

Este exemplar corresponde a versão final da dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica do médico LUÍS HENRIQUE BARBOSA BOECHAT.

Campinas, 03 de julho de 1995.



Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Orientador

**REATIVIDADE DE AUTO-ANTICORPOS
ANTITIROIDIANOS A PEPTÍDEOS DE TIROGLOBULINA
OBTIDOS POR TRIPSINIZAÇÃO LIMITADA**

Luis Henrique Barbosa Boëchat

Orientador : Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção
do Título de Mestre em Clínica Médica.

Universidade Estadual de Campinas
Campinas - SP
1995

UNIDADE	BC
N.º ORDEMADA:	UNICAMP
	B633r
V.	25414
P.	433/95
	☐ ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/09/95
N.º CPD	

CM-00077173-0

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP

B633r Boechat, Luiz Henrique Barbosa
Reatividade de auto-anticorpos anti tiroidianos a peptí-
deos de tiroglobina obtidos por tripsinização limitada /
Luiz Henrique Barbosa Boechat. Campinas, SP : [s.n.], 1993.

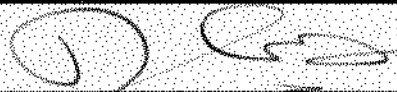
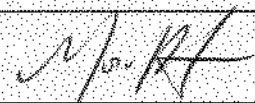
Orientador : Ricardo de Lima Zollner
Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tiroglobulina. 2. Tireoidite auto-imune. 3. Tireoi-
dite subaguda. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universi-
dade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros

1. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner - 
2. Prof. Dr. Nassim Lajgi - 
3. Prof. Dr. Márcio José Abdalla Saad - 

**Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

Data: 03/08/1995

**A minha mãe, minha irmã e
Maria Cláudia.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, meu orientador, pela abertura das portas da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia e constante apoio nas atividades acadêmicas.

À Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann, amiga constantemente presente, com quem tenho dividido muitas das dúvidas que envolvem as doenças tiroidianas auto-imunes.

Às Profas. Dras. Martha de Oliveira Guerra e Vera Peters, docentes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, por terem demonstrado o caminho da ciência feita com dedicação, responsabilidade e senso ético.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Tambascia que, através de muitas conversas, despertou em mim o interesse pelas doenças tiroidianas.

Aos amigos pós-graduandos do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia que sempre souberam reforçar o sentido de trabalho em equipe e cooperação irrestrita.

Ao Prof. Dr. Walter Pinto Jr., membro da disciplina de Genética Médica da FCM-UNICAMP, pela presteza com que nos cedeu amostras de tripsina 0646 - Sigma.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental, em especial ao Prof. Dr. José Vassallo e Profa. Dra. Glauce Aparecida Pinto, pelo fornecimento das amostras de *Trypsin Type III*, Sigma.

A todos os membros da Disciplina de Endocrinologia da FCM - UNICAMP pela cooperação na seleção de pacientes e obtenção de amostras de soro.

A todos os membros da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia por receberem de braços abertos um endocrinologista interessado em imunopatologia.

A Conceição Vilella, bióloga do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia, por um sem número de auxílios durante todo o processo de elaboração deste trabalho.

A Eliene Pinheiro e Margarida Oliveira, funcionárias da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, pela colaboração constante e dedicação ímpar que facilitam o trabalho de pesquisa.

A Laurione Cândido de Oliveira, bióloga do Laboratório de Patologia Central, pela gentileza tanto no fornecimento de amostras de soros quanto na dosagem da tiroglobulina por radioimunoensaio.

À Sra. Solange Arruda Sanches pela fundamental colaboração na editoração e impressão desta dissertação.

“É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, de tal maneira que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática.”

(Paulo Freire)

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

ABREVIATURAS

≥ 205 kDa: peso molecular maior ou igual a 205 kDa.

Ac-Tg: auto-anticorpos antitiroglobulina.

Ac-TGPO: auto-anticorpos com reatividade dupla antitiroglobulina e antitiroperoxidase.

Ac-TPO: auto-anticorpos anti-TPO.

AMP: adenosina monofosfato.

D.P.L.: pontos por polegada.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EBT: extrato bruto de tiróide.

EBTh: extrato bruto de tiróide humana.

EBTp: extrato bruto de tiróide porcina.

EDTA: etileno-diamino-tetra-acético.

I¹²⁵/I¹³¹: iodo radioativo (isótopos 125 e 131)

IgG: imunoglobulina G.

kDa: kiloDáltons.

LATS: "long-acting thyroid stimulator".

PBS: tampão fosfato.

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

SDS: duodecil sulfato de sódio.

T₃: triiodotironina.

T₄: tetraiodotironina (tiroxina).

T₄L: tiroxina livre.

Tg: tiroglobulina

TPO: tiroperoxidase.

TRIS: tris[hidro-metil] amino acético.

TSA: tiroidite subaguda.

TSH: hormônio tirotrófico.

TSHR-Ab B: anticorpo bloqueador do receptor de hormônio tirotrófico.

TSHR-Ab S: anticorpo estimulador do receptor de hormônio tirotrófico.

SUMÁRIO

1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	04
2.1 Doença Tiroidiana Auto-imune e Tiroidite Subaguda	04
2.1.1. Doença Tiroidiana Auto-imune	04
2.1.2. Tiroidite Subaguda	07
2.2 Tiroglobulina	10
2.2.1 Aspectos Gerais	10
2.2.2 Internalização, Clivagem Proteolítica e Liberação Hormonal	14
2.2.3 Aspectos Imunológicos	16
3. OBJETIVOS	23
4. CASUÍSTICA, MATERIAL MÉTODOS	24
4.1. Casuística	24
4.1.1 População de Referência	24
4.1.2 População de Estudo	24
4.1.3 População Controle	26
4.2. Material e Métodos	27
4.2.1 Dosagem de Hormônios Tiroidianos e TSH	27
4.2.3 Determinação dos Níveis Séricos de Auto-anticorpos Antitiroidianos	27
4.2.4 Obtenção do Tecido Tiroidiano	27
4.2.5 Preparação do Extrato Bruto de Tiróide (EBT)	28
4.2.6 Inibidores de Proteases	29
4.2.7 Fracionamento Cromatográfico dos Extratos Tiroidianos	29
4.2.8 Dosagem de Imunoglobulinas nos Extratos Tiroidianos e Frações Cromatográficas	30
4.2.9 Eletroforese Analítica em Gel de Poliacrilamida-SDS	30
4.2.10. Eletroforese de Transferência Seguida de <i>Immunoblotting</i>	32
4.2.11 <i>Dot Blot</i>	33
4.2.12 Dosagem de Tiroglobulina Humana por Radioimunoensaio	33

4.2.13 Dosagem de Proteínas	34
4.2.14 Tripsinização Limitada da Tiroglobulina	35
4.2.15 Reagentes Utilizados	35
4.2.16 Processamento de Imagens	35
4.2.17 Análise Estatística	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Extrato Bruto Tiroidiano	37
5.2 Fracionamento Cromatográfico dos Extratos Tiroidianos Brutos e Análise por SDS-PAGE	37
5.2.1 Extrato Tiroidiano Porcino	37
5.2.1.1. Fracionamento Cromatográfico	37
5.2.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	40
5.2.2 Extrato Tiroidiano Humano	41
5.2.2.1 Fracionamento Cromatográfico	41
5.2.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS	41
5.3 Dosagem de Imunoglobulinas G (Ig G) em Extratos Tiroidianos e Frações Cromatográficas	41
5.4. Reconhecimento da Fração Ih por auto-anticorpos antitiroglobulina	44
5.5 Dosagem de Tiroglobulina Humana no Pico Ih por Radioimunoensaio	44
5.6 Tripsinização Limitada da Tiroglobulina	46
5.7 Reatividade de Auto-anticorpos antitiroglobulina a Fragmentos Tripticos da Tiroglobulina Humana	46
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	64
8. SUMMARY	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. RESUMO

A tiroglobulina é a principal proteína sintetizada pelas células foliculares tiroidianas, representando um dos principais auto-antígenos envolvidos tanto nas doenças auto-imunes da tireóide quanto na indução de tireoidite em modelos experimentais. Vários trabalhos têm sido publicados relatando aspectos referentes à imunogenicidade da tiroglobulina humana e de outros animais, incluindo seu mapeamento epitópico e a descrição de oligopeptídeos imunogênicos sintéticos ou obtidos por tratamento enzimático.

A síntese de hormônios tiroidianos envolve a recaptação da tiroglobulina presente no lúmen folicular e seu processamento por endoproteases lisossômicas. Entre estas enzimas destacam-se as catepsinas B, D, H e L, cuja ação conjunta cliva o monômero de tiroglobulina em locais pré-determinados. Trabalhos recentes relatam a existência de sítios preferenciais de clivagem proteica por tripsina, demonstrando que estas áreas são correspondentes àquelas em que atuam as proteases endógenas tiroidianas. Portanto, a utilização do modelo de tripsinização limitada da tiroglobulina leva à obtenção de peptídeos análogos aos resultantes do processamento intra-lisossômico tiroidiano.

Neste trabalho realizamos a purificação de tiroglobulina porcina e humana a partir de extratos tiroidianos brutos através de cromatografia por exclusão de pesos moleculares, caracterizando eletroforética e imunologicamente tais proteínas. A

tiroglobulina humana assim purificada foi submetida a tripsinização limitada com obtenção de peptídeos com pesos moleculares entre 29 kDa e ≥ 205 kDa. O reconhecimento destes peptídeos por auto-anticorpos antitiroglobulina foi estudado através da técnica de *immunoblotting*.

Desta forma foi possível verificar que a frequência de reconhecimento destes fragmentos proteicos por auto-anticorpos foi semelhante nos pacientes com doença de Basedow-Graves e tiroidite de Hashimoto, sendo estes reunidos em um único grupo referente à doença tiroidiana auto-imune. Ao compararmos os grupos com tiroidite subaguda (TSA) e doença tiroidiana auto-imune, verificamos que peptídeos de 80 kDa, 185 kDa e ≥ 205 kDa reagiram mais frequentemente com soros provenientes de pacientes com TSA.

A comparação de nossos achados com relatos da literatura sugerem que o peptídeo de 80 kDa corresponda à extremidade N-terminal da molécula de tiroglobulina humana, área pouco envolvida na gênese de auto-anticorpos em doença tiroidiana auto-imune.

Estes dados demonstram que, embora os auto-anticorpos antitiroglobulina reajam com todos os peptídeos obtidos por tripsinização limitada da Tg humana, os perfis de reconhecimento diferem entre as situações auto-imunes e não auto-imunes. O estudo destes peptídeos, sobretudo o de 80 kDa, poderá contribuir para a elucidação

das relações entre endoproteases, peptídeos de tiroglobulina obtidos *in vivo* e resposta humoral à tiroglobulina.

2. INTRODUÇÃO

2.1 DOENÇA TIROIDIANA AUTO-IMUNE E TIROIDITE SUBAGUDA

2.1.1 Doença Tiroidiana Auto-imune

Consideradas inicialmente processos distintos, a tiroidite de Hashimoto e a doença de Basedow-Graves representam extremos opostos de uma única entidade (WEETMAN, 1991). FATOURECHI et al. (1971) descreveram na tiróide de pacientes com doença de Graves, aspectos histológicos semelhantes àqueles encontrados na tiroidite de Hashimoto, como infiltração linfocitária e centros germinativos. Os relatos de evolução espontânea de doença de Basedow-Graves para tiroidite de Hashimoto e vice-versa (VOLPÉ, 1991) reforçam esta hipótese e permitem agrupá-las sob a denominação de doença tiroidiana auto-imune.

A doença de Basedow-Graves, causa mais comum de tirotoxicose abaixo dos 40 anos, foi descrita separadamente por estes autores (GRAVES, 1835; VON BASEDOW, 1840) e compreende, na sua forma completa, bócio difuso, hipertiroidismo, oftalmopatia, dermatopatia infiltrativa e acropaquia. WARTHIN (1928) já propunha o envolvimento do sistema imune na fisiopatologia desta doença, baseando-se nos achados de aumento de linfonodos, timo e baço. Em 1956, ADAMS & PURVES identificaram um fator de estímulo tiroídiano no soro de pacientes com doença de Graves, cuja ação era mais prolongada que a da tirotrofina e foi denominado posteriormente "*long-acting thyroid stimulator*"

(LATS). KRISS et al. (1964) associaram definitivamente a doença a um distúrbio auto-imune ao demonstrar que o LATS era uma imunoglobulina. A ação de estímulo tiroídiano foi então relacionada à existência de anticorpos capazes de reagir com o receptor de TSH, ativando a via do AMP cíclico, levando à hiperprodução hormonal e hipertrofia tiroídiana (SMITH & HALL, 1974).

Alguns autores chegaram a sugerir que os anticorpos estimuladores do receptor de TSH (TSHR-Ab S) estariam presentes nos soros de até 100% dos pacientes com doença de Basedow-Graves (RAPOPORT et al., 1984; BURMAN & BAKER, 1985; DURON et al., 1987), embora ILICKI et al. (1992) descrevam sua negatividade em 10% destes indivíduos. Tais anticorpos são produzidos principalmente por plasmócitos intra-tiroídianos, apesar de existirem outros sítios de síntese (WEETMAN et al., 1984; MC LACHLAN, 1986a). Portanto, a incapacidade em detectar o TSHR-Ab S no sangue periférico, não reflete, obrigatoriamente, a ausência de envolvimento deste anticorpo na fisiopatologia do hipertiroidismo auto-imune. Outros anticorpos dirigidos ao receptor de TSH e que apresentam capacidade de inibi-lo (TSHR-Ab B) são descritos na doença de Basedow-Graves e outras formas de doença tiroídiana auto-imune.

Em 1912, HASHIMOTO descreveu vários pacientes com bócio nos quais a histologia tiroídiana era caracterizada por infiltrado linfóide, fibrose, atrofia e modificação eosinofílica das células foliculares. Conhecida hoje pela denominação eponímica de tiroidite de Hashimoto, esta entidade nosológica foi

associada inicialmente ao sistema imunológico pelo achado de hipergamaglobulinemia (VOLPÉ, 1991). Em 1956, ROITT et al. demonstraram a presença de auto-anticorpos antitiroglobulina (Ac-Tg) em soros de pacientes com tiroidite de Hashimoto. Concomitantemente, ROSE & WITEBSKI (1956) obtiveram o primeiro modelo de tiroidite experimental auto-imune em coelhos ao administrar, por via subcutânea, extrato tiroidiano homólogo emulsificado em adjuvante de Freund. Estes fatos, associados à descrição dos anticorpos reativos à fração microssomal tiroidiana, reforçaram a hipótese de etiologia auto-imune (HOLBOROW et al., 1959). CZARNOCKA et al. (1985a, b) demonstraram que o antígeno microssomal correspondia à tiroperoxidase (TPO), o que estaria de acordo com relatos prévios de expressão deste antígeno no citoplasma e membrana apical do tirócito (KHOURY et al., 1981; FENZI et al., 1982).

Os antígenos responsáveis pela destruição celular na tiroidite de Hashimoto ainda são discutidos na literatura. A tiroglobulina é a principal proteína envolvida nos modelos experimentais espontâneos e induzidos de tiroidite (CHARREIRE, 1989). DONIACH & ROITT (1957) propuseram que os anticorpos antitiroglobulina fossem citotóxicos em humanos, fato questionado por KOFFLER & FRIEDMAN (1964), uma vez que seus títulos séricos não refletem a intensidade da doença. Os níveis de anticorpos anti-TPO (Ac-TPO) foram relacionados ao grau de infiltração linfocitária na tiroidite de Hashimoto e na doença de Basedow-Graves (MAAGOE et al., 1977; TAMAI et al., 1989), mas investigações recentes demonstram que a atividade citotóxica do soro dos

pacientes não é mediada por estes anticorpos e sim por outros ainda pouco caracterizados (BOGNER et al., 1990; CHIOVATTO et al., 1993).

