

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno*

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogen thyreotropic hormone*

Dani Ejzenberg** Edna Teruko Kimura***

Ejzenberg D, Kimura ET. Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):36-44.

RESUMO: Objetivo. Neste estudo foram modulados os níveis de TSH hipofisário de ratos por tratamento farmacológico in vivo, para avaliação da possível perda celular por apoptose durante a involução da glândula tiróide por supressão de TSH. **Métodos.** Ratos Wistar machos (~220g peso corporal pc) foram tratados com metimazol (MTZ) 0,03% na água de beber por três semanas. Após este período receberam tiroxina (T4) 20 mg/100 g pc/dia intraperitonealmente por 1(T4-1d), 2 (T4-2d), 3 (T4-3d) e 5 (T4-5d) dias e o grupo controle (MTZ) sem tratamento com T4. Foi realizada a quantificação de DNA para verificação da perda celular e o valor obtido na A595 no espectrofotômetro foi comparada à curva padrão de DNA de esperma de salmão. **Resultados.** O peso da tiróide (T)/100g de pc do animal e os valores de DNA calculados em mg/100 g de pc, Média \pm SE, e a variação da quantidade de DNA (%) em comparação ao grupo MTZ. Na análise morfológica do tecido à microscopia óptica e eletrônica (MO e ME), os folículos dos ratos tratados com MTZ apresentam tirócitos altos com lúmens fechados e se observam reaparecimento gradativo dos lúmens e redução variada da altura das células nos tecidos com tratamento com T4. Em alguns lúmens, dos grupos tratados com T4 nota-se a presença de estruturas eletrondensas contendo resíduos de organelas, sendo mais frequente nos tratamentos prolongados. Na região basal dos folículos aparecem esporadicamente células envolvendo fragmentos densos contendo cromatina intensamente condensada e resíduos de organelas (corpos apoptóticos) ou ainda células com cromatina condensada em meia-lua (células apoptóticas) nos grupos que receberam tratamento com T4. **Conclusão.** Nas tiróides dos animais tratados com T4 ocorre redução de DNA e observam-se estruturas morfológicas de apoptose à MO e ME. A perda celular por processo de apoptose contribui juntamente com a hipoplasia das células foliculares na involução da glândula tiróide de ratos submetidos a supressão de TSH.

DESCRITORES: Ratos Wistar; Estudos de avaliação; Apoptose/efeitos de drogas; Tirotropina/análise; Supressão; Hormônios tireoidianos/análise.

INTRODUÇÃO

A apoptose é um processo de deleção celular, com caracterização morfológica típica, que pode ocorrer fisiologicamente e em algumas condições patológicas^{10,13,22,32,41}. Atualmente seu estudo tem

ganhado importância na medida em que este processo está envolvido na etiopatogenia das doenças auto-imunes tireoidianas (Doença de Graves e Tireoidite de Hashimoto), nos tumores tireoidianos, na gênese

* Prêmio Oswaldo Cruz (Área Básica) - COMU, 1999.

** Acadêmico da FMUSP.

*** Prof^a Dra. do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Depto. de Histologia e Embriologia (orientadora).

do diabetes mellitus, na Doença de Alzheimer e na morfogênese dos animais e do homem^{5,6,11,16,17,21,24,25,33,36-38,45,52,57,58}. À microscopia óptica e eletrônica o núcleo da célula em apoptose pode ter aspecto inicial em meia-lua, falciforme, navicular ou de corpo arredondado e denso. Já o citoplasma apresenta-se diminuído de volume e igualmente condensado. Na evolução do processo o núcleo pode sofrer ruptura com confinamento dos fragmentos nucleares picnóticos ("budding phenomenon"), ou ainda apresentar-se extremamente compactado e reduzido de tamanho. A apoptose termina com a perda das junções intercelulares sendo então a célula fagocitada por macrófagos ou englobada pelas células adjacentes^{39,47,55}. Sob aspecto bioquímico a apoptose decorre da ação de endonucleases, que determinam a fragmentação do DNA, de proteases que rompem o citoesqueleto e provocam a redução do volume celular; e de transglutaminases que originam o "cross-linking" de proteínas citoplasmáticas^{2,3,4,14,15,23,29,30,35,48,56,60}.

Nos últimos anos houve grande interesse na comprovação da presença e caracterização de células apoptóticas nos tecidos de órgãos humanos e de animais, empregando diferentes métodos^{9,27,43,53,55}. Em glândulas dependentes de estímulo hormonal tais como córtex-adrenal, ovário, útero, mama e próstata foram observadas células apoptóticas na supressão de seus respectivos hormônios tróficos^{9,27,43,53,55}. Na glândula tireóide os conhecimentos sobre a ocorrência de apoptose em humanos e animais são muito limitados. Foi constatada a ocorrência do processo apenas em culturas celulares tireoidianas *in vitro* porém há evidências indiretas de que o evento apoptótico possa ocorrer nesta glândula^{7,8,12,18,19,24,26,28,31,34,42,44,46,49,50,51,54,59}. Em humanos e animais há redução volumétrica e ponderal do órgão na supressão do hormônio tireotrófico (TSH) endógeno, não acompanhada de sinais do outro tipo de deleção celular, a necrose.

No presente estudo utilizamos um modelo experimental em que se promoveu inicialmente um crescimento da glândula tireóide por ação do TSH endógeno com emprego de metimazol (MTZ). Na sequência do experimento provocou-se uma redução ponderal e volumétrica da glândula por supressão do TSH, utilizando-se tiroxina (T_4). O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de apoptose na tireóide de ratos *in vivo*, nestas circunstâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado um modelo experimental em tecido tireoidiano de ratos. Inicialmente procurou-se obter um aumento do volume/peso da tireóide através da

administração de MTZ por via oral. Esta droga provoca um aumento secundário do TSH produzido pela hipófise do animal por bloqueio da síntese de T_3 e T_4 . Secundariamente há incremento do TSH, reconhecido fator trófico da tireóide. Numa segunda etapa do protocolo foi induzida a supressão do TSH endógeno por administração intraperitoneal de T_4 , sendo que esta condição origina a hipotrofia da glândula. Neste experimento procurou-se comprovar esta hipotrofia evolutiva da tireóide através da dosagem de DNA. A avaliação da presença de células foliculares tireoidianas apoptóticas foi feita através da caracterização morfológica utilizando as microscopias óptica e eletrônica de transmissão.

