

**DOENÇA TIROIDEANA AUTO-IMUNE: EXPRESSÃO DE
COLÁGENO IV E LAMININA E RELAÇÃO COM ANTICORPOS
CIRCULANTES ANTIMEMBRANA BASAL.**

Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

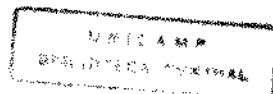
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Co-orientador: Prof. Dr. José Vassallo

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção do Título de Doutor em
Medicina (Medicina Interna).

Campinas - SP

1994



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	UNICAMP
V.	8/14
TERRAÇO	23096
PROG.	236/94
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO X	11,00
DATA	03/12/94
A.º CPU	

CM-00064279-5

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Zantut-Wittmann, Denize Engelbrecht
2178 Doença tiroideana auto-imune : expressão de colágeno IV e lamina
nina e relação com anticorpos circulantes anti-membrana basal /
Denize Engelbrecht Zantut Wittmann. -- Campinas, SP : L.E.N.J., 1994.

Orientadores : Ricardo de Lins Zollner, José Vassallo.
Tese - (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Graves. 2. Tireoidite autoimune. 3. Membrana basal.
I. Zollner, Ricardo de Lins. II. Vassallo José. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

20. CDD -614.44
-611.019 7

Índices para catálogo sistemático:

1. Doença de Graves 616.44
2. Tireoidite autoimune 616.44
3. Membrana basal 611.019 7

Dedico

**aos meus pais, Nelson e Olga
e ao Herbert, meu marido.**

Meus agradecimentos,

Ao Professor Doutor Ricardo de Lima Zollner, membro da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FCM-UNICAMP, meu orientador, pelo incentivo à pesquisa; compreensão, apoio e dedicação irrestritos.

Ao Professor Doutor José Vassallo, membro do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP, meu co-orientador, pela confiança e apoio incondicionais.

Aos colegas da Disciplina de Endocrinologia da FCM-UNICAMP pela colaboração e amizade ao longo destes anos de convivência.

Ao Dr. Luís Henrique Barbosa Boechat, pós-graduando, colega de especialidade e amigo que, através de sugestões e discussões, muito contribuiu para este trabalho.

À Professora Doutora Glauce Aparecida Pinto, co-responsável pelo Laboratório de Patologia Experimental (LAPE), pelo interesse e grande ajuda na realização dos procedimentos de imuno-histoquímica.

Ao Sr. Herbert Wittmann pelo apoio e paciência dispensados, sobretudo, nas áreas de metodologia e informática.

À Conceição Vilella, Eliene Pinheiro, Margarida Oliveira e demais funcionários e amigos do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia pelo auxílio fundamental durante o convívio diário.

Aos amigos e funcionários do Laboratório Especializado de Endocrinologia, Sandra Pereira, Márcia Pedroso e Ismair Genésio, pela significativa colaboração, inclusive nas dosagens hormonais.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Patologia Experimental, especialmente à Fernanda Oliveira, pela importante cooperação para a realização da técnica de imuno-histoquímica.

Ao Sr. Edson Tavares de Souza, funcionário do Departamento de Compras da FCM-UNICAMP, pelo empenho frente às dificuldades na aquisição de insumos essenciais à viabilização deste trabalho.

Ao Sr. Alexandre Ribeiro pelo processamento gráfico e organização das imagens do "immunoblot".

Aos pacientes do Hospital das Clínicas da UNICAMP, elementos fundamentais e razão desta pesquisa.

Este trabalho foi idealizado e realizado no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FCM-UNICAMP.

SUMÁRIO

SUMÁRIO:

	página
1- RESUMO	10
2- INTRODUÇÃO	
2.1- Aspectos Imunológicos da Doença Tiroideana Auto-imune.....	13
2.2- Membrana basal.....	20
2.3- Membrana basal do folículo tiroideano.....	24
2.4- Justificativas e Objetivos.....	29
3- CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	
3.1- CASUÍSTICA	
3.1.1- População de referência.....	32
3.1.2- Populações de estudo	
3.1.2.1- a) estudo sérico.....	32
b) estudo morfológico.....	33
3.1.2.2- População controle de características normais.....	36
3.1.3- Seleção dos pacientes	
3.1.3.1- Critérios de inclusão	
a) estudo sérico.....	37
b) estudo morfológico.....	38
3.1.3.2- Critérios de exclusão.....	40
3.2- MATERIAL E MÉTODOS	
3.2.1- Obtenção e armazenamento das amostras de soro.....	40

3.2.2- Análises sorológicas.....	41
3.2.3- Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.....	41
3.2.4- Eletroforese de transferência seguida de "immunoblotting".....	43
3.2.5- Coleta e preparo do tecido tiroideano.....	44
3.2.6- Microscopia óptica.....	45
3.2.7- Técnica de imuno-histoquímica.....	45
3.2.8- Reagentes utilizados.....	47

4- RESULTADOS

4.1- Pesquisa de anticorpos anticolágeno IV e antilaminina nos soros de pacientes com Doença Tiroideana Auto-imune.	
a) Eletroforeses de referência em gel de poliacrilamida-SDS.....	49
b) Eletroforeses de transferência seguida de "immunoblot" para detecção de anticorpos anticolágeno IV e antilaminina.....	51
4.2- Expressão de colágeno IV e laminina em Doença Tiroideana Auto-imune.....	58

5- DISCUSSÃO.....	65
--------------------------	-----------

6- CONCLUSÕES.....	80
---------------------------	-----------

7- SUMMARY.....	84
------------------------	-----------

8- ANEXO

8.1- Abreviaturas.....	87
------------------------	----

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
---	-----------

RESUMO

1- RESUMO

O trabalho teve o intuito de estudar aspectos séricos e morfológicos na relação entre a membrana basal do folículo tiroideano e doença tiroideana auto-imune, procurando elementos que possam acrescentar subsídios para o entendimento de sua fisiopatologia.

O estudo sorológico de pacientes com diversas alterações tiroideanas foi realizado através de eletroforese de transferência seguida de "immunoblot", com a finalidade de detectar anticorpos anticolágeno IV e antilaminina, dois dos elementos principais da membrana basal. Tal procedimento possibilitou a detecção de anticorpos reativos a várias frações do colágeno IV encontrados apenas na doença de Basedow-Graves. Da mesma forma, esta especificidade pôde ser verificada para os anticorpos antilaminina existentes nos soros destes pacientes, através do reconhecimento da fração reativa de 57 kDa da estrutura da laminina.

Estes anticorpos estariam envolvidos na fisiopatologia dos mecanismos auto-ímmunes da doença tiroideana e não somente com o estado hipermetabólico devido à tirotoxicose, pois não ocorreram em hipertiroidismo de origem tumoral benigna.

Assim, o estudo morfológico através de imuno-histoquímica, especificamente do colágeno IV e laminina, poderia elucidar alguns aspectos sobre a existência de anormalidades da membrana basal folicular na doença tiroideana auto-imune. Entretanto, não houve a demonstração de alterações

importantes da membrana tanto na doença de Basedow-Graves quanto na tiroidite de Hashimoto, especialmente interrupção, inclusive em áreas de intenso infiltrado linfoplasmocitário. Foram visualizados locais de adelgaçamento da membrana, sobretudo na doença de Graves, talvez frutos do hipermetabolismo, que liberaria colágeno IV e laminina para a circulação, e conseqüentemente, induziria a produção de seus respectivos anticorpos.

Desta forma, o anticorpo anticolágeno IV poderia tratar-se não apenas de reflexo do estado hipermetabólico, mas integrante do processo fisiopatológico da doença de Graves. De modo semelhante, nossos resultados sugerem que a fração de 57 kDa da laminina seja um provável marcador sorológico para a Doença de Basedow-Graves, contudo existe a necessidade da ampliação do estudo para que possamos relacioná-los ao estágio da doença.

INTRODUÇÃO

2- INTRODUÇÃO :

2.1- ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA DOENÇA TIROIDEANA AUTO-IMUNE:

Até o início da década de 70, a doença de Basedow-Graves e a tiroidite de Hashimoto eram consideradas processos distintos. FATOURECHI, MC CONAHEY, WOOLNER, em 1971, propuseram, a partir de estudos morfológicos, que ambas representassem entidade única com ampla variação de manifestações clínico-patológicas. Estes autores evidenciaram na tiróide de pacientes com doença de Graves, aspectos histológicos semelhantes aos encontrados na tiroidite de Hashimoto, como infiltração linfoplasmocitária e centros germinativos.

Considerando-se os aspectos epidemiológicos, a doença de Basedow Graves é a causa mais comum de tirotoxicose em pacientes abaixo dos 40 anos. Descrita clinicamente de forma completa por Karl Adolph VON BASEDOW (1840), compreende bócio difuso, hipertiroidismo, oftalmopatia, dermopatia infiltrativa e acropaquia, manifestações não necessariamente de aparecimento sincrônico, podendo estar associadas a outras doenças auto-imunes.

A partir dos trabalhos de ADAMS & PURVES (1957) e ADAMS (1965) foi possível identificar um agente estimulador da tiróide no soro de

pacientes com doença de Basedow-Graves em atividade que diferia do TSH, denominado "long-acting thyroid stimulator" (LATS) e presente em 40 a 50 % destes (SELLERS, AWAD, SCHEMBAUM, 1970). Em 1964, KRISS, PLESHAKOV, CHIEN (1964) caracterizaram o LATS como imunoglobulina do isotipo G (IgG), fato sugestivo de processo auto-imune. Posteriormente, SMITH & HALL (1974) demonstraram que esta IgG estimulava a tiróide via sistema adenil-ciclase de regulação celular, além de agir como anticorpo anti-receptor de TSH na membrana plasmática do tirócito (TSHR-Ab S). Teoricamente, o TSHR-Ab S poderia ser detectado em títulos elevados em 100% dos pacientes com doença de Graves ativa (BURMAN & BAKER, 1985; RAPOPORT et al., 1984; DURON et al., 1987), entretanto, mais recentemente, ILICKI, GAMSTED, KARLSSON (1992) demonstraram que cerca de 10% destes pacientes apresentam TSHR-Ab S indetectável, sugerindo que exista estímulo tiroideano direto através de mecanismos independentes do anticorpo. Em 1986, MC LACHLAN et al. afirmaram que este anticorpo era produzido principalmente na "tiróide de Graves" a partir dos linfócitos B infiltrados, apesar de existirem locais extratiroideanos de síntese, como linfonodos cervicais e medula óssea (WEETMAN et al., 1984).

No outro extremo da doença tiroideana auto-imune, encontra-se a tiroidite de HASHIMOTO, descrita pelo próprio em 1912 como "Struma lymphomatosa", doença inflamatória crônica da tiróide e uma das causas mais comuns de hipotireoidismo no adulto. ROITT et al. (1956) e DONIACH & ROITT (1957), inicialmente, identificaram um anticorpo órgão-específico antitiroglobulina no soro destes pacientes como o responsável pela destruição da glândula, fato questionado por KOFFLER & FRIEDMAN (1964), já que seus títulos não refletiam o estágio da doença. Contudo, com o reconhecimento do anticorpo antifração microssomal da célula tiroideana, classificou-se a tiroidite de

Hashimoto como doença auto-imune (ROSE & WITEBSKY, 1958; MC KAY & BURNETT, 1962; DONIACH, 1967).

ENDO, KASAGI, KONISHI (1978) demonstraram no soro de pacientes com ambas as doenças uma imunoglobulina inibidora da ligação do TSH ao seu receptor de membrana plasmática (TSHR-Ab B - anticorpo anti-receptor de TSH de ação bloqueadora), que levaria ao hipotireoidismo por ocupar o receptor e inibir a produção hormonal (NAGAYAMA & RAPOPORT, 1992).

KOSUGI et al. (1992), utilizando mutações do TSHR de ratos, localizaram os sítios de ligação dos auto-anticorpos anti-receptores de TSH na doença tiroideana auto-imune em área próxima à sua terminação carboxi do domínio extra-celular, essencial à função do receptor. Sugerem ainda que TSHR-Ab B e TSHR-Ab S ligar-se-iam a diferentes porções do receptor e a variedade de alterações fisiopatológicas na função tiroideana existente na doença tiroideana auto-imune poderia estar relacionada à interação e concentração de TSHR-Ab B e TSHR-Ab S. Na tiroidite de Hashimoto os TSHR-Ab são menos comuns que na Doença de Basedow-Graves e o mecanismo molecular pelo qual os efeitos divergentes dos TSHR-Ab são produzidos continua obscuro, podendo haver, inclusive, outros anticorpos que não os estimuladores ou inibidores (NAGAYAMA & RAPOPORT, 1992). Existem IgGs fixadoras de complemento e anticorpos contra um antígeno específico da tiróide na superfície celular, o microssomal que, acredita-se, são relevantes na destruição celular tiroideana (MC LACHLAN & RAPOPORT, 1992). Tanto o anticorpo antitiroglobulina quanto o antimicrossomal apresentam títulos elevados em 80 a 90% dos casos na tiroidite de Hashimoto; MORI & KRISS (1971) comprovaram a presença destes no soro de cerca de 50% dos pacientes com doença de Graves. MC LACHLAN & RAPOPORT (1992), durante pesquisa realizada em população de indivíduos normais, encontraram, sobretudo no sexo feminino, 10% dos casos apresentando

anticorpo antimicrossomal e sugerem que este seja um excelente indicador de processo inflamatório na glândula tiróide.

Aponta-se também a existência de imunoglobulina estimuladora do crescimento tiroideano (anticorpo estimulador do crescimento tiroideano - TGSAb) na doença de Graves e alguns bócios eutiroideanos agindo através de outra via que não da adenilciclase (DREXHAGE et al., 1980; WILDERS-TRUSCHNIG et al., 1990).

Foram identificados vários sistemas antigênicos envolvendo diferentes constituintes tiroideanos como: tiroglobulina, antígeno microssomal, segundo antígeno colóide, antígenos da superfície celular e antígenos relacionados ao receptor de TSH (PINCHERA et al., 1985). Classicamente, a tiroglobulina é o antígeno mais solúvel do colóide e o microssomal, tipicamente intra-citoplasmático, está associado às membranas do retículo endoplasmático liso (ROITT et al., 1964). Estudos subseqüentes evidenciaram que o microssomo também seria expresso na superfície da célula tiroideana, mais especificamente na borda apical microvilar e não poderia estar separado do receptor de TSH (KHOURY et al., 1981; KHOURY, BOTTAZZO, ROITT, 1984; FENZI et al., 1982; CHIOVATO et al., 1985).

A partir de frações de células de tiróide humana MARIOTTI et al., em 1979, realizaram a solubilização do antígeno microssomal permitindo, através de técnicas de imunoprecipitação e "immunoblotting", a identificação de sua estrutura química glicoprotéica, de peso molecular entre 100 e 110 kDa (KAJITA et al., 1985; BANGA et al., 1985; HAMADA et al., 1985).

CZARNOCKA et al. (1985a,b) demonstraram que a fração microssomal estaria antigenicamente relacionada à peroxidase tiroideana humana. Auto-anticorpos que reagiam com tiroperoxidase (TPO) altamente purificada foram detectados no soro de pacientes com doença tiroideana auto-imune contendo o anticorpo antimicrossomal, independentemente da presença de

anticorpos antitiroglobulina, e RUF et al., (1987) através da produção de anticorpo monoclonal, comprovaram que o antígeno "microssomal" era a peroxidase tiroideana. Este anticorpo monoclonal não reagia com tiroglobulina, mas ligava-se a preparações de TPO humana, bovina e porcina, lactoperoxidase bovina e mieloperoxidase humana sem alterar suas atividades enzimáticas.

Na tentativa de esclarecer alguns aspectos sobre a função do anticorpo antitiroperoxidase, OKAMOTO, HAMADA, SAITO (1989) demonstraram que alguns anticorpos anti-TPO bloqueavam a atividade da peroxidase tiroideana "in vitro" mas, a reação não se realizava com facilidade (OKAMOTO et al., 1991). Entretanto, quando SALLER, HORMANN, MANN (1991) avaliaram a participação direta do anticorpo anti-TPO na atividade da TPO não encontraram inibição significativa da atividade enzimática em nenhum dos soros investigados, seja de pacientes com doença tiroideana auto-imune, seja de indivíduos normais, provavelmente devido à natureza heterogênea deste anticorpo.

KAWAI et al. (1993), estudando comparativamente aspectos histológicos e séricos de pacientes com doença de Graves e títulos variáveis de TSHR-Ab S, sugeriram que aqueles em que os soros apresentavam TSHR-Ab S indetectável estavam, talvez, em um estágio precoce ou pertenciam a um sub-tipo da doença. Esta poderia iniciar-se com infiltração linfocitária, seguindo-se destruição do epitélio folicular, liberação de hormônios tiroideanos, recuperação do epitélio folicular e subsequente hiperplasia papilífera completa. Tais achados histológicos são similares aos encontrados em alguns tipos de tiroidite de Hashimoto em pacientes eutiroideanos, existindo, portanto, a possibilidade de a doença tiroideana auto-imune desenvolver-se a partir da infiltração linfocitária. As tiróides dos pacientes com TSHR-Ab S exibiram padrão histológico com hiperplasia papilífera mais acentuada, maior conteúdo de colóide e mínima infiltração linfocitária.

soro de indivíduos normais, sem correlação com os títulos de anticorpo antimicrosomal. A atividade citotóxica destes soros, localizada na fração IgG não seria, portanto, mediada pelo anticorpo anti-TPO e sim por fatores ainda não identificados.

Através de método radiométrico, CHIOVATTO et al. (1993) puderam detectar e quantificar anticorpos citotóxicos tiróide-específico mediados por complemento, além de observar seus efeitos em cultura de tiróide humana, avaliando a porcentagem de lise celular específica. Este índice foi maior e mais prevalente em pacientes com tiroidite de Hashimoto com bócio e em estado de hipotiroidismo, sugerindo que estes anticorpos estavam implicados na destruição da glândula e levando a crer que a tiroidite sem bócio seria o estágio final da destruição auto-imune, resultando na menor disponibilidade dos antígenos tiroideanos. No entanto, como um terço dos pacientes com tiroidite de Hashimoto eutiroideanos apresentou tais anticorpos, sua presença não implicaria, necessariamente, em destruição tecidual progressiva. Estes anticorpos não seriam os responsáveis pelo dano inicial da glândula, muito embora possam contribuir para a destruição tiroideana logo que a estrutura folicular normal for rompida por outros mecanismos. Na tentativa de identificá-los, diante da falta de relação com títulos de anticorpos anti-TPO, surge a hipótese de que outros antígenos tiroideanos seriam o alvo dos anticorpos citotóxicos.

Existe a possibilidade de o processo auto-imune patológico na doença tiroideana iniciar-se com a quebra da integridade morfológica do folículo tiroideano, conseqüente extravasamento de tiroglobulina e formação do anticorpo anti-tiroglobulina (ROITT, CAMPBELL, DONIACH, 1958), pois a membrana basal e as junções firmes das células foliculares protegem a tiroglobulina do sistema imunológico (KALDERON, BOGAARS, DIAMOND, 1973),

No entanto, os fatores responsáveis e a comprovação destas alterações não estão devidamente estabelecidos e o comprometimento

imunológico da membrana basal folicular nas doenças tiroideanas auto-ímmunes ainda permanece pouco elucidado.

2.2- MEMBRANA BASAL:

O organismo é formado por 2 tipos de componentes: parênquima e tecido conjuntivo. O parênquima geralmente consiste de tecidos em que as células são adjacentes umas às outras e o tecido conjuntivo compõe-se de células distribuídas entre fibras de vários tipos, como as frouxas e as densas (COPENHAVER, BUNGE, BUNGE, 1971). Entre parênquima e tecido conjuntivo existem camadas finas referidas como membranas basais. Teoricamente, o organismo possui uma única e imensa membrana basal separando todo o parênquima do tecido conjuntivo, exceto onde há interrupção, como no epitélio intestinal, ou ausência, como no fígado (MC CLUGAGE, LOW, ZIMNY, 1986).