2.1.2 Tiroidite Subaguda

A tiroidite subaguda (TSA) foi descrita por DE QUERVAIN (1904) como alteração inflamatória auto-limitada da tiróide e, contrariamente a sua designação, reflete o comprometimento agudo da glândula (BENKER et al., 1988). A doença manifesta-se de forma abrupta, caracterizada por dor em região cervical anterior, irradiada para ouvidos, mandíbula e região occipital, agravada pela rotação do pescoço, deglutição e palpação. Queixas sistêmicas de mal estar e febre são comuns, associando-se a sinais de tirotoxicose leve. Os achados laboratoriais clássicos incluem aumento da velocidade de hemossedimentação (BASTENIE et al., 1972), hipocaptação de iodo radioativo pelo parênquima tiroidiano (KITCHENER & CHAPMAN, 1989) e presença de células multinucleadas gigantes nas avaliações histopatológicas (PERSSON, 1968; CHANG et al., 1983).

Pródromos com mialgia, mal estar e fadiga, ausência de leucocitose e curso autolimitado da doença sugerem etiologia viral (TOMER & DAVIES, 1993). Desta forma, a TSA tem sido associada a infecções pelos vírus da caxumba (EYLAN et al., 1957; McARTHUR, 1964; HUNG, 1969; SHEBA, 1968), sarampo, resfriado comum, vírus de Epstein-Barr e Cocksackie (VOLPÉ, 1979). STANCEK et al. (1975) isolaram vírus citopático em 5 dentre 28 pacientes com TSA, sendo posteriormente identificado como retrovírus espumoso humano

(WERNER & GELDERBLUM, 1979). É interessante observar que as infecções por vírus espumosos resultam na formação de células multinucleadas gigantes antes da lise celular (FLÜGEL, 1991) como na TSA. Embora atraente, a associação entre TSA e vírus espumoso humano não foi confirmada por outros autores (DE BONS-GUILLEMIN et al., 1992).

Apesar da provável etiologia viral, várias manifestações imunológicas têm sido relatadas em portadores de TSA. Ao contrário da normalização histológica e funcional que ocorre na maior parte dos pacientes, alguns evoluem para tiroidite de Hashimoto, caracterizada pelos altos títulos de anticorpos antitiroidianos e infiltrado linfocitário típico (IVY, 1961; TIKKANEN & LAMBERG, 1982; MARINONI & MARINONI, 1984; GOZARIU et al., 1986). Episódios prévios de TSA têm sido relatados em indivíduos com doença de Basedow-Graves, associada à presença sérica de auto-anticorpos estimuladores do receptor do TSH (WERNER, 1979; WARTOFSKY & SCHAAF, 1987; FUKATA et al., 1992). As relações causais são, entretanto, tênues

O envolvimento da imunidade celular na TSA é demonstrado pela sensibilização de linfócitos T para antígenos tiroidianos (WALL et al., 1976; TOTTERMAN et al., 1978; GALLUZZO et al., 1980). Estas observações, entretanto, têm sido interpretadas como respostas secundárias à liberação antigênica decorrente da infecção viral (TOMER & DAVIES, 1993). FUKAZAWA et al. (1990) descreveram a redução do número absoluto e relativo de “células killer” durante a

primeira fase da doença e correlacionaram tal fato à ação de uma glicoproteína ácida imunossupressora.

Auto-anticorpos Ac-Tg e Ac-TPO são descritos em soros de 42 a 64% do pacientes (VOLPÉ et al., 1967; LIO et al., 1984), porém os títulos decrescem rapidamente, permanecendo baixos ou negatizando-se à medida em que o paciente evolui para a cura. Anticorpos dirigidos ao receptor de TSH, incluindo aqueles com capacidade de estimulá-lo, são descritos nos soros de pacientes com TSA (WALL et al., 1982; BLIDDAL et al., 1985; MITANI et al., 1992; NAKAMURA et al., 1992). Neste contexto, TAMAI et al. (1991) demonstraram frequência aumentada de anticorpos bloqueadores da ação do TSH em pacientes com TSA que evoluíram com hipotireoidismo transitório.

WEETMAN et al. (1987) estudaram a reatividade dos soros de pacientes com TSA a extratos antigênicos de tecido tireoidiano. Ao utilizarem a técnica de *immunoblotting*, foram capazes de demonstrar anticorpos direcionados a determinantes cujos pesos moleculares variavam entre 10 e 177 kDa. Estes auto-anticorpos não foram detectados nos indivíduos normais e persistiram nos soros de pacientes por períodos de até 39 meses após o episódio agudo, podendo representar anormalidade persistente do sistema imunológico.

2.2 TIROGLOBULINA

2.2.1 Aspectos Gerais

A tiroglobulina (Tg) é a principal proteína sintetizada pela célula folicular tireoidiana, chegando a representar 75% do material proteico das glândulas de mamíferos (VAN HERLE, et al., 1979). Esta proteína tem sido objeto de estudos há várias décadas uma vez que é um dos principais antígenos envolvidos nas patologias tireoidianas auto-imunes espontâneas e induzidas (CHARREIRE, 1989), além de suporte ativo da síntese hormonal tireoidiana. No entanto, seu elevado peso molecular (660 kDa), sua heterogeneidade resultante de modificações pós-traducionais como iodinação e glicosilação e sua alta sensibilidade à proteólise dificultaram a compreensão inicial de características básicas como o número e tamanho de subunidades (MALTHIÉRY et al., 1989).

A descrição da estrutura primária da Tg humana, deduzida a partir de seu DNA complementar (MALTHIÉRY & LISSITSKY, 1987), trouxe novos subsídios para o estudo dos mecanismos envolvidos na síntese dos hormônios tireoidianos ao demonstrar que esta proteína é formada por duas cadeias polipeptídicas idênticas de 2748 aminoácidos e vários sítios de glicosilação. Dados provenientes de estudos com a Tg porcina (DESRUISSEAU et al., 1994) e humana (SAKURAI et al., 1991) sugerem que oligossacárides contribuam para sua carga negativa, sendo o número destes controlado pelo hormônio tirotrófico.

A análise da estrutura primária da Tg humana (MALTHIÉRY & LISSITSKY, 1987) evidencia 3 tipos de homologias internas (Figura 1, página 12). Dez domínios (homologia tipo 1) de 60 aminoácidos são encontrados na metade amino-terminal da molécula, apresentando resíduos de cisteína, glicina e prolina em posições invariáveis, o que sugere a conservação de estrutura tridimensional rígida. A área de homologia do tipo 2 é formada por 3 domínios curtos, de 14 a 17 aminoácidos, localizados na porção central e seguidos por outros cinco domínios (homologia tipo 3) que apresentam elevado número de resíduos de cisteína. Portanto, os 2/3 amino-terminais do monômero de Tg, representados pelas áreas de homologia interna citadas, apresentam blocos de estrutura tridimensional rígida sugeridos pela presença, em posições fixas, de aminoácidos envolvidos na manutenção da conformação estrutural. Em algumas regiões, tais blocos são separados por inserções peptídicas de tamanho variado que estariam relacionadas a junções *exon-intron* e parecem projetar-se na superfície da molécula (PARMA et al., 1987). A porção C-terminal (30%) não apresenta este tipo de estruturas repetitivas, tem menor número de resíduos de cisteína e provavelmente maior liberdade estrutural.

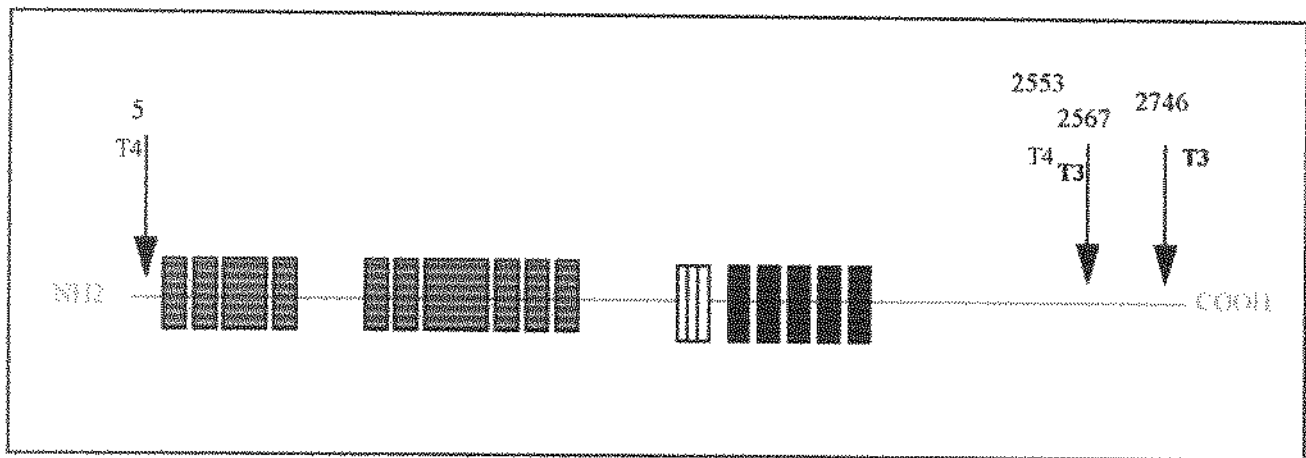


Figura 1. Representação esquemática do monômero de tiroglobulina humana. NH₂ e COOH indicam, respectivamente, as extremidades amino e C-terminal. Os sítios preferenciais de síntese de tiroxina (T₄) e triiodotironina (T₃) estão representados pelas flechas, sendo os resíduos de tirosina identificados pela numeração. ■ : áreas de homologia de tipo 1. □ : áreas de homologia de tipo 2. ▨ : áreas de homologia de tipo 3. Modificado de MALTHIÈRY & LISSITSKY, 1987.

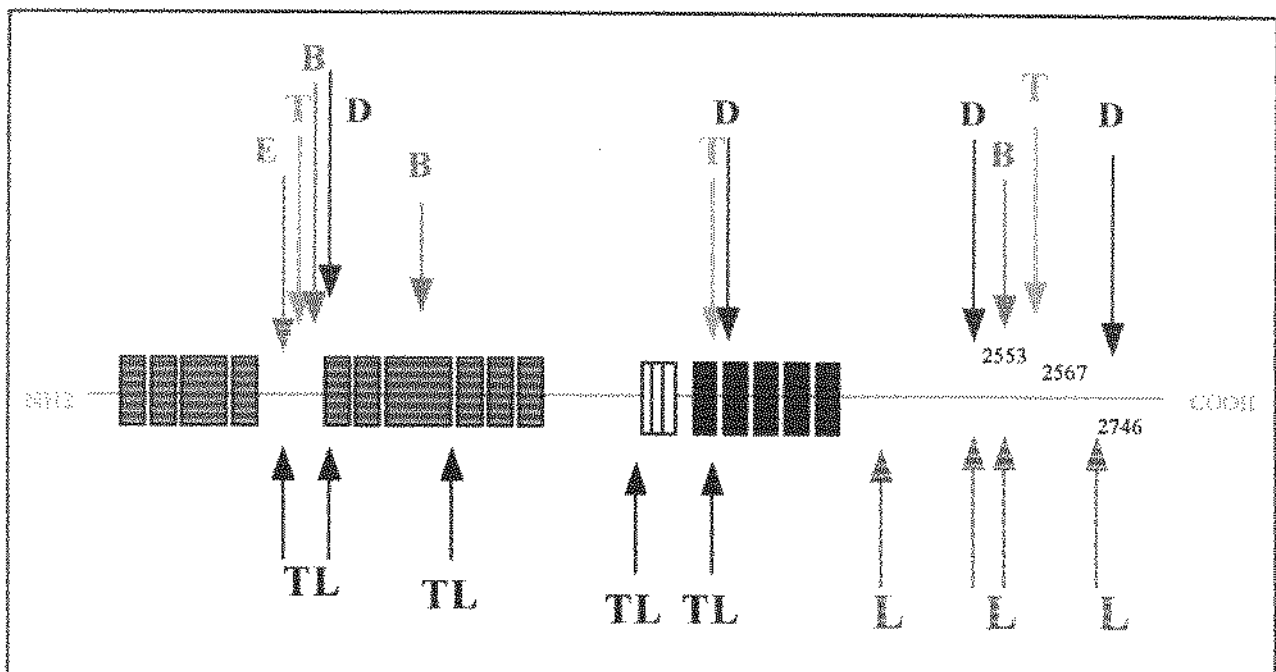


Figura 2. Representação esquemática do monômero de tiroglobulina humana, demonstrando as áreas de homologia interna do tipo 1 ■ 2 □ e 3 ▨ As setas indicam os sítios preferenciais de clivagem espontânea (E) e induzida por tripsina (T), termolisina (TL) e catepsinas B, D e L

As seqüências proteicas da Tg de bovinos, humanos e ratos têm elevada homologia, sendo os primeiros 20 aminoácidos idênticos nestas espécies (CHARREIRE, 1989). Comparações através de bancos de dados revelaram 38% de semelhança entre as estruturas repetitivas do tipo I e o domínio extracitoplasmático da cadeia invariável *Ii4I*, associada aos antígenos Ia do sistema de histocompatibilidade murino. A porção C-terminal é homóloga (64%) à acetilcolinesterase de *Torpedo californica*, sugerindo que estas proteínas tenham evoluído de um gene ancestral comum (TAKAGI et al., 1991).

As reações de acoplamento de iodotirosinas e conseqüente síntese de hormônios tireoidianos ocorrem mesmo em níveis baixos de iodinação, levando à formação de 4 a 8 moléculas de T_4 ou T_3 por dímero de Tg. LAMAS et al. (1974) e GAVARET et al. (1977) demonstraram que os resíduos de tirosina presentes na molécula apresentam diferentes graus de reatividade ao iodo e sugeriram que a iodinação ocorresse de modo seqüencial e controlado pela estrutura espacial da proteína. Desta forma 20 dos 67 resíduos de tirosina presentes no monômero de Tg humana são passíveis de iodinação e apenas quatro podem atuar como sítios de síntese hormonal. Tirosinas nas extremidades N e C-terminal (posições 5 e 2746) são, respectivamente, os locais preferenciais de formação de tiroxina e triiodotironina, havendo o envolvimento secundário das posições 2553 e 2567 (MARRIQ et al., 1982; RAWITCH et al., 1983; MALTHIÉRY & LISSITSKY, 1987). A localização terminal dos dois principais sítios de hormonogênese parece ter relevância para a síntese de iodotironinas, uma vez que estas áreas são mais

acessíveis à iodinação, apresentam maior grau de liberdade estrutural que favorece as reações de acoplamento, além de serem sensíveis a proteólise (MALTHIÉRY et al., 1989).

2.2.2 Internalização, Clivagem Proteolítica e Liberação Hormonal

A biossíntese dos hormônios tireoidianos requer o transporte bi-direcional da Tg. A molécula recém sintetizada é secretada para o lúmen folicular onde, sob ação da TPO, ocorrem as reações de iodinação e acoplamento de iodotirosinas, com a formação de resíduos de T_4 e T_3 ainda ligados à Tg (GRUFFAT et al., 1992).

A endocitose da Tg pode ocorrer por macro ou micropinocitose, sendo a contribuição relativa de cada processo dependente da espécie estudada e da atividade funcional da glândula (BERNIER-VALENTIN et al., 1991). Em humanos, a micropinocitose predomina sob condições fisiológicas, embora situações de demanda elevada e constante de hormônios tireoidianos possam levar ao envolvimento do processo macropinocítico (KOSTROUCH et al., 1993). Após a internalização, a Tg passa seqüencialmente por endossomas precoces, tardios e, finalmente, lisosomas.

A liberação de hormônios tireoidianos a partir de um precursor proteico de peso molecular tão elevado depende da clivagem proteolítica da molécula em diferentes partes e ordem pré-determinada (GENTILE & SALVATORE, 1993). Tem sido demonstrado que a degradação lisosomal da Tg leva inicialmente à

liberação dos resíduos de T_4 e T_3 de ambas as extremidades. Endopeptidases como a catepsina D e cisteíno-proteases como as catepsinas B, H e L têm sido implicadas, sendo a ação sinérgica destas enzimas necessária para a secreção hormonal (DUNN et al., 1991a; DUNN et al., 1991b).