I Animais e tratamento

Utilizamos 40 ratos machos da raça Wistar, criados no Biotério do Departamento de Histologia e Embriologia com peso de cerca de 220 g os quais foram tratados com água contendo 0,03% de Metimazol, *ad libidum*, por 3 semanas. Após este período 8 ratos não receberam nova medicação constituindo o grupo controle (GrMTZ). Os outros 32 receberam tiroxina (T_4) aplicada intraperitonealmente na dosagem de 20 mg/100g de peso corporal/24h por um período de 1, 2, 3 ou 5 dias constituindo os grupos T_4 -1d, T_4 -2d, T_4 -3d e T_4 -5d (com 8 ratos cada). Os 8 animais de cada grupo foram sacrificados para extração cirúrgica de suas tireóides no dia subsequente ao término do tratamento com T_4 , sendo que os 8 animais controle foram sacrificados após o tratamento com Metimazol. Os ratos foram previamente anestesiados com hidrato de cloral a 33% (0,1 ml/100 g de peso corpóreo) e perfundidos com 500 ml de solução salina a 0,9% por 10 minutos. Dez animais (2 de cada grupo T_4 e 2 do grupo MTZ) tiveram a tireóide analisada à microscopia eletrônica. Estes ratos foram previamente submetidos à perfusão adicional com glutaraldeído a 3% para fixação do tecido.

II - Dosagem de DNA

O tecido tireoidiano foi homogeneizado após adição de 1 ml de ácido perclórico 0,3 N, sendo então centrifugado a 3000 g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi suspenso em ácido perclórico 1,5 N. Estas amostras foram incubadas em banho-maria a 80°C por 30 min. Após nova centrifugação coletou-se 0,9 ml de sobrenadante ao qual acrescentou-se sucessivamente 0,9 ml de ácido perclórico 1,5 N, 2 ml de solução de difenilamina 4% diluído em ácido acético glacial e 100 ml de solução de acetaldeído 0,2% gelado. Esta amostra foi incubada em banho-maria a 80°C por 2 horas. Concomitantemente foram preparadas amostras contendo DNA de esperma de salmão que serviram

para a elaboração da curva padrão. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro em A_{595} e a quantidade de DNA foi calculada baseando-se na curva-padrão. Para efeito de comparação foram dosados os conteúdos de DNA dos testículos dos ratos sacrificados.

Análise estatística

Foram realizadas análises de variância com um fator (tratamento) seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey, sendo o nível de significância adotado $p < 0,05$. A suposição de homocedasticidade dos grupos foi satisfeita com transformação logarítmica dos dados. Foram construídas e comparadas as retas de regressão dos pesos das glândulas e do conteúdo de material nuclear dos diferentes grupos de tratamento.

III. Análise morfológica à microscopia óptica e eletrônica de transmissão

Microscopia óptica - Para os estudos histológicos empregando esta técnica os tecidos tiroidianos foram cortados e coletados em lâmina de vidro, previamente tratada com polilisina. Foi retirada a parafina por imersão em xilol, e reidratado em soluções de álcool 100%, 95%, 70% e lavagem em água corrente. A seguir os tecidos foram corados em soluções de hematoxilina de Harris por 5 minutos, seguida de coloração por eosina de Erlich por 2 min. Após rápida desidratação em soluções de álcool seguida de banhos em xilol os materiais foram cobertos com lamínula utilizando resina Enthellan. Os tecidos foram observados e analisados à microscopia de luz e documentados em fotos.

Microscopia eletrônica de transmissão

Para esta técnica os tecidos tiroidianos foram cortados e fixados em solução de Karnovsky, contendo 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em solução de cacodilato 0,1 M, seguida de pós-fixação em solução de ósmio 1%. Posteriormente o material foi desidratado por banhos sucessivos em soluções de álcool 50%, 70%, 90%, 95%, 100% e imersão em solução de óxido de propileno 100%. Os tecidos foram infiltrados em solução contendo resina e óxido de propileno na mesma proporção, e na sequência imersos em solução de resina onde foram incluídos em resina. O tecido fixado foi analisado em cortes semi-finos corados com solução de azul de metileno 2% e levado para observação à microscopia óptica quando foram delimitadas as áreas para a realização dos cortes finos. Após nova trimagem dos blocos os tecidos foram cortados em porções de 60

a 90 nm de espessura apoiadas em telas de cobre. Foram corados sucessivamente com soluções de acetato de uracila 5% e citrato de chumbo. Após a secagem, o material foi armazenado a 4°C até ser levado à observação em microscópio eletrônico de transmissão. Foram empregados os microscópios do Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas e as imagens mais características foram documentadas em fotos.

RESULTADOS

1 - Amostra

Para efeito de resultados e análise estatística foram considerados 26 ratos do total de 30, pois 4 ratos morreram durante o experimento (2 dos grupos T_4 -2d e T_4 -5d e 2 do grupo T_4 -3d).

2 - Indução de hipotrofia tiroidiana

Os resultados relativos ao peso da tiróide em relação à massa corpórea de cada rato dos grupos controle e tratados com tiroxina estão colocados na Tabela 1. Foi observada uma relação decrescente nos pesos relativos da tiróide com o tratamento com tiroxina sendo a diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre o grupo T_4 -5d e os demais grupos.

Tabela 1 - Resultados das massas das tiróides em relação aos pesos corpóreos dos ratos dos grupos MTZ e T_4 (na unidade mg de tecido/100g de peso de rato).