TODD & BOWMANN (1857) descreveram-na pela primeira vez como membrana simples, fina, vítrea, localizada na base do epitélio. Dentre os métodos tintoriais, a descoberta do ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos ricos em grupos 1,2 glicol foi um passo importante para melhor evidenciar as membranas basais (HOTCHKISS, 1948). Sua caracterização bioquímica sofreu, inicialmente, inúmeros contratemplos devido à natureza insolúvel e quantidade limitada (TIMPL & MARTIN, 1982). O emprego de procedimentos de cultura de células, especialmente do tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo, veio facilitar o estudo de componentes da

membrana basal, sobretudo através da extração de seus componentes colágeno IV e laminina (TIMPL et al., 1979). Este tumor, originário de grupos celulares que circundam a matriz extracelular, apresenta propriedades bioquímicas semelhantes às da membrana basal (ORKIN et al., 1977).

As membranas basais são estruturas heterogêneas, altamente especializadas, elétron-densas, constituídas por proteínas de matriz extracelular de 20 a 200 nm de largura. Promovem a ancoragem de células adjacentes e estímulos para a diferenciação, migração e fenótipo celular, o que lhes confere papel importante no desenvolvimento embrionário e reparo tecidual. Responsáveis pela compartimentalização e manutenção da arquitetura tecidual, servem também como barreiras para a filtração de macromoléculas. Seus componentes, normalmente produzidos e depositados pelas células adjacentes, permanecem ancorados à matriz extracelular através de interações com receptores celulares específicos (MARTINEZ-HERNANDES & AMENTA, 1983; TIMPL, 1989; BOSMANN et al., 1989). Compostas por glicoproteínas colágenas e não colágenas de 0.05 um de espessura, são visíveis à microscopia óptica quando utilizada coloração para detecção de carboidratos (LEBLOND, GLEGG, EIDINGER, 1957; TIMPL & MARTIN, 1982; MARTIN & TIMPL, 1987).

A membrana basal visualizada à microscopia eletrônica apresenta 3 camadas associadas: lâmina lúcida ou rara, lâmina densa e "pars fibroreticularis" (LEBLOND & LAURIE, 1986).

Segundo INOUE & LEBLOND (1988), a lâmina lúcida situada em contacto com a membrana plasmática das células é reluzente, fina (15 a 65 nm) e atravessada por filamentos. Justaposta a ela, a lâmina densa, elétron-densa, geralmente com espessura uniforme (15 a 125 nm), é a camada mais proeminente e sua ausência implica em falta de membrana basal. A "pars fibroreticularis" é a zona de transição entre lâmina densa e tecido conjuntivo, consistindo em estruturas semelhantes a fibras reticulares, microfibrilas e fibrilas ancoradoras.

Na sua estrutura distinguimos os seguintes elementos principais: colágeno tipo IV, laminina, nidogênio ou entactina, heparan sulfato de proteoglicano e fibronectina (TIMPL & MARTIN, 1982; YURCHENCO & SCHITTONY, 1990).

O COLÁGENO IV é um componente característico das membranas basais. Seus monômeros têm forma de um triplo bastão helicoidal com 390 nm de comprimento, com cadeia carboxi-terminal (C-terminal) constituída por domínio globular não colágeno (NC-1), e cadeia amino-terminal (N-terminal) encontrando-se no domínio 7S (BABEL & GEANVIELE, 1984). Assim, na cadeia C-terminal, cada molécula contém um glóbulo, podendo fundir-se com o glóbulo de outra molécula, enquanto na N-terminal cada molécula pode ligar-se a 3 outras moléculas levando ao chamado colágeno 7S (INOUE, 1989). Uma de suas principais funções é a formação de estruturas de sustentação construídas através de conjuntos de monômeros de colágeno IV gerando grandes agregados supra-moleculares. A caracterização estrutural inicial das moléculas de colágeno IV sugeriu que, em conjunto, formavam uma rede ilimitada devido à distribuição alternativa dos domínios 7S e NC-1, entre os quais ocorria ligação cruzada. (TIMPL et al., 1981). Estudos posteriores mostraram que a rede de colágeno IV era bem mais complexa, incluindo interações laterais ao longo da hélice tripla e ligação adicional dos demais segmentos NC-1 aos domínios da hélice tripla (YURCHENCO & FURTHMAYR, 1984; TSILIBARY & CHARONIS, 1986), podendo formar-se uma rede irregular "in situ" como demonstrado através de microscopia eletrônica por YURCHENCO & RUBEN (1987). O colágeno IV possui, também, a capacidade de ligar-se a laminina, proteoglicano, nidogênio e às próprias células (TIMPL, 1989).

A LAMININA é o componente não colágeno mais abundante da membrana basal, apresentando estrutura única em forma de cruz com distintas propriedades de ligação celular (TIMPL et al., 1979; ENGEL et al., 1981).

Isolada do tumor EHS, com peso molecular de 900 kDa, compõe-se de 3 cadeias polipeptídicas: A (400 kDa), B1 e B2 (220 kDa) ligadas entre si por pontes dissulfídicas, havendo 3 braços curtos (37 nm) e 1 braço longo (77 nm), com domínios terminais globulares. Durante a embriogênese parece ser a primeira proteína da matriz extra-celular (BECK, HUNTER, ENGEL, 1990), sendo capaz de polimerizar-se "in vitro", através de interações entre os domínios globulares terminais na presença de cálcio (BECK et al., 1990). Liga-se ao colágeno IV "in vitro", efetivamente, na presença de nidogênio (AUMAILLEY et al., 1989) e apresenta potencial de ligação com o heparan sulfato de proteoglicano no segmento C-terminal da cadeia A (EDGAR, TIMPL, THOENEM, 1984). Suas principais funções envolvem a capacidade para interagir com células e modular o comportamento celular, no que diz respeito à adesão, polarização, propagação, migração, diferenciação celular e estimulação neuronal (DEUTZMANN et al., 1990). Possui atividade promotora do crescimento, muitas vezes comparável à atividade do EGF (fator de crescimento epidérmico) através de seu fragmento E1 (PANAYOTOU et al., 1989). Existe ainda um processo de ligação das células à laminina mediado por receptores de integrina, que inclui interações com fosfolipídeos e heparan sulfato (SONNENBERG et al., 1990).

ENTACTINA (CARLIN et al., 1981) e **NIDOGÊNIO** (TIMPL et al., 1983) são nomes diferentes para a mesma molécula (DURKIN et al., 1988; MANN et al., 1989). Dotada de grande capacidade de ligação celular, apresenta papel importante na síntese da membrana e remodelação tecidual, na embriogênese, cicatrização e tumores metastáticos (WEBER, 1992).

O HEPARAN SULFATO DE PROTEOGLICANO caracteriza-se por um núcleo protéico ligado de forma covalente às cadeias heparan sulfato, conferindo à membrana basal propriedades de filtração seletiva dependente de carga (FARQUAHR, 1981). Existe como molécula de alta densidade (130 kDa) (FUJIWARA et al., 1984), com distribuição e papel fisiológico desconhecidos e

de baixa densidade, ligada firmemente à membrana basal do EHS e presente em várias membranas basais (PAULSSON et al., 1987b; YURCHENCO & SCHITTNY, 1990).

A **FIBRONECTINA**, componente plasmático (300 ug/ml) e também a maior glicoproteína do tecido conjuntivo, com peso molecular de 450.000 kDa (HYNES & YAMADA, 1982), foi incorporada, recentemente, como representante próprio da membrana basal (YURCHENCO & SCHITTNY, 1990). Os 2 tipos, plasmática e celular, são muito semelhantes em estrutura e propriedades, sendo o hepatócito a principal fonte da plasmática (VOSS et al., 1979). Sua função primordial está na adesão e propagação celular a substratos sólidos, como, por exemplo, plástico, colágeno, gelatina e fibrina (KLEIMAN, KLEBE, MARTIN, 1981), além da organização do citoesqueleto, transformação oncogênica, migração celular, hemostasia e trombose, diferenciação embrionária (HYNES & YAMADA, 1982).

2.3- MEMBRANA BASAL DO FOLÍCULO TIROIDEANO:

Particularmente, a membrana basal folicular tiroideana (MBF) localiza-se sob o epitélio folicular, com 30 a 50 nm de espessura, separada da membrana plasmática epitelial por uma zona menos densa de 15 a 50 nm de espessura (KLINCK, OERTEL, WINSHIP, 1970). A MBF envolve, de forma contínua, todos os folículos seguindo o contorno epitelial, desempenhando papel importante na prevenção do extravasamento de tiroglobulina para o espaço perifolicular (PFALTZ & HEDINGER, 1986).

Alterações da membrana basal relacionam-se a inúmeras doenças metabólicas, infecciosas, neoplásicas e auto-imunes existindo exaustivas pesquisas para a elucidação de seus mecanismos fisiopatológicos (MARTINEZ-HERNANDES & AMENTA, 1983).

Apenas com o aparecimento de técnicas de coloração mais sensíveis e específicas, tornou-se óbvia a existência da membrana basal folicular, despertando o interesse quanto a sua importância na patogênese da doença tiroideana auto-imune. SOMMERS & MEISSNER (1954) analisaram a membrana basal em tiroidite crônica, bócio multinodular, adenoma folicular, carcinoma papilífero e em tiróide normal, pelo método de MC MANUS & MOWRY (1952) e coloração pela prata (MALLORY, 1938) encontrando, apenas na tiroidite crônica, descontinuidade da membrana basal e importantes alterações difusas degenerativas, sobretudo acompanhando infiltração linfocitária. Tais evidências morfológicas seriam importantes na patogênese da tiroidite crônica quanto à falência na manutenção da continuidade estrutural da membrana basal tiroideana.

STUART & ALLAN (1958) sugeriram haver relação entre alterações da membrana basal folicular e a presença dos anticorpos "antitiróide". Esta irregularidade da membrana levaria ao escape de tiroglobulina do colóide para o tecido intersticial com subsequente reação inflamatória, tornando estas alterações de membrana basal a base da formação dos anticorpos anti-tiróide. Posteriormente, em trabalhos sobre ultra-estrutura, observaram-se, à microscopia eletrônica, depósitos elétron-densos na membrana basal de alguns folículos de tiroidite de Hashimoto, geralmente associados à presença de plasmócitos (KALDERON et al., 1973). Comparando-se tiroidite de Hashimoto, doença de Graves e bócio nodular constatou-se, à microscopia eletrônica, a existência de depósitos de imunocomplexos. Tais estruturas, ainda não muito bem elucidadas,

foram verificadas nos pacientes com tiroidite e doença de Graves e não naqueles com bócio nodular (PFALTZ & HEDINGER, 1986).

CHARPIN et al. (1985), estudando ultra-estruturalmente a distribuição de laminina na membrana basal de tiróide humana normal através de imuno-histoquímica, evidenciaram-na como uma linha escura osmiofílica, claramente separada da membrana plasmática pela lâmina lúcida, fato sugestivo de sua localização na lâmina densa. Esta expressão ocorreu de forma semelhante na membrana basal de tiróide normal, na doença de Graves e adenoma folicular; entretanto, notaram sua diminuição em carcinoma folicular pouco diferenciado. Provavelmente existam fatores implicados nestas alterações como: síntese diminuída da laminina, associação defeituosa com outros componentes de membrana basal ou envolvimento de proteases derivadas das células tumorais na lise da membrana. Contudo, a perda de membrana basal não significa processo maligno e sua presença não significa benignidade. Dados semelhantes haviam sido encontrados por MIETTINEN & VIRTANEN (1984) estudando laminina e colágeno IV através de imuno-histoquímica. Outros autores constataram ausência destes componentes em tumores francamente invasivos e a preservação da membrana basal na quase totalidade dos casos de tumores encapsulados (KENDALL et al., 1985).

Estudo de colágeno IV, laminina e heparan sulfato de proteoglicano dos diversos processos patológicos tiroideanos foi realizado por KATOH et al. (1993), demonstrando distribuição irregular e interrupção da membrana basal em áreas de invasão em carcinoma papilífero, chegando à completa ausência em algumas áreas. O carcinoma anaplásico mostrou escassez ou perda total da membrana basal epitelial. Em tiróide normal e de doença de Basedow-Graves mostrou-se como linha contínua, ao contrário de tiroidite de Hashimoto, em que existiram interrupções da membrana, sobretudo em áreas de infiltrado linfocitário ou fibrose.

Foi observada uma relação entre aumento de níveis séricos de colágeno IV e de hormônios tiroideanos, provavelmente devido ao estado hipermetabólico, podendo este ser considerado como marcador do estado de hipertiroidismo (INUI et al., 1992; SHIMA et al., 1992; SENDA et al., 1993). Existem na Síndrome de Goodpasture e em alguns tipos de glomerulonefrites, anticorpos anti-colágeno IV, especialmente contra frações dos domínios NC-1 e 7S (KEFALIDES et al., 1993)

Dentre os processos patológicos em que podem existir níveis séricos elevados de laminina destacam-se: doença hepática crônica ativa (GRESSNER, TITTOR, KROPF, 1988), artrite reumatóide, tumores e diabetes. KROPF, GRESSNER, JOSEPH (1989) demonstraram níveis elevados de laminina em soro de pacientes hipertiroideos, não correlacionados aos níveis de hormônios tiroideanos, provavelmente devendo-se à ativação geral inespecífica do metabolismo celular.

Por sua vez, BERNARD et al. (1986) encontraram anticorpos antilaminina em 15% de indivíduos normais. Em pacientes com tripanossomíase (TOWBIN et al., 1987), intoxicação por metais pesados (BERNARD et al., 1987), glomerulonefrite pós-estreptocócica (KEFALIDES et al., 1986), e lúpus eritematoso sistêmico também são demonstrados anticorpos antilaminina de maneira independente dos níveis séricos de laminina. A presença dos auto-anticorpos, juntamente com os antígenos, estaria implicada na formação de imunocomplexos patológicos (SCHECHTER & LOPES, 1990).

A interação dos elementos da membrana basal entre si está alterada nas doenças neoplásicas, pois as células tumorais podem sintetizar, provocar lise ou induzir a produção de matriz extracelular pelas células padrão (LIOTTA, 1984). Os processos de adesão e destruição da membrana basal são considerados como etapas necessárias para as células oncogênicas extravasarem e formarem metástase (LIOTTA, RAO, WEWER, 1986). Estudos demonstram receptores de

laminina em células neoplásicas (TERRANOVA et al., 1983), macrófagos (HUARD, MALINOFF, WICHA, 1986), linfócitos granulócitos (BRYANT et al., 1987) e bactérias patogênicas (SWITALSKI et al., 1984; LOPES, REIS, BRENTANI, 1985). Portanto, os níveis plasmáticos de laminina poderiam servir de marcadores de alterações de membrana basal em tumores invasivos e doenças inflamatórias, havendo a possibilidade de este material liberado induzir resposta imunológica através da quebra dos mecanismos de tolerância dos antígenos reconhecidos como próprios e levar à produção de auto-anticorpos (SCHECHTER & LOPES, 1990).

Estas observações abririam novos horizontes à pesquisa das doenças auto-imunes. A possível associação entre a ocorrência de anticorpos antimembrana basal e fatores genéticos ou ambientais poderia contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no aparecimento e na imunopatogênese destes auto-anticorpos em humanos (BERNARD et al., 1986).

Até o presente, não encontramos estudos verificando a existência de anticorpos anticolágeno IV ou antilaminina em processos tiroideanos auto-imunes, nem as características morfológicas detalhadas relacionando membrana basal e doença tiroideana auto-imune.

2.4- JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS:

A tiroperoxidase e a tiroglobulina são componentes do folículo tiroideano que podem ser expressos na superfície da célula em doença tiroideana auto-imune. A membrana basal, como componente normal da estrutura folicular, tem merecido atenção quanto à sua provável participação nos processos inflamatórios da tiróide.

A possível relação entre alterações de membrana basal e presença dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina na tiroidite crônica vem sendo aventada desde a década de 50 (STUART & ALLAN, 1958). Os autores lançaram a hipótese de haver escape de colóide para o interstício através da irregularidade da membrana basal folicular, com conseqüente reação inflamatória e formação destes anticorpos.

Além disto, as considerações realizadas por KAWAI et al. (1993) sobre a cronologia do processo fisiopatológico na doença tiroideana auto-imune sugerem que o início desta seria através de infiltração linfocitária intratiroideana, destruição dos folículos, liberação de hormônios tiroideanos, recuperação do epitélio folicular e, finalmente, hiperplasia papilífera completa e levam-nos a reforçar a hipótese de um possível engajamento dos componentes de membrana basal na etiopatogenia da doença tiroideana auto-imune. Dessa forma, temos como objetivos:

- Identificar anticorpos anticolágeno IV e antilaminina em soro de pacientes com doença tiroideana auto-imune.
- Estudar e caracterizar a expressão de colágeno IV e laminina em tecido tiroideano normal e doença tiroideana auto-imune.

Acreditamos que os objetivos delineados neste trabalho venham acenar com novas perspectivas que poderão contribuir para o entendimento da imunopatologia da doença tiroideana auto-imune.

**CASUÍSTICA,
MATERIAL E MÉTODOS**

3- CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS:

3.1- CASUÍSTICA:

3.1.1- POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA:

A população de referência constituiu-se de pacientes atendidos nos Ambulatórios de Doença Tiroideana Auto-imune e de Doença Nodular Tiroideana da Disciplina de Endocrinologia, ou operados nas Disciplinas de Cirurgia Torácica ou Cabeça e Pescoço da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3.1.2- POPULAÇÕES DE ESTUDO:

3.1.2.1- a) Estudo sérico:

A população para o estudo sérico constou de 36 pacientes na faixa etária entre 5 e 64 anos, sendo 31 do sexo feminino e 5 do sexo masculino, portadores de doenças tiroideanas discriminadas como se segue:

- 11 pacientes com Doença de Basedow Graves, de 15 a 53 anos (média de 33.9 anos), sendo 10 mulheres e 1 homem;
- 11 pacientes com Tiroidite de Hashimoto, de 14 a 64 anos (média de 37.6 anos), sendo 8 mulheres e 3 homens;
- 5 pacientes com hipertiroidismo de etiologia não auto-imune, sendo 4 adenomas tóxicos e um bócio multinodular tóxico, de 45 a 63 anos (média de 55 anos), todos do sexo feminino;
- 5 pacientes com hipotiroidismo não auto-imune, 3 por defeito de síntese hormonal, 1 por hemi-agenesia de tiróide e 1 por agenesia de tiróide, de 2 m a 18 a (média de 10.2 anos); destes, 4 são do sexo feminino e 1 do sexo masculino;
- 4 pacientes com patologia tiroideana não auto-imune, eutiroideanos, apresentando bócio multinodular atóxico, de 28 a 60 anos (média de 44.7 anos), todas mulheres.

b) Estudo morfológico:

A população do estudo histopatológico foi de 30 pacientes com tiroidopatia, na faixa etária de 14 a 64 anos, 24 mulheres e 6 homens, distribuindo-se do seguinte modo:

- 11 pacientes com Doença de Basedow Graves, 14 a 32 anos (média de 24.2 anos), sendo 9 do sexo feminino e 2 do masculino;
- 7 pacientes com Tiroidite de Hashimoto, 37 a 64 anos (média de 49.8 anos), sendo 6 do sexo feminino e 1 do masculino;
- 3 pacientes com hipertiroidismo de etiologia não auto-imune, todos com adenoma tóxico, 42 a 49 anos (média de 45.3 anos), sendo 2 mulheres e 1 homem;

- 9 pacientes com doença tiroideana sem alteração funcional, todos com bócio multinodular atóxico, 37 a 62 anos (média de 48.4 anos), sendo 7 do sexo feminino e 2 do masculino.

Os critérios diagnósticos basearam-se em informações clínicas, laboratoriais e histológicas. Os exames histopatológicos foram analisados em coloração pela hematoxilina e eosina.