Estudos visando determinar os sítios de ação proteolítica e correlacioná-los com a estrutura terciária da Tg humana e de outros mamíferos demonstraram a conservação de áreas sensíveis à proteólise localizadas na extremidade C-terminal e, sobretudo, nas seqüências peptídicas que se inserem entre os blocos de homologia interna. (Figura 2, página 12 e Tabela I, página 17). GENTILE et al. (1992) propuseram que ocorresse quebra espontânea da Tg humana entre os aminoácidos Leucina (503) e Serina (504), localizados na inserção entre o quarto e quinto blocos de homologia tipo 1. Estas regiões são também susceptíveis à ação enzimática da tripsina, termolisina e catepsinas B, D e L (DUNN et al., 1991a; DUNN et al., 1991b; GENTILE & SALVATORE, 1993).

Embora a tripsina não participe fisiologicamente da liberação dos resíduos hormonais da cadeia de Tg, sua atividade em razões enzima/substrato baixas é análoga àquela das endopeptidases tiroidianas, levando à obtenção de peptídeos semelhantes aos derivados do processamento lisosomal do pró-hormônio. O estudo da antigenicidade de tais seqüências proteicas pode trazer novos subsídios para a compreensão do envolvimento da tiroglobulina como auto-antígeno nas patologias tiroidianas de caráter auto-imune.

2.2.3 Aspectos Imunológicos

Auto-anticorpos antitiroglobulina (Ac-Tg), inicialmente descritos na tiroidite de Hashimoto, são também detectados nas outras formas de doença tiroidiana auto-imune e em até 27% dos indivíduos sadios (DONIACH & ROITT, 1956; GUILBERT et al., 1982; ERICSSON et al., 1985). WEETMAN et al. (1984) demonstraram que a maior parte destes anticorpos é produzida por linfócitos intra-tiroidianos, fato confirmado por MC LACHLAN et al. (1986b) ao comparar plasmócitos intra-glandulares com aqueles presentes no sangue periférico. BAKER et al. (1988) relataram a produção de Ac-Tg restrita à tiróide em um paciente com tiroidite de Hashimoto cuja sorologia era negativa. Estes autores obtiveram vários anticorpos monoclonais a partir de linfócitos extraídos deste tecido glandular, incluindo uma IgM com especificidade restrita à Tg humana.

Os níveis de Ac-Tg nos pacientes com doença tiroidiana auto-imune e nos modelos experimentais não se correlacionam com as alterações histopatológicas (CHARREIRE, 1989). VLADUTIU & ROSE (1971) induziram tiroidite autoimune ao injetar soro de camundongos doentes em outros normais, enquanto JAROSZEWSKI et al. (1978) demonstraram que Ac-Tg intensificavam o grau de infiltrado tiroidiano em galinhas obesas, propondo que tais anticorpos fossem potencializadores da resposta. Estes dados, no entanto, não foram confirmados por outros autores (OKAYASU, 1985).

Tabela I. Sítios preferenciais de clivagem do monômero de tiroglobulina por proteólise espontânea e induzida por tripsina, termolisina e catepsinas B, D e L.

Protease	Resíduos envolvidos	Referência Bibliográfica
Clivagem Espontânea	503	GENTILE et al., 1992
Tripsina	522	GENTILE & SALVATORE, 1993
	1627	
	2513	
Termolisina	503	GENTILE & SALVATORE, 1993
	597	
	982	
	990	
	1405	
	1831	
Catepsina B	532	DUNN et al., 1991b
	795	
	2487	
Catepsina D	2389	DUNN et al., 1991b
	2452	
	2490	
Catepsina L	551	DUNN ET AL., 1991b
	1835	
	2643	
	2468	

RUF et al. (1985), ao comparar as especificidades de Ac-Tg entre indivíduos normais, com doença de Basedow-Graves, tiroidite de Hashimoto e carcinoma de tiróide sugeriram que o repertório destes anticorpos fosse semelhante, embora houvesse predomínio de reatividade a alguns epítomos na doença tiroidiana auto-imune. Desta forma, propuseram que o aumento dos níveis séricos de Ac-Tg em pacientes com carcinoma resultaria de ativação policlonal decorrente da liberação de tiroglobulina do tecido neoplásico. Por outro lado, na doença tiroidiana auto-imune, tal fato envolveria distúrbios da imunorregulação. Esta hipótese foi reforçada por MORI et al. (1985) e TAO et al. (1985) que descreveram, respectivamente, redução da atividade linfocitária T supressora e aumento de T auxiliar específica para a Tg na doença de Basedow-Graves.

HEIDELBERGER (1938) indicou a existência de 40 epítomos na molécula de Tg humana detectáveis por anticorpos heterólogos. Usando proteínas de fusão, MALTHIÈRY et al. (1991) caracterizaram 7 regiões antigênicas expostas na superfície da molécula e localizaram a reatividade de auto-anticorpos de pacientes nas regiões central e C-terminal (HENRY et al., 1990). BOUANANI et al. (1989) compararam a reatividade de Ac-Tg de indivíduos sadios com a de tiropatia autoimune, demonstrando que tais anticorpos eram dirigidos a porções diferentes da molécula. Recentemente o número de áreas imunorreativas da Tg foi expandido para 11 e a região central da molécula (resíduos 1149-1250) confirmada como um dos principais auto-epítomos envolvidos na doença

tiroidiana auto-imune (HENRY et al., 1990; BOUANANI et al., 1992; HENRY et al., 1992).

Evidências provenientes de modelos animais indicam que o conteúdo de iodo da Tg influencia sua antigenicidade e que a redução do teor deste ion na proteína utilizada para imunização leva à redução da severidade da tiroidite experimental (ALLEN et al., 1986; CHAMPION et al., 1987). De modo análogo, estudos epidemiológicos em humanos demonstraram que o aumento da ingestão de iodo está correlacionado à maior frequência e severidade de lesão tiroidiana auto-imune (VAN HERLE et al., 1979). Estes fatos, associados à existência de auto-anticorpos antitiroxina leva ao interesse pela imunogenicidade dos sítios de síntese hormonal (SAKATA et al., 1993). HUTCHINGS et al. (1992) descreveram um peptídeo sintético de 12 aminoácidos que incluía o sítio hormonogênico 2553 e era capaz de induzir tiroidite experimental em camundongos CBA/J. Neste experimento, a troca do resíduo de T₄ por qualquer dos 20 aminoácidos levava à perda da antigenicidade.

CHRONOPOULOU & CARAYANNIOTIS (1992) evidenciaram seqüência de aminoácidos localizada na região C-terminal da tiroglobulina humana (2495-2511), e presente em outras espécies, cuja capacidade de induzir tiroidite experimental em várias linhagens de camundongos era semelhante à da tiroglobulina íntegra. TEXIER et al. (1992) induziram tiroidite experimental inoculando um peptídeo de 40 aminoácidos, derivado da clivagem triptica da Tg

porcina e localizado entre os resíduos 1672-1711 da molécula (numeração referente à Tg humana). Portanto, os epítomos envolvidos nos modelos de tiroidite induzida parecem estar localizados tanto na extremidade C-terminal quanto na porção central do monômero de Tg, regiões com distribuição análoga à das áreas antigênicas reconhecidas por auto-anticorpos na doença tiroidiana auto-imune.

KOHNO et al.(1988) e RUF et al. (1990) descreveram auto-anticorpos capazes de reagir de forma cruzada com a Tg e TPO (Ac-TGPO).Utilizando-se radioimunoensaio *tipo sanduiche*, foi possível confirmar a presença destes anticorpos no soro de humanos e animais, identificando a Tg como antígeno indutor. Portanto, os Ac-TGPO representam um tipo particular de Ac-Tg (RUF et al., 1993).

HOSHIOKA et al. (1993) utilizaram peptídeos sintéticos para elucidar possíveis epítomos envolvidos na origem dos Ac-TGPO, sendo capazes de identificar seqüências homólogas de aminoácidos da Tg (resíduos 2730-2743) e TPO (resíduos 118-131) que compartilhavam reatividade para células T e eram eficazes na indução de tiroidite experimental. No entanto, outros autores não verificaram reconhecimento de peptídeos recombinantes da Tg e TPO através de técnicas empregando tanto anticorpos monoclonais quanto policlonais heterólogos, ou auto-anticorpos anti-Tg e anti-TPO (HENRY et al., 1991). Segundo RUF et al (1992) o reconhecimento cruzado não implica

obrigatoriamente na semelhança epitópica, mas poderia representar a existência de auto-anticorpos capazes de se ligar à Tg e TPO por sítios diferentes da porção variável da mesma imunoglobulina .

O significado clínico dos Ac-TGPO ainda permanece obscuro. Recentemente, RUF et al. (1994) relataram que tais anticorpos estão presentes na maior parte dos pacientes com tireoidite de Hashimoto e apenas em poucos com doença de Basedow-Graves, carcinoma de tireóide e mixedema primário. Em indivíduos sadios e com outras doenças auto-imunes como *diabetes mellitus* insulino-dependente e artrite reumatóide não foi possível identificá-los, apesar de alguns soros apresentarem níveis detectáveis de Ac-Tg e Ac-TPO. A reposição de L-tiroxina nos pacientes com hipotireoidismo auto-imune resultou na redução dos níveis de Ac-TGPO, mesmo quando os valores de Ac-Tg permaneceram estáveis, indicando provável significado fisiopatológico para este auto-anticorpos.

Embora muitos estudos visando determinar a estrutura da tiroglobulina humana e suas relações com o sistema imunológico tenham sido realizados, referências à reatividade de peptídeos derivados da ação de endoproteases tireoidianas, e portanto presentes *in vivo*, são escassos na literatura. A análise das características imunogênicas destes peptídeos em situações de doenças auto-imunes e não auto-imunes pode colaborar para a compreensão da origem e papel

do anticorpos antitiroglobulina na doença tiroidiana auto-imune e modelos de tiroidite experimental.

3. OBJETIVOS

1. Obtenção e caracterização de extratos tiroidianos brutos porcino e humano.
2. Fracionamento destes extratos através de cromatografia por exclusão de pesos moleculares (Sephadex G-100 e G-200) visando purificar tiroglobulinas humana e porcina.
3. Caracterização eletroforética e imunológica da tiroglobulina humana.
4. Tripsinização limitada das tiroglobulinas humana e porcina e caracterização dos fragmentos obtidos.
5. Comparação do reconhecimento dos peptídeos derivados da tripsinização limitada da tiroglobulina humana por auto-anticorpos antitiroglobulina presentes no soro de pacientes portadores de tiroidite de Hashimoto, doença de Basedow-Graves e tiroidite subaguda.

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

4.1.1 População de Referência

Indivíduos da região de Campinas (SP), atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.1.2 População de Estudo

Pacientes atendidos e acompanhados no ambulatório de doença tiroidiana auto-imune do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, com diagnóstico de doença de Basedow-Graves (18 casos), tiroidite de Hashimoto (18 casos) ou tiroidite subaguda (10 casos). Todos os pacientes estudados apresentavam níveis séricos de Ac-Tg acima de 100 UI/ml.

a. Critérios de Inclusão

Os pacientes com DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES eram diagnosticados pelos achados clínicos de tirotoxicose, bócio difuso e, ocasionalmente, aspectos infiltrativos como oftalmopatia, mixedema pré-tibial e acropaquia. A confirmação do quadro de hipertireoidismo primário era feita pelo aumento dos níveis séricos de tiroxina livre (T_4L) e supressão de hormônio tirotrófico (TSH) avaliado por técnica ultra-sensível. A sugestão de origem auto-imune (WOEBER, 1986) deveu-se à elevação dos níveis de anticorpos antitiroperoxidase (Ac-TPO) e antitiroglobulina (Ac-Tg).

O diagnóstico de TIROIDITE DE HASHIMOTO era baseado nas manifestações clínicas de hipotireoidismo primário (confirmado pela elevação dos níveis séricos de TSH e diminuídos de T₄L), cuja origem auto-imune era sugerida pela presença de valores acima do normal de auto-anticorpos antitiroídianos (VOLPÉ, 1991).

Consideramos como portadores de TIROIDITE SUBAGUDA pacientes que referiram queixas de dor em região cervical anterior, de início recente (menos de trinta dias), com ou sem irradiação para ouvido e mandíbula, de caráter contínuo, fortemente acentuada pela palpação, acompanhada de sinais gerais de astenia e febre (temperatura axilar acima de 38° C). A palpação demonstrava o endurecimento do parênquima tireoideano, sem evidências locais de supuração. Eram considerados importantes para o diagnóstico os achados de elevação da velocidade de hemossedimentação, presença de células multinucleadas gigantes na citologia aspirativa de tireóide e hipocaptação difusa de I¹³¹ no estudo cintilográfico. Estes critérios correspondem às características classicamente descritas para a tireoidite subaguda (CZERNIAK & STEIMBERG, 1957; LEBACQ et al., 1976; VOLPÉ, 1979) que foram recentemente confirmados em nosso meio (TAMBASCIA, 1992).

b. Critérios de Exclusão

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

4.1.3. População Controle

Utilizou-se como controles 5 soros de indivíduos sadios, cujos níveis de auto-anticorpos antitiroidianos eram indetectáveis.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Dosagem de Hormônios Tiroidianos e TSH

As concentrações séricas de tiroxina livre (T_4L) eram determinadas por método imunoenzimático fluorimétrico em kits comerciais (Baxter Diagnostics Inc., EUA), tendo como valores normais aqueles compreendidos entre 0,7 e 1,5 ng/dl. Os níveis de tirotrofina (TSH) eram avaliados por kits imunofluorimétricos ultra-sensíveis (Baxter Diagnostics Inc., EUA) com valores normais entre 0,10 e 9,0 mUI/L.

4.2.2. Determinação dos Níveis Séricos de Auto-anticorpos Antitiroidianos

Os níveis séricos de auto-anticorpos Ac-Tg e Ac-TPO eram determinados por radioimunoensaio (Serono Diagnostics, EUA) considerando-se anormais os valores acima de 100 UI/ml.

4.2.3. Obtenção de Tecido Tiroidiano

Para padronização do procedimento experimental eram utilizados tecidos tiroidianos porcino obtido em abatedouro local. Esta opção deveu-se à ampla utilização da tireóide suína como modelo experimental (SMITH & HALL, 1974; DAWES et al., 1977; HUMPHRIES, et al., 1981; HARDISTY et al, 1983) e pela maior facilidade de obtenção de amostras teciduais.

Tecido tireoidiano humano normal era obtido a partir de peça cirúrgica proveniente de laringectomia associada a tireoidectomia por neoplasia de laringe.

Imediatamente após a retirada, as glândulas eram lavadas em tampão fosfato pH 7,3 (PBS) a 4° C no qual eram transportadas para o laboratório.

4.2.4 Preparação do Extrato Antigênico Bruto de Tiróide (EBT)

As glândulas eram dissecadas cuidadosamente para retirada de tecido conjuntivo e cortadas em fragmentos de aproximadamente 5mm de aresta que eram novamente lavados em PBS. O material era homogenizado em *blender* juntamente com PBS (três vezes o volume de tecido) até a obtenção de solução homogênea que era filtrada em camada dupla de gaze estéril. Após centrifugação do homogenato a 2000 x g (20 minutos), o sobrenadante era dialisado contra PBS durante 24 horas (2000 ml). Todos os procedimentos eram realizados a 4° C.

Os extratos antigênicos brutos de tiróide humana e porcina eram então estocados a -80° C até a utilização, exceto pequenas aliquotas das quais dosava-se o conteúdo proteico.

4.2.5. Inibidores de Proteases

Solução inibidora de proteases (NaCl 1M, Tris-HCl 50 mM, Phenyl-methylsulphonyl fluoride- Sigma P-7626, EDTA 20 mM, ácido épsilon amino capróico 50 mM, pH 7,5) era adicionada a todos os extratos antigênicos tiroidianos.

