

# Topologia das principais proteínas envolvidas na síntese de hormônios tireoideanos

## *Topology of the main proteins involved in thyroid hormone synthesis*

---

WAGNER DE JESUS PINTO<sup>1</sup>  
MIGUEL ARCANJO AREAS<sup>2</sup>  
JOSÉ EDUARDO DE MARIALVA<sup>2</sup>  
SILVANA MARIA GUIDA CARDOSO<sup>2</sup>

---

### RESUMO

**Objetivos:** descrever a topologia das principais proteínas envolvidas na síntese de hormônios tireoideanos através da revisão da literatura científica especializada.

**Fonte de dados:** foram realizadas buscas nos bancos de dados Scielo e Pubmed, utilizando palavras chaves relacionadas ao tema em questão.

**Síntese dos dados:** os hormônios tireoideanos são armazenados no colóide, uma substância presente na luz do folículo e formada em grande parte pela glicoproteína mais altamente expressa do tireócito, a tireoglobulina. A tireoglobulina apresenta 660 kDa e é codificada por um único gen situado no cromossomo 8, (8q24.21-8q24.23), apresentando 48 éxons. A iodação dos resíduos de tirosina presentes na tireoglobulina é realizada por outra proteína, a tireoperoxidase. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é essencial como oxidante na reação de oxidação do iodeto catalisada pela tireoperoxidase e, quando os níveis intracelulares de iodeto são suficientes, a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> passa a ser o passo limitante na biossíntese dos hormônios tireoideanos. A enzima responsável pela geração de peróxido de hidrogênio foi caracterizada em tireóides humanas e, posteriormente, clonada, tendo sido denominada oxidase tireóidea (ThOx ou DuOx).

**Conclusões:** o estudo estrutural e topológico das proteínas envolvidas com a hormonogênese tireoideana é a base para a melhor compreensão em nível molecular da função da glândula tireóide, sendo ainda útil na identificação precisa de mutações e regiões e de interação com fármacos, receptores, ou mesmo imunocomplexos.

**DESCRIPTORIOS:** HORMÔNIOS TIRÓIDEOS/síntese química; GLÂNDULA TIRÓIDE/fisiologia; GLÂNDULA TIRÓIDE/fisiopatologia; PROTEÍNAS.

### ABSTRACT

**Aims:** To describe the topology of the main proteins related to thyroid synthesis through science articles from data bases.

**Source of data:** Articles were retrieved from Pubmed and Scielo data base using the key-words related to the theme.

**Summary of the findings:** Thyroid hormones are stored in the colloid, a substance found in the thyroid follicle and the site of the highest expressed glycoprotein of the thyroid cell, thyroglobulin, which is a 660kDa single polypeptide protein, which gene is located on chromosome 8 (8q24.21-8q24.23) and contains 48 exons. The incorporation of iodine in

---

<sup>1</sup> Mestre em Fisiologia e Biofísica e Doutor em Biologia Funcional e Molecular pela Universidade Estadual de Campinas. Professor Adjunto da Universidade Federal do Acre.

<sup>2</sup> Mestre em Biologia Funcional e Molecular e Doutor em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Professor Assistente do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

<sup>3</sup> Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas. Professor da Universidade São Judas Tadeu.

<sup>4</sup> Mestre em Biologia Funcional e Molecular e Doutora em Biologia Funcional e Molecular pela Universidade Estadual de Campinas.

tyrosine residues in thyroglobulin is catalyzed by another protein, thyroperoxidase. Thyroperoxidase requires hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) for the iodine oxidation in this reaction, and in the presence of sufficient cytosolic iodine,  $H_2O_2$  is rate limiting in the biosynthesis of thyroid hormones. The generation of  $H_2O_2$  is regulated by thyroid oxidase (ThOx or DuOx). Structural and topological studies of the proteins involved in thyroid hormone synthesis provide the basis for the best understanding of thyroid function at molecular and atomic resolution.

**Conclusions:** Studies looking at structural and topological characteristics of thyroid proteins and their production can provide better understanding into the identification at molecular level of mutations and interactions with receptors, drugs and immunocomplexes, that have medical relevance.