O diagnóstico clínico da DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES fundamentou-se nos achados de tirototoxicose, bócio difuso e aspectos infiltrativos, como oftalmopatia, dermopatia e acropaquia. A confirmação laboratorial da tirototoxicose realizou-se através de dosagens séricas elevadas de tiroxina livre (T4L) e de tirotrófina ultra-sensível (TSH-us) diminuídas e a sugestão da origem auto-imune através da verificação dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina (WOEBER, 1986). Consideramos os pacientes antes do início do tratamento, em atividade de doença, como portadores de TSHR-Ab S. O exame anátomo-patológico baseou-se na verificação de hipertrofia e hiperplasia celulares, e áreas de infiltrado linfocitário (OERTEL & LI VOLSI, 1986).

Os pacientes com TIROIDITE DE HASHIMOTO foram identificados através das manifestações clínicas de hipotiroidismo, com ou sem bócio, sendo este geralmente de pequenas dimensões, quando presente. O esclarecimento sobre a origem primária da tiroidopatia foi realizado por dosagens de T4L diminuído e TSH-us elevado, avaliando-se o componente auto-imune através dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina (VOLPÉ, 1986). Os aspectos histológicos da Tiroidite de Hashimoto são semelhantes aos da Doença de Basedow-Graves, diferindo quanto à presença de folículos tiroideanos

atróficos, geralmente envolvidos por infiltrado de linfócitos (OERTEL & LI VOLSI, 1986).

Os pacientes com ADENOMA TÓXICO ou nódulo tireoideano autônomo funcionante poderiam apresentar-se em eutiroidismo ou tirotoxicose. A cintilografia com I131 identificou maior captação do isótopo pelo nódulo em relação ao restante da glândula, havendo a comprovação da função autônoma através da ausência de supressão do nódulo após administração oral de triiodotironina (T3) durante 10 dias, e/ou aumento da captação pelo tecido tireoideano extranodular após injeção intramuscular de TSH. Foram avaliados os níveis de T4L e TSH-us confirmando a tirotoxicose e os anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina analisados para afastar coincidência com doença tireoideana auto-imune. O diagnóstico histológico baseou-se no encontro de nódulo solitário, encapsulado, de arquitetura interna com folículos de tamanho uniforme e o restante da glândula composto de tecido normal suprimido ou com micronódulos (MC CONAHEY, 1986).

A hipótese diagnóstica de BÓCIO MULTINODULAR ATÓXICO realizou-se através do aumento nodular da glândula tireóide à palpação e eutiroidismo clínico e a confirmação com exame ultra-sonográfico da tireóide e dosagens de T4L e TSH-us. Os anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina foram colhidos para afastar doença auto-imune (STUDER & GEBEL, 1986). Ao exame anátomo-patológico havia nódulos com cápsula pouco evidente, arquitetura variada, diâmetro de 1mm a 10-12 cm, e folículos de tamanho variado (OERTEL & LI VOLSI, 1986).

As populações dos estudos sérico e morfológico não puderam ser as mesmas, devido ao número restrito de pacientes com indicação de tireoidectomia

em Doença de Basedow Graves, adenoma tóxico e bócio multinodular atóxico e por não haver, praticamente, indicação de tireoidectomia para Tireoidite de Hashimoto ou tireóide normal. Tais fatos tornariam extremamente longo o tempo de observação dos pacientes, dificultando o processo de seleção. Entretanto, procuramos abranger as diversas situações existentes nestas doenças no tocante à função tiroideana e presença dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina.

3.1.2.2- POPULAÇÃO CONTROLE COM CARACTERÍSTICAS NORMAIS:

a) Soros de 10 indivíduos-controle normais obtidos de doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Unicamp, sem evidências de infecções ou antecedentes de outros processos patológicos, foram pareados quanto ao sexo e faixa etária da população de estudo. Para o controle de soro reativo ao colágeno IV, utilizamos soro de coelho com anticorpo policlonal monoespecífico anticolágeno IV, produzido e testado no Laboratório de Imunologia Clínica da FCM-UNICAMP. O controle positivo de reação à laminina realizou-se com anticorpo antilaminina originário de camundongo, produzido e gentilmente cedido pelo Instituto Pasteur, Paris, França.

b) Foram obtidas 10 amostras de tecido tiroideano normal ao exame anátomo-patológico, havendo 7 de indivíduos que sofreram laringectomia e 3 com tireoidectomia por carcinoma papilífero. Seis eram do sexo masculino e 4 do sexo feminino, de 38 a 62 anos (média de 52 anos). Todos se encontravam em

eutiroidismo clínico e os pacientes com carcinoma papilífero obtiveram a adequada confirmação laboratorial.

3.1.3- SELEÇÃO DOS PACIENTES:

3.1.3.1- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

a) Estudo sérico:

Os pacientes com DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES estavam clínica e laboratorialmente em tirotoxicose ou eutiroidismo decorrente de tratamento com drogas antitiroideanas e apresentavam dados quanto aos níveis de anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina. Dos pacientes estudados, 8 estavam em tirotoxicose, momento prévio ao tratamento e 3, usando medicação antitiroideana, em eutiroidismo. Quatro apresentavam somente o anticorpo antimicrosomal em títulos elevados; em 4, ambos os anticorpos eram positivos e em 3, ambos negativos.

Os pacientes com TIROIDITE DE HASHIMOTO estavam em hipo ou eutiroidismo devido à reposição oral de tiroxina, além de constar dosagem de anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina. Destes, 7 não haviam sido tratados, estando, portanto, em hipotiroidismo e 4 em eutiroidismo, devido à reposição hormonal. Três pacientes apresentavam apenas o anticorpo antimicrosomal em títulos elevados, 2 somente o antitiroglobulina, 5 apresentavam ambos positivos e um paciente mostrava-os dentro da normalidade.

Para pacientes com ADENOMA TÓXICO os critérios eram semelhantes aos da Doença de Basedow-Graves. Três pacientes estavam sem terapêutica com antitiroideanos e 2 aguardavam o tratamento ablativo em eutiroidismo, às custas da medicação. Os pacientes não apresentaram anticorpos antimicrosomal ou antitiroglobulina em títulos acima do normal.

Os portadores de HIPOTIROIDISMO NÃO AUTO-IMUNE seguiram os critérios de Tiroidite de Hashimoto. Em todos os pacientes o soro foi colhido antes do início do tratamento, portanto em hipotiroidismo e em nenhum detectaram-se os anticorpos antimicrosomal ou antitiroglobulina em títulos elevados.

b) Estudo morfológico:

Para a avaliação da tiróide em condições ideais na DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES seria preferível que os pacientes estivessem em atividade de doença e sem tratamento algum; no entanto, nesta situação, praticamente, não há indicações cirúrgicas, devido ao maior risco existente no estado de tirotoxicose. Além disso, geralmente propõe-se, de início, a administração de drogas antitiroideanas e, portanto, a cirurgia como primeira opção de tratamento, fere a própria ética médica. Partindo-se desta premissa, incluímos no estudo pacientes com indicação cirúrgica habitual: em eutiroidismo ou tirotoxicose leve, usando drogas anti-tiroideanas ou medicações que diminuam os níveis de tiroxina circulante. A cirurgia foi motivada por não adesão do paciente ao tratamento clínico, processos alérgicos ou tóxicos reacionais às drogas antitiroideanas. Foram submetidos à detecção dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina.

Sete pacientes estudados estavam em uso de drogas antitiroideanas, metimazol ou propiltiouracil e 4 utilizavam propranolol ou carbonato de lítio. Todos estavam eutiroides ou em discreta tirotoxicose clínica e laboratorial. Em 7 deles somente o anticorpo anti-microsomal era positivo e em 4 ambos o eram.

Os pacientes com TIROIDITE DE HASHIMOTO selecionados deveriam preencher os critérios histopatológicos, não importando se funcionalmente estivessem em hipo ou eutiroidismo, pois praticamente inexiste indicação cirúrgica para tais pacientes, excetuando-se as raras situações associadas de carcinoma ou nódulo suspeito. A avaliação dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina era necessária, mas sua ausência não excluía o paciente. Em nossa casuística, 6 pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de Tireoidite de Hashimoto sofreram tireoidectomia por bócio nodular benigno que estivera sob suspeição e em um paciente esta acompanhou laringectomia. Todos, exceto um paciente em hipotireoidismo, encontravam-se em eutiroidismo clínico. Na paciente laringectomizada não foi possível realizar as dosagens laboratoriais precedendo a cirurgia, ao contrário dos 6 restantes. Dois pacientes apresentavam somente o anticorpo antimicrosomal em títulos elevados; em 3 deles ambos os anticorpos eram positivos e em um paciente eram negativos.

Os critérios para inclusão dos pacientes com ADENOMA TÓXICO eram similares aos da Doença de Basedow-Graves. A realização da cirurgia com o paciente em franca tirotoxicose não ocorreu por motivos semelhantes aos dos outros pacientes com hipertireoidismo. Em relação a medicamentos, estavam usando metimazol ou propiltiouracil e em eutiroidismo clínico e laboratorial. Nenhum deles apresentava os anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina em níveis anormais.

A aceitação dos pacientes com BÓCIO MULTINODULAR ATÓXICO baseou-se nos exames clínico e ultra-sonográfico da tiróide. Os 9 pacientes estudados obtiveram indicação cirúrgica devido a sinais e sintomas de compressão local ou motivos estéticos. Todos eram eutiroideanos clínica e laboratorialmente e não apresentavam títulos anormais dos anticorpos antimicrosomal e anti-tiroglobulina.

3.1.3.2- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Eram excluídos os pacientes com associação de outras doenças auto-ímmunes, degenerativas e infecciosas, além de desnutrição, alcoolismo e deficiências imunológicas.

Os pacientes com adenoma tóxico e bócio multinodular atóxico que apresentaram anticorpos séricos antimicrosomal ou antitiroglobulina foram excluídos dos respectivos grupos.

3.2- MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1- OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SORO:

As amostras de sangue foram coletadas por veno-punção, sem anticoagulante e os soros separados por centrifugação e armazenados a -20°C até sua utilização.

3.2.2- ANÁLISES SOROLÓGICAS :

A determinação dos níveis dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina foi realizada através de radioimunoensaio, empregando-se kits comerciais para anticorpo antimicrosomal e antitiroglobulina ("Serono Diagnostics S.A", EUA), com valores normais de referência menores que 100 UI/ml.

Os níveis de tiroxina livre (T4 L) e tirotrófina ultra-sensível (TSH-us) foram avaliados utilizando-se método imunoenzimático fluorimétrico através de kits comerciais ("Baxter Diagnostics Inc.", EUA), apresentando valores normais de 4.5 a 12 ng/dl e 0.35 a 4.5 mUI/ml, respectivamente. Os soros coletados de pacientes em hipertiroidismo clínico e laboratorial por doença de Graves, antes do início do tratamento, foram considerados como prováveis portadores de TSHR-Ab S.

3.2.3- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS:

A eletroforese em gel de poliacrilamida realizada em placa vertical de vidro lavada e desengordurada seguiu basicamente o método de LAEMMLI (1970), modificado por SAUAIA & LAICINI (1977), com adaptações

desenvolvidas no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LICA) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FCM-UNICAMP.

As amostras do material a ser estudado, adicionou-se, na proporção de 1:1, solução de TRIS-HCl 0.187 M, pH 6.8, com 6% de SDS, EDTA 6 mM, 0.003% de azul de bromofenol e 25% de glicerol. Realizou-se, então, a redução das pontes dissulfídicas acrescentando-se 2-mercaptoetanol a 10% e em seguida, fervura durante 2 minutos.

A eletroforese apresentava as seguintes características:

- dimensões da placa: 14 cm de comprimento
 16 cm de largura
 0.2 cm de espessura
- concentração do gel: gel de empilhamento a 5%
 gel de separação a 7 ou 8%
- amperagem: 40 mA durante todo o processo

Foi utilizado o corante azul de bromofenol para orientação quanto à extensão da migração, sendo interrompida a corrente quando a linha do corante atingia 1 cm da borda inferior do gel. Os pontos de referência foram tomados através de padrão contendo proteínas de peso molecular conhecido: miosina de músculo de coelho de 205 kDa; β galactosidase de *Escherichia coli* de 116 kDa; fosforilase b de músculo de coelho de 97.4 kDa; albumina bovina de 66 kDa; ovoalbumina de 45 kDa e anidrase carbônica de eritrócitos bovinos de 29 kDa (MW-SDS-200 para pesos moleculares, Sigma Chemical Co., EUA).

Para a coloração dos peptídeos separados ao longo do gel foi utilizada solução com Coomassie Brilliant Blue R 250 0.2%, metanol 45% e ácido acético 10% durante uma noite. A retirada do excesso de corante foi feita com solução de metanol 45% e ácido acético 10%, seguindo-se secagem e documentação.

3.2.4- ELETROFORESE DE TRANSFERÊNCIA SEGUIDA DE "IMMUNOBLOTTING":

Inicialmente foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida-SDS como descrito acima, sendo aplicados 50 µg de colágeno tipo IV (cod. C7521, ácido solúvel, de placenta humana, Sigma Chemical Co., EUA) ou laminina (cod. L2020, de membrana basal de sarcoma de EHS em camundongo, Sigma Chemical Co., EUA) em cada poço. Após a eletroforese das amostras, transportou-se o gel para a cuba de transferência empregando-se tampão TRIS 24.8 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, acrescido de metanol a 20%. Iniciou-se a eletroforese e transferência do material contido no gel para membrana de nitrocelulose (cod. 162-0115, 0.45 µm, Bio-Rad Laboratories, EUA), sob temperatura de 4°C, durante uma noite, fixando-se a corrente em 50 mA, segundo a técnica descrita por TOWBIN, STAEHELIN, GORDON (1979), modificada por DE BLAS & CHERWINSKI (1983), com adaptações elaboradas no LICA.

Após a eletroforese, a membrana era cortada em tiras e estas acondicionadas em cubetas distintas com tampão de lavagem (PBS sem azida), procedendo-se a 3 trocas, durante 5 minutos cada, à temperatura ambiente sob agitação branda. Após a aspiração, adicionou-se solução de bloqueio dos sítios de ligação inespecífica composta por soro fetal bovino (SFB) 3% e gelatina 0.03% com Tween 20 0.05%, em PBS sem azida sob agitação branda, à temperatura ambiente, durante 60 minutos. Nova aspiração era realizada, assim como 3 trocas com tampão de lavagem, durante 5 minutos cada. Prosseguiu-se à incubação dos soros de indivíduos normais e dos de pacientes com doença tiroideana auto-imune, diluídos 1:50 para ensaios utilizando-se como antígeno o colágeno IV e 1:200 para os com laminina; também 1:200 para os controles positivos tanto com

anticorpo anticolágeno IV quanto com antilaminina, em SFB 1.5% e gelatina 0.015% com Tween 20 0.025%, em PBS sem azida durante uma noite, a 4°C. Aspirava-se a solução, seguindo-se a lavagem com 3 trocas de tampão de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Seguiu-se incubação das tiras de membrana durante uma hora com IgG de cabra anti-IgG humana conjugada com peroxidase (Abbot Laboratórios do Brasil, diluição 1:2000), na proporção de 0.3 ml: 20 ml de SFB 1.5% e gelatina 0.015% com Tween 20 a 0.025% em PBS sem azida, à temperatura ambiente, sob agitação branda. A aspiração e 3 trocas com tampão de lavagem eram repetidas para dar início à incubação com solução de 3'3'diamino-benzidina (DAB, Sigma Chemical Co, EUA), filtrada antes de sua utilização e em que 50 mg eram dissolvidos em 100 ml de PBS sem azida. Adicionava-se, então, solução de cloreto de cobalto a 1% (1 ul/ml) deixando-se agitar brandamente por cerca de 15 minutos, à temperatura ambiente, para se proceder à revelação com solução de H₂O₂ 30% (1 ul/ml). Após este momento, prosseguiu-se à aspiração e interrupção da reação com água deionizada. A documentação realizou-se através do processamento das imagens colhidas por "scanner" e fotografadas posteriormente.

3.2.5- COLETA E PREPARO DO TECIDO TIROIDEANO:

As amostras dos tecidos utilizados foram cedidas pelo Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP, assim como a realização do preparo das peças e coloração por hematoxilina e eosina.

Os tecidos eram retirados e imersos em formalina 10% por um período mínimo de 24 horas. Seguiu-se secção em blocos e inclusão em parafina pelos métodos habituais.

3.2.6- MICROSCOPIA ÓPTICA:

Os diagnósticos foram analisados e confirmados por médicos patologistas do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP.

Os fragmentos de tecido incluídos em parafina provenientes de tireóide humana normal, de doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, adenoma tóxico e bócio multinodular atóxico foram cortados em micrótomo com 5 μ m de espessura e colocados sobre lâmina para microscopia. Procedeu-se à coloração por hematoxilina e eosina (HE) pelos métodos habituais para a seleção dos blocos mais adequados e posterior processamento das reações imuno-histoquímicas. A visualização foi realizada em microscópio óptico comum.

3.2.7- TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA:

Os procedimentos de imuno-histoquímica foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental (LAPE) do Centro de Atendimento Integrado à Saúde da Mulher (CAISM) da FCM-UNICAMP, através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, descrita por HSU, RAINE, FANGER (1981), com algumas adaptações realizadas no LAPE.

Os cortes histológicos de 6 μ m de espessura dos blocos de parafina selecionados foram colocados em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e silanizadas, permanecendo em estufa a 60°C durante um mínimo de 24 horas.

Os cortes foram desparafinados através de um banho de xilol a 60°C, por 15 minutos e 2 banhos de xilol, à temperatura ambiente, por 10 minutos cada. Em seguida foram hidratados com gradiente crescente de álcoois: 3 banhos de álcool absoluto, 2 minutos cada; uma vez em álcool 80%, 2 minutos; uma vez em álcool 50%, 2 minutos; todos à temperatura ambiente. Procedeu-se à lavagem em água corrente por 2 minutos e a um banho em água destilada, para então se realizar o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 15 minutos em solução a 3% de H₂O₂ 30% em metanol. Seguiu-se lavagem em água corrente e destilada, banho em PBS, à temperatura ambiente.

A digestão enzimática foi feita com pepsina (Pepsin, Sigma Chemical Co., EUA, código P 7012) 0.4 g em 100 ml HCl 0.01 N (0.4%), incubando-se as lâminas por 2 horas, a 37°C, com lavagem posterior em água corrente e passagem por água destilada. Os cortes foram colocados em tampão citrato 1mM, pH 6.0, submetidos à irradiação por micro-ondas, a 70°C, por 5 minutos, repetindo-se o procedimento por 2 vezes, deixando-se esfriar por 10 minutos. Seguiu-se a incubação com solução para bloqueio de reações inespecíficas composta por soro normal de cavalo à diluição 1:10 em BSA 0.1%, por 20 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente, com subsequente retirada do excesso de soro, sem lavagem posterior.

O período de incubação com o anticorpo primário anticolágeno IV (Dakopatts, Denmark, código M785, monoclonal, produzido em camundongo, à diluição de 1:100 em BSA 0.1%) ou antilaminina (Sigma Chemical Co., EUA, monoclonal, à diluição de 1:1000 em BSA 0.1%) foi de uma noite, a 4°C, em câmara úmida. Na manhã seguinte retirava-se o excesso do anticorpo, realizando-se 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo secundário biotinizado (Imunoglobulina porcina biotinizada anti-cabra, camundongo, coelho, Multi Link, cod. n° E453, Dako, Denmark), diluído a 1:150 em tampão PBS com azida sódica 0.02%, durava 30 minutos em câmara

úmida, à temperatura ambiente, seguida de outras 3 lavagens em PBS, de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Incubava-se então com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABCComplex, cod. n° K377, Dako Corporation, USA) na diluição 1:10 em tampão TRIS-HCl 0.05 M, pH 7.6, por 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente e posterior lavagem em tampão PBS.