4.2.6. Fracionamento Cromatográfico dos Extratos Tiroidianos

a) Filtração em Coluna de Gel de Sephadex G-100

Este procedimento era realizado em coluna cromatográfica de 114 ml ($1,84 \text{ cm}^2$ de secção X 62 cm de altura) contendo gel de Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Suécia) equilibrado com solução de NaCl 0,15 M, com fluxo de eluição de 18 ml/hora. O volume de exclusão da coluna era calculado utilizando-se o Blue Dextran 2.000 como marcador (Sigma Chemical Company, EUA).

b) Filtração em Coluna de Gel de Sephadex G-200

Este procedimento era realizado em coluna cromatográfica de 150,45 ml ($1,77 \text{ cm}^2$ de secção X 85 cm de altura) contendo gel de Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Suécia) equilibrado com solução de NaCl 0,15 M, com fluxo de eluição de 9 ml/hora. O volume de exclusão da coluna era calculado utilizando-se o Blue Dextran 2.000 como marcador (Sigma Chemical Company, EUA).

c) Coleta das Frações Cromatográficas

As frações cromatográficas eluídas eram monitorizadas por absorbanciometria (Single Path UV Monitor, Pharmacia, Suécia), registradas graficamente e recolhidas por coletor automático (Fracil-100, Incibrás). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 280 nm e as frações reunidas em *pools* conforme o perfil de eluição cromatográfico. Estes foram concentrados utilizando-se unidades de ultrafiltração imersíveis (CX-30™ e CX-10™; Millipore Corporation, EUA). As amostras foram conservadas a -20° C até a utilização.

4.2.7. Dosagem de Imunoglobulinas nos Extratos Tiroidianos e Frações Cromatográficas

Com o objetivo de excluir a presença de IgG nos extratos tiroidianos e frações cromatográficas os materiais eram submetidos a dosagem desta imunoglobulina por nefelometria automatizada (Array Protein System, Beckman, EUA) e imunodifusão radial.

4.2.8 Eletroforese Analítica em Gel de Poliacrilamida - SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida era realizada em placa vertical de acordo com o método de LAEMMLI (1970) modificado por SAUAIA e LAICINE (1977) e com adaptações do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia. As amostras de material a serem aplicadas eram aquecidas em água fervente por 1 minuto em

presença de duodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2% em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%, sendo adicionado 2-mercaptoetanol a 10% quando se desejava a redução proteica. Eram aplicados 5 µg de material proteico por poço para a análise tintorial e 15 µg nas corridas destinadas a eletroforese de transferência.

As dimensões dos géis eram 7,0 cm X 8,5 cm X 0,75mm, concentrações de 7 a 15% (conforme a amostra estudada) para o gel de separação e de 5% para o de empilhamento. A eletroforese era realizada sob corrente contínua (30 mA), com voltagem inicial de aproximadamente 40 V e final de 150 V e a migração proteica interrompida quando o corante azul de bromofenol estava a 1cm da borda inferior do gel de separação, ou seja, cerca de 1 hora após o início do procedimento.

Após a corrida, os géis destinados a análise tintorial do material eram corados em solução de Coomassie Blue 0,2% diluído em ácido acético glacial 10%, metanol 45% e água destilada *qsp*, sendo o excesso de corante retirado com solução de metanol 45%, ácido acético glacial 10% água destilada *qsp*. Alternativamente, quando se desejava maior sensibilidade na detecção de bandas proteicas, utilizava-se a coloração pelo método da prata (MORRISSEY, 1981).

Os géis destinados a eletroforese de transferência eram lavados em tampão Tris 20mM, Glicina 150mM, Metanol 20%, pH 8,3 por 15 minutos com o objetivo de retirar o excesso de SDS.

Os pesos moleculares das proteínas separadas eletroforeticamente eram calculados por comparação com solução padrão contendo miosina de músculo de coelho de 205 kDa, β -galactosidase de *Escherichia coli* de 116 kDa, fosforilase 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, Sigma Chemical Company, EUA).

4.2.9. Eletroforese de Transferência Seguida de *Immunoblotting*

O material proveniente da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS era transferido eletroforeticamente (90 minutos a 4° C, 150 mAmp/gel) para papel de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Medium, 0,45 micron, Bio-Rad, EUA) com dimensões idênticas àquelas do gel de separação, conforme técnica de TOWBIN et al. (1979) modificada por BURNETTE (1981) e com adaptações do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia - UNICAMP. O tampão de eletroforese de transferência era composto de Tris 20 mM, Glicina 150 mM e metanol 20%, pH 8,3.

Após a transferência, os sítios adicionais de ligação no papel eram bloqueados por incubação do mesmo em solução contendo soro fetal bovino 3%, gelatina 0,3%, Tween 0,05%, (diluídos em PBS pH 7,3) durante 1 hora. Após 3 lavagens de 10 minutos em PBS, as fitas de nitrocelulose eram incubadas por 3 horas com os soros

a serem testados na diluição 1/1000 (soro fetal bovino 1%, gelatina 0,1%, Tween 0,016%). Os soros eram retirados, as fitas lavadas como anteriormente e colocadas em contato com conjugado anti-IgG humana ligado à peroxidase (Abbot Laboratórios do Brasil, titulação aproximada de 1/2000) durante 1 hora protegidas da luz. Em seguida a novo ciclo de lavagens, as membranas foram submersas em solução de Diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., 50 mg/100 ml de PBS) por 30 minutos e o substrato revelado em presença de H₂O₂ e solução de cloreto de cobalto e sulfato de níquel 1% (de BLAS & CHERWINSKI, 1983; ZOLLNER, 1990). A reação era bloqueada pela adição de água deionizada.

4.2.10. Dot Blot

O procedimento de *dot blot* era realizado conforme descrito por LITTAUER et al. (1986) com modificações desenvolvidas no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia - UNICAMP. Em resumo, 5 µl (125 µg) da solução contendo o antígeno a ser testado eram colocados diretamente sobre o papel de nitrocelulose. Após secarem, as fitas eram submetidas a metodologia semelhante àquela descrita para o *immunoblotting*.

4.2.11 Dosagem de Tiroglobulina Humana por Radioimunoensaio

A dosagem de tiroglobulina era realizada por radioimunoensaio de duplo anticorpo utilizando o I¹²⁵ como radioisótopo (Diagnostic Products Corporation, USA).

4.2.12. Dosagem de Proteínas

A dosagem proteica dos extratos tireoidianos e frações cromatográficas era realizada pelo de método LOWRY modificado (HARTREE, 1972), utilizando soroalbumina bovina como proteína de referência. Amostras da solução padrão de albumina (2,6 mg/ml) eram diluídas para 1 ml de água, obtendo-se concentrações finais que variavam entre 13 e 117 µg/ml. Tais amostras eram tratadas com 0,9 ml da solução "A" (Tartarato de sódio e potássio 2g, Carbonato de sódio 100g, NaOH 1N 500 ml e água destilada *qsp* 1000 ml) e aquecidas em banho a 56° C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos recebiam 0,1 ml da solução "B" (Tartarato de sódio e potássio 2g, sulfato cúprico 1g, NaOH 1N 10 ml; água destilada *qsp* 100 ml) com a qual permaneciam reagindo por 10 minutos. Três ml da solução "C" (Folin-Ciocalteu 1/15 em água destilada) eram então adicionados vigorosamente, de maneira que o jato líquido de reagente forçasse uma mistura rápida. Os tubos de ensaio eram novamente aquecidos a 56° C por 10 minutos.

Ao atingirem a temperatura ambiente, as amostras eram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. Os dados obtidos permitiam construir uma curva de referência na qual eram determinadas as concentrações proteicas das amostras experimentais que eram tratadas por procedimento idêntico.

4.2.13. Tripsinização Limitada da Tiroglobulina

As amostras de tiroglobulina porcina e humana eram dialisadas contra tampão Tris-NaCl (Tris 50 mM, NaCl 130 mM, pH 8,4) e tinham suas concentrações ajustadas para 2mg/ml por diluição no mesmo tampão. Eram então incubadas a 30° C, durante 60 minutos, com tripsina (Trypsin Type III, Sigma Chemical Co., EUA) em razões enzima/substrato que variavam de 1/1000 a 1/100 para padronização do procedimento. Após análise inicial optou-se pela relação tripsina/tiroglobulina de 1/1000. A digestão triptica era bloqueada pela diluição das aliquotas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10% , azul de bromofenol 0,001%) e posterior fervura durante 1 minuto e 30 segundos na presença de 2-mercaptoetanol 10%.

4.2.14. Reagentes Utilizados

Todos os reagentes utilizados cuja procedência não foi citada eram *pro analyse*.

4.2.15. Processamento de Imagens

As figuras correspondentes às eletroforeses em gel de poliacrilamida - SDS, *dot blot* e *immunoblotting* eram obtidas através de *scanner* de mesa ou cilíndrico com leitura a *laser*, processadas em editor de imagem (Aldus PhotoStyler 2.0) e impressas a jato de tinta com 300 x 600 d.p.i.(pontos por polegadas).

4.2.16. Análise Estatística

As frequências de positividade da reação de *immunoblotting* de cada fragmento tríptico de tiroglobulina dos grupos estudados eram comparadas através do teste de qui-quadrado (com correção de Yates) ou, quando necessário, pelo “teste exato de Fisher”. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade de sua ocorrência casual era menor que 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Extrato Bruto Tiroidiano

Após a dissecação, homogeneização, centrifugações e filtração dos tecidos tiroidianos porcino e humano, obtivemos os Extratos Brutos de Tiróide (EBT) com concentrações proteicas de 7,36 mg/ml (extrato porcino) e 4,40 mg/ml (extrato humano). Ambos os materiais mostraram-se complexos quando analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, com bandas proteicas que variaram de cerca de 300 kDa a cerca de 15 kDa. Os perfis eletroforéticos dos extratos humano e porcino foram semelhantes (Figura 3, página 38).

5.2 Fracionamento Cromatográfico dos Extratos Tiroidianos e Análise por SDS - PAGE

5.2.1 Extrato Tiroidiano Porcino

5.2.1.1 Fracionamento Cromatográfico

Com o objetivo de padronização dos procedimentos experimentais, o EBT porcino foi submetido a filtração em coluna de Sephadex G-100. A análise do perfil cromatográfico (Figura 4a, página 39) evidenciou uma fração inicial mais concentrada, cuja eluição correspondeu àquela do volume de exclusão da coluna (Fração "A"). Embora não tenhamos evidenciado outros picos tão intensos, houve eluição em *plateau* das frações intermediárias (Fração "B") e em forma de pico alargado nas porções finais (Fração "C").

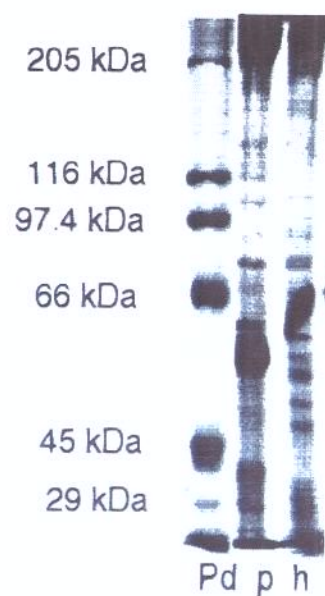


Figura 3. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das preparações de extrato tiroidiano bruto porcino (p) e humano (h) sob condições desnaturantes e redutoras. Pd: padrão de pesos moleculares (MW-SDS 200, Sigma), cujos valores estão representados (kDa).

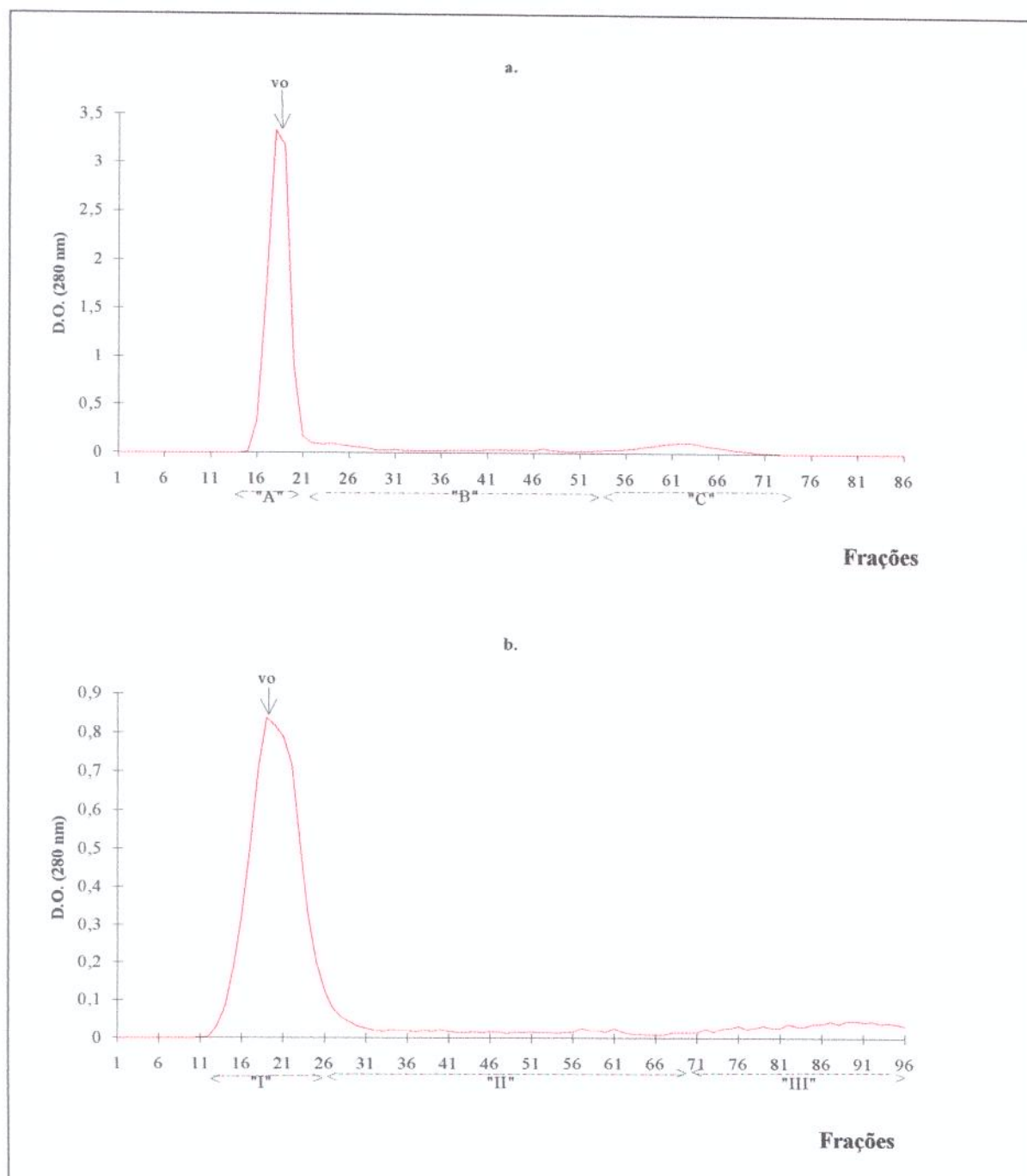


Figura 4. a. Filtração em gel de Sephadex G-100 do Extrato Bruto Tiroidiano Porcino (EBTp). Foram aplicados 2,5 ml da preparação (18,4 mg de proteína) em coluna cromatográfica (114 ml) com fluxo de eluição de 18 ml/h e frações de 3 ml.
b. Procedimento análogo em gel de Sephadex G-200 e coluna cromatográfica de 150,45 ml. Aplicados 2 ml da preparação de EBTp (14,7 mg de proteína), sendo o fluxo de eluição de 9 ml/h e as frações coletadas de 3ml.
vo: volume de exclusão da coluna.

O perfil cromatográfico em G-200 foi semelhante, sendo as frações obtidas denominadas, analogamente, Frações “I”, “II” e “III” (Figura 4b, página 39).

