D, Carbonell-Uberos F, Roig R. Influence of volume reduction and cryopreservation methodologies on quality of thawed umbilical cord blood units for transplantation. *Cryobiology*. 2008;56(2):152-8.
62. Swan H, Harper F, Christensen SP. Autoimplantation of thyroid tissue in the treatment of lingual thyroid. *Surgery*. 1952; 32: 293-8.
63. Swan H, Jenkins D, Schemel J. Thyroid autograft. A 12-year follow-up. *Arch Surg*. 1967; 94: 817-20.
64. Taylor MJ, Weegman BP, Baicu SC, Giwa SE. New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs. *Transfus Med Hemother*. 2019;46(3):197-215.
65. Thusoo TK, Das D. Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue. *J Am Coll Surg*. 2003;196(4):663-4.
66. Tsai SH, Chien SC, Nguyen PA, Chien PH, Ma HP, Asdary RN, Wang YC, Humayun A, Huang CL, Iqbal U, Jian WS. Incidences of hypothyroidism associated with surgical procedures for thyroid disorders: a nationwide population-based study. *Front Pharmacol*. 2019;10:1378.

67. Vaisman F, Coeli CM, Ward LS, Graf H, Carvalho G, Montenegro R Jr, Vaisman M. How good is the levothyroxine replacement in primary hypothyroidism patients in Brazil? Data of a multicentre study. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(7):485-8.
68. Vargas-Pinto S, Romero Arenas MA. Lobectomy compared to total thyroidectomy for low-risk papillary thyroid cancer: a systematic review. *J Surg Res.* 2019;242:244-51.
69. Yamane I, Kamba S. Autotransplantation of the thyroid in the bone marrow and the vascular lumen. *Yonago Acta Med.* 1970;14(3):131-45.
70. Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Thyroid allograft after total thyroidectomy in a rat model. *Auris Nasus Larynx.* 1994;21(4):237-42.
71. Yüce İ, Okuducu H, Çağlı S, Vural A, Gundoğdu R, Abdulrezzak U, Arlı T, Aydın M, Guney E. Experimental autotransplantation and cryopreservation of the thyroid gland. *Head Neck.* 2015;37(7):940-5.

9 APÊNDICES

Tabela 7. Peso total da tireoide e do tecido transplantado no GT, por animal

Ratos (N)	Peso corporal (g)	Peso total da tireoide (mg)	Peso do tecido transplantado (mg)	Diâmetro do tecido transplantado (mm)
1	320	15,00	6,15	3,10
2	300	13,80	6,32	3,10
3	280	13,70	5,67	2,80
4	280	13,80	6,25	2,90
5	300	13,80	6,34	3,10
6	330	14,00	6,50	3,10
7	280	13,70	5,80	2,80
8	280	13,80	6,00	2,90
Média	296,25	13,95	6,12	2,97
Mediana	290,00	13,80	6,20	3,00
DP	18,66	0,40	0,26	0,12

DP = Desvio-padrão da média.

Tabela 8. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GC, por animal

Grupo Controle (N)	T3_{total} (nmol/L)	T4L (pmol/L)	TSH (mUI/L)	Ca_{total} (mmol/L)
1. t = 0	1,00	26,25	16,85	2,03
13ª semana	1,01	20,33	21,91	1,99
2. t = 0	0,93	31,92	16,76	1,90
13ª semana	0,95	45,05	15,95	1,74
3. t = 0	0,93	37,07	19,36	1,96
13ª semana	0,91	34,36	18,72	2,03
4. t = 0	0,96	39,38	17,87	2,07
13ª semana	1,06	25,74	17,48	1,87
5. t = 0	0,97	46,98	18,17	2,03
13ª semana	1,00	21,62	19,14	1,99
6. t = 0	0,79	34,88	16,80	1,71
13ª semana	0,82	31,02	17,23	1,75
7. t = 0	0,99	36,04	22,55	1,79
13ª semana	0,87	37,97	20,70	1,87
8. t = 0	0,94	39,64	19,14	1,72
13ª semana	1,04	26,64	16,80	2,03