Grupos	Gr MTZ n = 6	T4-1d n = 6	T4-2d n = 5	T4-3d n = 4	T4-5d n = 5
Massa tiróide/peso de rato	12,3 ± 4,0	12,1 ± 0,8	10,7 ± 0,3	8,7 ± 0,4	3,5 ± 0,3

3 - Dosagem de DNA

Os resultados relativos ao conteúdo total de DNA de cada tiróide em relação ao peso do animal estão colocados na Tabela 2. Foi observada uma redução na quantidade de DNA a partir do início do tratamento com tiroxina, porém a variação só foi significativa ($p < 0,05$) entre os grupos T_4 -5d e o grupo controle (Grupo MTZ). Os resultados comparativos entre a redução ponderal e do conteúdo de DNA podem ser encontrados no Gráfico 1. No Gráfico 2 podemos observar a relação do conteúdo de DNA da tiróide frente ao conteúdo de DNA do testículo do rato submetido aos mesmos estímulos porém sem resposta frente ao hormônio tiroidiano administrado.

Tabela 2 Resultados dos conteúdos totais de DNA das tiróides dos ratos dos grupos MTZ e T₄ (na unidade mg de DNA tiroídiano/100g de peso do rato) e variação percentual dos grupos T₄ em relação ao grupo MTZ.

Grupos	Gr MTZ (n = 6)	T4-1d (n = 6)	T4-2d (n = 5)	T4-3d (n = 4)	T4-5d (n = 5)
Massa Tiróide/peso de rato	36,0 ± 4,0	30,9 ± 1,9	29,5 ± 2,1	27,6 ± 2,4	22,9 ± 2,5
%Variação DNA		-14,2	-18,1	-23,4	-36,4

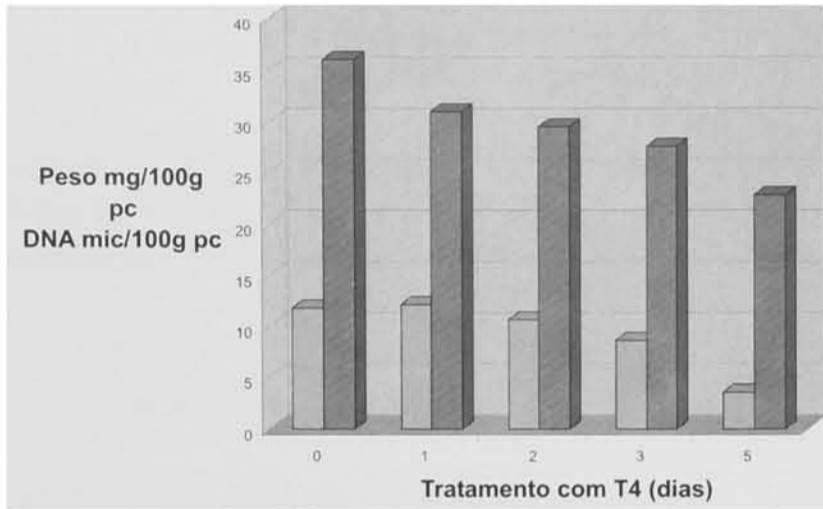


Gráfico 1 Evolução comparativa entre o peso e o conteúdo de DNA das glândulas tiróides.

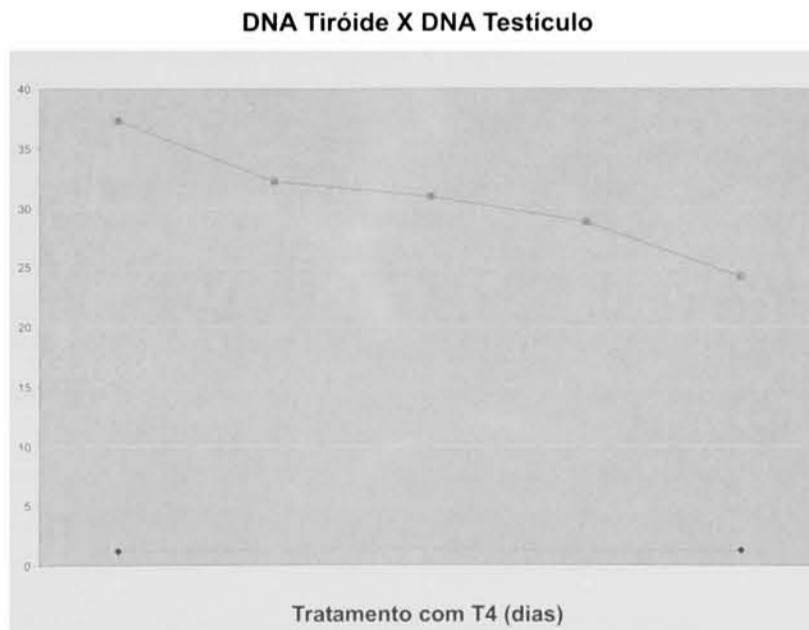


Gráfico 2 - Relação entre o conteúdo de DNA da tiróide e do DNA do testículo do rato.

4 - Análise morfológica dos tecidos tiroídianos à microscopia óptica e eletrônica de transmissão

Nos cortes histológicos do grupo MTZ observamos folículos com aumento na altura das células foliculares e lúmen reduzido em relação ao tecido tiroídiano não tratado (Figuras 1 e 2). Em

contraposição nos cortes dos grupos T₄ observamos uma abertura gradativa do lúmen folicular acompanhando a administração de tiroxina além da redução na altura dos tirócitos. Estes aspectos são mais visíveis em imagens dos grupos T₄-3d e T₄-5d (Figuras 3, 4 e 5). Nos cortes dos grupos tratados com tiroxina foram visualizadas células com núcleo condensado (inclusive em meia-lua), além da presença de massas contendo fragmentos nucleares e organelas citoplasmáticas (corpos apoptóticos) (Figuras 6 a 11). Estes aspectos característicos de apoptose foram observados na base dos folículos junto ao endotélio (corpos apoptóticos e células alteradas) e no lúmen (corpos apoptóticos). No grupo T₄-1d foram observados pequeno número de células com condensação nuclear, localizadas na base do folículo; nos grupos T₄-2d e T₄-3d temos o aparecimento de um maior número de células com morfologia semelhante às descritas no grupo anterior porém passamos a observar também massas de restos nucleares e citoplasmáticos nos lúmens foliculares e na base do folículo. No grupo T₄-5d não foram detectados alterações morfológicas características de apoptose. Não observamos nos cortes a presença de macrófagos, neutrófilos ou linfócitos.