5.2.1.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida -SDS

A análise eletroforética das frações obtidas em coluna de Sephadex G-100 (SDS-PAGE a 8%) demonstrou a presença de uma banda proteica isolada na Fração “A”, cujo peso molecular foi estimado como > 205 kDa, uma vez que a migração da mesma era menor que a da miosina de coelho (205 kDa) presente no padrão utilizado. A fração “B” apresentou bandas proteicas que variaram de > 205 kDa a peptídeos de aproximadamente 30 kDa, enquanto a Fração “C” correspondeu principalmente aos pesos moleculares entre 70 kDa e <29 kDa. A proteína isolada na fração “A” esteve presente nas três frações estudadas (Figura 5, página 42)).

A fração “I” de G-200 foi também analisada em Gel a 14% no qual foi possível confirmar que esta era constituída exclusivamente pela proteína de peso molecular superior a 205 kDa citada anteriormente..

5.2.2 Extrato Tiroidiano Humano

5.2.2.1 Fracionamento Cromatográfico

O perfil de eluição cromatográfica do EBT humano em coluna de G-100 foi semelhante àquele descrito para o extrato porcino, sendo as frações denominadas analogamente A_h , B_h e C_h (Figura 6a, página 43). O fracionamento deste extrato em coluna de Sephadex G-200 permitiu melhor delimitação do pico inicial (Pico I_h). O restante da eluição foi semelhante ao observado em G-100, sendo as frações denominadas II_h e III_h (Figura 6b, página 43).

5.2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Os picos iniciais observados em ambos os géis (A_h e I_h) foram analisados por SDS-PAGE no qual migraram como bandas proteicas únicas com peso molecular estimado como >205 kDa (Figura 7, página 45).

5.3 Dosagem de Imunoglobulinas G (IgG) em Extratos Tiroidianos e Frações Cromatográficas

As dosagens de IgG nos extratos tiroidianos humano e porcino, bem como em todas as frações cromatográficas estudadas foram negativas, tanto pela nefelometria quanto pela imundifusão radial.

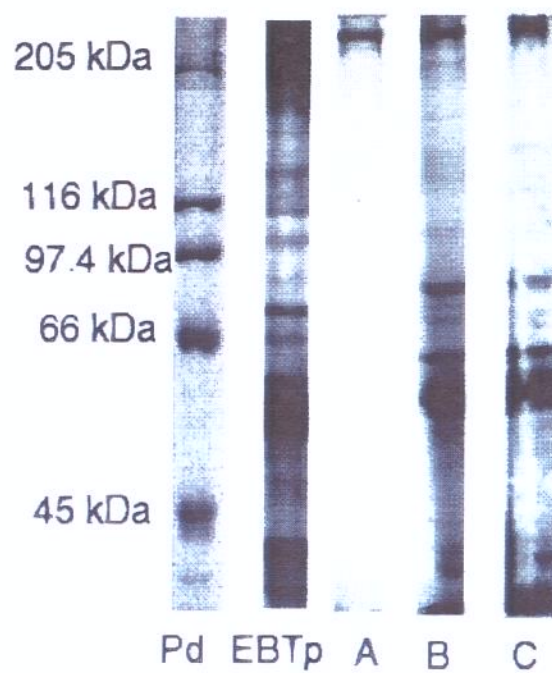


Figura 5. Representação de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 8% sob condições desnaturantes das preparações: extrato tireoideano bruto porcino (EBTp) e frações "A", "B" e "C" obtidas por seu fracionamento em coluna de gel de Sephadex G-100. Pd: padrão de pesos moleculares (MW-SDS 200, Sigma) cujos valores estão representados (kDa).

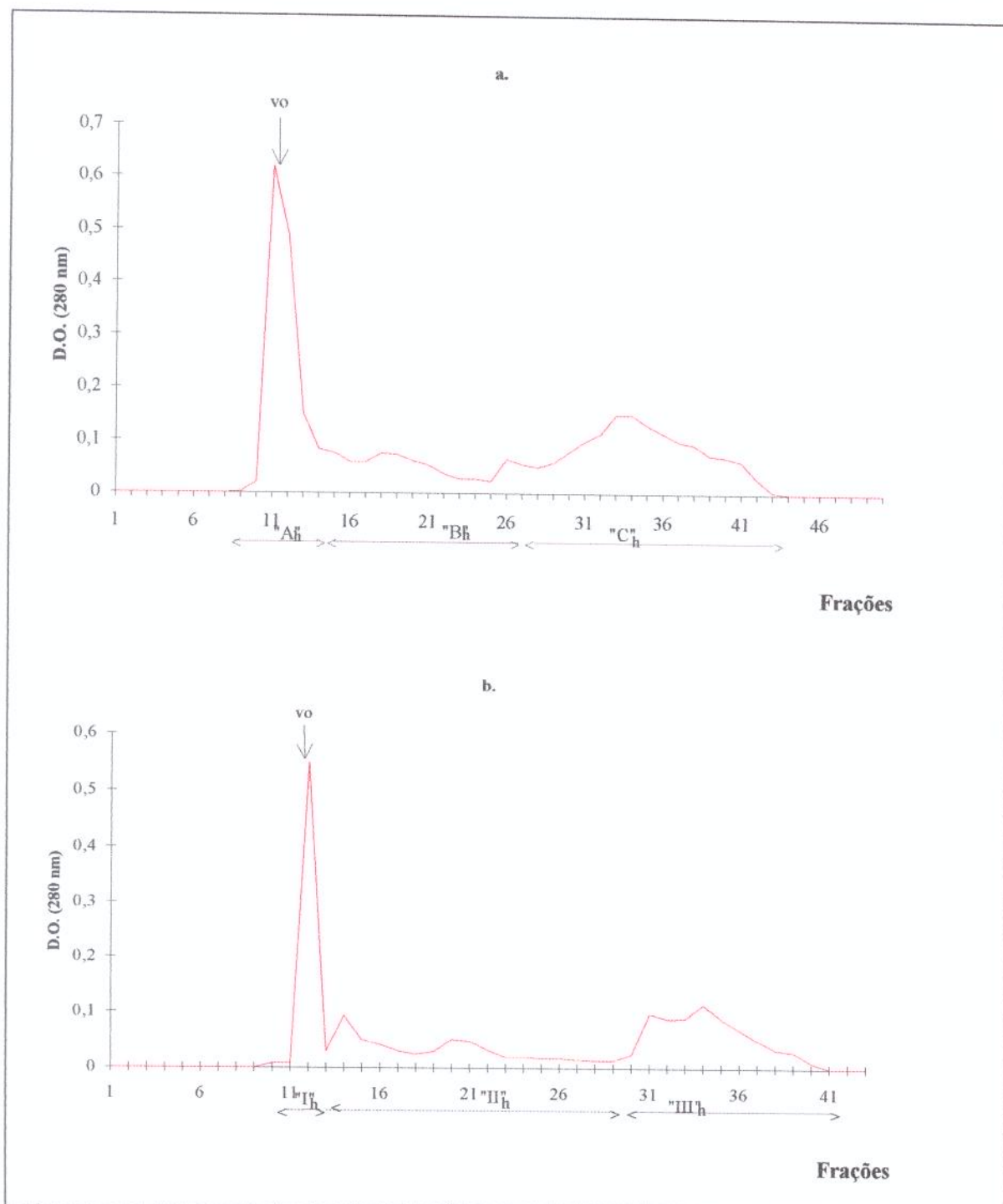


Figura 6. a. Filtração em gel de Sephadex G-100 do Extrato Bruto Tiroidiano Humano (EBTh). Foram aplicados 2,5ml da preparação (11 mg de proteína) em coluna cromatográfica (114 ml) com fluxo de eluição de 18 ml/h e frações de 3 ml.

b. Procedimento análogo em gel de Sephadex G-200 e coluna cromatográfica de 150,45 ml. Aplicados 2ml da preparação de EBTh (8,8 mg de proteína), sendo o fluxo de eluição de 9 ml/h e as frações coletadas de 3ml.

vo: volume de exclusão da coluna.

5.4 Reconhecimento da Fração I_h por Auto-anticorpos Antitiroglobulina

Com objetivo de confirmar a hipótese de que a Fração I_h correspondia à tiroglobulina humana, realizamos procedimentos de *dot blot* e *immunoblotting* nos quais a reatividade do material proteico desta fração frente a auto-anticorpos Ac-Tg foi testada. O soro padrão positivo utilizado apresentava valores de Ac-Tg correspondentes a 1480 UI/ml e ausência de Ac-TPO. Para excluir a possibilidade da presença de tiroperoxidase na amostra em questão, testamos sua reatividade a soro de paciente com tiroidite de Hashimoto positivo para Ac-TPO (3960 UI/ml) e negativo para Ac-Tg. Os soros controles não apresentaram positividade para nenhum dos auto-anticorpos acima.

Os resultados obtidos com as técnicas de *dot blot* e *immunoblotting* foram semelhantes, demonstrando a reatividade exclusiva do Pico I_h a anticorpos Ac-Tg e caracterizando esta proteína como a tiroglobulina humana. Observou-se também que as amostras de tiroglobulina humana submetidas à redução não foram reconhecidas por Ac-Tg (Figuras 8 e 9, página 48 e 49).

5.5 Dosagem de Tiroglobulina Humana no Pico I_h por Radioimunoensaio

A dosagem de tiroglobulina na fração I_h por radioimunoensaio confirmou a presença desta proteína em concentração de 4,9 mg/dl na amostra estudada.

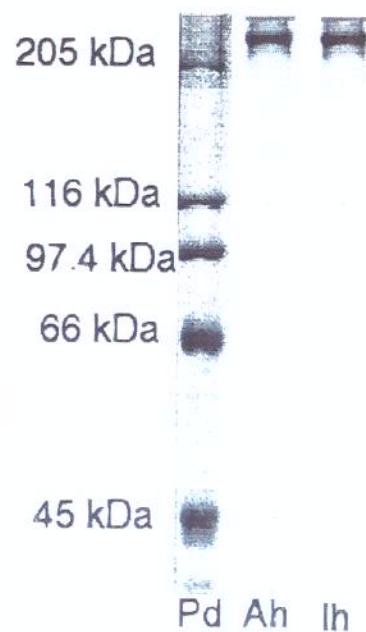


Figura 7. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS das frações A_h e I_h do extrato tireoidiano bruto humano. Gel a 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. Pd: padrão de pesos moleculares (MW-SDS 200, Sigma), cujos valores estão representados (kDa).

5.6 Tripsinização Limitada da Tiroglobulina

Visando padronizar o procedimento, utilizamos razões tripsina/tiroglobulina que variaram de 1/1000 a 1/100. Os resultados destes ensaios caracterizaram a relação de 1/1000 como a mais apropriada (Figura 10, página 50), sendo esta utilizada em todos os experimentos posteriores. Nestas condições, a clivagem proteolítica da tiroglobulina porcina resultou no surgimento de bandas com pesos moleculares que variaram 29 kDa e >205 kDa. De modo análogo, a tiroglobulina humana fragmentou-se em peptídeos cujos pesos variaram de <29 kDa a >205 kDa (Tabela II, página 51).

5.7 Reatividade de Auto-anticorpos Antitiroglobulina a Fragmentos Trípticos de Tiroglobulina Humana

Os resultados das reações de *immunoblotting* entre os fragmentos obtidos por tripsinização limitada da tiroglobulina humana e os soros de pacientes estão resumidos na Tabela III (página 52). Somente peptídeos com peso molecular entre 45 kDa e ≥ 205 kDa foram reconhecidos pelos soros provenientes dos pacientes estudados (figura 11, página 53).

A análise da frequência de reatividade dos soros de pacientes com doença de Basedow-Graves e tiroidite de Hashimoto não demonstrou diferenças estatisticamente significativas em relação a nenhum dos peptídeos estudados, permitindo reunir estes dados em um único grupo referente à doença tiroidiana auto-imune.

Os peptídeos com peso molecular de 80 kDa, 185 kDa e ≥ 205 kDa, reagiram mais freqüentemente com auto-anticorpos presentes nos soros de indivíduos com tiroidite subaguda quando comparados ao grupo com doença tiroidiana auto-imune (Tabela IV, página 54).

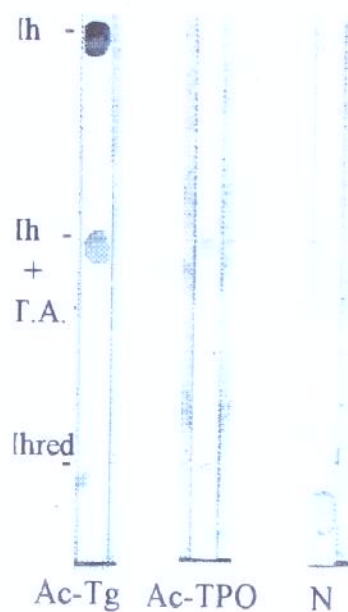


Figura 8. Representação de *dot blot* da reação do pico I_h integro diluido em PBS (I_h) ou tampão de amostra de SDS-PAGE ($I_h + T.A.$) e reduzido com 2-mercaptoetanol a 10% (I_h red).com soros contendo 1480 UI/ml de anticorpos antitiroglobulina (Ac-Tg) ou 3960 UI/ml de anticorpos antitireoperoxidase (Ac-TPO). O controle negativo da reação foi realizado com soro sem níveis detectáveis de auto-anticorpos antitiroidianos (N).Foram aplicados 125 ug de proteína diretamente sobre o papel de nitrocelulose utilizando-se o 3,3-diaminobenzidine como substrato e H_2O_2 como reveladora da reação.

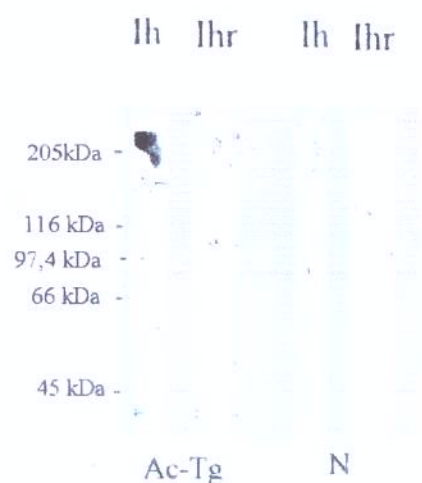


Figura 9. Representação de *immunoblotting* da reação do pico I_h integro (I_h) ou reduzido com 2-mercaptoetanol a 10% (I_h red) com soro contendo 1480 UI/ml de auto-anticorpos antitiroglobulina (Ac-Tg) porém sem níveis detectáveis de anticorpos antitireoperoxidase. O controle negativo da reação foi feito com soro cujos níveis de auto-anticorpos antiroidianos eram indetectáveis (N). Foi utilizado para separação eletroforética gel a 8% seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Os pesos moleculares de referência estão representados (kDa).

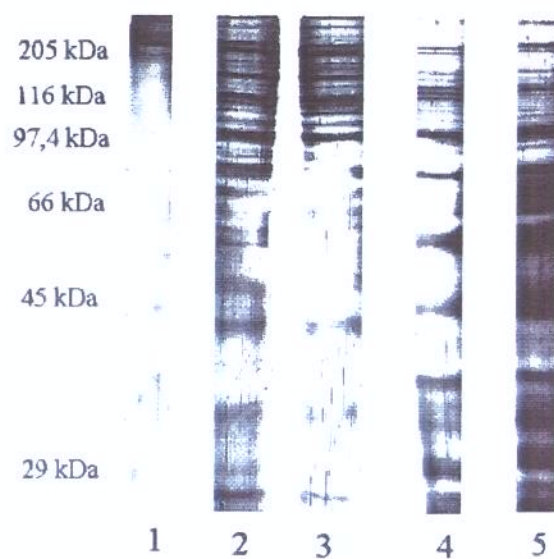


Figura 10. Representação de análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS das preparações de tiroglobulina porcina não reduzida (1) e após tripsinização por 60 minutos a 30° C nas razões enzima/substrato de 1/500 (2) e 1/1000 (3). Procedimento análogo foi realizado com a tiroglobulina humana nas razões tripsina/tiroglobulina de 1/500 (4) e 1/1000 (5). Gel a 12% corado pelo método da prata. Os padrões de peso molecular estão representados ao lado em kDa.