A coloração com DAB (3,3 tetra-hidrocloro de diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., código D 5637) 40 mg dissolvidos em 100 ml de tampão PBS e 40 ul de H₂O₂ 30%, realizou-se à temperatura ambiente, em banho de 2 a 3 minutos ou até a visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes, para, em seguida, se proceder à lavagem em água corrente e passagem em água destilada. A contra-coloração com Hematoxilina de Mayer durante 30 segundos, à temperatura ambiente, foi seguida por lavagem em água corrente e destilada, passagem em água amoniacal, lavagem em água corrente e passagem em água destilada. A desidratação foi feita em gradiente crescente de álcoois: uma vez em álcool 50%, uma vez em álcool 80% , 3 vezes em álcool absoluto e passagem em 3 xilóis para a montagem das lâminas com Entellan (Merck, n° 7961). O controle positivo interno dos cortes foi avaliado através da coloração da membrana basal de vasos. A observação dos resultados foi feita em microscópio óptico comum. A documentação fotográfica realizou-se através de fotomicroscópio.

3.2.8- REAGENTES UTILIZADOS:

Os reagentes utilizados sem a citação da procedência eram produtos "pro análise".

RESULTADOS

4- RESULTADOS :

Os resultados dos procedimentos realizados serão apresentados de acordo com a seguinte seqüência:

4.1) Pesquisa de anticorpos séricos anticolágeno IV e antilaminina em pacientes com doença tiroideana auto-imune.

4.2) Expressão de colágeno IV e laminina na doença tiroideana auto-imune

4.1) PESQUISA DE ANTICORPOS SÉRICOS ANTICOLÁGENO IV E ANTILAMININA EM PACIENTES COM DOENÇA TIROIDEANA AUTO-IMUNE

a) Eletroforeses de referência em gel de poliacrilamida-SDS:

Através da realização de eletroforeses em gel de poliacrilamida-SDS a 7%, foram demonstrados diferentes peptídeos pertencentes ao COLÁGENO IV, reduzido e desnaturado. Pudemos verificar padrão compatível com o encontrado na literatura (DIXIT & GLANVIELE, 1982).

Caracteristicamente, na forma não reduzida existe limitação para sua migração eletroforética no gel de separação. Desta forma procedemos à

redução com 2-mercaptoetanol a 20% e desnaturação obtida por banho a 100°C, 2 minutos, pois nestas situações a molécula se quebra em pelo menos 3 componentes distintos de 140, 120 e 75 kDa, e seu domínio 7S, de 360 kDa, gera peptídeos variando entre 15 e 150 kDa, além de outros de pesos moleculares maiores (RISTELI et al., 1980).

Assim, obtivemos fragmentos do COLÁGENO IV com os seguintes pesos moleculares: >300, 208, 180, 162, 135, 102, 92, 87, 72, 70, 68, 60, 56, 52, 47, 42, 38 e 36 kDa.

A LAMININA recebeu tratamento referente aos processos de redução e desnaturação sob condições semelhantes às aplicadas ao colágeno IV, existindo a compatibilidade com os dados descritos na literatura por FOIDART et al.(1982). Quando reduzidas suas pontes dissulfídicas, observam-se 2 cadeias polipeptídicas de 200 a 220 kDa e 400 a 440 kDa. No entanto, a separação e caracterização química das cadeias são prejudicadas devido à sua reagregação mesmo após redução e desnaturação, e resultados conflitantes podem ser encontrados ao analisá-las por eletroforese. Mesmo frente a estas dificuldades, existem relatos definindo que, ao serem quebradas pela pepsina, resultam em cadeias de 290 e 45 kDa, além de outros fragmentos menores (CHUNG et al., 1979).

Segundo a metodologia utilizada, ou seja, gel de separação a 8%, aplicação de 40 µg de proteína por poço, redução de pontes dissulfídicas e desnaturação protéica, obtivemos os seguintes fragmentos de laminina: > 300, 178, 133, 108, 88, 77, 57, 53, 43, 40 e 38 kDa.

b) Eletroforeses de transferência seguidas de "immunoblot" para detecção de anticorpos anticolágeno IV e antilaminina.

Realizado ensaio para a obtenção de controle-positivo através de "immunoblot", verificando reação de COLÁGENO IV com soro de coelho contendo anticorpo policlonal monoespecífico anticolágeno IV, na diluição 1:200, detectamos o aparecimento de fragmentos de pesos moleculares similares aos constantes no gel de poliacrilamida-SDS: >300, 208, 180, 162, 135, 102, 92, 87, 72, 70, 68, 56, 52, 47, 42, 38 e 36 kDa. (Figura 1 - C, pag. 54)

O "immunoblot" que testava os soros dos pacientes foi realizado na diluição 1:50 e 50 µg de colágeno IV aplicados em cada poço do gel. Foram realizados alguns experimentos com soro na diluição 1:200, sendo obtidos resultados semelhantes, excetuando-se a intensidade de reação, que se mostrou menos evidente.

Nos 11 pacientes com DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES existiu reatividade sorológica para as frações de 208, 180, 162, 135, 102, 87, 68 e 60 kDa, de intensidade moderada, exceto as de 68 e 60 kDa de maior intensidade, padrão mantido com diluição do soro 1:200. Portanto, não foram observadas diferenças quanto à presença ou não dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina nos soros, nem quanto aos níveis de hormônios tiroideanos. (Figura 1 - G, pag. 54)

Os soros dos 11 pacientes com hipotireoidismo por TIROIDITE DE HASHIMOTO testados em ambas as diluições não demonstraram reatividade ao colágeno IV exceto em 68 e 60 kDa, não sendo notada diferença entre níveis de T4L e TSH-us assim como de anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina.

(Figura 1 - H, pag. 54). Apenas em um paciente em eutiroidismo e com ambos anticorpos em níveis altos evidenciaram-se bandas de 208, 180, 162, 135, 102, 68 e 60 kDa de moderada intensidade. Em outros 2 pacientes foi observada reatividade muito fraca à fração de 87 kDa e moderada às de 68 e 60 kDa. Em relação às características clínicas e laboratoriais, ambos estavam em hipotiroidismo: um apresentava anticorpo antimicrosomal em níveis elevados e antitiroglobulina negativo e o outro, os dois anticorpos negativos.

A respeito dos soros de 5 pacientes com ADENOMA TÓXICO, nenhum apresentou reatividade às várias frações protéicas, como ficou evidenciado nos pacientes com doença de Basedow-Graves; entretanto, em 3 deles houve reação em 68 e 60 kDa de moderada intensidade e extremamente fraca em 87 kDa.

Naqueles pacientes com HIPOTIROIDISMO NÃO AUTO-IMUNE a reatividade foi irrelevante, excetuando-se 68 e 60 kDa e 1 paciente com fraca intensidade de reação em frações de 208, 180, 162, 135 e 102 kDa.

Três indivíduos dos 10 CONTROLES-NORMAIS integrantes deste grupo apresentaram reatividade irrelevante ao fragmento de 87 kDa e moderada a intensa em 68 e 60 kDa (Figura 1 - N, pag. 54)

A Tabela I resume estes dados.(pag. 53)

TABELA I - INTENSIDADE DE REAÇÃO AO COLÁGENO TIPO IV VISUALIZADA ATRAVÉS DE "IMMUNOBLOT".

controle positivo (kDa)	DBG 11/11	TH 1/11	AT 3/5	HNAI 1/5	NL 3/10
> 300	-	-	-	-	-
208	++	++	-	+	-
180	++	++	-	+	-
162	++	++	-	+	-
135	++	++	-	+	-
102	++	++	-	+	-
92	-	-	-	-	-
87	++	-	+	-	+
72	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-
68	+++	+++	+++	+++	+++
60	+++	+++	+++	+++	+++
56	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-

Legenda: **DBG**= Doença de Basedow Graves

TH= Tiroidite de Hashimoto

AT= Adenoma tóxico

HNAI= Hipotiroidismo não auto-imune

NL= Controles-normais

(-) = negativa

(+) = fraca

(++) = moderada

(+++)= intensa

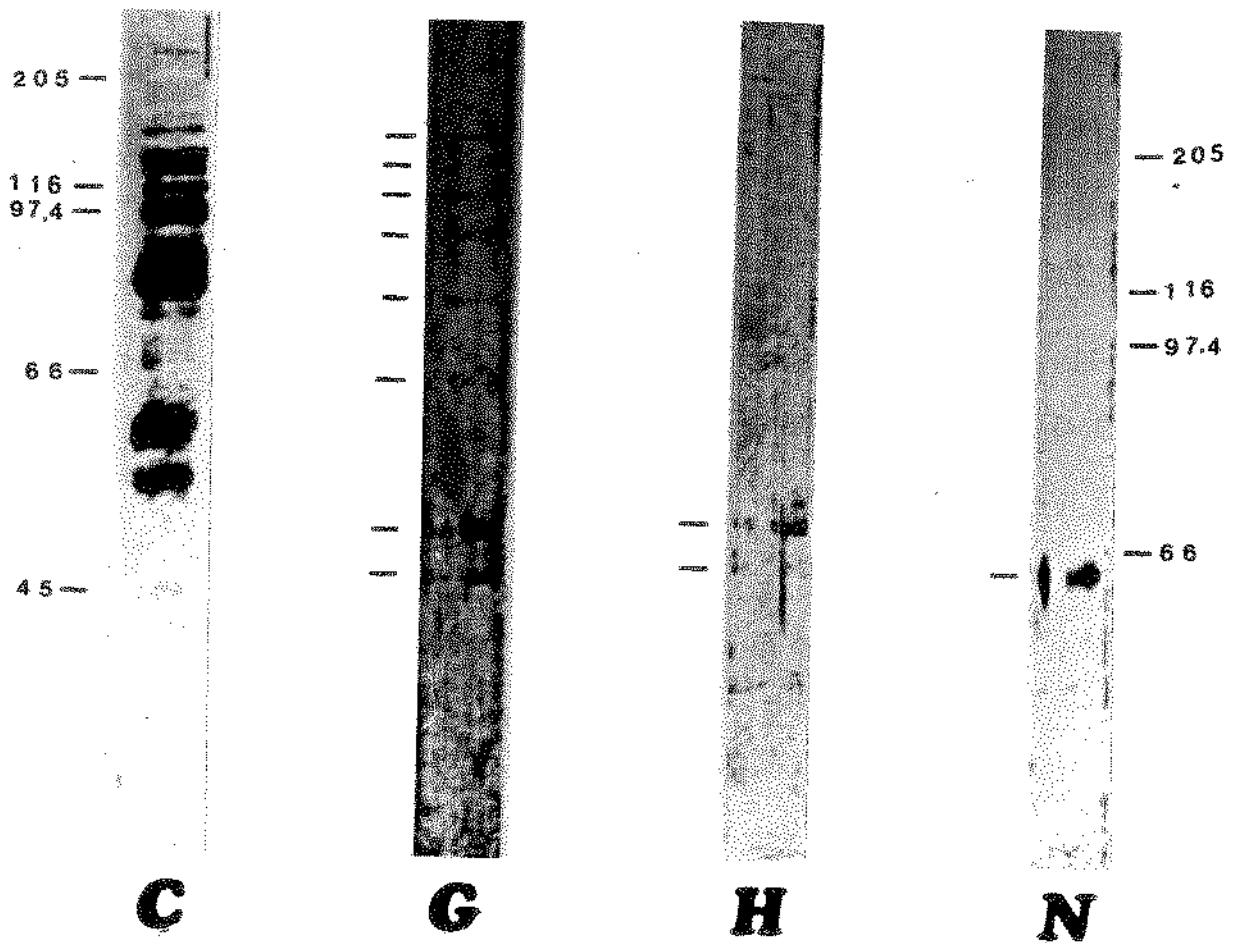


FIGURA 1: "Immunoblot" representativo da reação dos fragmentos de colágeno IV com soros de pacientes com doença de Graves (**G**), tiroidite de Hashimoto (**H**) e indivíduos normais (**N**), em gel de poliacrilamida-SDS a 7%.

Utilizado como controle positivo anticorpo policlonal monoespecífico anticolágeno IV (**C**), em gel a 8%. As reatividades dos soros para as bandas proteicas de 208, 180, 162, 135, 102, 87, 68 e 60 kDa estão assinaladas com traços.

Com o objetivo de demonstrar o controle positivo para LAMININA foi realizado "immunoblot" em gel a 8% e diluição 1:200 do anticorpo antilaminina de camundongo, visualizando-se bandas protéicas de pesos moleculares semelhantes às presentes no gel de poliacrilamida-SDS: >300, 178, 133, 108, 98, 88, 77, 57, 53, 43, 40 e 38 kDa. (Figura 2 - C, pag. 57).

Todos os soros dos pacientes com DOENÇA DE BASEDOW GRAVES reagiram intensamente com os peptídeos de > 300, 178, 98, 88 e 57 kDa e fracamente com os de 133 e 108 kDa, de maneira independente dos níveis de hormônios tiroideanos ou presença de anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina. (Figura 2 - G, pag. 57).

De modo semelhante, os anticorpos presentes nos soros dos pacientes com TIROIDITE DE HASHIMOTO reagiram fortemente para > 300, 178, 98 e 88 kDa e com menor intensidade para 133 e 108 kDa, não se encontrando diferenças entre os soros nos diversos estados de função tiroideana ou níveis de anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina. (Figura 2 - H, pag. 57).

Os soros de pacientes com HIPER E HIPOTIROIDISMO DE ORIGEM NÃO AUTO-IMUNE apresentaram reação de moderada intensidade com fragmentos de > 300, 178, 98 e 88 kDa, sem mostrarem relações com as alterações dos níveis hormonais.

Nos soros NORMAIS houve reatividade muito fraca com > 300, 98 e 88 kDa. (Figura 2 - N, pag. 57).

A Tabela II resume estes dados (pag. 56):

TABELA II - INTENSIDADE DE REAÇÃO À LAMININA VISUALIZADA ATRAVÉS DE "IMMUNOBLOT".

controle positivo (kDa)	DBG n = 11	TH n = 11	DTNAI n = 10	NL n = 10
>300	+++	+++	++	+
178	+++	+++	++	+
133	++	++	-	-
108	++	++	-	-
98	+++	+++	++	+
88	+++	+++	++	+
77	-	-	-	-
57	+++	-	-	-
53	-	-	-	-
43	-	-	-	-
40	-	-	-	-
38	-	-	-	-

Legenda: DBG= Doença de Basedow Graves
 TH= Tiroidite de Hashimoto
 DTNAI= Doença Tiroideana não auto-imune
 NL= Controles-normais

(-) = negativa
 (+) = fraca
 (++) = moderada
 (+++) = intensa

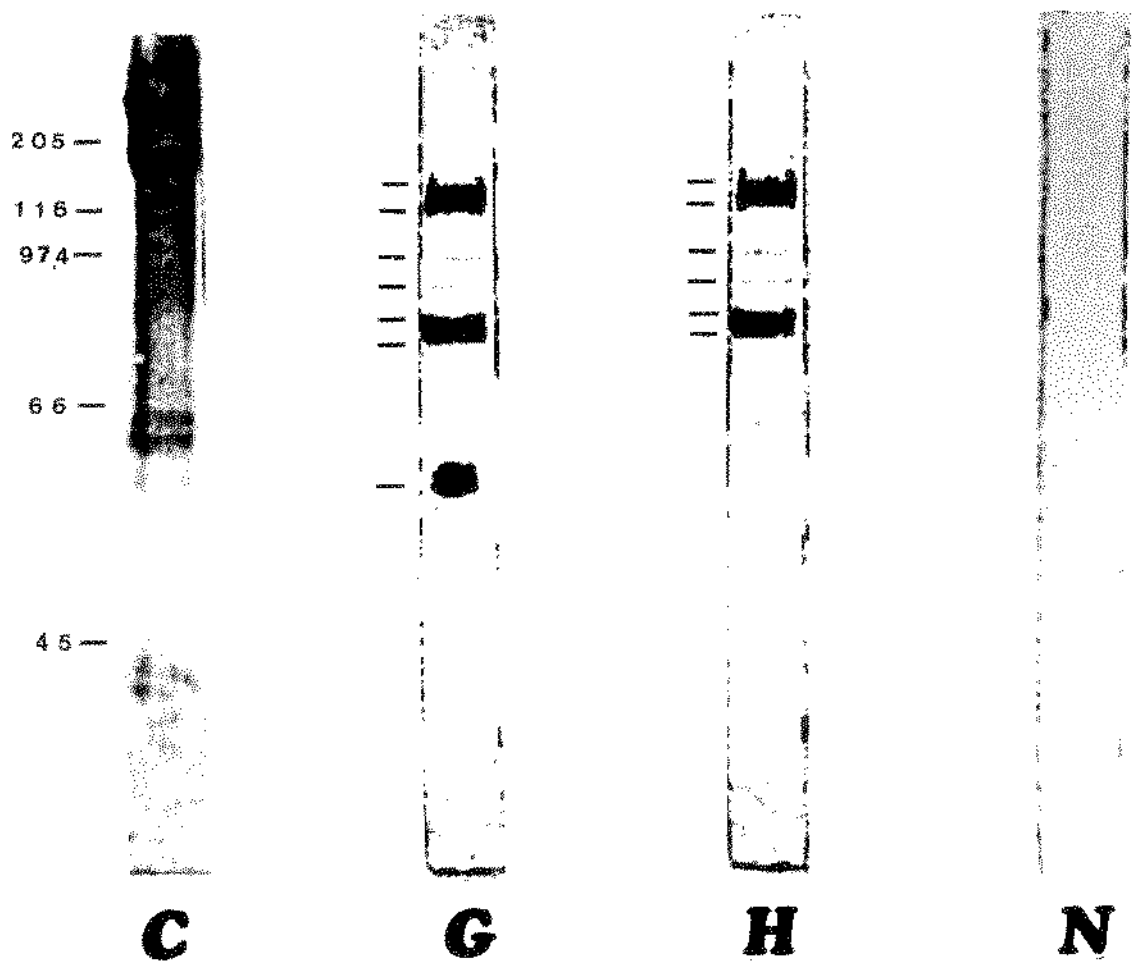


FIGURA 2: Representação de "Immunoblot" da reação de laminina com soros dos pacientes com doença de Graves (**G**), tiroidite de Hashimoto (**H**) e indivíduos normais (**N**). O padrão do controle positivo foi realizado

com anticorpo policlonal antilaminina (**C**). Todos os procedimentos foram feitos em gel a 8%. As bandas proteicas de 300, 178, 133, 108, 98, 88 e 57 kDa, produto das reações com os soros estudados estão discriminadas com traços.

4.2) ESTUDO MORFOLÓGICO: EXPRESSÃO DE COLÁGENO IV E LAMININA NA DOENÇA TIROIDEANA AUTO-IMUNE

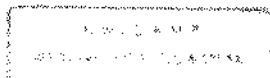
A expressão destes componentes foi evidenciada através de coloração por técnica de imuno-histoquímica como descrição anterior, observando-se o padrão de membrana basal de acordo com a seguinte classificação:

- A) linear contínuo
- B) com áreas de adelgaçamento
- C) com áreas pequenas de descontinuidade
- D) com áreas grandes de descontinuidade
- E) com áreas de espessamento.

Para a avaliação da intensidade de reação e infiltrado inflamatório utilizou-se a escala:

- (+) : fraco
- (++) : moderado
- (+++): intenso.

No tecido tiroideano NORMAL o colágeno IV estava presente como linha contínua, delgada, de coloração acastanhada, intensidade +/++, em topografia de membrana basal epitelial, ao redor dos folículos, cujas células eram evidenciadas pelos núcleos azulados dispostos lado a lado. Estavam presentes pequenas áreas de interrupção da membrana, raras no corte, assim como discretos focos de adelgaçamento, anormalidades que podem ser interpretadas como artefatos de técnica ou distribuição normal da membrana basal no órgão. Evidenciava-se a membrana basal vascular com o aspecto de "alças" (Figura 3 - 1A, pag.62).