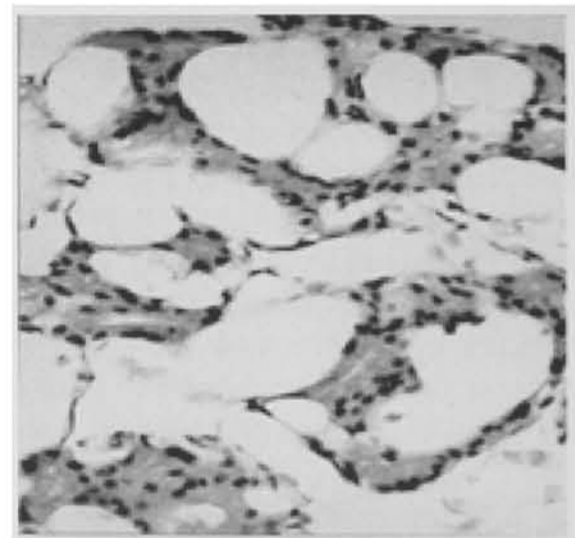


Figura 1 - Micrografia óptica de tiróide de rato normal. Aumento original: 20X.

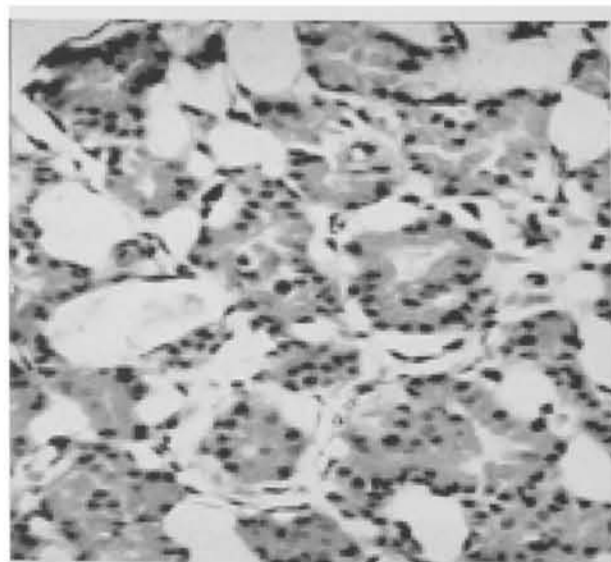


Figura 2 - Micrografia óptica de tiróide de rato tratado com MTZ. Aumento original: 20X.

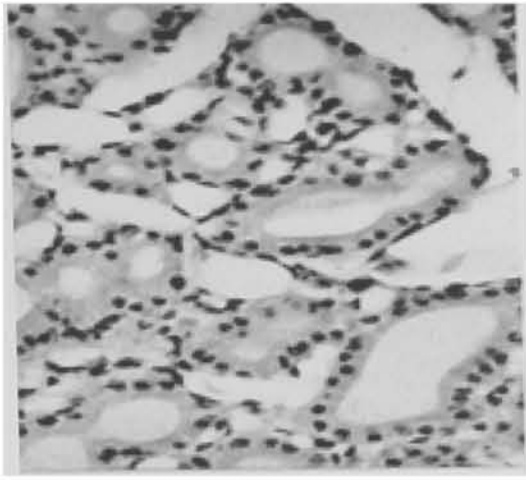


Figura 3 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-1dia. Aumento original: 20X.

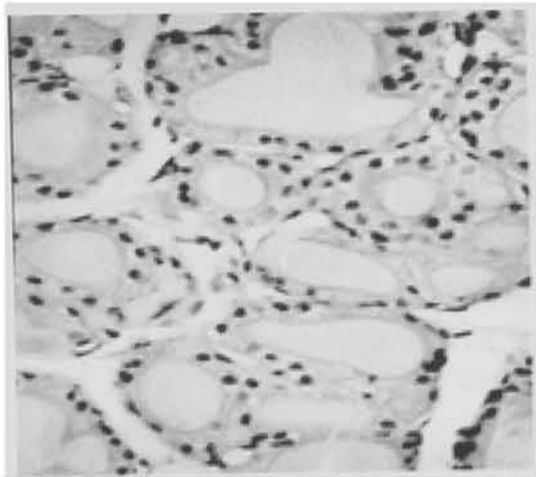


Figura 4 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4- 2 dias. Aumento original: 20X.

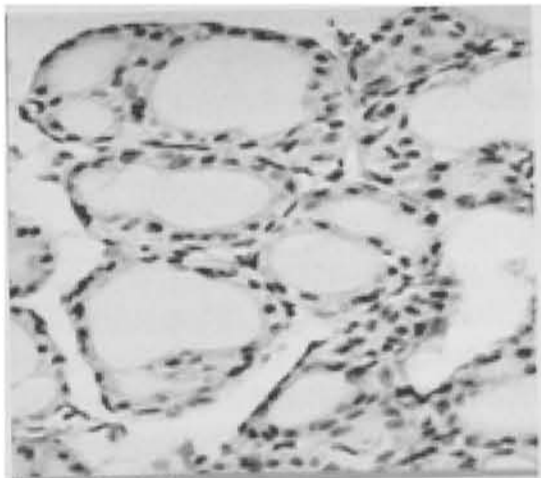


Figura 5 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-3 dias. Aumento original: 20X.