Tabela II. Peptídeos resultantes de tripsinização limitada^a das tiroglobulinas porcina e humana.

Tiroglobulina porcina		Tiroglobulina humana	
>205 kDa	74 kDa	>205 kDa	75 kDa
190 kDa	64 kDa	185 kDa	70 kDa
160 kDa	52 kDa	170 kDa	66 kDa
124 kDa	44 kDa	160 kDa	60 kDa
112 kDa	38 kDa	145 kDa	56 kDa
105 kDa	33 kDa	130 kDa	50 kDa
90 kDa	30 kDa	115 kDa	45 kDa
82 kDa	29 kDa	110 kDa	38 kDa
		100 kDa	31 kDa
		90 kDa	29 kDa
		80 kDa	< 29 kDa

^a Procedimento utilizando razão tripsina/tiroglobulina de 1/1000 por 60 minutos a 30° C

Tabela III. Frequências absolutas e relativas da reatividade de auto-anticorpos antitiroglobulina a fragmentos trípticos de tiroglobulina humana em pacientes com doença de Basedow-Graves, tiroidite de Hashimoto e tiroidite subaguda.

Fragmentos (kDa)	Doença de Basedow-Graves	Tiroidite de Hashimoto	Tiroidite Subaguda
>205	6/18 (33,3%)	11/18 (61%)	9/10 (90%)
185	8/18 (44,4%)	4/18 (22,2%)	8/10 (80%)
170	2/18 (11,1%)	2/18 (11,1)	0/10 (0%)
160	4/18 (22,2%)	0/18 (0%)	4/10 (40%)
145	11/18 (61%)	7/18 (38,8%)	6/10 (60%)
130	4/18 (22,2%)	7/18 (38,8%)	2/10 (20%)
115	5/18 (27,7%)	7/18 (38,8%)	3/10 (30%)
110	9/18 (50%)	7/18 (38,8%)	7/10 (70%)
100	6/18 (33,3%)	3/18 (16,7%)	6/10 (60%)
90	7/18 (38,8%)	10/18 (55,5%)	5/10 (50%)
80	3/18 (16,7%)	6/18 (33,3%)	7/10 (70%)
75	4/18 (22,2%)	4/18 (22,2%)	5/10 (50%)
70	5/18 (27,7%)	5/18 (27,7%)	0/10 (0%)
66	3/18 (16,7%)	7/18 (38,8%)	1/10 (10%)
60	9/18 (50%)	4/18 (22,2%)	4/10 (40%)
56	6/18 (33,3%)	5/18 (27,7%)	1/10 (10%)
50	0/18 (0%)	2/18 (11,1%)	1/10 (10%)
45	2/18 (11,1%)	3/18 (16,7%)	0/10 (0%)

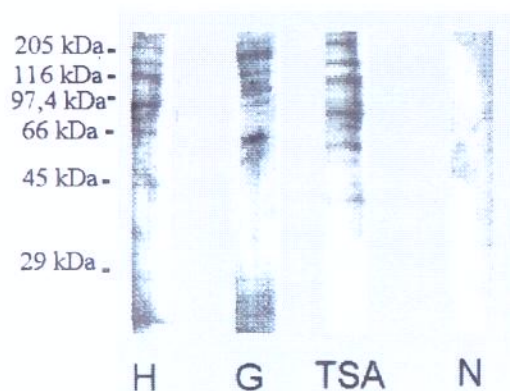


Figura 11. Representação de *immunoblotting* da reação entre os peptídeos derivados da tripsinização limitada da tiroglobulina humana e soros de pacientes com tiroidite de Hashimoto (H), doença de Basedow-Graves (G) e tiroidite subaguda (TSA) contendo auto-anticorpos antitiroglobulina. O controle negativo da reação foi feito utilizando-se soro de indivíduo sadio com níveis indetectáveis de auto-anticorpos antitiroidianos. O gel de poliacrilamida-SDS foi preparado a 12% e os padrões de peso molecular (MW-SDS 200, Sigma) estão representados ao lado em kDa.

Tabela IV. Frequências absolutas e relativas de reconhecimento dos peptídeos de 80 kDa, 185 kDa e ≥ 205 kDa por auto-anticorpos antitiroglobulina na doença tiroidiana auto-imune e tiroidite subaguda.

Fragmentos (kDa)	Doença Tiroidiana Auto-imune	Tiroidite Subaguda
≥ 205	17/36 (47,0%)	9/10 (90,0%) ^a
185	12/36 (33,3%)	8/10 (80,0%) ^a
80	9/36 (25,0%)	7/10 (70,0%) ^a

^a: $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

Embora a tiroglobulina venha sendo estudada há várias décadas, somente a partir da descrição de sua estrutura primária por MALTHIÈRY & LISSITSKY (1987) houve possibilidade de avanços na compreensão de aspectos relacionados a sua conformação espacial e comportamento como auto-antígeno. O tamanho elevado de seu monômero (2748 aminoácidos) dificulta a produção de tiroglobulina recombinante, fazendo com que estudos referentes à molécula íntegra sejam realizados com material proteico obtido de tiróides de humanos e animais. Neste contexto, várias abordagens experimentais têm sido utilizadas para purificação desta proteína, como precipitação com sulfato de amônia ou ácido ortofosfórico (GRUFFAT, et al, 1992; LEMANSKY & HERZOG, 1992) e fracionamento cromatográfico (CHAN et al., 1987).

Neste trabalho optamos pela purificação da tiroglobulina porcina e humana através de fracionamento em colunas de gel de Sephadex, uma vez que tal procedimento exclui o risco de modificações estruturais decorrentes da exposição da proteína a níveis de pH fora do limite fisiológico (EDELCOCH, 1960). Com esta metodologia foi possível obter duas proteínas análogas a partir dos extratos tiroidianos brutos humano e porcino que migraram de forma isolada em gel de poliacrilamida-SDS (frações I e I_b) e apresentavam peso molecular acima de 205 kDa. A presença de peptídeos de peso molecular baixo nestes materiais foi excluída pela análise

eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 14%, demonstrando a eficácia do procedimento.

Embora as características eletroforéticas observadas fossem semelhantes às aquelas descritas para a tiroglobulina (GENTILE et al., 1992), realizamos vários experimentos objetivando confirmar a hipótese de que a fração I_h correspondia a esta proteína. Desta forma, foi possível verificar seu reconhecimento por auto-anticorpos antitiroglobulina de pacientes com doença tiroidiana auto-imune tanto por técnica de *dot blot* quanto pelo *immunoblotting*. Deve-se ressaltar que soros contendo Ac-TPO na ausência de Ac-Tg não reconheceram a fração I_h , comportamento semelhante ao dos controles provenientes de indivíduos saudáveis, cujos níveis de auto-anticorpos antitiroidianos eram indetectáveis. Estes dados foram confirmados pela dosagem de tiroglobulina humana através de radioimunoensaio de duplo anticorpo, caracterizando definitivamente a fração I_h como tiroglobulina humana.

A síntese hormonal tiroidiana inclui a captação da tiroglobulina iodada presente no lúmen folicular e sua clivagem por endoproteases, levando à liberação de resíduos de tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) dos endossomos tardios (ROUSSET, 1991). Este processo parece ocorrer de forma controlada, havendo a participação de várias enzimas, algumas das quais já bem descritas como as catepsinas B, D, H e L. A atividade proteolítica conjunta destas enzimas permite a liberação hormonal,

podendo resultar na produção de fragmentos proteicos com peso molecular intermediário e que conservem características antigênicas.

GENTILE & SALVATORE (1993) utilizaram a técnica de proteólise limitada, com razões enzima/substrato baixas e por períodos variáveis de tempo. Assim sendo, conseguiram determinar os sítios preferenciais de clivagem para a termolisina e tripsina, seqüenciando os fragmentos obtidos e localizando-os na estrutura primária da tiroglobulina de ratos, bovinos e humanos. A comparação dos sítios de ação trípica com aqueles envolvidos na proteólise por catepsinas, descritos por DUNN et al. (1991a,b), revela que essas enzimas atuam sempre em regiões semelhantes da molécula, provavelmente expostas na superfície.

Visando padronizar os procedimentos experimentais optamos pelo tratamento enzimático da tiroglobulina porcina, uma vez que tiróides de porco são utilizadas classicamente como modelo experimental (SMITH & HALL, 1974; DAWES et al., 1977; HUMPHRIES, et al., 1981; HARDISTY et al, 1983). Após vários ensaios de tripsinização, decidimos realizar a proteólise limitada da tiroglobulina na razão enzima/substrato de 1/1000 por 60 minutos a 30° C, uma vez que, nestas condições, obtivemos peptídeos com pesos moleculares baixos, intermediários e elevados.

Os fragmentos obtidos pela tripsinização das tiroglobulinas humana e porcina apresentaram pesos moleculares variando entre ≥ 205 kDa e ≤ 29 kDa, distribuindo-se de forma análoga nos pesos intermediários. Nossos achados são comparáveis

àqueles descritos por GENTILE & SALVATORE (1993) que obtiveram peptídeos de tiroglobulina humana de 265 kDa, 230 kDa, 145 kDa, 105 kDa, 80 kDa, 56 kDa e 29 kDa. No entanto, em nossas condições experimentais, além destes fragmentos observamos o aparecimento de outros com pesos moleculares próximos. Tal fato poderia ser resultante das diferenças entre as preparações de tripsina utilizadas, uma vez que, em nosso caso, tal enzima apresentava atividade residual de quimiotripsina.

Vários autores têm publicado dados referentes à antigenicidade de fragmentos de tiroglobulina. No entanto, estes estudos geralmente abordam pequenos peptídeos sintéticos ou resultantes de proteólise com razões enzima/substrato elevadas e por períodos de até 4 horas (SALAMERO et al., 1987). Este tipo de abordagem experimental permite caracterizar pequenas seqüências de aminoácidos, mas não considera o papel antigênico de fragmentos de tiroglobulina que possam resultar, *in vivo*, da atividade de endoproteases.

A avaliação da reatividade de auto-anticorpos antitiroglobulina aos peptídeos obtidos por tripsinização limitada poderá trazer subsídios para a compreensão dos eventos que desencadeiam a produção destes anticorpos nas várias situações patológicas em que são detectados. Os resultados das reações de *immunoblotting* descritas neste trabalho sugerem que os Ac-Tg reconheçam vários sítios antigênicos distribuídos ao longo da molécula, uma vez que a reatividade se deu a todos os fragmentos maiores que 45 kDa. A incapacidade em detectar antígenos com pesos

abaixo deste limite poderia estar relacionada à desestruturação espacial destes peptídeos, conforme publicação de DONG et al. (1988) sugerindo que grande parte dos epítomos envolvidos na resposta humoral à tiroglobulina sejam conformacionais.

A análise estatística das frequências de reconhecimento de cada fragmento triptico na doença de Graves e tiroidite de Hashimoto não revelou diferenças significativas. Este resultado está em conformidade com a visão atual da literatura, na qual estas situações representam manifestações diferentes da entidade nosológica descrita como doença tiroidiana auto-imune (WEETMAN, 1991). Portanto, foi possível reunir os resultados referentes a estas duas doenças em um único grupo e compará-lo àquele formado por soros de pacientes com tiroidite subaguda.

Os soros de pacientes com tiroidite subaguda, quando comparados àqueles provenientes de pacientes com doença tiroidiana auto-imune, reconheceram mais frequentemente os peptídeos de 80 kDa, 185 kDa e ≥ 205 kDa. Os demais peptídeos reagiram com frequências semelhantes em ambas as situações.

A ação enzimática da tripsina ao nível do resíduo 522 da tiroglobulina resulta na quebra do monômero em peptídeos de 80 kDa e 265kDa. Esta região, localizada entre a quarta e quinta área de homologia interna, é susceptível à ação da termolisina e catepsinas B e L, além de representar área de fragmentação espontânea da tiroglobulina (DUNN et al., 1991; GENTILE et al., 1992; GENTILE

& SALVATORE, 1993). O fragmento de 80 kDa corresponde, portanto, aos 521 aminoácidos da extremidade N-terminal, contém o sítio hormonogênico localizado no resíduo 5 e quatro das dez áreas de homologia interna do tipo 1. Estas características indicam um peptídeo com estrutura rígida e provável manutenção dos epítomos conformacionais. Por outro lado, a banda proteica maior que 205 kDa pode representar, na realidade, o somatório de vários peptídeos conforme descrito por GENTILE & SALVATORE (1993) com pesos moleculares de 265 kDa e 230 kDa, além do monômero íntegro. Embora o fragmento de 185 kDa não tenha sido descrito por aquele autor, este provavelmente seja resultante da quebra dos peptídeos citados acima.

Estudos visando o mapeamento epitópico da tiroglobulina humana indicam a existência de até 11 áreas antigênicas, a maior parte destas localizadas na região central da molécula, mas também abrangendo as extremidades N e C-terminal (MALTHIÈRY et al., 1991). HENRY et al. (1990; 1992) demonstraram que auto-anticorpos antitiroglobulina obtidos de pacientes com doença tiroídiana auto-imune estão relacionados a epítomos localizados na região central e C-terminal da molécula, confirmando os achados de BOUANANI et al. (1992) que relataram diferenças no padrão de reconhecimento antigênico observado em indivíduos saudáveis e portadores de patologias auto-imunes. No entanto, estes autores não relatam a região reconhecida por auto-anticorpos de indivíduos normais.

RUF et al. (1985) propuseram que o repertório de Ac-Tg fosse semelhante em indivíduos normais, com doenças auto-imunes da tireóide e carcinoma tireoidiano, havendo apenas variação na frequência de envolvimento dos epítopos correspondentes. Com base nestes relatos, propuseram que mecanismos diferentes fossem responsáveis pela elevação dos títulos destes auto-anticorpos nas situações descritas. Enquanto na doença tireoidiana auto-imune os dados experimentais sugerem distúrbios relacionados à imunorregulação, como redução de atividade T supressora e elevação de T auxiliar (MORI et al., 1985; TAO et al., 1985), a produção de Ac-Tg no carcinoma envolveria liberação antigênica e ativação policlonal.

A evolução da tireoidite subaguda inclui a destruição de folículos tireoidianos com liberação de grandes quantidades de tiroglobulina para a circulação (VOLPÈ, 1991). Este fato ocorre na vigência de provável infecção viral na qual inúmeros mecanismos de defesa estariam envolvidos. Vários relatos associam infecções virais à ativação policlonal, em geral através da ação de superantígenos (MIETHKE et al., 1995). Desta forma, a presença de tiroglobulina circulante poderia desencadear, em associação à ativação policlonal, amplificação da produção de Ac-Tg, neste caso dirigidos a regiões da proteína que estejam expostas na superfície e não necessariamente relacionados às regiões imunodominantes.

Os dados obtidos através dos modelos de tireoidite experimental auto-imune indicam que vários peptídeos de tiroglobulina são eficazes na indução de Ac-Tg quando

administrados em associação a ativadores policlonais como adjuvante de Freund ou lipopolissacárides. Estes peptídeos, obtidos por clivagem proteolítica ou através de síntese em laboratório, são normalmente localizados na porção central ou C-terminal da molécula (CHRONOPOULOU & CARAYANNIOTIS, 1992; HUTCHINGS et al., 1992; TEXIER et al., 1992). Informações referentes a modelos de tiroidite experimental obtidos por administração de seqüências correspondentes à região N-terminal não são comuns na literatura.

Portanto, a maior freqüência de reatividade dos soros de pacientes com tiroidite subaguda ao peptídeo de 80 kDa descrito neste trabalho não significa, necessariamente, que este desempenhe papel patogênico no processo. Ao contrário, os anticorpos reativos a este peptídeo poderiam representar epifenômeno, uma vez que a destruição dos folículos tireoidianos e morte celular levam, provavelmente, à liberação não só de tiroglobulina, mas de proteases endógenas e peptídeos derivados de sua ação.