Tabela 9. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GS, por animal

Grupo Simulação	T3_{total} (nmol/L)	T4L (pmol/L)	TSH (mUI/L)	Ca_{total} (mmol/L)
1. t = 0	1,04	30,37	18,05	1,69
13ª semana	0,87	30,24	17,72	1,62
2. t = 0	1,04	33,46	17,87	1,67
13ª semana	0,89	45,59	15,89	1,99
3. t = 0	1,03	36,04	16,76	1,94
13ª semana	0,85	32,18	15,95	1,87
4. t = 0	0,98	41,19	19,14	2,02
13ª semana	0,97	33,46	17,65	1,89
5. t = 0	0,96	33,72	16,80	1,84
13ª semana	0,85	32,82	16,04	2,09
6. t = 0	1,01	34,65	17,95	1,83
13ª semana	0,88	35,86	16,45	1,78
7. t = 0	1,03	32,27	16,87	1,78
13ª semana	0,89	33,92	16,10	1,80
8. t = 0	1,02	37,95	18,37	1,90
13ª semana	0,88	35,58	17,44	1,63

Tabela 10. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GHT, por animal

Grupo Hipotireoidismo (N)	T3_{total} (nmol/L)	T4L (pmol/L)	TSH (mUI/L)	Ca_{total} (mmol/L)
1. t = 0	0,91	25,48	16,80	1,80
2ª semana	0,96	8,75	26,17	1,55
13ª semana	0,53	0,77	54,25	1,62
2. t = 0	0,97	30,24	18,51	2,07
2ª semana	1,01	9,01	23,93	2,03
13ª semana	0,49	1,15	59,14	2,04
3. t = 0	0,93	39,13	15,95	1,96
2ª semana	0,90	14,67	20,80	1,70
13ª semana	0,66	0,90	64,93	1,81
4. t = 0	0,90	28,96	17,44	1,62
2ª semana	0,90	9,65	18,91	1,49
13ª semana	0,78	0,12	48,51	2,06
5. t = 0	0,87	44,66	19,31	1,77
2ª semana	0,67	16,34	19,30	1,59
13ª semana	0,50	0,12	61,25	1,72
6. t = 0	0,95	36,04	18,61	1,79
2ª semana	0,99	22,39	19,18	2,12
13ª semana	0,66	0,64	51,27	2,10
7. t = 0	0,84	26,00	16,76	1,94
2ª semana	0,58	10,29	32,76	1,60
13ª semana	0,39	1,15	57,87	1,66
8. t = 0	0,86	25,48	19,61	2,02
2ª semana	0,70	9,65	28,51	2,03
13ª semana	0,55	2,31	51,70	1,79

Tabela 11. Concentrações séricas de T3 total, T4L, TSH e cálcio no GT, por animal

Grupo Transplantado (N)	T3_{total} (nmol/L)	T4L (pmol/L)	TSH (mUI/L)	Ca_{total} (mmol/L)
1. t = 0	0,86	26,00	15,91	2,07
13ª semana	0,88	16,99	31,42	1,82
2. t = 0	1,02	29,99	17,58	1,80
13ª semana	0,87	22,09	34,68	1,96
3. t = 0	0,98	26,16	18,03	1,62
13ª semana	1,02	23,68	33,61	1,87
4. t = 0	1,05	21,49	18,19	1,82
13ª semana	0,84	9,51	60,85	1,82
5. t = 0	1,03	28,18	16,38	1,66
13ª semana	1,05	25,19	47,87	1,86
6. t = 0	0,11	46,59	17,52	1,55
13ª semana	0,89	15,78	38,29	2,05
7. t = 0	0,90	36,29	16,00	1,93
13ª semana	0,68	28,61	31,90	1,87
8. t = 0	0,90	44,92	16,85	2,17
13ª semana	0,83	36,21	32,34	2,05