**KEY WORDS:** THYROID HORMONES/chemical synthesis; THYROID GLAND/physiology; THYROID GLAND/physiopathology; PROTEINS.

## INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoideanos são essenciais para o pleno desenvolvimento de órgãos, sistemas e controle do metabolismo.<sup>1</sup> A glândula tireóide apresenta a propriedade de concentrar iodo e o torna disponível para a síntese dos hormônios tireoideanos 3,5,3' triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) sendo que cerca de 80% do T3 plasmático é derivado fora da tireóide através da 5'-monodeiodinação do T4 nos tecidos alvo. Assim, o iodo é parte integral da molécula dos hormônios tireoideanos, compondo 59% e 65% do tamanho da molécula de T3 e T4 respectivamente.<sup>2</sup> A relevância desse mecanismo pode ser verificada em regiões onde a presença de iodo na dieta é pobre, compondo um importante problema de saúde pública.<sup>3</sup>

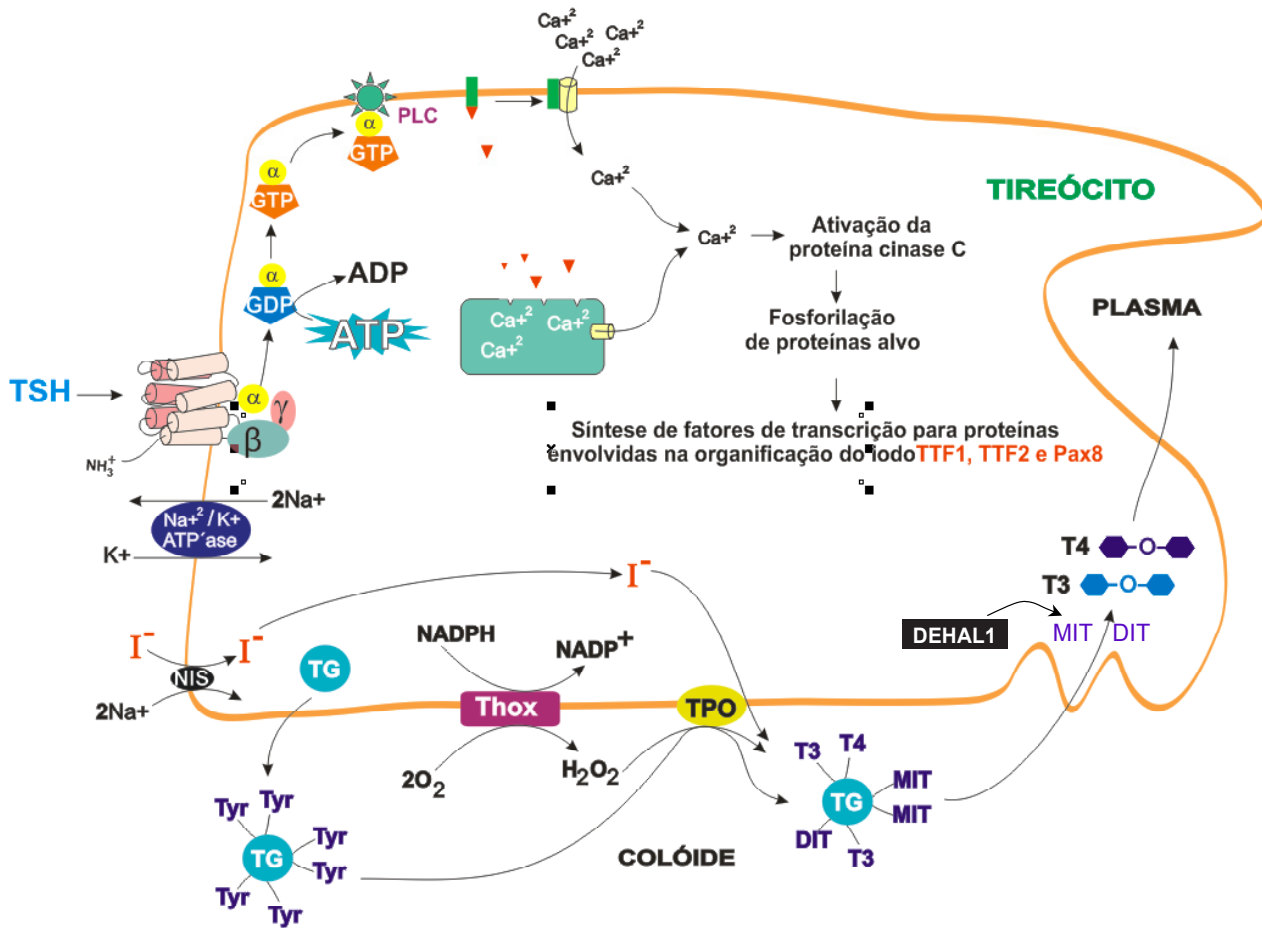
A síntese de hormônios tireoideanos requer o desenvolvimento adequado da glândula tireóide e um aporte dietético suficiente de iodo seguido de uma série sequencial de reações bioquímicas que têm lugar nas células foliculares da glândula.<sup>4</sup> Cada folículo tireoideano consiste de uma única camada de células epiteliais organizadas ao redor de um lúmen, o qual é preenchido por um colóide onde predomina a tireoglobulina (Tg), uma grande glicoproteína que atua como suporte para a síntese de hormônios tireoideanos.<sup>5</sup> A captação de iodo através da membrana basolateral dos tireócitos é necessária para a plena síntese de hormônios e esse processo é mediado pela proteína transportadora I<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> (NIS-Natrium iodine importer), cujo gen situa-se no cromossomo 19. Nesse processo de transporte, dois íons sódio são carregados para o interior do tireócito, enquanto somente um iodo é internalizado. Os íons sódio atuam no sentido de criar um gradiente que favorece o transporte do iodo,<sup>3,1</sup> sendo que a energia necessária para gerar o gradiente de sódio é provida pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>