Vários autores (IVY, 1961; TIKKANEN & LAMBERG, 1982; MARINONI & MARINONI, 1984; GOZARIU et al., 1986) relatam episódios de tiroidite de Hashimoto que surgem após surtos de tiroidite subaguda. O estudo do perfil de reatividade de anticorpos Ac-Tg nestes pacientes, verificando a freqüência de reatividade aos diversos peptídeos de tiroglobulina pode elucidar alguns dos mecanismos envolvidos nestes casos.

A verificação da eficácia do peptídeo de 80 kDa, ou seus fragmentos, na indução de tiroidite experimental auto-imune poderá trazer subsídios para melhor compreensão das diferenças existentes entre os sítios de ligação dos auto-anticorpos antitiroglobulina na doença tiroidiana auto-imune e outros processos não auto-imunes.

7. CONCLUSÕES

A metodologia empregada para obtenção dos extratos tiroidianos brutos e seu posterior fracionamento em colunas cromatográficas resultou na obtenção de proteínas com elevado grau de pureza, caracterizadas como tiroglobulinas porcina e humana.

O ensaio de tripsinização limitada da tiroglobulina em razões enzima/substrato de 1/1000, por 60 minutos a 30° C resultaram na obtenção de fragmentos proteicos semelhantes aos descritos previamente por outros autores, embora tenham sido observados outros peptídeos com pesos moleculares próximos a estes. Tais diferenças refletem, provavelmente, a presença de atividade residual de quimotripsina na preparação enzimática utilizada neste trabalho.

Os peptídeos derivados da tripsinização limitada das tiroglobulinas humana e porcina foram análogos, com pesos moleculares variando entre cerca de 29 kDa e ≥ 205 kDa. O reconhecimento dos fragmentos trípticos de tiroglobulina humana por anticorpos antitiroglobulina de pacientes com doença de Basedow-Graves e tiroidite de Hashimoto foi semelhante do ponto de vista estatístico, reforçando a hipótese atual da literatura, na qual tais doenças são descritas associadamente como doença tiroidiana auto-imune.

Anticorpos antitiroglobulina de pacientes com tiroidite subaguda reagiram mais freqüentemente com peptídeos de 80 kDa, 185 kDa e ≥ 205 kDa quando comparados a anticorpos de indivíduos portadores de doença tiroidiana auto-imune.

A comparação de nossos resultados com os de outros autores sugere que o peptídeo de 80 kDa, reconhecido mais freqüentemente pelos soros provenientes de indivíduos com tiroidite subaguda, corresponda à extremidade N-terminal da tiroglobulina. Esta área difere da região imunodominante da molécula, reconhecida por auto-anticorpos na doença tiroidiana auto-imune e localizada a nível central e C-terminal.

8. SUMMARY

Thyroglobulin is synthesized by thyroid epithelial cells and is one of the autoantigens involved in thyroid autoimmune diseases and the main one involved in thyroiditis in animal models. Many studies related to the immunogenicity of human thyroglobulin have been published, including those describing its epitopic mapping and the oligopeptides obtained by enzymatic proteolysis.

Thyroid hormone synthesis involves thyroglobulin capture from follicular *lumen* and its processing by lysosomal proteases. Among these enzymes, cathepsins B, D, H and L have been described. The concerned action of these endoproteases leads to proteolysis in pre-determined sites. Recent papers describe the existence of preferential sites of trypsin action, demonstrating that these areas are the same involved in thyroglobulin lysis by endogenous proteases. Furthermore, the model of limited trypsinization could be used to obtain peptides analogous to those produced *in vivo* by thyroid proteases.

In this study we have purified porcine and human thyroglobulin from thyroid crude extracts using molecular weight exclusion chromatography. Human thyroglobulin obtained by this method was used in limited proteolysis with trypsin, resulting in peptides ranging from 29 kDa to ≥ 205 kDa. The reaction of these peptides with antithyroglobulin antibodies was analyzed by immunoblotting.

We observed that all the peptides were recognized equally by serum from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. However, when patients with thyroid autoimmune disease and with subacute thyroiditis were compared, it was possible to verify that peptides with 80 kDa, 185 kDa and ≥ 205 kDa were more frequently recognized by serum from this second group.

Data from other researchers suggest that the peptide with 80 kDa could represent the amino-terminal extremity of thyroglobulin, an area not frequently involved in autoantibodies production in autoimmune thyroid diseases.

Our findings suggest that, although antithyroglobulin autoantibodies recognize all the peptides obtained by limited trypsinization of human thyroglobulin, the frequencies of reaction with each fragment differ between autoimmune and non autoimmune thyroid diseases. Further characterization of these peptides, with special interest on that with 80 kDa may contribute to understand the relationships among thyroid endoproteases, thyroglobulin peptides obtained *in vivo* and humoral response to thyroglobulin.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.D. & PURVES, H.D. Abnormal response in the assay of thyrotropin. *Proc. Univ. Otago Med. Sch.*, 34:11, 1956.
- ALLEN, E.M.; APPEL, M.C. & BRAVERMAN, L.E. The effect of iodine ingestion on the development of spontaneous lymphocytic thyroiditis in the diabetes-prone BB/W rat. *Endocrinology*, 118:1977, 1986.
- BAKER, J.R.; SAUNDERS, N.B.; WARTOFSKY, L., TSENG, Y.C. & BURMAN, K.D. Seronegative Hashimoto thyroiditis with thyroid autoantibody production localized to the thyroid. *Ann. Intern. Med.*, 108: 26, 1988.
- BASTENIE, P.A; BONNYNS, M & NEVE, P. Subacute and chronic granulomatous thyroiditis. In BASTENIE, P. A. & ERMANS, A. M. Thyroiditis and thyroid function. Clinical, Morphological and Physiopathological Studies. Oxford, Pergamon Press, 1972.
- BENKER, C; OLBRICHT, T; WINDECK, R.; WAGNER, R.; ALBERS, H.; LEDERBOGER, S.; HOFF, H.G. & REIWEIN, D. The sonographical and functional sequelae of De Quervain's subacute thyroiditis: long term follow-up. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 117: 435, 1988.
- BERNIER-VALENTIN, F.; KOSTROUCH, Z.; RABILLOUD, R & ROUSSET, B. Analysis of the thyroglobulin internalization process using *in vitro* reconstituted thyroid follicles: evidence for a coated vesicle-dependent endocytic pathway. *Endocrinology*, 129 (4): 2194, 1991.
- BLIDDAL, H.; BECH, K.; FELDT-RASMUSSEN, U.; HIER-MADSEN, L.; THOMSEM, B. & NIELSEN, H. Humoral autoimmune manifestations in subacute thyoroiditis. *Allergy*, 40: 599, 1985.
- 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.

- BOUANANI, M.; HANIN, V.; BASTIDE, M. & PAU, B. New antigenic clusters on human thyroglobulin defined by an expanded panel of monoclonal antibodies. *Immunology Letters*, 32:259, 1992.
- BOUANANI, M.; PIECHACZYK, M.; PAU, B. & BASTIDE, M. Significance of the recognition of certain antigenic regions on the human thyroglobulin molecule by natural autoantibodies from healthy subjects. *J. Immunol.*, 143:1129, 1989.
- BURMAN, K.D. & BAKER JR., J.R. Immune mechanisms in Graves' disease. *Endoc. Rev.*, 6:183, 1985.
- BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112: 195, 1981.
- CHAMPION, B.R.; RAYNER, D.C.; BYFIELD, P.G.H PAGE, K.R.; CHAN, C.T.J. & ROITT, I.M. Critical role of iodination for T cell recognition of thyroglobulin in experimental murine thyroid autoimmunity. *J.Immunol.*, 139:3665, 1987.
- CHAMPION, B. R.; COOKE, A. & RAYNER, C. Thyroid autoimmunity. *Current Opinions in Immunology*, 4: 770, 1992.
- CHAN, C.T.J.; BYFIELD, R.L.; HIMSWORTH, R.L. & SHEPHERD, P. Human autoantibodies to thyroglobulin are directed towards a restricted number of specific epitopes. *Clin. Exp. Immunol.*, 70:516, 1987.
- CHANG, T.C.; CHEN, F.W.; KOU, S.H.; CHANG, C.C. & HUANG, S.M. Diagnostic criterion of granulomatous thyroiditis by the needle aspiration cytopathology. *Taiwan. I. Hsueh. Hui. Tsa. Chih.*, 82: 496, 1983.
- CHARREIRE, J. Immune mechanisms in autoimmune thyroiditis. *Adv. Immunol.*, 46: 263, 1989.

- CHIOVATO, L. BASSI, P.; SANTINI, F.; MAMMOLI, C.; LAPI, 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.
- CHRONOPOULOU, E. & CARAYANNIOTIS, G. Identification of a thyroiditogenic sequence within the thyroglobulin molecule. *J. Immunol.*, 149:1339, 1992.
- CZARNOCKA, B.; RUF, J.; FERRAND, M. & CARAYON, P. Parenté antigénique entre la peroxydase thyroïdienne et l'antigène microsomal impliqué dans les affections auto-immunes de la thyroïde. *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.
- CZERNIAK, K. & STEIMBERG, H. The chronology of events in the development of subacute thyroiditis studied by radioactive iodide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17: 1448, 1957.
- DAWES, P.; PETERSEN, V.; REES SMITH, B.; & HALL, R. Solubilization and partial characterization of human and porcine thyrotrophin receptors. *J. Endocrinol.*, 78: 89, 1978.
- DE BLAS, A. L. & CHERWINSKI, H. M. Detecton of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.*, 133: 214, 1983.
- DE QUERVAIN, F. Die akute nicht Eiterige Thyreoditis und die Beleiligung der Schilddruse an akuten intoxicationen und infektionen uberhaupt. *Mett. Grenzgeb. Med. Chir.* 2:, Supplement Bd. 1, 1904.
- DEBONS-GUILLEMIN, M.C.; VALLA, J.; GAZEAU-J; WYBIER-FRANQUIL J.; GIRON, M.L.; TOUBERT, M.E.; CANIVET, M. & PERIES, J. No evidence of spumaretroviruses infection markers in 19 cases of De Quervain's thyroiditis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8: 1547, 1992.

- DESRUISSEAU, J.; FRANC, J. L.; GRUFFAT, D. & HABAUD, O. Glycosylation of thyroglobulin secreted by porcine cells cultured in chamber system: thyrotropin controls the number of oligosaccharides and their anionic residues. *Endocrinology*, **134** (1):1676, 1994.
- DONG, Q.; LUDGATE, M. & VASSART, G. Towards an antigenic map of human thyroglobulin: identification of ten epitope-bearing sequences within the primary structure of thyroglobulin. *J. Endocrinol.*, **122**:169, 1989.
- DONIACH, D & ROITT, I. Autoimmunity in Hashimoto's disease and its implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **17**:1239, 1957.
- DUNN, A. D.; CRUTCHFIELD, H. E. & DUNN, J. Proteolytic processing of thyroglobulin by extracts of thyroid lysosomes. *Endocrinology*, **128**(6): 3073, 1991a.
- DUNN, A. D.; CRUTCHFIELD, H. E. & DUNN, J. Thyroglobulin processing by thyroid proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D and L. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(30): 20198, 1991b.
- 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.
- EDELHOCH, H. The properties of thyroglobulin: the effects of alkali. *J. Biol. Chem.*, **235**:1326, 1960.
- ERICSSON, U.B.; CHRISTENSEN, S.B. & THORELL, J.I. A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid diseases as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radioassay. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **37**:154, 1985.
- EYLAN, E. ZMUCKY, R & SHEBA, C. Mumps virus and subacute thyroiditis: evidence of a causal association. *Lancet* **1**: 1062, 1957.

- 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.
- FLÜGEL, R.M. Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes* **4**: 739, 1991.
- FUKATA, S.; MATSUZUKA, F.; KOBAYASHI, A.; HIRAI, K.; KUMA, K. & SUGAWARA, M. Development of Graves' disease after subacute thyroiditis: two unusual cases. *Acta Endocrinol (Copenh.)*, **126**: 495, 1992.
- FUKAZAWA, H.; SAKURADA, T.; TAMURA, K.; YAMAMOTO, M.; KATSUMI, Y.; KAISE, K.; KAISE, N.; ITAGAKI, Y.; SAITO, S. & YOSHINAGA, K. The influence of immunosuppressive acidic protein on the activity of K-lymphocytes in subacute thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**: 193, 1990.
- GALLUZZO, A.; GIORDANO, C.; ANDRONICO, F.; FILARDO, C.; ANDRONICO, C. & GIANDOMENICO, B. Leucocyte migration test in subacute thyroiditis: hypothetical role of cell-mediated immunity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **50**:1038, 1980.
- GAVARET, J. M., DÈME, D., NUNEZ, J. & SALVATORE, G. Sequential reactivity of tyrosil residues of thyroglobulin upon iodination catalysed by thyroid peroxidase. *J. Biol. Chem.* **252**: 3281, 1977.
- GENTILE, F.; PALUMBO, G. & SALVATORE, G. The origin of the electrophoretic doublet of thyroglobulin. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, **186**:1185, 1992.
- GENTILE, F. & SALVATORE, G. Preferential sites of proteolytic cleavage of bovine, human and rat thyroglobulin. The use of limited proteolysis to detect solvent-exposed regions of the primary structure. *Eur. J. Biochem.* **218**: 603, 1993.

- GOZARIU, L.; STROE, M.; VLADUTIU, T.; YEPEZ-ESCOBAR, G.; SIMIONES-C.O.; L.; SZANTAY, E.; DUMITRU, E. & FLORESCU, O. Late hypothyroidism following subacute thyroiditis. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **87**: 48, 1986.
- GRAVES, R.J. Clinical lectures. *Lond. Med. Surg. J.* **7**: 516, 1835.
- GRUFFAT, D.; VENOT, N.; MARRIQ, C. & CHABAUD, O. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin secreted by porcine thyroid cells cultured on porous bottom chambers: effect of iodide. *Endocrinology*, **131**(6): 2921, 1992.
- GUILBERT, B.; DIGHIERO, G. & AVRAMEAS, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera I: detection, isolation and characterization. *J. Immunol.*, **128**(6):2779, 1985.
- HARDISTY, C.; KENDALL-TAYLOR, P.; ATKINSON, S.; HUMPHRIES, H. & MUNRO, D. The assay of Graves' immunoglobulins: a comparison of different methods. *Clinical Endocrinology*, **18**: 637, 1983.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of Lowry's method that gives a linear photometric respons. *Anal. Biochem.*, **48**: 422, 1972.
- HASHIMOTO, H. Zur Kennttnis der lymphomatosen Veranderung der Schilddruse (Struma lymphomatosa). *Arch. Klin. Chir.* **97**: 21, 1912.
- HEIDELBERGER, M. The molecular composition of immune precipitates from rabbit sera. *Journal of the American Chemical Society*, **60**:242, 1938.
- HENRY, M.; MALTHIÈRY, Y.; ZANELLI, E. & CHARVET, B. Epitope mapping of human thyroglobulin: heterogeneous recognition by thyroid pathologic sera. *J. Immunol.*, **145**:3692, 1990.
- HENRY, M.; ZANELLI, E. & MALTHIÈRY, Y. Anti-human thyroperoxidase and anti-human thyroglobulin antibodies present no cross-reactivity on recombinant peptides. *Clin. Exp. Immunol.*, **86**:478, 1991.