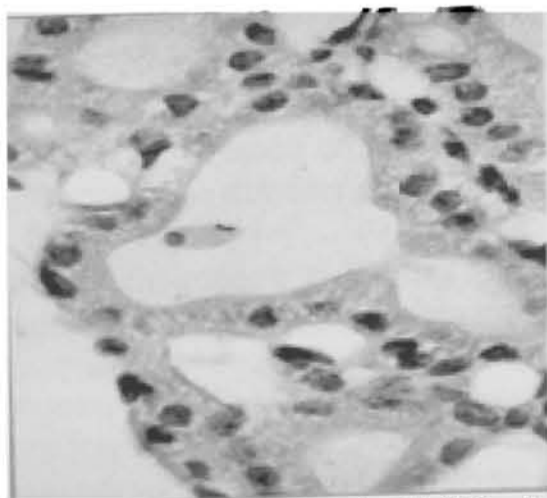


Figura 6 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-1dia. Pode-se observar fragmentos nucleares condensados no lúmen envoltos por membrana citoplasmática. Aumento original: 40X.

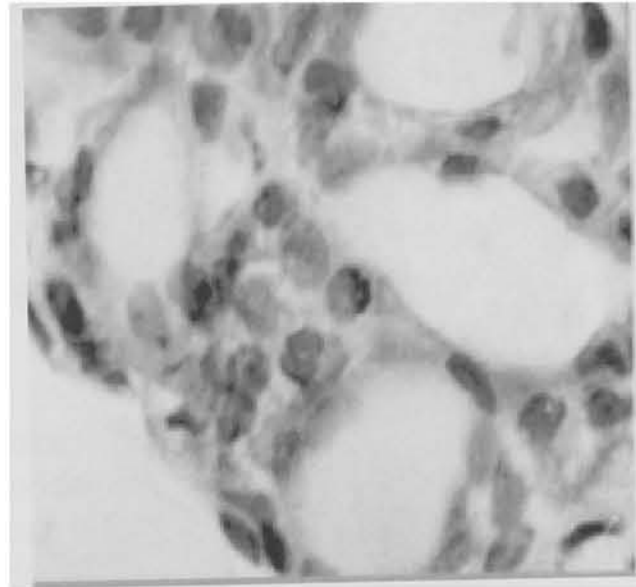


Figura 7 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-3 dias. Nesta imagem tem-se célula folicular com núcleo condensado em meia-lua característico do evento apoptótico. Aumento original: 40X.

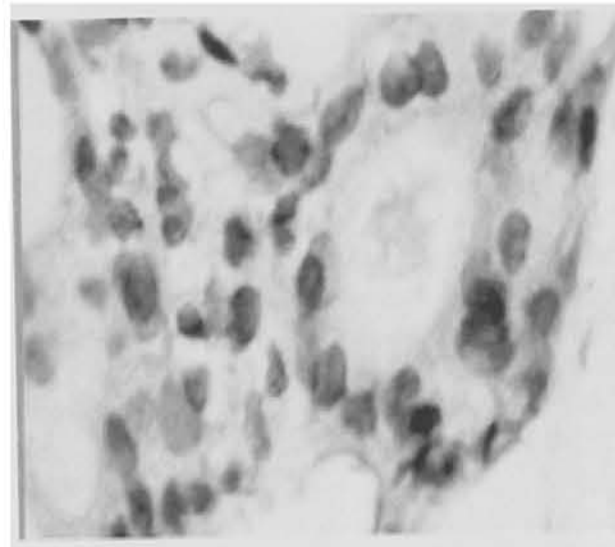


Figura 8 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo com T4-3 dias. Podemos visualizar célula folicular com condensação nuclear, evento inicial no processo apoptótico. Aumento original: 40X.

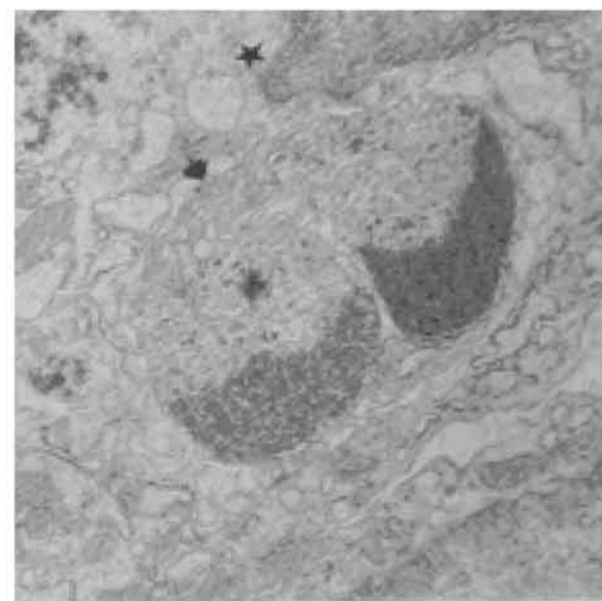


Figura 9 Elétron-micrografia de tiróide de rato do grupo T4-2 dias. Observa-se núcleo condensado em meia-lua característico do evento apoptótico. Aumento original: 9460X.

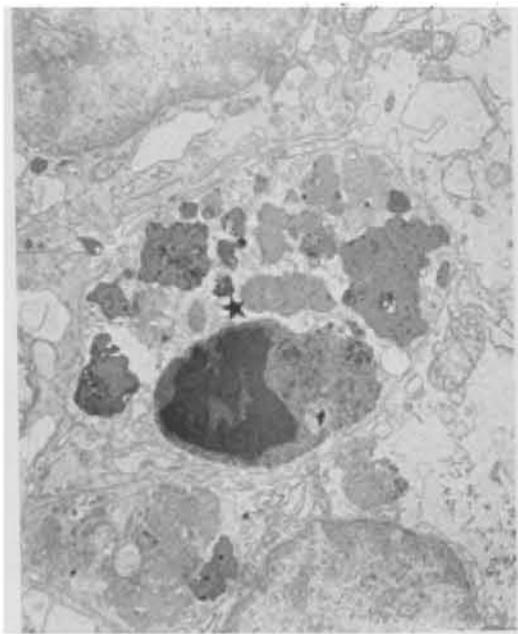


Figura 10 Elétron-micrografia de tiróide de rato do grupo T4-2 dias. Nesta foto pode-se observar um corpo apoptótico com integridade de membranas e núcleo condensado e fragmentado. Aumento original: 40X.