ATPase dependente, bomba sensível à oubaína<sup>6</sup> (Figura 1).

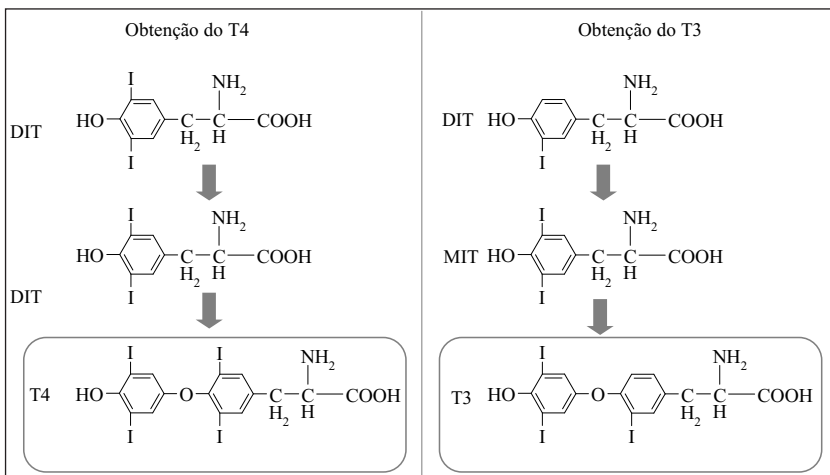
O efluxo de iodo através da membrana apical do tireócito é mediado ao menos em parte pela pendrina.<sup>7</sup> Uma vez captado, o iodo é rapidamente incorporado aos resíduos de tirosina da Tg, processo este denominado organificação do iodo e catalizado pela enzima tireoperoxidase (TPO) na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultando na formação de monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). A síntese de  $H_2O_2$  ocorre na membrana apical do tireócito através de uma via bioquímica que envolve dois membros da família da NADPH oxidase (Duox1 e Duox2).<sup>8,9</sup> Recentemente, foi identificada uma proteína relacionada à tireodoxina, chamada de EFP1 (*EF-hand binding protein 1*). Foi proposto que essa proteína está relacionada à família de complexos protéicos tireóideos envolvidos com a síntese de  $H_2O_2$ .<sup>10</sup> A TPO catalisa ainda o acoplamento de duas moléculas de iodotirosina para formar T3 ou T4 (Figura 2). A liberação de hormônios tireoideanos ocorre por meio de pinocitose. Esse conteúdo coloidal sofre digestão no interior dos lisossomos, liberando o T3 e o T4 da Tg. O T3 e o T4 são posteriormente exportados para o plasma através da membrana basolateral do tireócito por um mecanismo ainda não plenamente esclarecido.<sup>4</sup>

## TIREOGLOBULINA

A síntese de hormônios tireoideanos segue uma via metabólica que depende estreitamente da Tg, uma proteína que forma o colóide, substância contida no folículo tireoideano e sítio de armazenagem de hormônios tireoideanos. A Tg é uma glicoproteína de 660 kDa codificada por um único gen de 270 kb situado no cromossomo 8q24.21-8q24.23, apresentando 48 éxons separados