- HENRY, M.; ZANELLI, E.; PIECHACZYK, M.; PAU, B. & MALTHIÈRY, Y. A major human thyroglobulin epitope defined with monoclonal antibodies is mainly recognized by human autoantibodies. *Eur. J. Immunol.*, 22:315, 1992.
- HOLBOROW, E.J.; BROWN, P.C.; ROITT, I.M. & DONIACH, D. Cytoplasmic localization of complement fixing auto-antigen in human thyroid epithelium. *Br. J. Exp. Pathol.* 40: 583, 1959.
- HOSHIOKA, A.; KOHNO, Y.; KATSUKI, T.; SHIMOJO, N.; MARUYAMA, N.; INAGAKI, Y.; YOKOCHI, T.; TARUTANI, O.; HOSOYA, T. & NIIMI, H. A common T-cell epitope between human thyroglobulin and human thyroperoxidase is related to murine experimental autoimmune thyroiditis. *Immunology Letters*, 37:235, 1993.
- HUMPHRIES, H.; DIRMIKIS, S. & MUNRO, D.S. Comparison of human and porcine membranes for radioreceptor assay of bovine thyrotrophin and thyrotrophin-binding inhibiting immunoglobulins. *J. Endocrinol.*, 93: 371, 1982.
- HUNG, W. Mumps thyroiditis and hypothyroidism. *J. Pediatr.*, 74:611, 1969.
- HUTCHINGS, P.R.; COOKE, A.; DAWE, K.; CHAMPION, B.R.; GEYSEN, M.; VALERIO, R. & ROITT, I.M. A thyroxine-containing peptide can induce murine experimental autoimmune thyroiditis. *J. Exp. Med.*, 175:869, 1992.
- ILICKI, A.; GAMSTEDT, A. & KARLSSON, F.A. Hyperthyroid Graves' disease without thyrotropin receptor antibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74: 1090, 1992.
- IVY, H.K. Permanent myxedema: an unusual complication of granulomatous thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21: 1284, 1961.
- JAROSZEWSKI, J.; SUNDICK, R.S. & ROSE, N.R. Effects of antiserum containing thyroglobulin antibody on the chicken thyroid gland. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 10:95, 1978.

- 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 and its involvement in complement-mediated cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.*, **45**:316, 1981.
- KITCHNER, M. I. & CHAPMAN, I. M. Subacute thyroiditis: a review of 105 cases. *Clin. Nucl. Med.*, **14**: 439, 1989.
- KOFFLER, D. & FRIEMAN, A.H. Localization of immunoglobulins in chronic thyroiditis. *Lab. Invest.*, **13**:239, 1964.
- KOHNO, Y.; NAITO, N. & HIYAMA, Y. Thyroglobulin and thyroid peroxidase share common epitopes recognized by autoantibodies in patients with chronic autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67**:899, 1988.
- KOSTROUCH, Z.; BERNIER-VALENTIN, F.; MUNARI-SILEM, Y.; RAJAS, F.; RABILLOU, R. & ROUSSET, B. Thyroglobulin molecules internalized by thyrocytes are sorted in early endosomes and partially recycled back to the follicular lumen. *Endocrinology*, **132**(6): 2645, 1993.
- 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.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the basal of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680, 1970.
- LAMAS, L., TAUROG, A., SALVATORE, G. & ELDOCH, H. Preferential synthesis of thyroxine from early iodinated tyrosyl residues in thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* **249**: 2732, 1974.
- LEBACQ, E. G.; THERASSE, G.; SCHMITZ, A.; DELANNOY, A. & DESTAILLEURS, C. Subacute thyroiditis. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **81**: 707, 1976.
- LEMANSKY, P. & HERZOG, V. Endocytosis of thyroglobulin is not mediated by mannose-6-phosphate receptors in thyrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **209** 111: 1992

- LIO, S.; POINTECORVI, A.; CARUSO, M.; MONACO, F. & D'ARMIENTO, M. Transitory subclinical and permanent hypothyroidism in the course of subacute thyroiditis (De Duervain's). *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **106**:67, 1984.
- LITTAUER, U. Z.; THIERAUF, M.; GINZBURG, I. & POSTINGL, H. Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7162, 1986.
- 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.
- MALTHIÈRY, Y. & LISSITZKY, S. Primary structure of thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur. J. Biochem.*, **165**: 491, 1987.
- MALTHIÈRY, Y. ; MARRIQ, C.; BERGÉ-LEFRANC, J.; HENRY, M.; LEJEUNE, P.; RUF, J. & LISSITZKY, S. Thyroglobulin structure and function: recent advances. *Biochimie*, **71**: 195, 1989.
- MALTHIÈRY, Y.; HENRY, M. & ZANELLI, E. Epitope mapping of the human thyroglobulin reveals a central immunodominant region. *FEBS Lett.*, **279**: 190, 1991.
- MARINONI, U. & MARINONI, P. Evoluzione, a lunga distanza, della tiroide acuta e subacuta. *G. Clin. Med.*, **65**: 433, 1984.
- MARRIQ, C.; ROLLAND, M. & LISSITZKY, S. Structure-function relationship in thyroglobulin: amino acid sequence of two different thyroxine-containing peptides from porcine thyroglobulin. *EMBO J.*, **1**: 397, 1982.
- MARRIQ, C.; ROLLAND, M. & LISSITZKY, S. Amino acid sequence of the unique 3,5,3'-triiodothyronine-containing sequence from porcine thyroglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**: 206, 1983.
- MCARTHUR, A.M. Subacute giant cell thyroiditis associated with mumps. *Med. J. Aust.* **1**: 116, 1964.

- McLACHLAN, S.M.; PEGG, C.A.S.; ATHERTON, M.C.; MIDDLETON, S.M.; CLARK, F. & REES-SMITH, B. TSH antibody synthesis by thyroid lymphocytes. *Clin. Endocrinol.*, **24**: 223, 1986a.
- MC LACHLAN, S.M.; ATHERTON, M.B., MIDDLETON, S.L. & REES-SMITH, B. A technique for the isolation and mitogenic activation of thyroglobulin-specific human B lymphocytes. *Immunol. Lett.*, **12(2-3)**:127, 1986b.
- MIETHKE, T.; WAHL, C.; HEEG, K. & WAGNER, H. Superantigens: the paradox of T-cell activation versus inactivation. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **106**:3, 1995.
- MITANI, Y.; SHIGEMASA, C.; KOUCHI, T.; TANIGUCHI, S.; UETA, Y.; YOSHIDA, A. & MASHIBA, H. Detection of thyroid-stimulating antibody in patients with inflammatory thyrotoxicosis. *Horm. Res.*, **37**: 196, 1992.
- 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.
- MORRISEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, **117**: 307, 1981.
- NAKAMURA, S.; HATTORI, J.; ISHIYAMA-TAKUNO, M.; SHIMA, H.; MATSUI, I. & SAKATA, S. Non-suppressed thyroidal radioactive iodine uptake (RAIU) in a case of subacute thyroiditis with thyroid-stimulating antibodies (TSAb). *Endocrinol. Japon.*, **39**: 469, 1992.
- OKAYASU, I. Transfer of experimental autoimmune thyroiditis to normal syngeneic mice by injection of mouse thyroglobulin-sensitized T lymphocytes after activation with concanavalin-A. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **36**:101, 1985.
- PARMA, J.; CRISTOPHE, D.; POHL, V. & VASSART, G. Structural organization of the 5' region of the thyroglobulin gene. Evidence of intron loss and "exonization" during evolution. *J. Mol. Biol.*, **196**:769, 1987.
- PERSSON, P. S. Cytodiagnosis of thyroiditis: a comparative study of cytological, histological, immunological and clinical findings in thyroiditis, particularly in diffuse lymphoid thyroiditis. *Acta Med. Scand. (Suppl.)*, **483**: 1, 1968.

- RAPOPORT, B.; GREENSPAN, F.S.; FILETTI, S. & PEPITONI, M. Clinical experience with human thyroid cell bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58**:332, 1984.
- RAWITCH, A.B.; CHERNOFF, S. B.; LITWER, M. R.; ROUSE, J. B. & HAMILTON, J. W. Thyroglobulin structure-function. The amino acid sequence surrounding tyroxine. *J. Biol. Chem.* **258**: 2079, 1983.
- ROITT, I. M.; DONIACH, D.; CAMPBELL, P. N. & VANGHAN-HUDSON, E. Autoantibodies in Hashimoto's thyroiditis. *Lancet*, **2**: 820, 1956.
- ROUSSET, B. Trafic intracellulaire et clivage protéolytique de la thyroglobuline, la prohormone thyroïdienne. *Annales d'Endocrinologie (Paris)*, **52**:355, 1991.
- ROSE, N.R. & WITEBSKY, E. Studies on organ-specificity. V. Changes in the thyroid gland of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extract. *J. Immunol.* **76**: 41, 1956.
- RUF, J.; CARAYON, P. & LISSITZKY, S. Various expressions of a unique anti-human thyroglobulin antibody repertoire in normal state and autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.*, **15**:268, 1985.
- RUF, J.; FERRAND, M. & CARAYON, P. Cross-reactivity between antibody to thyroglobulin and thyroperoxidase. *In*: Thyroperoxidase and thyroid autoimmunity. Carayon, P. & Ruf, J. eds. Libbey, London, pp 183-193, 1990.
- RUF, J.; FERRAND, M.; DURAND-GORDE, J.M. & CARAYON, P. Immunopurification and characterization of thyroid autoantibodies with dual specificity to thyroglobulin and thyroperoxidase. *Autoimmunity*, **11**:179, 1992.
- RUF, J.; FERRAND, M.; DURAND-GORDE, J.M.; DE MICCO, C. & CARAYON, P. Significance of thyroglobulin antibodies cross-reactive with thyroperoxidase (TGPO antibodies) in individual patients and immunized mice. *Clin. Exp. Immunol.*, **92**:65, 1993.

- RUF, J.; FELDT-RASMUSSEN, U.; HEGEDÜS, L.; FERRAND, M. & CARAYON, P. Bispecific thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibodies in patients with various thyroid and autoimmune diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**:1404, 1994.
- SAKATA, S.; MATSUDA, M.; TAKUNO, H.; OGAWA, T.; MATSUI, I.; SARUI, H.; MAEKAWA, H.; KOTANI, T.; OKUDA, K.; TARUTANI, O. & MIURA, K. Immune recognition of hormonogenic sites of human thyroglobulin: studies of Graves'sera and a murine monoclonal antibody with thyroid hormone antibody activity. *Endocrine Journal*, **40**:393, 1993.
- SAKURAI, S.; FOGELFELD, L. & SCHNEIDER, A. B. Anionic carbohydrate groups of human thyroglobulin containing both phosphate and sulfate. *Endocrinology*, **129** (2): 915, 1991.
- SALAMERO, J.; REMY, J.J.; MICHEL-BECHET, M.M & CHARREIRE, J. Experimental autoimmune thyroiditis induced by a 5-10 kDa tryptic fragment from porcine thyroglobulin. *Eur. J. Immunol.*, **17**:843, 1987.
- SAUAIA, H. & LAICINE, E. M. Vertical slab electrophoresis apparatus. *Anal. Biochem.*, **80**:125, 1977.
- SHEBA, C. & BANK, H. Prevention of mumps thyroiditis. *N Eng J Med* **279**:108, 1968.
- SMITH, B. R. & HALL, R. Binding of thyroid stimulators to thyroid membranes. *FEBS Lett.*, **42**: 301, 1974.
- STANCEK, D.; STANCEKOVA-GRESSNEROVA, M.; JANOTKA, M.; HNILICA, P. & ORAVEC, D. Isolation and some serological and epidemiological data on the viruses recovered from patients with subacute thyroiditis (De Quervain's). *Med. Microbiol.Immunol.*, **161**: 133, 1975.
- TAKAGI, Y.; OMURA, T. & GO, M. Evolutionary origin of thyroglobulin by duplication of esterase gene. *FEBS Lett.*, **282**(1):17, 1991.

- 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.
- TAMAI, H.; NOZAKI, T.; MUKUTA, T.; MORITA, T.; MATSUBAYASHI, S.; KUMA, K.; KUMAGAI, L.F. & NAGATAKI, S. The incidence of thyroid stimulating blocking antibodies during the hypothyroid phase in patients with subacute thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**: 245, 1991.
- TAMBASCIA, M. A. Contribuição ao estudo da tiroidite subaguda: aspectos clínicos, laboratoriais, citológicos e imunogenéticos. Campinas. 1992./Tese. Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- TAO, T.; GATENBY, P.A.; LEU, S.; PHAM, H. & KRISS, J.P. Helper and supressor activities of lymphocyte subsets on antithyroglobulin production in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **61**:520, 1985.
- TEXIER, B.; BÉDIN, C.; TANG, H.; CAMOIN, L.; LAURENT-WINTER, C. & CHARREIRE, J. Characterization and sequencing of a 40-aminoacid peptide from human thyroglobulin inducing experimental autoimmune thyroiditis. *J. Immunol.*, **148**:3405, 1992.
- TIKKANEN, M.J. & LAMBERG, B.A. Hypothyroidism following subacute thyroiditis. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **101**: 348, 1982.
- TOMER, Y. & DAVIES, T.F. Infection, thyroid disease and autoimmunity. *Endocrine Reviews*, **14**(1): 107, 1993.
- TOTTERMAN, T.H. Distribution of T, B and thyroglobulin-binding lymphocytes infiltrating the gland in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and De Quervain's thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **10**: 270, 1978.
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T. & GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350, 1979.

- VAN HERLE, A.J.; VASSART, G. & DUMONT, J. E. Control of thyroglobulin synthesis and secretion. *New England J. Med.*, 301:239, 1979.
- VLADUTIU, A.O. & ROSE, N.R. Transfer of experimental autoimmune thyroiditis of the mouse by serum. *J. Immunol.*, 106:1139, 1971.
- VOLPÉ, R.; ROW, V.V. & EZRIN, C. Circulating viral and thyroid antibodies in subacute thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol.*, 27: 1275, 1967.
- VOLPÉ, R. Subacute (De Quervain's) thyroiditis. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 8: 81, 1979.
- VOLPÉ, R. Autoimmune thyroiditis. In: The Thyroid. A fundamental and clinical text. Ingbar, S. H. & Braverman, L. E., 6^a ed., 1991.
- VON BASEDOW, K.A. Exophtalmos durch hypertrophie des zellgewebes in der augenhohle. *Wochenschrift für die gesamte Heilkunde* 13: 14, 1840.
- WALL, J.R.; FANG, S.L.; INGBAR, S.H. & BRAVERMAN, L.E. Lymphocyte transformation in response to human thyroid extract in patients with subacute thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 43: 587, 1976.
- WALL, J.R.; STRAKOSCH, C.R.; BANDFY, P. & BAYLY, R. Nature of thyrotropin displacement activity in subacute thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54: 349, 1982.
- WARTHIN, A.S. The constitutional entity of exophtalmic goiter and so-called toxic adenoma. *Ann. Int. Med.*, 2: 553, 1928.
- WARTOFSKY, L. & SCHAAF, M. Graves' disease with thyrotoxicosis following subacute thyroiditis. *Am. J. Med.*, 38:761, 1987.
- WEETMAN, A.P.; MCGREGOR, A.M.; WHEELER, M.H. & HALL, R. Extrathyroidal sites of autoantibody synthesis in Graves' disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 56: 330, 1984.

- WEETMAN, A.P.; SMALLRIDGE, R.C. & NUTMAN, T.B. Persistent thyroid autoimmunity after subacute thyroiditis. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 23:1, 1987.
- WEETMAN, A.P. Thyroid autoimmune disease. *In: The Thyroid. A fundamental and clinical text.* Ingbar, S. H. & Braverman, L. E., 6ª ed., 1991.
- WERNER, J. & GELDERBLOM, H. Isolation of foamy virus from patients with De Quervain thyroiditis. *Lancet* 2: 258, 1979.
- WERNER, S.C. Graves' disease following acute (subacute) thyroiditis. *Arch. Intern. Med.*, 139: 1313, 1979.
- WOEBER, K. A. Graves' Disease. General consideration. *In: The Thyroid. A fundamental and clinical text.* Ingbar, S. H. & Braverman, L. E., 5ª ed., 1986, pag. 982.
- ZOLLNER, R. L. Isolamento e identificação de antígenos de membrana basal pulmonar excretado na urina de ratos normais. Ribeirão Preto. 1990./Tese. Doutorado. Universidade de São Paulo.