Similarmente à expressão de colágeno IV na membrana basal folicular, a laminina dispôs-se com padrão linear contínuo, coloração acastanhada, mas com reação discretamente maior (++/+++). Mantiveram-se as áreas de interrupção e adelgaçamento à semelhança do colágeno IV. Praticamente não se observou infiltrado inflamatório nestas amostras. A coloração específica limitou-se às áreas correspondentes à membrana basal, não havendo invasão de citoplasma e núcleo celulares ou espaço colóide (Figura 3 - 1B, pag. 62).

As tiróides dos pacientes com DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES apresentaram expressão de colágeno IV e laminina de intensidade semelhante à encontrada na tiróide normal, tanto em termos de membrana basal epitelial quanto vascular (Figura 3 - 3A, pag. 63). O padrão linear contínuo variou com algumas áreas de adelgaçamento, sobretudo quando em contacto com o infiltrado inflamatório linfocitário ou centros germinativos. Este infiltrado teve intensidade que variou de +/++ (Figura 3 - 3B, 3C, pag. 63).

Nos tecidos tiroideanos apresentando TIROIDITE DE HASHIMOTO o padrão contínuo da reação na membrana e a intensidade de reação de colágeno IV e laminina mantiveram-se como no padrão normal. Houve variação quanto ao tamanho dos folículos, inclusive inúmeros em processo de atrofia. Foram encontradas áreas extensas de infiltração de células inflamatórias, com ou sem centros germinativos, em contigüidade ou não com o tecido fibroso, que ladeavam ou envolviam completamente os folículos tiroideanos nas mais diversas fases involutivas. Na maior parte das vezes os folículos remanescentes permaneciam com a membrana basal apresentando algumas áreas de adelgaçamento, sem áreas de interrupção. Em outras situações, sobretudo na presença de infiltrado inflamatório, as áreas de adelgaçamento tornavam-se mais proeminentes (Figura 3 - 4A, 4B, 4C, pag. 63).

Os padrões da imunocoloração para as tiróides na Doença de Graves e Tiroidite de Hashimoto foram em grande parte semelhantes quanto à expressão de colágeno IV e laminina.

Os tecidos tiroideanos extraídos cirurgicamente por ADENOMA TÓXICO apresentavam nítido espessamento da membrana basal, observado tanto para colágeno IV (Figura 3 - 2A, pag. 62) quanto para laminina inexistindo, inclusive, a diferença de intensidade de reação entre os dois componentes (+++). A membrana basal mostrou-se de caráter contínuo e, raramente, notavam-se áreas de adelgaçamento ou descontinuidade, em contraposição ao aspecto frequentemente encontrado lembrando delaminação da membrana basal (Figura 3 - 2B, pag. 62). Houve variação quanto ao tamanho dos folículos e celularidade. Praticamente não se observou infiltração linfocitária.

As tiróides com BÓCIO MULTINODULAR ATÓXICO apresentaram espessamento da membrana basal para ambos os componentes estudados, de menor expressão que no adenoma tóxico (++), de caráter contínuo, com poucas áreas de adelgaçamento ou interrupção, não sendo observado aspecto de delaminação. Nas áreas de infiltrado inflamatório pouco freqüentes não houve alterações significativas na continuidade da membrana basal.

Em resumo, os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas no padrão de continuidade da membrana basal, no tocante a colágeno IV e laminina, nos grupos acima mencionados. As pequenas diferenças citadas, tais como áreas de adelgaçamento em adjacências de infiltrado inflamatório, não puderam ser consideradas, a rigor, como pontos de "quebra" ou destruição de membrana basal, mesmo porque existiram também no grupo controle normal. Sobretudo, não foram observadas áreas de grande

descontinuidade. A impressão de espessamento da membrana basal no adenoma tóxico foi nítida, embora este não tenha sido quantificado. Os dados estão sumarizados a seguir na Tabela III (pag. 61):

TABELA III - PADRÃO DE COLORAÇÃO DE COLÁGENO IV E LAMININA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA EM DOENÇA TIROIDEANA

	TN	DBG	TH	AT	BMA
padrão de membrana basal	A B C	A B C	A B C	A E	A E
intensidade da reação IHQ	(+)	(+)	(+)	(+++)	(++)
intensidade do infiltrado inflamatório	(-)	(++)	(+++)	(-)	(-)

Legenda: TN: tireóide normal

DBG: Doença de Graves

TH: Tiroidite de Hashimoto

AT: Adenoma tóxico

BMA: Bócio Multinodular Atóxico

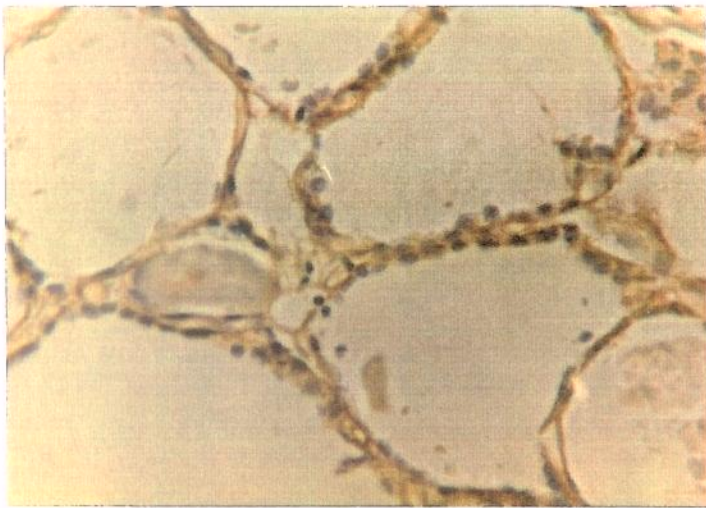
A) linear contínuo

B) áreas de adelgaçamento

C) áreas pequenas de descontinuidade

D) áreas grandes de descontinuidade

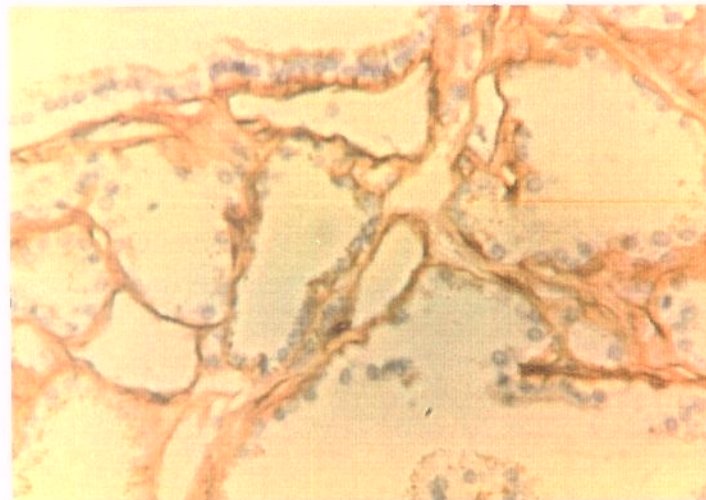
E) áreas de espessamento



1A



1B



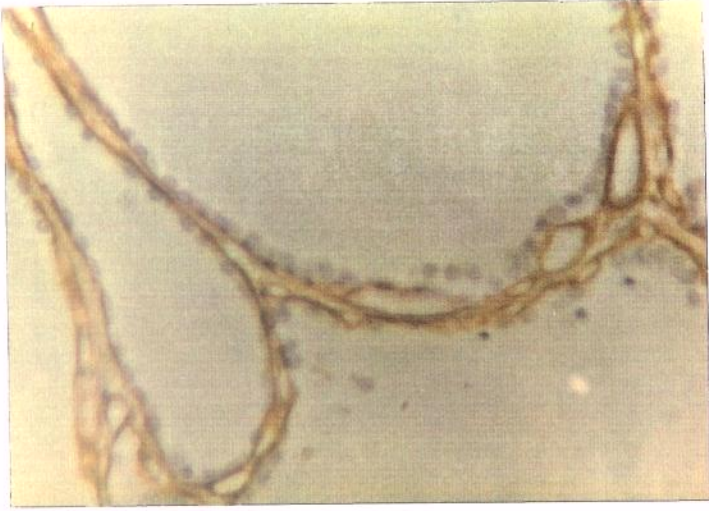
2A



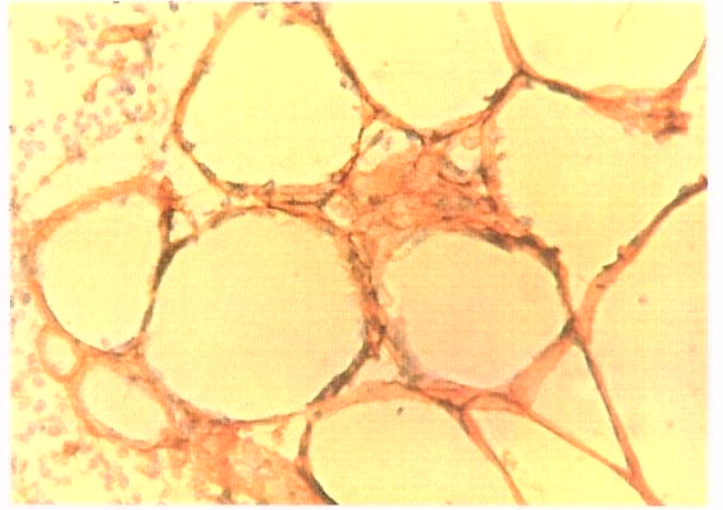
2B

FIGURA 3. 1) Tiróide normal. 1A: colágeno IV; linha contínua acastanhada envolvendo os folículos (528 X). 1B: laminina; linha semelhante à anterior; note 2 áreas de interrupção da membrana basal, prováveis artefatos de técnica (528 X). 2) **Adenoma tóxico.** 2A: colágeno IV; nota-se espessamento da membrana basal (528 X). 2B: laminina; aspecto lembrando delaminação da membrana (528 X) (setas). 3) **Doença de Basedow Graves.** 3A: laminina; tecido sem infiltrado inflamatório, nota-se linha contínua envolvendo folículos e vasos sanguíneos (528 X). 3B: colágeno IV; infiltrado linfoplasmocitário, notar

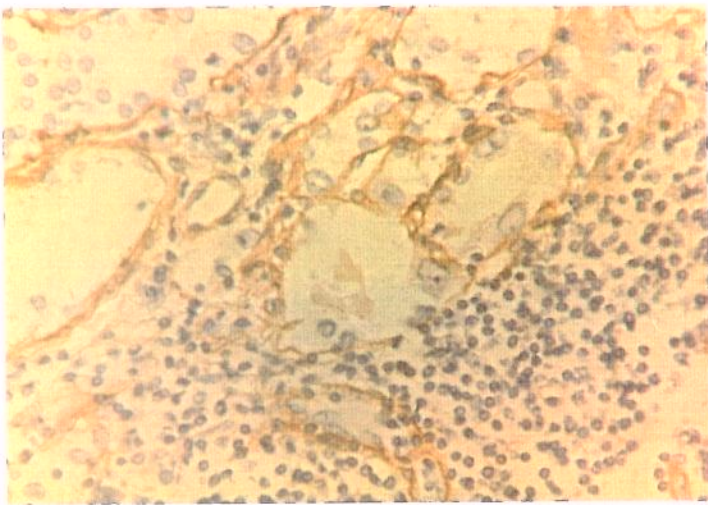
manutenção da linha marrom da membrana basal (528 X). 3C: laminina; notar a manutenção da integridade da membrana basal em área de intenso infiltrado linfoplasmocitário (528 X). 4) **Tiroidite de Hashimoto.** 4A: colágeno IV; folículos com membrana basal íntegra em contacto com infiltrado inflamatório (330 X). 4B: laminina; notar integridade da membrana basal em contacto com infiltrado inflamatório (528 X). 4C: laminina; integridade da membrana basal em área de intenso infiltrado linfoplasmocitário (528 X). (Imuno-histoquímica/streptavidina-biotina-peroxidase/DAB, contra-coloração com hematoxilina).



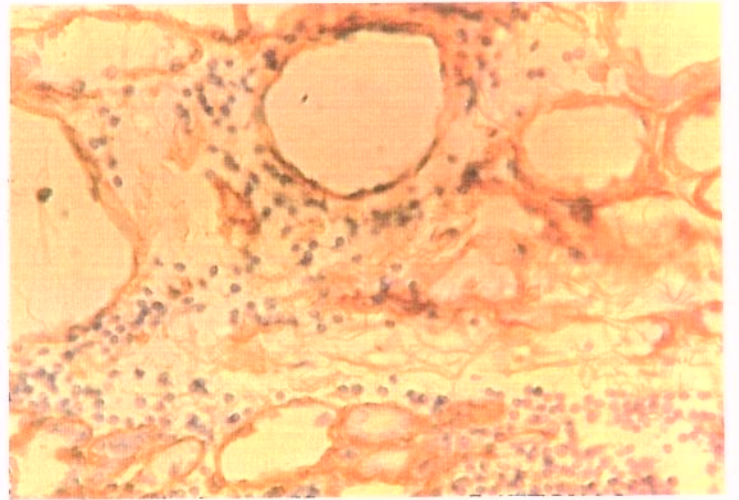
3 A



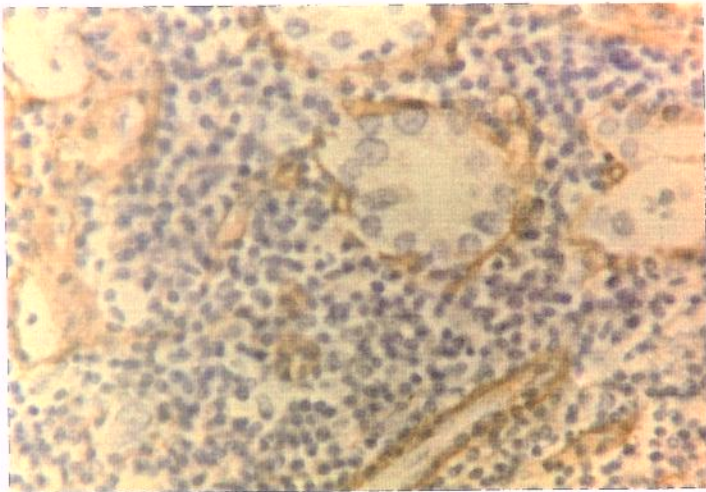
4 A



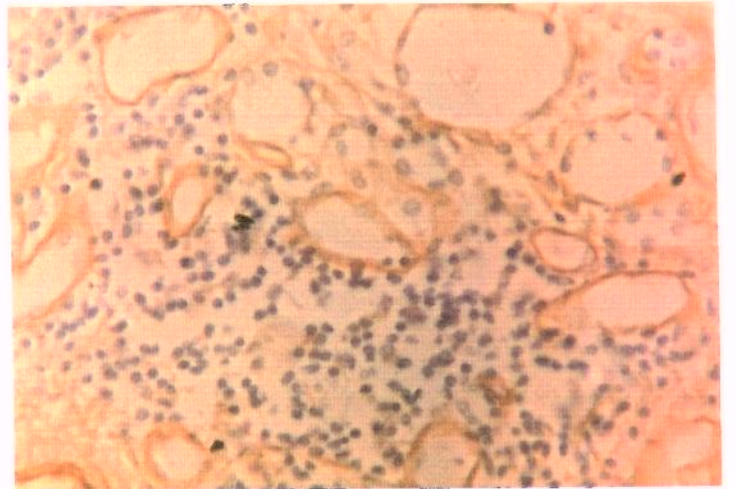
3 B



4 B



3 C



4 C

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO:

A membrana basal folicular vem sendo alvo da atenção de estudiosos de Doença Tiroideana Auto-imune desde a década de 50, sobretudo devido à facilitação de sua visualização pelo aperfeiçoamento das técnicas de coloração e caracterização. Inicialmente, encontraram-se anormalidades da membrana basal em folículos de tiroidite crônica como relatado por SOMMERS & MEISSNER em 1954, em que alterações importantes degenerativas e de descontinuidade eram acompanhadas ou não de áreas de infiltrado linfocitário que faziam parte deste quadro histopatológico. Tal aspecto, estudado através de microscopia eletrônica, revelou a existência de áreas com infiltração linfocitária, adelgaçamento, irregularidade, borramento e aspecto multiestratificado, geralmente sem interrupção da membrana basal, exceto quando plasmócitos ou linfócitos atravessavam do espaço perifolicular para o ácino. Além disso, na Tiroidite de Hashimoto, foram demonstradas deposições de material globóide irregular elétron-denso, quase que exclusivamente em áreas acometidas pelo infiltrado, enquanto que na Doença de Graves encontrou-se adelgaçamento mínimo, irregular e sem depósitos (KALDERON et al., 1973). Mais tarde, através de estudo por microscopia de imunofluorescência na tiróide de Graves, FUJIWARA et al.(1981) demonstraram a ativação local do sistema complemento e depósitos de imunocomplexos solúveis na membrana basal folicular.

Inicialmente, alguns autores tentaram estabelecer a relação entre infiltrado inflamatório, rompimento da membrana basal folicular, formação de anticorpo antitiroglobulina e destruição da tiróide, tanto em Tiroidite de Hashimoto, quanto em Doença de Graves (DONIACH & ROITT, 1957; STUART & ALLAN, 1958). Outros deram maior enfoque à presença de imunoglobulina G e complemento, encontrados no colóide, como prováveis complexos antígeno-anticorpo de ação citotóxica (KOFFLER & FRIEDMAN, 1964).

Estudos demonstraram haver associação entre infiltração linfoplasmocitária e evolução para hipotiroidismo, após tratamento medicamentoso (TAMAI et al., 1989; HAMADA et al., 1987) ou cirúrgico (OKAMOTO et al., 1992). PASCHKE et al. (1993) relacionaram a presença dos anticorpos antitiroperoxidase e antitiroglobulina séricos ao grau de infiltração linfo-plasmocitária, células T ativadas e apresentadoras de antígenos em tiróide de Graves, que seriam responsáveis pela produção intratiroideana dos anticorpos na doença tiroideana auto-imune.

Com o intuito de elucidar o mecanismo fisiopatológico da doença de Graves, KAWAI et al. (1993) sugeriram que esta teria início com infiltração linfocitária, destruição do epitélio folicular, liberação dos hormônios tiroideanos, recuperação dos folículos, caminhando para a hiperplasia papilífera. Tal padrão inflamatório é semelhante ao padrão da Tiroidite de Hashimoto em eutiroidismo.

Estas teorias sobre alterações morfológicas do folículo tiroideano como parte do processo auto-imune na doença tiroideana direcionaram os estudos para a investigação da membrana basal folicular e seus componentes.

Estudos evidenciaram um aumento dos níveis séricos de colágeno IV (SHIMA et al., 1992; INUI et al., 1992; SENDA et al., 1993) e laminina (KROPP et al., 1989) em pacientes hipertiróideos e diminuição dos níveis de colágeno IV sérico em hipotiroidismo (INUI et al., 1992) procurando relacionar o

processo fisiopatológico da Doença Tiroideana Auto-imune e alterações da membrana basal.

Os níveis plasmáticos destes componentes de membrana basal poderiam refletir a quebra dos mecanismos de tolerância a antígenos reconhecidos como próprios, indução de resposta imunológica e produção de auto-anticorpos (SCHECHTER & LOPES, 1990). Portanto, a hipótese de existir uma relação entre alteração ou rompimento da membrana basal e processo fisiopatológico de produção dos anticorpos presentes na doença tiroideana auto-imune permanece para ser elucidada.

Assim, na tentativa de contribuir para os estudos neste sentido, iniciamos a pesquisa de anticorpos anticolágeno IV e antilaminina no soro de pacientes com doença tiroideana auto-imune através de imunodifusão passiva em gel de agarose 1%. No entanto, não encontramos linha de precipitação entre nenhuma das amostras de soro obtidas destes pacientes e colágeno IV ou laminina, provavelmente por não existirem anticorpos precipitantes ou devido à falha na sensibilidade da técnica (dados não apresentados). Através de técnica mais sensível como a do "immunoblotting", que permite a caracterização de antígenos e anticorpos, associando o poder analítico das técnicas eletroforéticas à alta especificidade da reação antígeno-anticorpo (STOTT, 1989), reavaliamos a hipótese sobre a existência ou não de anticorpos séricos anticolágeno IV e antilaminina.