**Figura 1** – Principais passos envolvidos na síntese de hormônios tireoideanos. O I<sup>-</sup> é captado na membrana basolateral do tireócito pelo NIS em função da energia gerada pelo gradiente eletroquímico produzido pela bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase dependente. Na face colateral do tireócito o I<sup>-</sup> é oxidado pela tireoperoxidase (TPO) na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é produzido pela enzima THOX e reduzido pelo cofator NADPH da mesma enzima. A tireoglobulina, a qual é secretada para a luz do foliculo atua como uma matriz de suporte para a síntese de hormônios tireoideanos. Primeiramente, a TPO catalisa a iodinação dos resíduos de tirosina, processo esse denominado organificação resultando na formação de MIT e DIT. Subsequentemente, duas moléculas de iodotirosina são acopladas para formar T3 ou T4 em uma reação também catalisada pela TPO. A tireoglobulina iodada é armazenada na luz do foliculo na forma de colóide. A tireoglobulina é captada pelo tireócito pelo processo de pinocitose sendo essa captação regulada de acordo com a demanda de secreção de hormônios. A porção de tireoglobulina captada do colóide sofre processamento no interior dos lisossomos gerando T3 e T4 que por sua vez são liberados para a corrente sanguínea por um processo ainda não plenamente elucidado. As moléculas de MIT e DIT não utilizadas sofrem desiodação pela enzima DEHAL1 (iodotirosina desalogenase). O iodo por sua vez é secretado para a síntese de novos hormônios tireoideanos sendo deslocado para o colóide. Note que os o acoplamento do TSH a seu receptor na membrana do tireócito desencadeia uma cascata de eventos que culmina com a síntese de proteínas envolvidas com a organificação do iodo.



**Figura 2** – Síntese de hormônios tireoideanos (T3 e T4) a partir de resíduos de tirosina iodados. MIT, monoiodotirosina; DIT, Diiodotirosina. Note que a união de dois DIT's forma o T4 enquanto que a união de um DT e um MIT dá origem ao T3.

por íntrons com tamanhos acima de 64kb.<sup>11</sup> A expressão é controlada pelo TSH tendo AMPc como segundo mensageiro intracelular que por sua vez regula os fatores de transcrição TTF-1, TTF-2 e Pax-8.<sup>12,13</sup> Esses mesmos fatores de transcrição também controlam a síntese de TPO e também o receptor de TSH.<sup>14</sup> Durante a síntese da Tg as cadeias nascentes formam interações dissulfeto com peso molecular de cerca de 2000kDa<sup>15</sup> e em aproximadamente 15 minutos esses complexos se dissolvem e a Tg organiza-se em monômeros, os quais posteriormente dimerizam-se para homodímeros 19S e eventualmente tetrâmeros 27S, tornando-se capazes de sofrer extrusão para a luz do folículo.<sup>16</sup>

Um intervalo de tempo de cerca de 90 minutos existe entre a dimerização da molécula e sua chegada ao aparelho de Golgi, indicando que a dimerização *per se* não é suficiente para o processo de exportação.<sup>16</sup> A dimerização é um processo mediado por chaperonas e atualmente conhece-se pelo menos sete chaperonas que atuam no enovelamento da Tg. A chaperona Bip associa-se à Tg nascente, intermediando a formação de pontes dissulfeto intracadeia. Outras chaperonas envolvidas são GRP170, GRP94, ERP72, ERP29, calnexina e calreticulina.<sup>17,18</sup> O enovelamento requer uma grande quantidade de chaperonas: de fato, a razão Bip/Tg é de aproximadamente 10 moléculas de Bip para uma Tg, enquanto que a calreticulina e a calnexina ligam-se simultaneamente à molécula de Tg durante o enovelamento.<sup>19</sup>

Posteriormente, a Tg é direcionada para o complexo de Golgi, onde sofre glicação. Cerca de 10% do peso molecular da Tg deve-se a carboidratos, constituídos principalmente por duas unidades, uma contendo sobretudo N-acetilglicosamina e a outra mais complexa, sendo formada de várias cadeias de N-acetilglicosamina, galactose e fucose (uma hexose cuja fórmula química é  $C_6H_{12}O_5$ ), ou então moléculas de ácido siálico estendendo-se a partir dos terminais de manose.<sup>14</sup> A interação mais comum de carboidratos na molécula de Tg ocorre entre a N-acetilglicosamina e um resíduo de asparagina. Além das cadeias de carboidratos, a Tg apresenta 60 pontes dissulfeto, fosfato (ligado às cadeias de polissacarídeos) nas formas de fosfoserina e fosfotirosina e, finalmente, sulfato, na forma de unidades de condroitina sulfato.<sup>20,21</sup> Cada molécula de Tg humana consiste de uma sequência de 2748 resíduos de aminoácidos. Dessa quantidade, 2,4% (67 resíduos) são moléculas de tirosina, sendo que normalmente não mais do