Tabela 12. Biodistribuição do radioisótopo no GC (% $\mu\text{Ci/g/animal}$)

Grupo Controle	1	3	4	5	6	7	8	
Sangue	3,10	1,70	1,80	1,90	3,40	1,80	1,70	1,90
Coração	1,50	2,16	1,70	2,20	1,50	1,70	1,80	1,80
Pulmão direito	2,40	1,90	2,60	1,35	1,20	1,50	1,45	1,70
Pulmão esquerdo	1,79	2,20	1,90	1,70	2,00	2,20	1,10	1,20
Fígado	1,00	1,85	1,70	2,25	2,64	1,50	1,60	1,80
Baço	1,41	0,60	0,55	1,20	0,88	0,80	0,85	0,55
Pâncreas	2,62	2,80	2,00	1,62	4,20	2,40	2,10	1,80
Estômago	12,75	13,75	14,60	14,90	13,20	12,20	13,9	12,84
Intestino	7,63	11,34	13,10	9,80	10,45	7,80	10,3	9,75
Rim direito	4,19	4,91	3,93	4,60	4,20	4,30	4,60	4,20
Rim esquerdo	5,35	5,59	4,60	5,60	5,10	4,10	4,20	4,25
Transplante tireoideano	3,90	4,50	3,80	3,80	4,90	5,10	4,80	4,50
Traqueia	1,40	0,82	1,08	1,00	0,60	0,50	0,75	0,90
Músculo bíceps femoral contralateral	0,60	0,80	0,42	0,28	0,40	0,30	0,50	0,30

Tabela 13. Biodistribuição do radioisótopo no GT (% $\mu\text{Ci/g/animal}$)

Grupo Transplantado	1	2	3	4	5	6	7	8
Sangue	1,81	1,28	2,80	0,77	2,55	1,90	1,20	1,50
Coração	1,50	1,40	2,35	1,70	1,74	1,40	1,70	1,85
Pulmão direito	2,51	1,22	2,15	1,70	1,76	1,80	0,80	1,40
Pulmão esquerdo	1,97	1,22	1,80	2,20	1,60	1,80	1,30	1,20
Fígado	2,15	1,22	1,80	1,80	2,15	2,00	1,40	2,10
Baço	1,20	0,60	1,00	0,60	0,82	0,80	0,80	0,60
Pâncreas	1,80	2,80	3,50	1,70	3,20	2,20	2,80	2,40
Estômago	11,20	10,2	13,40	12,70	12,40	10,85	10,3	12,0
Intestino	8,40	11,3	13,20	10,43	8,35	9,00	8,00	9,30
Rim direito	3,80	4,91	4,50	5,60	4,20	3,80	4,50	4,70
Rim esquerdo	3,80	4,60	5,50	4,50	3,80	3,80	3,80	4,90
Traqueia	0,90	0,72	1,08	1,40	0,90	1,00	0,82	1,20
Transplante tireoidiano	1,10	3,65	0,80	0,75	0,74	1,60	1,05	1,80
Músculo bíceps Femoral contralateral	0,70	0,50	0,48	0,60	0,73	0,50	0,52	0,80

10 ANEXOS

10.1 Normatização da Tese

A parte pré-textual desta Tese seguiu as normas de resolução específica do Conselho de Ensino para Graduados e Pesquisa (CEPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, número 02/2002. As referências bibliográficas foram baseadas nas diretrizes de Vancouver. A parte textual seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023/2018.

10.2 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 9 de janeiro de 2018

Prezado Professor Alberto Schanaider;

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Autotransplante de Tireoide após Tireoidectomia Total. Estudo experimental em ratos.”**, protocolo nº 111/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **13/12/2017**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 01/12/2020
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus/ Wistar</i>
Nº de animais	36 animais
Peso/idade	250-270g / 6 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Centro de Cirurgia Experimental - CCS - UFRJ

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CCS
 Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde,
 Bloco K, 2º andar -Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil. Tel: (21)
 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br