Entre todos os pacientes estudados através desta metodologia, tivemos a oportunidade de observar a presença de anticorpo anticolágeno IV exclusivamente nos pacientes com Doença de Basedow-Graves. A observação deste anticorpo não sofreu influência do estadió clínico ou laboratorial, estando presente em pacientes em tirotoxicose, hipo ou eutiroidismo, estes 2 últimos secundários ao uso de medicação antitiroideana. Não houve correlação entre a presença ou ausência dos anticorpos antimicrosomal ou antitiroglobulina e

anticorpo anticolágeno IV. Nos soros dos pacientes com Tiroidite de Hashimoto não se verificou anticorpo sérico anticolágeno IV, em hipo ou mesmo eutiroidismo secundário à reposição hormonal, exceto em um soro de paciente com níveis hormonais normais devido à reposição. Em 2 soros de hipotiroideos houve ligação do anticorpo apenas à fração de 87 kDa. Similarmente, não observamos correlação entre estas alterações e presença dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina.

Apesar de não havermos encontrado informações disponíveis na literatura correlacionando a presença de anticorpo anticolágeno IV e doença tiroideana auto-imune, interessaram-nos os trabalhos de INUI et al. (1992), SHIMA et al. (1992) e SENDA et al. (1993), que estudaram níveis séricos periféricos de colágeno IV e domínio 7S em pacientes com Doença de Basedow-Graves em hipertiroidismo. Estes autores demonstraram aumento deste componente da membrana basal associado à elevação dos hormônios tiroideanos e sua normalização, com o retorno destes hormônios aos níveis normais. Situação semelhante foi observada em pacientes com tiroidite crônica auto-imune: diminuição dos níveis séricos de colágeno IV e 7S durante o estágio clínico de hipotiroidismo e sua normalização com a reposição de L-Tiroxina. Apesar de o mecanismo destas alterações não estar totalmente elucidado, os autores sugerem que o aumento do colágeno IV e 7S seja decorrente das elevadas taxas de síntese em vários órgãos e degradação na circulação, propondo que seja considerado como marcador do estado de hipertiroidismo.

Nossos resultados sugerem que provavelmente, este anticorpo anticolágeno IV não esteja associado somente ao estado hipermetabólico, pois testamos soros de pacientes com doença de Graves em variados estágios clínicos: hipertiroidismo sem tratamento ou de início recente, hipertiroideos de longa data com tratamento irregular, eutiroides e um hipotiroideo, estes em tratamento clínico por mais de um ano e, apesar da ampla variação entre os estados

metabólicos, o anticorpo anticolágeno IV manteve-se presente. A presença do anticorpo poderia ser representativa da elevação dos níveis do colágeno IV circulante observado com o hipermetabolismo. No entanto, ao estudarmos pacientes em hipertiroidismo por adenoma hiperfuncionante, com hormônios tiroideanos em níveis elevados, encontramos soros reativos em 3 de 5 pacientes, apenas para as frações de 87, 68 e 60 kDa. Estas 2 últimas estiveram presentes em todos os indivíduos estudados, sendo aparentemente desprovidas de significado patológico, assim como a reatividade ao fragmento de 87 kDa, presente também em 30% dos normais. Assim, o fato de encontrarmos reatividade do anticorpo a várias frações protéicas no soro de um paciente com Tiroidite de Hashimoto reforçaria nossa hipótese, pois existe a possibilidade de não se haver encontrado este paciente em estado hipermetabólico propiciando elevação do colágeno IV e conseqüente aparecimento de anticorpo anticolágeno IV.

Contudo, serão necessários outros estudos para esclarecer se a presença do anticorpo anticolágeno IV se associar à lesão da membrana basal folicular, iniciando o processo de auto-imunidade na doença de Graves, como proposto por alguns autores e de se existe participação como substrato fisiopatológico.

A estrutura do colágeno IV da placenta humana mostra 2 cadeias polipeptídicas do domínio NC-1: $\alpha 1(\text{IV})$ de 180 kDa e $\alpha 2(\text{IV})$ de 165 kDa, que, sob processo de redução, quebram-se preferencialmente em $\alpha 1(\text{IV})$ 140 kDa, $\alpha 2(\text{IV})$ 120 kDa, $\alpha 1(\text{IV})$ 95 kDa, $\alpha 2(\text{IV})$ 95 kDa e $\alpha 2(\text{IV})$ 75 kDa (CROUCH, SAGE, BORNSTEIN, 1980). Outros peptídeos de $\alpha 1(\text{IV})$ com pesos moleculares de 170, 100, 70 e 50 kDa e de $\alpha 2(\text{IV})$ de 80, 70, 68 e 40 kDa podem ser encontrados, além de diferenças nos valores dos pesos moleculares devidas ao esperado artefato experimental (BAILEY et al., 1979; KRESINA & MILLER,

1979). Fragmentos de peso molecular mais alto derivam da redução do domínio 7S do colágeno IV, de 360 kDa (RISTELI et al., 1980).

BUTKOWSKI et al. (1985); KLEPPEL, MICHAEL, FISH, (1986) demonstraram a existência de auto-anticorpos dirigidos contra um ou mais antígenos localizados sobretudo no domínio NC-1 do colágeno IV que formam complexos antígeno-anticorpo, podendo permanecer circulantes ou depositar-se. De qualquer forma, uma vez que ocorra a reação antígeno-anticorpo, mediadores comuns da inflamação poderão ser ativados levando à resposta inflamatória e, quando esta for intensa, à destruição do tecido (COCHRANE, 1979).

Através de estudos imunoenzimáticos com peptídeos sintéticos do colágeno IV na Síndrome de Goodpasture, doença apresentando anticorpos anticolágeno IV ligados firmemente às membranas basais glomerular e alveolar, pode-se constatar a existência de reação principalmente com peptídeos do domínio NC-1, além de alguns do domínio 7S. Estudo semelhante realizado com glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica, demonstrou depósitos de complexos antígeno-anticorpo nos capilares glomerulares e verificou reatividade exclusivamente para o domínio 7S, sendo que foi a presença de aminoácidos aromáticos em sua molécula que predisse com maior acerto a imuno-reatividade destes peptídeos sintéticos (KEFALIDES et al., 1993)

O anticorpo anticolágeno IV encontrado nos pacientes com Doença de Basedow Graves estudados no presente trabalho provavelmente foi produzido contra peptídeos derivados do domínio 7S do colágeno IV como o de peso molecular de 208 kDa, da cadeia $\alpha 1(IV)$ de 180, 135 e 102 kDa e de $\alpha 2(IV)$ de 162, 87 e 68 kDa. O fato deste anticorpo haver sido demonstrado somente na doença de Graves, pode revesti-lo de importância no processo fisiopatológico desta doença, denotando a implicação de alguma anormalidade na membrana basal folicular.

No tocante à laminina, KROPF, GRESSNER, JOSEPH (1989) verificaram o aumento de seus níveis séricos em pacientes hipertiróides, entretanto sem relação com níveis de hormônios tiroideanos, sugerindo-se que esta anormalidade seja decorrente da ativação inespecífica do metabolismo em geral. Anticorpos antilaminina são encontrados no soro de pacientes com glomerulonefrite pós-estreptocócica (KEFALIDES et al., 1986), intoxicação por metais pesados (BERNARD et al., 1986), tripanossomíase nas fases crônica (TOWBIN et al., 1987) e aguda (GAZZINELLI et al., 1988), lúpus eritematoso sistêmico (SCHECHTER & LOPES, 1990) e em baixos títulos em 15% de indivíduos normais (BERNARD et al., 1986). Mesmo com baixos níveis de laminina sérica, podem ser encontrados altos títulos destes anticorpos, fato que não implica necessariamente na formação de imunocomplexos (SCHECHTER & LOPES, 1990)

O estabelecimento das frações de laminina não é tão evidente, pois existe reagregação das cadeias de 200 e 400 kDa após os processos de redução e desnaturação, fato que pode levar a resultados conflitantes se analisados sob eletroforese (CHUNG et al., 1979). Em nossos procedimentos verificamos os seguintes fragmentos de laminina originária do tumor de EHS sob condições de redução e desnaturação: >300, 178, 133, 108, 98, 88, 77, 57, 53, 43, 40 e 38 kDa.

Todos os soros dos pacientes com tiroidopatia estudados apresentaram anticorpos com reatividade às frações protéicas da laminina de >300, 178, 133, 108, 98 e 88 kDa. Tal fato poderia refletir um "turnover" mais intensificado da laminina nestes processos levando à produção destes anticorpos, que não seriam, necessariamente, dotados de significado na patogênese destas doenças. No entanto, apenas os soros dos pacientes com Doença de Basedow-Graves reagiram com o fragmento de 57 kDa, de maneira independente da função tiroideana ou presença dos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina. Este anticorpo contra o fragmento protéico de 57 kDa aparentemente não estaria

relacionado ao estado hipermetabólico, sugestão baseada em sua ausência nos soros de pacientes com adenoma tóxico. Provavelmente não se correlaciona aos anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina, hipótese reforçada devido às variações observadas quanto a presença destes no grupo com Doença de Basedow-Graves, pois houve a demonstração de reatividade ao peptídeo de 57 kDa em todos os soros. Reforçando esta idéia, temos o estudo dos pacientes com Tiroidite de Hashimoto, em cujos soros esta reação nunca esteve presente, embora a maioria apresentasse os anticorpos antimicrosomal e/ou antitiroglobulina. Portanto, podemos inferir diante destes resultados que a reatividade à fração da laminina de 57 kDa estaria relacionada ao processo fisiopatológico da Doença de Graves e a presença desta reação poderia apontar para um marcador sérico.

A existência de deposição de material elétron-denso na membrana basal da tiroidite de Hashimoto (KALDERON et al. 1973) e de depósitos de imunocomplexos na membrana basal folicular da doença de Graves (FUJIWARA et al., 1981) necessita ser esclarecida. A presença destes anticorpos anticolágeno IV e antilaminina poderia contribuir para a identificação destes depósitos de membrana basal folicular na doença tiroideana auto-imune

Além das características evidentemente importantes da membrana basal a respeito da morfologia e sustentação dos tecidos, são conhecidas relações específicas entre cada um de seus componentes e as células adjacentes. Assim, LI & CHEUNG (1992) investigaram o efeito da membrana basal na adesão, migração e proliferação linfocitária e, para tal, utilizaram como modelo o "matrigel", que se mostrou bioquímica, estrutural e biologicamente semelhante à membrana basal normal. Concluíram que esta serve como substrato para a adesão linfocitária durante o extravasamento, tem um efeito haptocinético na migração e modula a ativação linfocitária. A entactina é o elemento indutor da adesão

linfocitária mais firme, sobretudo em relação ao mesmo efeito exercido por fibronectina, laminina e colágeno IV.

Por outro lado, a laminina é o componente responsável pelo direcionamento da migração linfocitária, de mecanismo de ação desconhecido (KUPIEC-WEGLINSKI & DE SOUZA, 1991), promovendo migração de diferentes tipos celulares "in vitro", sendo importante no desenvolvimento neurológico (SEPHÉL et al., 1989) e metástase tumoral (IWAMOTO et al., 1987). Neste sentido, HERSKOVIZ et al. (1992) mostraram que a ativação das células T aumenta sua adesão à fibronectina e laminina e o CD4 pode regular a fraca adesão entre receptores de VLA, uma integrina que serve de intermediária neste processo e componentes da membrana extracelular. A ativação linfocitária aumenta sua adesão à fibronectina, laminina e colágeno IV e mais intensamente à entactina, imputando-se à membrana basal papel importante no extravasamento linfocitário (LI & CHEUNG, 1992).

Seria apropriado levantar a hipótese sobre o envolvimento da laminina e colágeno IV, entre outros elementos da membrana basal folicular, influenciando no direcionamento, adesão e ativação do infiltrado linfoplasmocitário presente na doença tiroideana auto-imune. Estes anticorpos anticolágeno IV e antilaminina poderiam, talvez, realizar função de citotoxicidade, ou outro tipo de efeito lesivo à membrana basal, lembrando o caminho sugerido por KAWAI et al. (1993) quando ressaltam a destruição do epitélio folicular decorrente do infiltrado linfocitário como um fator inicial na Doença de Basedow-Graves. Há ainda a pesquisa do grupo de CHIOVATO et al. (1993), que detectou e quantificou os anticorpos citotóxicos anti-tiróide mediados por complemento, relatando que estes não são os responsáveis primários pela lesão inicial do tecido tiroideano, apenas desempenhando papel na manutenção do processo de destruição tiroideana após o rompimento do folículo normal por mecanismos outros. Um estudo morfológico observando especificamente os

componentes da membrana basal auxiliaria no entendimento da sua relação histopatológica com o infiltrado linfocitário.

Segundo KATOH et al. (1993), apesar de progresso considerável estar ocorrendo nos últimos anos em relação ao esclarecimento sobre a composição e a estrutura da membrana basal, pouco se conhece sobre suas alterações estruturais em processos de doença e o modo como estas anormalidades influenciam em suas funções. Mais especificamente, pouquíssima atenção tem sido dispensada à distribuição das proteínas da membrana basal nas doenças tiroideanas. MIETTINEN & VIRTANEN (1984) e CHARPIN et al. (1985) detectaram morfologicamente a laminina de tumores tiroideanos em humanos e KENDALL et al. (1985) examinaram a distribuição de colágeno IV e laminina em tumores foliculares de tiróide.

KATOH et al. (1993) utilizando técnica de imuno-histoquímica para a observação de componentes específicos da membrana basal tiroideana, colágeno IV, laminina e heparan sulfato de proteoglicano na doença de Basedow-Graves, tiroidite de Hashimoto, bócio adenomatoso, adenoma folicular, carcinomas folicular, papilífero, anaplásico e medular, demonstraram membrana basal epitelial linear envolvendo os folículos, acompanhados por membrana basal vascular formando "laçadas" em tiróide normal, de doença de Graves e bócio adenomatoso. A membrana basal de tiroidite de Hashimoto foi referida como escassa e de distribuição descontínua, como provável resultado de destruição folicular. O estudo enfocou sobretudo as neoplasias benignas e malignas, concluindo que as alterações da membrana basal nas doenças tiroideanas espelhariam suas variações de arquitetura, presumivelmente em conexão com sua função e/ou comportamento biológico.

Realizamos, inicialmente, o estudo morfológico da membrana basal das doenças tiroideanas através da coloração pelo PAS, o que se mostrou pouco elucidativo devido à inespecificidade deste método na identificação da membrana

basal (dados não apresentados). Assim, o ácido periódico reagindo com os polissacarídeos converte-os em compostos aldeídicos de alto peso molecular e o reagente de Schiff, ácido fucsina-sulfuroso, oxida os polissacarídeos do tecido em polialdeídos, que são intensamente corados (HOTCHKISS, 1948). O método do PAS cora, portanto glicoproteínas em geral e não necessariamente, apenas membrana basal, não havendo, desta forma, individualização de nenhum de seus elementos (BARSKY et al., 1983). No entanto, o emprego da imunohistoquímica e utilização de anticorpos anticolágeno IV e antilaminina identifica regiões distintas da membrana basal nos vários estados patológicos, lâmina densa e lúcida, respectivamente (YAOITA, FOIDART, KATZ, 1978) e observação de sua estrutura (KATOH et al., 1993).

Em procedimentos imuno-histoquímicos, para a demonstração de componentes de membrana basal em tecido parafinado, é fundamental a realização de digestão enzimática com pepsina. A explicação deste mecanismo permanece desconhecida, havendo a hipótese de a pepsina possuir a capacidade de solubilizar porções do colágeno IV e laminina, expondo os sítios antigênicos anteriormente mascarados pela fixação em formalina. BARSKY et al. (1984) descrevem que, após o tratamento enzimático, a laminina exhibe coloração pouco mais intensa que o colágeno IV, fato observado também em nosso estudo.

Mais recentemente, MCKEE, HOBBS, HALL (1993) demonstraram que a irradiação de micro-ondas melhora a recuperação de antígenos, diminuindo o limiar de detecção destes após desparafinação e hidratação dos cortes, mas sem existir explicação definitiva para este fenômeno curioso. A irradiação de micro-ondas aumenta a intensidade da coloração por imunoperoxidase especialmente de anticorpos contra antígenos de membrana (VAN VLIJMEN-WILLEMS & VAN ERP, 1993).

A análise da imunocoloração na tiróide dos pacientes estudados mostrou espessamento da membrana basal epitelial no adenoma tóxico, sugerindo

ser decorrente de fatores intrínsecos das células tumorais hiperfuncionantes, provavelmente sem ligação com o estado de hipermetabolismo, pois na Doença de Basedow-Graves a membrana basal folicular mostrava-se semelhante à da tiróide normal e até mesmo adelgada, sobretudo quando em contacto com o infiltrado inflamatório.

O estado hipermetabólico celular encontrado na Doença de Basedow-Graves, poderia levar à liberação de elementos da membrana basal folicular para o sangue periférico e conseqüente resposta imunológica com produção de anticorpos anticolágeno IV e antilaminina. No entanto, interessantemente, estes anticorpos não foram detectados no soro de pacientes com adenoma tóxico, fato que seria perfeitamente aceitável, pois neste processo patológico também existe hipertiroidismo; além disso, dados disponíveis na literatura indicam que a elevação dos níveis de colágeno IV e laminina no soro de hipertiroideos decorre de ativação geral do metabolismo dependente dos níveis de hormônios tiroideanos. Contrariamente ao encontrado na doença de Basedow-Graves, ao analisarmos a tiróide dos pacientes com o adenoma, não observamos áreas de adelgaçamento da membrana basal epitelial e sim, de espessamento. Não acreditamos que estas observações sejam devidas à terapêutica, pois os pacientes com ambas as doenças estavam sob esquema de tratamento com os mesmos medicamentos. Estes aspectos divergentes entre estes dois processos patológicos tiroideanos cursando com hiperfunção, sugerem que alterações metabólicas semelhantes interfeririam de modo diferente em termos de equilíbrio da membrana basal.

Um ponto importante observado neste trabalho consiste na manutenção da integridade da membrana basal quando evidenciados colágeno IV e laminina em Doença de Basedow-Graves, inclusive em áreas de intenso infiltrado linfoplasmocitário e adelgaçamento da membrana. Na Tiroidite de Hashimoto, mesmo nos folículos remanescentes, não observamos áreas de

adelgaçamento da membrana tão frequentes, mesmo quando em contacto com o infiltrado inflamatório ou tecido conjuntivo fibroso. A integridade da membrana basal folicular, nestes casos, manteve-se preservada, ao contrário da descrição de KATOH et al. (1993), que refere descontinuidade da mesma em seu material de estudo.

Aspecto semelhante evidenciado pela imuno-histoquímica em nossos pacientes havia sido descrito por KALDERON & BOGAARS (1977) através de microscopia eletrônica. Tais autores constataram adelgaçamento da membrana basal na tiróide de Graves, mas esta mantinha-se íntegra inclusive na Tiroidite de Hashimoto.

KALDERON et al. (1977) estudando galinhas de linhagem obesa, "OS", observaram que a tiroidite auto-imune hereditária espontânea destes animais iniciava-se com infiltrado linfoplasmocitário, adelgaçamento e aspecto mal definido da membrana basal, evoluindo para infiltrado intenso, depósitos elétron-densos na membrana basal totalmente adelgada e muitas vezes fragmentada destes folículos. Tais dados são compatíveis com os achados em humanos (KALDERON et al., 1973), contudo um enfoque sobre a relação entre o infiltrado linfoplasmocitário na doença tiroideana auto-imune e elementos específicos da membrana basal não é de nosso conhecimento.

Na doença tiroideana auto-imune o infiltrado interfolicular compõe-se, predominantemente, de linfócitos e plasmócitos, identificando-se IgG. Os centros germinativos são semelhantes aos gânglios linfáticos na questão morfológica e imuno-histológica (KNECHT, SAREMASLANI, HEDINGER, 1981).