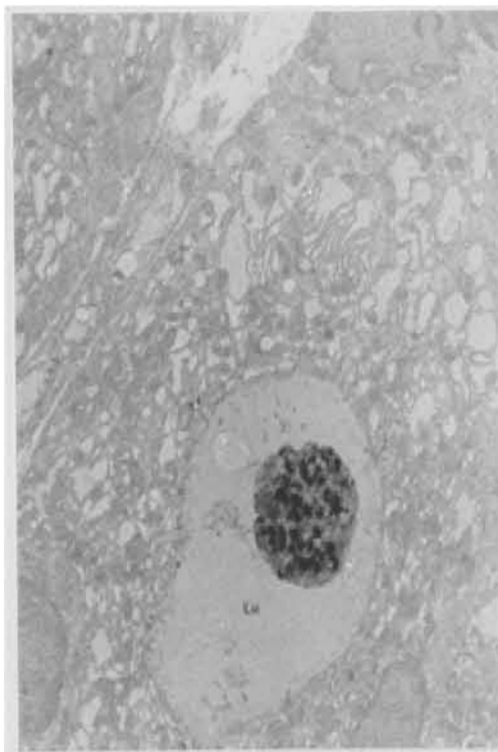


Figura 11 Elétron-micrografia de tiróide de rato do grupo T4-3 dias. Nesta imagem observa-se um aglomerado de material nuclear condensado juntamente com algumas organelas no lúmen. Aumento original: 40X.

DISCUSSÃO

A descrição inicial da apoptose tem mais de um século, porém sua implicação nos processos fisiológicos e patológicos assim como a natureza íntima deste processo de deleção celular não estão completamente esclarecidas.

Em nosso estudo um primeiro dado a ser analisado é a efetividade do modelo experimental na indução de hipotrofia tiroídiana de ratos *in vivo*. Isto pôde ser comprovado no grupo tratado com T₄ por 5

dias, embora a tendência à hipotrofia seja manifesta nos grupos T₄-1d, T₄-2d e T₄-3d. A máxima redução da massa tiroídiana que verificamos foi de 71% para o grupo T₄-5d.

A quantidade de DNA total da tiróide foi menor nos grupos T₄, em relação ao grupo MTZ, sendo significativa nos ratos do grupo T₄-5d onde a tiroxina foi utilizada por um período maior. Portanto, neste último grupo a diminuição da quantidade de material nuclear da glândula tiroide que verificamos- 36,4% é sinalizadora da ocorrência de um processo de deleção celular. Também a forte correlação constatada entre a redução do peso tiroídiano e da quantidade de DNA total da glândula, na análise das retas de regressão, sugere a ocorrência de morte celular.

Recentemente foi comunicada a caracterização da apoptose na tiróide em um modelo *in vitro* utilizando células de cachorro. O presente estudo utilizou um modelo *in vivo* mais próximo do processo biológico normal e também encontrou à microscopia eletrônica células de morfologia apoptótica com redução do volume celular, condensação do material nuclear junto à carioteca, formação de corpos com restos nucleares e citoplasmáticos (corpos apoptóticos) e manutenção do sistema de membranas, sem sinais inflamatórios (os quais caracterizariam células necróticas).

Portanto constatamos uma regressão ponderal tiroídiana em ratos vivos por deleção celular associada a características morfológicas apoptóticas na ausência de sinais inflamatórios. Estes dados indicam na direção de uma involução glandular determinada por apoptose, porém diversos outros fatores devem ser analisados conjuntamente.

Uma vez caracterizada a ocorrência de apoptose na tiróide dos ratos utilizados neste experimento devem ser consideradas três possibilidades: termos detectado um evento fisiológico, um processo induzido pelo modelo experimental ou uma associação dos dois anteriores. Acreditamos que frente à lenta renovação do tecido tiroídiano e à grande velocidade do processo apoptótico (30 a 40 min) os achados de nosso estudo não refletem apenas um processo fisiológico casual e independente do modelo experimental desenvolvido⁵⁰ Em outros tecidos com alta taxa de renovação como o epitélio intestinal a apoptose pode ser constatada sem a necessidade de indução.

Outros pontos a serem abordados são a localização e o destino das células apoptóticas. À microscopia eletrônica estas células foram visualizadas na base de folículos íntegros ou no lúmen dos mesmos. A partir destas posições podemos inferir que as células próximas ao lúmen podem estar sendo englobadas por células vizinhas e as adjacentes à base do folículo estariam sendo fagocitadas por macrófagos da corrente sanguínea. Esta última via

poderia estar facilitada no modelo animal desenvolvido pela neovascularização que foi promovida na tiróide durante a estimulação com TSH endógeno. Porém não visualizamos a fagocitose nos cortes histológicos observados.

Por fim a análise conjunta dos achados à microscopia e do conteúdo total de DNA nos grupos de ratos tratados com tiroxina permitem uma avaliação da evolução do processo apoptótico na glândula tiróide frente ao modelo experimental utilizado. Observamos a seguinte evolução: do primeiro ao terceiro dia após a supressão do TSH endógeno com tiroxina são observadas células apoptóticas, progressivo aparecimento de restos celulares e concomitante redução do DNA total da glândula. No quinto dia de supressão (grupo T₄-5d) não foram detectadas alterações morfológicas características de apoptose porém a significativa redução de 36,4% no DNA total da glândula em relação ao grupo controle traduz uma

deleção celular significativa anterior. Estes fatos são indicadores indiretos da ocorrência do processo apoptótico num tempo inferior a 5 dias no modelo experimental adotado.