Considerando-se que os linfócitos intratiroideanos na doença tiroideana auto-imune produzem os TSHR-Ab (MC LACHLAN et al., 1986), os anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina (MC LACHLAN et al., 1979) e os anticorpos citotóxicos antitiróide (CHIOVATO et al., 1993), pode-se inferir que

haveria uma "co-existência pacífica" destes anticorpos com a membrana basal, pois em nenhum dos casos estudados observou-se rompimento dela quando em contacto com o infiltrado linfoplasmocitário ou centro germinativo. O fato de encontrarmos anticorpos anticolágeno IV e antilaminina envolvidos na doença de Basedow-Graves indica que, provavelmente, elementos da membrana basal podem ser reconhecidos como componentes antigênicos no processo fisiopatológico da doença tiroideana auto-imune. Estes resultados indicam a necessidade de estudarmos as propriedades biológicas destes anticorpos antimembrana basal na doença tiroideana auto-imune.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES:

- 1) A pesquisa de anticorpo sérico anticolágeno IV em pacientes com tireoideopatias foi realizada através da utilização de “immunoblot”. Demonstrou fixação de anticorpos com peptídeos do colágeno IV apenas na doença de Basedow Graves.
- 2) A presença dos anticorpos anticolágeno IV não se correlacionou aos níveis de hormônios tiroideanos ou de anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina.
- 3) O estudo similar para a detecção de anticorpo sérico antilaminina demonstrou atividade específica no soro de pacientes com doença de Basedow-Graves na fração protéica de 57 kDa da laminina. Não foi verificada relação entre níveis de hormônios tiroideanos e de anticorpos antimicrosomal e antitiroglobulina.
- 4) Estes auto-anticorpos podem estar envolvidos, de alguma forma, com a fisiopatologia auto-imune e não com o estado hipermetabólico, visto que não foram identificados nos soros de pacientes hipertiroídeos por outras causas.

- 5) Os aspectos morfológicos fornecidos pela técnica de imuno-histoquímica demonstraram semelhança quanto à intensidade de reação e localização de colágeno IV e laminina na membrana basal folicular de tiróide normal, doença de Basedow-Graves e tiroidite de Hashimoto.
- 6) A análise imuno-histoquímica do adenoma tóxico possibilitou a demonstração de espessamento da membrana basal folicular, no que diz respeito a colágeno IV e laminina, indicando, provavelmente, tratar-se de característica própria da célula adenomatosa.
- 7) Na doença de Basedow-Graves a membrana basal epitelial esteve adelgada quando em contacto com infiltrado linfoplasmocitário ou centro germinativo, mas sem apresentar áreas de interrupção nas estruturas observadas.
- 8) Na tiroidite de Hashimoto a continuidade da membrana basal epitelial foi mantida, observando-se áreas de adelgaçamento mais discreto, apesar de infiltração linfocitária ou tecido conjuntivo fibroso, ao contrário de referências obtidas da literatura.
- 9) Na doença tiroideana auto-imune, os estudos morfológicos da membrana basal folicular não demonstraram sua interrupção, apesar da presença de intenso infiltrado linfoplasmocitário.
- 10) Os dados obtidos até o presente levaram-nos a questionar a participação dos anticorpos antitiroperoxidase, antitiroglobulina, anti-receptor de TSH, citotóxicos, anti-membrana basal e outros fatores implicados, na

determinação de alterações estruturais significativas da membrana basal folicular na doença tiroideana auto-imune.

11) Finalmente, com a demonstração de anticorpos contra as frações de 208, 180, 162, 135, 102, 87, 68 e 60 kDa do colágeno IV e mais especificamente de 57 kDa da laminina, tornar-se-á necessário o estudo de suas propriedades biológicas e possível participação como marcadores sorológicos na fisiopatologia da doença tiroideana auto-imune.

SUMMARY

7- SUMMARY

The purpose of the present study is to evaluate serological and morphologic aspects concerning the basement membrane (BM) of the thyroid follicle in autoimmune thyroid disease (ATD). In this way, new elements for a better understanding of its pathophysiology could be suggested.

In order to detect antibodies to collagen IV and laminin, two major components of the BM, serological tests of patients with the diagnosis of different thyroid diseases were performed by the transfer electrophoresis method followed by immunoblot.

Only in the Basedow-Graves' disease antibodies to various collagen IV fractions were detected. Also, antibodies to laminin were found in these patients' sera, detected by recognition of the 57 kDa fraction of laminin. These antibodies are probably involved in the pathogenesis of ATD and are not just consequence of hypermetabolic states due to hyperthyroidism, since no antibodies could be detected in thyroid hyperfunction caused by benign thyroid neoplasia.

Production of such antibodies could be attributed to or cause BM alterations as a consequence of disturbed immunological tolerance to their components, which are otherwise recognized as self, and induction of immunologic response. If this is true, immunohistochemical staining of collagen IV and laminin could be useful in detecting follicle BM

disruption in ATD. Our results do not corroborate this hypothesis, since we were not able to find BM alterations in thyroid diseases, even in areas of heavy lymphoplasmatic inflammation. Finding of focal BM thinning, mainly in Graves' disease, could be preliminarily explained by hypermetabolism, delivery of collagen IV and laminin to the circulation and induction of antibody production against them. This hypothesis, however, is not corroborated by the findings in toxic adenoma, another cause of hyperthyroidism, in which BM thinning is not present. In Hashimoto thyroiditis, in disagreement with previously reported data, no disruption, nor significant BM thinning were seen.

The pathogenetic role of these antibodies is not yet clear, but it does not seem that they cause follicular BM damage. Further investigations are needed to characterize biologically such antibodies and to understand their relationship to follicular BM in ATD.

ANEXO

8- ANEXO

8.1- ABREVIATURAS:

- *AMP*: adenosina mono-fosfato
- *EDTA*: etileno-diamino-tetra-acético
- *EHS, tumor de*: tumor de Engelbreth-Holm-Swarm
- *IgG*: imunoglobulina do isotipo G
- *kDa*: unidade de peso molecular Dalton. 1 kDa = 1000 daltons
- *LAPE*: Laboratório de Patologia Experimental
- *LATS*: "long-acting thyroid stimulator"
- *LICA*: Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia
- *MB*: membrana basal
- *MBF*: membrana basal folicular
- *PAS*: ácido periódico de Schiff
- *PBS*: solução salina tamponada
- *SDS*: duodecil sulfato de sódio
- *T3*: triiodotironina
- *T4L*: tetraiodotironina livre
- *TPO*: tiroperoxidase
- *TRIS*: tris[hidro-metil]amino-acético
- *TSH*: tirotrofina, hormônio estimulador da tiróide

- *TSHR*: receptor de TSH
- *TSHR-Ab*: anticorpo anti-receptor de TSH
- *TSHR-Ab S*: anticorpo anti-receptor de TSH de ação estimuladora
- *TSHR-Ab B*: anticorpo anti-receptor de TSH de ação bloqueadora
- *TSH-us*: ensaio ultra-sensível para dosagem do TSH

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADAMS, D.D.- Pathogenesis of the hyperthyroidism of Graves' disease. *Br. Med. J.*, 1:1015, 1965.
- ADAMS, D.D. & PURVES, H.D.- The role of thyrotropin in hyperthyroidism and exophthalmos. *Metabolism*, 6:26, 1957.
- AUMAILLEY, M.; WIEDEMANN, H.; MANN, K.; TIMPL, R.- Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.*, 184:241, 1989.
- BABEL, W. & GEANVIELE, R.W.- Structure of human basement membrane (type IV) collagen. *Eur. J. Biochem.*, 143:545, 1984.
- BAILEY, A.J.; SIMS, T.J.; DUANEL, V.C.; LIGHT, N.D.- Partial characterization of a second basement membrane collagen in human placenta. *FEBS Lett.*, 99:361, 1979.
- BANGA, J.P.; PRYCE, G.; HAMMOND, L.; ROITT, I.M.- Structural features of autoantigens involved in thyroid autoimmune disease: the thyroid microsomal/microvillar antigen. *Mol. Immunol.*, 22:629, 1985.

- BARSKY, S.H.; RAO, N.C.; RESTREPO, C.; LIOTTA, L.A.- Immunocytochemical enhancement of basement membrane antigens by pepsin: applications in diagnostic pathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 82:191,1984.
- BARSKY, S.H.; SIEGAL, G.P.; JANNOTTA, F.; LIOTTA, L.A.- Loss a basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab. Invest.*, 49:140,1983.
- BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J.- Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB*, 4: 148, 1990.
- BERNARD, A.M.; LAUWERYS, R.; MATHIEU, P.; FOIDART, J.M.- Anti-basement membrane antibodies in the serum of healthy subjects. *N. Engl. J. Med.*, 314: 1456,1986.
- BERNARD, A.M.; ROELS, H.R.; FOIDART, J.M., LAUWERYS, R.L.- Search for anti-laminin antibodies in the serum of workers exposed to cadmium, mercury vapour or lead. *Int. Arch. Occu. Env. H.*, 59:303,1987.
- BOGNER, U.; KOTULLA, P.; PETERS, H.; SCHEUSENER, H.- Thyroid peroxidase/microsomal antibodies are not identical with thyroid cytotoxic antibodies in autoimmune thyroiditis. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 123: 431,1990.
- BOSMANN, F.T.; CLEUTJENS, J.; BECK, C.; HAVENITH, M.- Basement membrane heterogeneity. *Histochem. J.*, 21:629,1989.

- BRYANT, G.; RAO, C.N.; BRENTANI, M.M.; MARTINS, W.; LOPES, J.D.; MARTIN, S.E.; LIOTTA, L.A.; SCHIFFMANN, E. A role for the laminin receptor in leukocyte chemotaxis. *J. Leu. Biol.*, 41: 220, 1987.
- BURMAN, K.D. & BAKER J.R., JR.- Immune mechanisms in Graves' disease. *Endocr. Rev.*, 6:183, 1985.
- BUTKOWSKI, R.; WIESLANDER, J.; WISDOM, B.J.; BARR, J.F.; NOELKEN, M.; HUDSON, B.G.- Properties of the glomerular domain of type IV collagen and its relationship to Goodpasture antigen. *J. Biol. Chem.*, 260:3739, 1985.
- CARLIN, B.; JAFFEE, R.; BENDER, B.; CHUNG, A.E.- Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 256:5209, 1981.
- CHARPIN, C.; KOPF, F.; POURREAU-SCHNEIDER, N.; LISSITZKY, J.C.; SAVAUT, M.N.; MARTIN, P.M.; TOGA, M.- Laminin immunodetection in tumorous and nontumorous disorders of human thyroid. *Bull. Cancer (Paris)*, 72:6, 1985.
- CHIOVATO, L.; BASSI, P.; SANTINI, F.; MAMMOLI, C.; LAPL, P.; CARAYON, P.; PINCHERA, A.- Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:1700, 1993.

- CHIOVATO, L.; VITTI, P.; LOMBARDI, A.; KOHN, L.D.; PINCHERA, A.-
Expression of the microsomal antigen on the surface of continuously
cultured rat thyroid cells is modulated by thyrotropin. *J. Clin.
Endocrinol. Metab.*, 61:12,1985.

- CHUNG, A.E.; JAFFE, R.; FREEMAN, I.L.; VERGNES, J.P.; BRAGIUSKI,
J.E.; CARLIN, B.- Properties of a basement membrane related
glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-
derived line. *Cell*, 16:277,1979.

- COCHRANE, C.G.- Mediation systems in neutrophil-independent immunologic
injury of the glomerulus. In: *Contemporary Issues in Nephrology*, ed.
Wilson, C.B.; Frenner, B.M.; Stein, J.H., New York, Churchill-
Livingstone, 1979, p. 106.

- COPENHAVER, W.M.; BUNGE, R.P.; BUNGE, M.B.- In: *Bailey's textbook
of Histology*, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1971.

- CROUCH, E.; SAGE, H.; BORNSTEIN, P.- Structural basis for apparent
heterogeneity of collagens in human basement membranes: type IV
procollagen contains two distinct chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
77:745,1980.

- CZARNOCKA, B.; RUF, J.; FERRAND, M.; CARAYON, P.- Antigenic
relationship between thyroid peroxidase and the microsomal antigen
involved in thyroid autoimmune diseases. *C. R. Acad. Sci. Paris*,
300:577,1985a.

- CZARNOCKA, B.; RUF, J.; FERRAND, M.; CARAYON, P.; LISSITZKY, S.-
Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the
microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. **FEBS
Lett.**, 190:147,1985b.

- DE BLAS, A.L. & CHERWINSKI, H.M.- Detection of autoantigens on
nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. **Anal.
Biochem.**, 133:214,1983.

- DEUTZMANN, R.; AUMAILLEY, M.; WIEDEMANN, H.; PISNY, W.;
TIMPL, R.; EDGAR, D.- Cell adhesion, spreading and neurite stimulation
by laminin fragment E8 depends on the maintenance of secondary and
tertiary structure in its rod and globular domain. **Eur. J. Biochem.**,
191:513,1990.

- DIXIT, S.N. & GLANVIELE, R.W.- Isolation and characterization of pepsin
solubilized basement membrane collagens (type IV) from human placenta,
bovine kidney cortices, and bovine lens capsule. In: **Immunochemistry of
the extra-cellular matrix**, ed. Furthmayr, H., Florida, CRC Press, Inc.,
vol. I, 1982, p. 61.

- DONIACH, D.- Thyroid autoimmune disease. **J. Clin. Pathol.**, 20: 385,1967.

- DONIACH, D. & ROITT, I.M.- Auto-immunity in Hashimoto's disease and its
implications. **J. Clin. Endocrinol.**, 17:1293,1957.

- DREXHAGE, H.A.; BOTTAZZO, G.F.; DONIACH, D.; BITENSKY, L.; CHAYEN, J.- Evidence for thyroid-growth-stimulating immunoglobulins in some goitrous thyroid disease. *Lancet*, ii: 287,1980.
- DURKIN, M.E.; CHAKRAVARTI, S.; BARTOS, B.B.; LIU, S-H.; FRIEDMANN, R.L.; CHUNG, A.E.- Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor. *J. Cell. Biol.*, 107:2749,1988.
- DURON, F.; TALBOT, J.N.; FERON, R.; AUBERT, P.; MILHAUD, G.- Clinical value of thyrotropin binding inhibiting immunoglobulins (TBII) assay in hyperthyroidism. *Biomed. Pharmacother.*, 41:383,1987.
- EDGAR, D.; TIMPL, R.; THOENEM, H.- The heparan-binding domain of laminin is responsible for its effect on neurite out growth and neuronal survival. *EMBOJ*, 3:1463,1984.
- ENDO, K.; KASAGI, K.; KONISHI, J.- Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46:734,1978.
- ENGEL, G.; ODERMATT, E.; ENGEL, A.; MADRI, J.A.; FURTHMAYR, H.; ROHDE, H.; TIMPL, R.- Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extra-cellular matrix. *J. Mol. Biol.*, 150:97,1981.

- FARQUHAR, M.G.- The glomerular basement membrane: a selective macromolecular filter.- In: **Cell Biology of Extracellular Matrix**. Hay, ED, ed, Plenum, New York, pp.335-378, 1981.
- FATOURECHI, V.; MC CONAHEY, W.M.; WOOLNER, L.B.- Hyperthyroidism associated with histologic Hashimoto's thyroiditis. **Mayo Clin. Proc.**, 46:682, 1971.
- FENZI, G.F.; BARTALENA, F.; CHIOVATO, L.; MARCOCCI, C.; ROTELLA, C.M.; ZONEFRATI, R.; TOCAFONDI, R.; PINCHERA, A.- Studies on thyroid cells surface antigens using cultured human thyroid cells. **Clin. Exp. Immunol.**, 47:336, 1982.
- FOIDART, J.M.; TIMPL, R.; FURTHMAYR, H.; MARTIN, G.R.- Laminin, a glycoprotein from basement membranes. In: **Immunochemistry of the extra-cellular matrix**, ed. Furthmayr, H., Florida, CRC Press, Inc., vol. I, 1982, p. 125.
- FORBES, I.J.; ROITT, I.M.; DONIACH, D.; SOLOMON, I.L.- The thyroid cytotoxic antibody. **J. Clin. Invest.**, 41:996, 1962.
- FUJIWARA, S.; WIEDEMANN H.; TIMPL, R.; LUSTIG, A.; ENGEL, J.- Structure and interactions of heparan sulfate proteoglycans from a mouse tumor basement membrane. **Eur. J. Biochem.**, 143:145, 1984.
- GAZZINELLI, R.; GALVÃO, L.M.C.; DIAS, J.C.P.; GAZZINELLI, G.; BRENER, Z.- Anti-laminin and specific antibodies in acute Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82:574, 1988.

- GRESSNER, A.M.; TITTOR, W.; KROPF, J.- The predictive value of serum laminin for portal hypertension in chronic liver diseases. *Hepato-Gastroenterology*, 35:95,1988.
- HAMADA, N.; GRIMM, C.; MORI, H.; DE GROOT, L.J.- Identification of a thyroid microsomal antigen by Western blot and immunoprecipitation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61:120,1985.
- HAMADA, N.; ITO, K.; MIMURA, T.; ISHICAWA, N.; MOMOTANI, N.; NOH, J.; HOSODA, Y.; MORI, H.- Retrospective reevaluation of the significance of thyroid microsomal antibody in the treatment of Graves disease. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 114:328,1987.
- HASHIMOTO, H.- Zur Kenntnis der lymphoematischen Veraenderungen der Schilddrüse (Struma lymphomatosa). *Arch. f. klin. Chir.*, 97:219,1912.
- HERSHKOVIZ, R.; MIRON, S.; COHEN, I.R.; MILLER, A.; LIDER, O.- T lymphocyte adhesion to the fibronectin and laminin components of the extracellular matrix is regulated by the CD4 molecule. *Eur. J. Immunol.*, 22:7,1992.
- HOTCHKISS, D.H.- A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 16:131,1948.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H.- Use of avidin-biotin- peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between

- ABC and unlabelled antibody (PAP) procedure. *J. Histochem. Cytochem.*, 29:557,1981.
- HUARD, T.K.; MALINOFF, H.L.; WICHA, M.S.- Macrophages express a plasma membrane receptor for basement membrane laminin. *Am. J. Pathol.*, 123:365,1986.
 - HYNES, R.O. & YAMADA, K.M.- Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell. Biol.*, 95:369,1982.
 - ILICKI, A.; GAMSTEDT, A., KARLSSON, F.A.- Hyperthyroid Graves' disease without detectable thyrotropin receptor antibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74:1090,1992.
 - INOUE, S.- Ultrastructure of basement membrane. *Int. Rev. Cytol.*, 117:57,1989.
 - INOUE, S. & LEBLOND, C.P.- Three-dimensional network of cords: the main component of basement membrane. *Am. J. Anat.*, 181:341,1988.
 - INUI, T.; OCHI, Y.; WEN, C.; NAKAJIMA, Y.; KAJITA, Y.- Increased serum concentrations of type IV collagen peptide and type III collagen peptide in hyperthyroidism. *Clin. Chim. Acta*, 205:181,1992.
 - IWAMOTO, Y.; ROBEY, F.A.; GRAF, J. SASAKI, M.; KLEINMANN, H.K.; YAMADA, Y.; MARTIN, G.R.- YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science*, 238:1132,1987.

- KAJITA, Y.; MORGAN, D.; PARKES, A.B.; SMITH, B.R.- Labelling and immunoprecipitation of thyroid microsomal antigen. *FEBS Lett.*, 187:334,1985.
- KALDERON, A.E. & BOGAARS, H.A.- Immune complex deposits in Graves'disease and Hashimoto's thyroiditis. *Am. J. Med.*, 63:729,1977.
- KALDERON, A.E.; BOGAARS, H.A.; DIAMOND, I.- Ultrastructural alterations of the follicular basement membrane in Hashimoto's thyroiditis: report of eight cases with basement membrane deposits. *Am. J. Med.*, 55:485,1973.
- KATOH, R.; MURAMATSU, A.; KAWAOI, A.; KOMIYAMA, A.; SUZUKI, K.; HEMMI, A.; KATAYAMA, S.- Alteration of the basement membrane in human thyroid diseases: an immunohistochemical study of type IV collagen, laminin and heparan sulphate proteoglycan. *Virch. Archiv. A. Pathol. Anat.*, 423:417,1993.
- KAWAI, K.; TAMAI, H.; MORI, T.; MORITA, T.; MATSUBAYASHI, S.; KATAYAMA, S.; KUMA, K.; KUMAGAI, L.F.- Thyroid hystology of hyperthyroid Graves' disease with undetectable thyrotropin receptor antibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:716,1993.
- KEFALIDES, N.A.; OHNO, N.; WILSON, C.B.; FILLIT, H.; ZABRISKI, J.; ROSENBLOOM, J.- Identification of antigenic epitopes in type IV collagen by use of synthetic peptides. *Kid. Int.*, 43:94,1993.

- KEFALIDES, N.A.; PEGG, M.T.; OHNO, N.; POON-KING, T.; ZABRISKIE, J.; FILLIT, H.- Antibodies to basement membrane collagen and to laminin are present in sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, 163:588,1986.
- KENDALL, C.H.; SANDERSON, P.R.; COPE, J.; TALBOT, I.C.- Follicular thyroid tumors: a study of laminin and type IV collagen in basement membrane and endothelium. *J. Clin. Pathol.*, 38:100,1985.
- KHOURY, E.L.; BOTTAZZO, G.F.; ROITT, I.- The thyroid microsomal antibody revisited: its paradoxal binding "in vitro" to the apical surface of the follicular epithelium. *J. Exp. Med.*, 199:577,1984.
- KHOURY, E.L.; HAMMOND, L.; BOTTAZZO, G.F.; DONIACH, D.- Presence of organ-specific "microsomal" autoantigen on the surface of human thyroid cells in culture its involvement in complement-mediated cytotoxicity. *Cli. Exp. Immunol.*, 45:316,1981.
- KITE, J.H.; ROSE, N.R.; KANO, K.; WITTEBSKY, E.- Citotoxicity of human thyroid autoantibodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 124:626,1965.
- KLEINMAN, H.; KLEBE, K.R.J.; MARTIN, G.R.- Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell. Biol.*, 88:473,1981.
- KLEPPEL, M.; MICHAEL, A.; FISH, A.- Antibody specificity of human glomerular basement membrane type IV collagen NC-1 subunits. *J. Biol. Chem.*, 261:16547,1986.

- KLINCK, G.H.; OERTEL, J.E.; WINSHIP, T.- Ultrastructure of normal human thyroid. *Lab. Invest.*, 22:2,1970.
- KNECHT, H.; SAREMASLANI, P.; HEDINGER, C.- Immunohistological findings in Hashimoto's thyroiditis, focal lymphocitic thyroiditis and thyroiditis de Quervain. Comparative study. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]*, 393:215,1981.
- KOFFLER, D. & FRIEDMAN, A.H.- Localization of immunoglobulins in chronic thyroiditis. *Lab. Invest.*, 13:239,1964.
- KOSUGI, S.; BAN, T.; KAMIZU, T.; KOHN, L.D.- Identification of separate determinants on the thyrotropin receptor reactive with Graves'thyroid-stimulating antibodies and with thyroid-stimulating blocking antibodies in idiopathic mixedema: these determinants have no homologous sequence on gonadotropin receptors. *Mol. Endocrinol.*, 6:168,1992.
- KRESINA, T.F. & MILLER, E.J.- Isolation and characterization of basement membrane collagen from human placental tissue. Evidence for the presence of two genetically distinct chains. *Biochemistry*, 18:3089,1979.
- KRISS, J.P.; PLESHAKOV, V.; CHIEN, J.R.- Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial mixedema. *J. Clin. Endocrinol.*, 24:1005,1964.
- KROPF, J.; GERSSNER, A.M.; JOSEPH, K.- Increased laminin concentrations in serum in hyperthyroidism. *Clin. Chem.*, 35:1540,1989.

- KUPIEC-WEGLINSKI, J.M. & DE SOUZA, M.- Lymphocyte traffic is modified "in vivo" by anti-laminin antibody. *Immunology*, 72:312,1991.
- LAEMMLI, U.K.- Cleavage of structural protein during the assembly of the basal of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680,1970.
- LEBLOND, C.P.; GLEGG, R.E.; EIDINGER, D. Presence of carbohydrates with free 1,2-glycol groups in sites stained by the periodic acid-Schiff technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 5:445,1957.
- LEBLOND, C.P. & LAURIE, G.W.- Morphological features of connective tissues. *Reumathology*, 10:1,1986.
- LERNER, A.R.; GLASSOK, R.G.; DIXON, F.J.- The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, 126:989,1967.
- LI, Y-Y. & CHEUNG, H.T.- Basement membrane and its components on lymphocyte adhesion, migration and proliferation. *J. Immunol.*, 149:3174,1992.
- LIKE, A.A.; APPEL, M.C.; ROSSINI, A.A.- Autoantibodies in the BB/W rat. *Diabetes*, 31:816,1982.
- LIOTTA, L.A.- Tumor invasion and metastases: role of basement membrane. *Am. J. Pathol.*, 107:339,1984.

- LIOTTA, L.A.; RAO, C.N.; WEWER, U.M.- Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu. Rev. Bioch.*, **55**:1037,1986.
- LOPES, J.D.; REIS, M.; BRENTANI, R.R.- Presence of laminin receptors in "Staphylococcus aureus". *Science*, **229**:275,1985.
- MAAGOE, H.; REINTOFT, I.; CHRISTENSEN, H.E.; SIMONSEN, J.; MOGENSEN, E.F.- Lymphocytic thyroiditis. I. Correlations between morphological, immunological and clinical findings. *Acta Med. Scand.*, **201**:299,1977.
- MALLORY, F.B.- In: *Pathological technique*, Philadelphia, WB Saunders CO, 1938, p. 434, p.165-167.
- MANN, K.; DEUTZMANN, M.; AUMAILLEY, M.; TIMPL, R.; RAIMOND, L.; YAMADA, Y.; PAN, T.; CONWAY, D.; CHU, M-L.- Aminoacid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV, and cells. *EMBO*, **8**:65,1989.
- MARIOTTI, S.; PINCHERA, A.; MARCOCCI, C.; VITTI, P., URBANO, C.; CHIOVATO, L.; TOSI, M.; BASCHIERI, L.- Solubilization of human thyroid microsomal antigen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**:207,1979.
- MARTIN, G.R. & TIMPL, R.- Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **3**:57,1987.

- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. & AMENTA, P.S.- The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.*, 48:656,1983.
- MC CLUGAGE, S.G.; LOW, F.N.; ZIMNY, M.L.- Porosity of basement membrane overlying Peyer's patches in rats and monkeys. *Gastroenterology*, 91:1128,1986.
- MC CONAHEY, W.M. - The autonomously functioning thyroid nodule. In: *The Thyroid. A fundamental and clinical text*, ed. Ingbar, S.H.; Braverman, L.E., Philadelphia, J.B. Lippincott,1986, p. 1077.
- MC KAY, I.R. & BURNETT, F.M.- Autoimmune disease: Experimental and clinical. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 55:619,1962.
- MC KEE, P.H.; HOBBS, C.; HALL, P.A.- Antigen retrieval by microwave irradiation lowers immunohistological detection thresholds. *Histopathology*, 23:377,1993.
- MC LACHLAN, S.M.; MC GREGOR, A.; REES SMITH, B.; HALL, R.- Thyroid-autoantibody synthesis by Hashimoto thyroid lymphocytes. *Lancet*, ii 1029:162,1979.
- MC LACHLAN, S.M.; PEGG, C.A.S.; ATHERTON, M.C.; MIDDLETON, S.M.; CLARK, F.; REES SMITH, B.- TSH receptor antibody synthesis by thyroid lymphocytes. *Clin. Endocrinol.*, 24:223,1986.

- MC LACHLAN, S.M. & RAPOPORT, B.- The molecular biology of thyroid peroxidase: cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocr. Rev.*, 13:192,1992.
- MC MANUS, J.F.A. & MOWRY, R.W.- Sulfuric acid hematoxylin stain for basement membranes. *Lab. Invest.*, 1:208,1952.
- MIETTINEN, M. & VIRTANEN, I.- Expression of laminin in thyroid gland and thyroid tumors: an immunohistologic study. *Int. J. Cancer*, 34:27,1984.
- MORI, T. & KRISS, J.P.- Measurements by competitive binding radioassay of serum anti-microsomal and anti-thyroglobulin antibodies in Graves' disease and other thyroid disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33:688,1971.
- NAGAYAMA, Y. & RAPOPORT, B.- The thyrotropin receptor twenty five years after its discovery: new insights following its molecular cloning. *Mol. Endocrinol.*, 6:145,1992.
- OERTEL, J.E. & LI VOLSI, V.A.- Pathology of thyroid Diseases. In: *The Thyroid. A fundamental and clinical text*, ed. Ingbar, S.H.; Braverman, L.E., Philadelphia, J.B. Lippincott, 1986, p. 651.
- OKAMOTO, T.; FUJIMOTO, Y.; OBARA, T.; ITO, Y.; AIBA, M.- Retrospective analysis of prognostic factors affecting the thyroid functional status after subtotal thyroidectomy for Graves'disease. *World J. Surg.*, 16:690,1992.

- OKAMOTO, Y.; HAMADA, N.; FUJISAWA, T.; NOH, J.; YAMAKAWA, J.; OHNO, M.; ITO, K.; MORII, H.- Why no simple relationship between thyroid peroxidase activity-inhibiting immunoglobulins and thyroid function in autoimmune disease? *Acta Endocrinol. (Copenh)*, **124**:442, 1991.
- OKAMOTO, Y.; HAMADA, N.; SAITO, H.- The peroxidase activity-inhibiting immunoglobulins in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **68**:730, 1989.
- ORKIN, R.W.; GEHRON, P.; MC GOODWIN, E.B.; MARTIN, G.R.; VALENTINE, T.; SWARM, R.- A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J. Exp. Med.*, **145**:204, 1977.
- PANAYOTOU, G.; END, P.; AUMAILLEY, M.; TIMPL, R.; ENGEL, J.- Domains of laminin with growth-factor activity. *Cell*, **56**:93, 1989.
- PASCHKE, R.; VOGG, M.; SWILLENS, S.; USADEL, K.H.- Correlation of microsomal antibodies with the intensity of the intrathyroidal autoimmune process in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**:939, 1993.
- PAULSSON, M.; YURCHENCO, P.D.; RUBEN, G.C.; ENGEL, J.; TIMPL, R.- Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane. *J. Mol. Biol.*, **197**:297, 1987.
- PFALTZ, M. & HEDINGER, C.E.- Abnormal basement membranes structures in autoimmune thyroid disease. *Lab. Invest.*, **55**:531, 1986.

- PINCHERA, A.; FENZL, G.F.; VITTI, P.; CHIOVATTO, L.; BARTALENA, L.; MACCHIA, E.; MARIOTTI, S.- Significance of thyroid antibodies in autoimmunity diseases. In: *Autoimmunity and the thyroid*, ed. Walfish P.G.; Wall J.R.; Volpé R., 1985, p. 139.
- RAPOPORT, B.; GREENSPAN, F.S.; FILETTI, S.; PEPITONI, M.- Clinical experience with a human thyroid cell bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58:332,1984.
- RISTELI, J.; BÄCHINGER, H.P.; ENGEL, J.; FURTHMAYR, H.; TIMPL, R.- 7S collagen characterization of an unusual basement membrane structure. *Eur. J. Biochem.*, 108:239,1980.
- ROITT, I.M.; CAMPBELL, P.N.; DONIACH, D.- The nature of the gamma globulins in lymphadenoid goiter. *Biochem. J.*, 69:248,1958.
- ROITT, I.M.; DONIACH, D.; CAMPBELL, P.N.; VANGHAN HUDSON, E.- Autoantibodies in Hashimoto's disease. *Lancet*, 2:820,1956.
- ROITT, I.M.; LING, N.R.; DONIACH, D.; COUCHMAN, K.G.- The cytoplasmic autoantigen of the human thyroid. I.Immunological and biochemical considerations. *Immunology*, 7:375,1964.
- ROSE, N.R. & WITEBSKY, E. Studies on organ specificity changes in the thyroid glands of rabbit thyroid extracts. *J. Immun.*, 76:417,1958.

- RUF, J.; CZARNOCKA, B.; DE MICCO, C.; DUTOIT, C.; FERRAND, M.; CARAYON, P.- Thyroid peroxidase is the organ-specific "microsomal" autoantigen involved in thyroid autoimmunity. *Acta Endocrinol. (Copenh.) suppl.*, 281:49,1987.
- SALLER, B.; HORMANN, R.; MANN, K.- Heterogeneity of autoantibodies against thyroid peroxidase in autoimmune thyroid disease: evidence against antibodies directly inhibiting peroxidase activity as regulatory factors in thyroid hormone metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 72:188,1991.
- SAUAIA, H. & LAICINE, E.M.- Vertical slab electrophoresis apparatus. *Anal. Biochem.*, 80:125,1977.
- SCHECHTER, G.B. & LOPES, J.D.- Two-site immunoassays for the measurement of serum laminin: correlation with breast cancer staging and presence of auto-antibodies. *Braz. J. Med. Biol. Res.*,23:141,1990.
- SELLERS, E.A.; AWAD, A.G.; SCHËMBAUM, E.- Long-acting thyroid stimulator in Graves' disease. *Lancet*, 2:335,1970.
- SENDA, Y.; NISHIBU, M; MIZUKAMI, Y; HASHIMOTO, T.- Evaluation of type IV collagen in patients with various thyroid disease. *Rinsho-Byori*, 41:1338, 1993.
- SEPHEL, G.C.; TASHIRO, K.I; SASAKI, M.; KANDEL, S.; YAMADA, Y.; KLEINMANN, H.K.- A laminin-pepsin fragment with cell attachment and neurite outgrowth activity at distinct sites. *Dev. Biol.*, 135:172,1989.

- SHIMA, T.; YANO, Y.; GOTO, H.; MISAKI, M.- Increased concentrations of type IV (7S) collagen in sera of hyperthyroid patients with Graves disease. *Clin. Chem.*, **38**:1843,1992.

- SMITH, B.R. & HALL, R. Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet*, **2**:427,1974.

- SOMMERS, S.C. & MEISSNER, W.A.- Basement membrane changes in chronic thyroiditis and other thyroid diseases. *Am. J. Clin. Pathol.*, **24**:434,1954.

- SONNENBERG, A.; SINDERS, C.J.T.; MODERMANN, P.W.; DAMSKY, C.H.; AUMALLEY, M. & TIMPL, R.- Integrin recognition of different cell binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that alpha-6-beta-4 functions as a major receptor for fragment E8. *J. Cell. Biol.*, **110**:2145,1990.

- STOTT, D.I.- Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Methods*, **119**:153,1989.

- STUART, A.E. & ALLAN, W.S.- The significance of basement membrane changes in thyroid disease. *Lancet*, **2**:1204,1958.

- STUDER, H. & GEBEL, F. - Sporadic goiter. In: **The Thyroid. A fundamental and clinical text**, ed. Ingbar, S.H.; Braverman, L.E., Philadelphia, J.B. Lippincott, 1986, p. 1311.

- SWITALSKI, L.M.; SPEZIALE, P.; HOOK, M.; WALDSTROM, T.; TIMPL, R.- Binding of "Streptococcus pyogenes" to laminin. *J. Biol. Chem.*, **259**:3734,1984.

- TAMAI, H.; KASAGI, K.; TAKAICHI, Y.; TAKAMATSU, J.; KOMAKI, G.; MATSUBAYASHI, S.; KONISHI, J.; KUMA, K.; KUMAGAI, L.F.; NAGATAKI, S. - Development of spontaneous hypothyroidism in patients with Graves' disease treated with antithyroid drugs: clinical, immunological and histological findings in 26 patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **69**:49,1989.

- TERRANOVA, V.P.; RAO, C.N.; KALEBIC, T.; MARGULIES, I.M.; LIOTTA, L.A.- Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**:444,1983.

- TIMPL, R.- Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, **180**:487,1989.

- TIMPL, R.; DZIADEK, M.; FUJIWARA, S.; NOWACK, S.; WICK, G.- Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur. J. Biochem.*, **137**:455,1983.

- TIMPL, R. & MARTIN, G.R.- Components of basement membranes. In: *Immunochemistry of the extra-cellular matrix*, ed. H Furthmayr, Florida, CRC Press, p. 119.

- TIMPL, R.; ROHDE, H.; GEHRON-ROBEY, P.; RENNARD, S.I.; FOIDART, J.M.; MARTIN, G.R.- Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.*, 254:9933,1979.
- TIMPL, R.; WIEDEMANN, H.; VAN HELDEN, V.; FURTHMAYR, H.; KUHN, K.- A network model of the organization of the type IV collagens molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.*, 120:203,1981.
- TODD, P.B. & BOWMAN, W.- *The physiological anatomy and physiology of man*, ed. Blanchard and Lea, Philadelphia, 1857, p. 129,523,660.
- TOWBIN, H.; ROSENFELDER, G.; WIESLANDER, J.; AVILA, J.L.; ROJAS, M.; SZARFMAN, A.; ESSER, K.; NOWACK, H.; TIMPL, R.- Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas'disease, American cutaneous leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl(alfa 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.*, 166:419,1987.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J.- Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350,1979.
- TSILIBARY, E.C. & CHARONIS, A.S.- The role of the main noncollagenous domain (NC1) in type IV collagen self-assembly. *J. Biol. Chem.*, 103:2467,1986.
- VAN VLIJMEN-WILLEMS, I. & VAN ERP, P.- Microwave irradiation for rapid and enhanced immunohistochemical staining: application to skin antigens. *Biotec. Histochem.*, 68:67,1993.

- VOLPÉ, R.- Autoimmune Thyroiditis. In: **The Thyroid. A fundamental and clinical text.** Ingbar, S.H. & Braverman, L.E., 5^o ed., 1986, pag.1266.
- VON BASEDOW, K.A.- Exophthalmos durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle. **Wochenschrift für die gesamte Heilkunde**, 13:14,1840.
- VOSS, B.; ALLAH, S.; RAUTERBERG, J.; ULLRICH, K.; GIESELMANN, V.; VON FIGURA, K.- Primary cultures of rat hepatocytes synthesize fibronectin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 901:1348,1979.
- YAOITA, H.; FOIDART, J.M.; KATZ, S.I.- Localization of the collagenous component in skin basement membrane. **J. Invest. Dermatol.**, 70:191,1978.
- YURCHENCO, P.D. & FURTHMAYR, H.- Self-assembly of basement membrane collagen. **Biochemistry**, 23:1839,1984.
- YURCHENCO, P.D. & RUBEN, G.C.- Basement membrane structure in situ. Evidence for lateral associations in the type IV collagen network. **J. Cell. Biol.**, 105:2559,1987.
- YURCHENCO, P.D. & SCHITTNY, J.C.- Molecular architecture of basement membranes. **FASEB J.**, 4:1577,1990.
- WEBER, M.- Basement membrane proteins. **Kidney Int**, 41:620,1992.

- WEETMAN, A.P.; MC GREGOR, A.M.; WHEELER, M.H.; HALL, R.-
Extrathyroidal sites of autoantibody synthesis in Graves' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, 56:330,1984.

- WILDERS-TRUSCHNIG, M.M.; DREXHAGE, H.A.; LEB, G.; FEBER, O.;
BEZINSCHEK, H.P.; BOHR, G.; LANLER, G.; KREJS, G.J.-
Chromatographically purified immunoglobulin G of endemic and
sporadic goiter patients stimulates FRTL-5 cell growth in a mitotic arrest
assay. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**,70:444,1990.

- WOEBER, K.A. - Graves'Disease. General considerations. In: **The Thyroid.**
A fundamental and clinical text. Ingbar, S.H. & Braverman, L.E., 5° ed.,
1986, pag. 982.