CONCLUSÃO

Os autores neste estudo caracterizaram morfológicamente a apoptose na glândula tiróide em um modelo animal *in vivo* através das microscopias óptica e eletrônica, e obtiveram como prova indireta a redução do material nuclear total da glândula na ausência de necrose celular. O modelo desenvolvido para o estudo do processo apoptótico nesta glândula foi adequado e poderá eventualmente ser utilizado para confirmação dos resultados verificados e aprimorado para outros estudos relacionados ao tema⁴⁰.

Ejzenberg D, Kimura ET. Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogen thyrotrophic hormone. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):36-44.

ABSTRACT: Objective. In this study, the levels of pituitary TSH in rats were modulated by pharmacological treatment *in vivo* to evaluate the possible cell loss through apoptosis during TSH suppression of thyroid gland. **Methods.** Male Wistar rats (~220gr body weight-bw) were given methimazole (MTZ) 0.03% in drinking water for three weeks. Then the animals received thyroxine (T₄) 20mg/100g bw/day ip for one (T₄-1d), two (T₄-2d), three (T₄-3d) or five (T₄-5d) days while the control group (MTZ) was not treated with T₄. After perfusion of the rats with physiologic serum (0.09%), the thyroids were surgically dissected and weighed. DNA were quantified to verify cell loss and the DNA value measured the spectrophotometer set at A₅₉₅ was compared to the normal curve of salmon sperm DNA. **Results.** The table show the thyroid weight (T) and the DNA concentration of T₄ treatment groups and the control group (MTZ). Mean ±SD. On the morphological analysis of the tissue by optical and electron microscopy (OM, EM), the follicles of the rats treated with MTZ present high thyrocytes with closed lumens which gradual reappearance of lumens and reduction of cell height were observed in the tissue of the groups treated with T₄. In some of their lumens, particularly in those subjected to prolonged treatment, electrondense structures containing cellular residue were seen. The fragments containing intensely condensed chromatin, cell structure residue (apoptotic bodies) or even cells with chromatin condensed in a half-moon shape (apoptotic cells) sporadically appear in the basal follicular region of the T₄ groups. **Conclusion.** In the thyroids of animals treated with T₄, there is a reduction of DNA and the presence of morphological structures suggesting apoptosis. In addition with the hypoplasia of the follicular cells, the cell loss by apoptotic process could be contributing to the shrinkage in the rat thyroid gland submitted to TSH suppression.

KEYWORDS: Rats, Wistar; Evaluation studies; Apoptosis/drugs effect; Thyrotropin/analysis; Suppression; Thyroid hormones/analysis

REFERÊNCIAS

1. Arscott PL, Baker JR Jr. Apoptosis and thyroiditis. Clin Immunol Immunopathol 1998;87(3):207-17
2. Arscott PL, Knapp J, Rymaszewski M, Bartron JL, Bretz JD, Thompson NW, et al. Fas (APO-1, CD95) mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. Endocrinology 1997;138(11):5019-27
3. Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. Br J Cancer. 1997;75(4):537-41
4. Blasko I, Schmitt TL, Steiner E, Trieb K, Grubeck-Loebenstein B. Tumor necrosis factor alpha augments amyloid beta protein (25-35) induced apoptosis in human cells. Neurosci Lett 1997;238(1-2):17-20.
5. Branet F, Brousset P, Krajewski S, Schlaifer D, Selves J, Reed JC, et al. Expression of the cell

- a model for the physiological regulation of thyroid growth. *Oncogene* 1998;16(11):1455-65.
8. Di Jeso B, Ulianich L, Racioppi L, D'Armiento F, Feliciello A, Pacifico F, et al. Serum withdrawal induces apoptotic cell death in Ki-ras transformed but not in normal differentiated thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214(3):819-24.
 9. Donnini D, Zambito AM, Perrella G, Ambesi-Ampiombato FS, Curcio F. Glucose may induce cell death through a free radical-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219(2):412-7.
 10. Flemming W. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Arch Anat EntwGesch* 1885;221-44.
 11. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al. Potential involvement of fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis [see comments] *Science* 1997; 275(5302):960-3.
 12. Golstein J, Dumont JE. Cytotoxic effects of iodide on thyroid cells: difference between rat thyroid FRTL-5 cell and primary dog thyrocyte responsiveness. *J Endocrinol Invest* 1996;19(2): 19-26.
 13. Graper L. Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. *Arch Zellforsch* 1914;12:373-94.
 14. Haake AR, Cooklis M. Incomplete differentiation of fetal keratinocytes in the skin equivalent leads to the default pathway of apoptosis. *Exp Cell Res* 1997;231(1):83-95.
 15. Hall Jackson CA, Jones T, Eccles NG, Dawson TP, Bond JA, Gescher A, Wynford-Thomas D. Induction of cell death by stimulation of protein kinase C in human epithelial cells expressing a mutant ras oncogene: a potential therapeutic target. *Br J Cancer* 1998;78(5):641-51.
 16. Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG, Goode AW, Bottazzo GF, Mirakian R. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J Pathol* 1997;182(2):138-44.
 17. Kanamori A, Brown DD. The analysis of complex developmental programmes: amphibian metamorphosis. *Genes Cells* 1996;1(5):429-35.
 18. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Ishikawa N, et al. Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 1996;137(8):3163-9.
 19. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Urayama-Tahara K, et al. Modulation of Fas mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxoedema. *Clin Exp Immunol* 1997;110(3):434-9.
 20. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
 21. Kerr JFR, Winterford Clay M, Harmon Brian V. Apoptosis - Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73(8):2013-26.
 22. Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971;105:13-20.
 23. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1998;138(5):482-91.
 24. Kikuchi S, Hiraide H, Tamakuma S, Yamamoto M. Expression of wild-type p53 tumor suppressor gene and its possible involvement in the apoptosis of thyroid tumors. *Surg Today* 1997;27(3):226-33.
 25. Koga M, Hiromatsu Y, Jimi A, Inoue Y, Nonaka K. Possible involvement of Fas-mediated apoptosis in eye muscle tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 1998;8(4):311-8.
 26. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 1995;20(4):231-6.
 27. Landstrom M, Damber JE, Bergh A. Prostatic tumor regrowth after initially successful castration therapy may be related to a decreased apoptotic cell death rate. *Cancer Res* 1994;54(16):4281-4.
 28. Lazzereschi D, Mincione G, Coppa A, Ranieri A, Turco A, Baccheschi G, et al. Oncogenes and antioncogenes involved in human thyroid carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 1997;16(3):325-32.
 29. Liu R, Takayama S, Zheng Y, Froesch B, Chen GQ, Zhang X, et al. Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* 1998;273(27):16985-92.
 30. Llanos S, Caelles C, Azorin I, Renau-Piqueras J, Fernandez-Luna JL, Bosca L, et al. The c-erbAalpha protooncogene induces apoptosis in glial cells via a protein kinase C- and bcl-2-suppressible mechanism. *J Neurochem* 1998;70(6):2315-26.
 31. Ludgate M, Jasani B. Apoptosis in autoimmune and non-autoimmune thyroid disease [editorial]. *J Pathol* 1997;182(2):123-4.
 32. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis-an overview of cell feath. *Am J Pathol* 1995;146(1):3-14.
 33. Manetto V, Lorenzini R, Cordon-Cardo C, Krajewski S, Rosai J, Reed JC, et al. Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumours. An immunohistochemical and western blot analysis. *Virchows Arch* 1997;430(2):125-30.
 34. Massart C, Gibassier J, Le Gall F, Raoul ML,

- Beurtin F, Genetet B, et al. Thyroid cell survival in coculture with autologous peripheral or intrathyroidal lymphocytes. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 1995;42(4):379-87
35. McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends Cell Biol* 1994;4:370-5.
 36. Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni Balafouta S, Koutras DA, et al. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol* 1998;83(6):2199-203.
 37. Moore D, Ohene Fianko D, Garcia B, Chakrabarti S. Apoptosis in thyroid neoplasms: relationship with p53 and bcl-2 expression. *Histopathology* 1998;32(1):35-42.
 38. Muller Y, Rocchi E, Lazaro JB, Clos J. Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *Int J Dev Neurosci* 1995;13(8):871-85.
 39. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 1998;52(6):252-8.
 40. Nishihara E, Nagayama Y, Narimatsu M, Namba H, Watanabe M, Niwa M, et al. Treatment of thyroid carcinoma cells with four different suicide gene/prodrug combinations in vitro. *Anticancer Res* 1998;18(3A):1521-5.
 41. Nissen F. Über das Verhalten der Kerne in den Milchdrüsenzellen bei der Absonderung. *Ach Mikroskop Anat* 1886;26:337-42.
 42. Pekary AE, Levin SR, Johnson DG, Berg L, Hershman JM. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17(4):185-95.
 43. Reimers JI. Interleukin-1 beta induced transient diabetes mellitus in rats. A model of the initial events in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus? *Dan Med Bull* 1998;45(2):157-80.
 44. Riou C, Remy C, Rabilloud R, Rousset B, Fonlupt P. H₂O₂ induces apoptosis of pig thyrocytes in culture. *J Endocrinol* 1998;156(2):315-22.
 45. Shimaoka Y, Hidaka Y, Okumura M, Takeoka K, Tada H, Amino N. Serum concentration of soluble Fas in patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 1998;8(1):43-7
 46. Shirai M, Arishima K, Yamamoto M, Eguchi Y. Nonresponsiveness of the thyroid gland to goitrogen in the early period in the rat: Light-and Electron-Microscopic Observations. *Acta Anat* 1992;144:17-22.
 47. Shi YB. Cell-cell and cell-ECM interactions in epithelial apoptosis and cell renewal during frog intestinal development. *Cell Biochem Biophys* 1995;27(3):179-202.
 48. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(17):1286-95.
 49. Su Y, Shi Y, Shi YB. Cyclosporin A but not FK506 inhibits thyroid hormone-induced apoptosis in tadpole intestinal epithelium. *FASEB J* 1997;11(7):559-65.
 50. Tamura M, Kimura H, Koji T, Tominaga T, Ashizawa K, Kiriya T, et al. Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. *Endocrinology* 1998;139(8):3646-53.
 51. Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, Hayakawa N, Ota Z. Apoptosis in thyroid diseases: a histochemical study. *Endocr J* 1995;42(2):193-201
 52. Tata JR. Metamorphosis: an exquisite model for hormonal regulation of post-embryonic development. *Biochem Soc Symp* 1996;62:123-36.
 53. Tonner E, Barber MC, Travers MT, Logan A, Flint DJ. Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology* 1997;138(12):5101-7
 54. Wallace H, Clarke AR, Harrison DJ, Hooper ML, Bishop JO. Ganciclovir-induced ablation non-proliferating thyrocytes expressing herpesvirus thymidine kinase occurs by p53-independent apoptosis. *Oncogene* 1996;13(1):55-61.
 55. Welsh AO. Uterine cell death implantation and early placentation. *Microsc Res Tech* 1995;25:223-45.
 56. Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993;74:777-9.
 57. Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *New Engl J Med* 1995;333(1):18-25.
 58. Yamashita S. Endocrine disease and apoptosis. *Intern Med* 1998;37(2):194-6.
 59. Yang T, Namba H, Hara T, Takamura N, Nagayama Y, Fukata S, et al. p53 induced by ionizing radiation mediates DNA end-jointing activity, but not apoptosis of thyroid cells. *Oncogene* 1997;14(13):1511-9.
 60. Yazdanbakhsh K, Choi JW, Li Y, Lau LF, Choi Y. Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(2):437-41.