que 25% dos resíduos de tirosina encontram-se iodados.<sup>21,23</sup> Somente quatro resíduos de tirosina por molécula de Tg, as posições 5 (éxon 2), 1291 (éxon 18), 2554 (éxon 44) e 2747 (éxon 48) estão envolvidas na hormonogênese, já que esses quatro resíduos de tirosina apresentam grande afinidade por iodo radioativo ( $I^{24}$ ). Paralelamente a esses quatro resíduos hormonogênicos, existem outros sítios capazes de armazenar iodeto (I), sendo que a afinidade desses resíduos varia consideravelmente em função de certos fatores, tais como grupos químicos vizinhos e constante de ionização.<sup>23</sup> O aumento do grau de iodação pode modificar a estrutura espacial da Tg e alterar suas propriedades, conduzindo a novas formas moleculares (27S e 37S). O aumento da iodação de resíduos de tirosina na molécula de Tg promove aumento da estabilidade da molécula, tornando-a resistente à proteólise.<sup>23</sup> Esse efeito ocorre porque os resíduos de iodotirosil apresentam maior hidrofobicidade quando comparados com resíduos de tirosil. Dessa forma, a iodação da molécula de tirosina apresenta importantes efeitos de estereoespecificidade com impacto no desenvolvimento de novos epítomos autoimunogênicos.<sup>24</sup> Saboori et al.<sup>25</sup> demonstraram que moléculas de Tg com altos níveis de iodação são mais imunogênicas quando comparadas com moléculas de Tg com reduzidos níveis de iodação. Após sofrer maturação, a Tg é extrudida para o lúmen folicular, onde irá compor a maior parte do colóide.

A Tg pode encontrar-se em duas formas no colóide: na forma dimérica, solúvel (19S 660kd) e seu respectivo tetrâmero; e na forma densa, insolúvel, a iodo-tireoglobulina (i-Tg), com concentração próxima de 600mg/mL<sup>27</sup>. Cerca de 34% de toda a Tg presente na tireóide humana encontra-se na forma de i-Tg.<sup>17</sup> A i-Tg é extremamente resistente à proteólise conduzida por enzimas tireoideanas, mas seu iodo pode ser liberado através de espécies reativas que promovem oxidação, geradas nas células tireoideanas.<sup>28,29</sup> Na membrana apical do tireócito a Tg interage com diversas proteínas durante os processos de endocitose e exocitose, como, por exemplo, o receptor de asialoglicoproteína (ASGPR), megalina e proteína dissulfeto isomerase.<sup>30</sup> O ASGPR transporta Tg recém sintetizada para o lúmen folicular. Foi proposto que o ASGPR sofre endocitose juntamente com o colóide, sendo posteriormente processado enzimaticamente no interior do tireócito.<sup>24</sup> A porção da Tg que interage com o ASGPR ainda

não está plenamente identificada. Embora exista muita informação sobre aspectos bioquímicos da molécula de Tg, Rivolta e Targovnik<sup>24</sup> destacam que muitas funções da Tg permanecem ainda não plenamente elucidadas em função do não conhecimento da sua estrutura espacial.

## TIREOPEROXIDASE

A TPO pertence à grande família de peroxidases de mamíferos, que inclui a mieloperoxidase, lactoperoxidase, eosinofilil-peroxidase e peroxidases salivares.<sup>31</sup> O I<sup>-</sup> é a forma pela qual o iodo é aproveitado pela tireóide. Nesse estado o iodo está altamente oxidado, sendo que somente duas substâncias apresentam um poder oxidante para converter o iodo em I<sup>-</sup>: o oxigênio (O<sub>2</sub>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>31</sup> Desde o início dos estudos destinados ao esclarecimento do mecanismo de oxidação do iodo, aventou-se a possibilidade de uma peroxidase envolvida na sua oxidação.<sup>32</sup> Esta idéia recebeu apoio por parte dos estudos conduzidos por Shaw e Hager em 1961,<sup>33</sup> os quais demonstraram que as reações biológicas de halogenação envolviam peroxidases. A purificação da TPO ocorreu em 1967 a partir de trabalhos conduzidos por Hosoya e Morrison<sup>34</sup> e Coval e Taurog.<sup>35</sup> A TPO é uma grande homoproteína glicada (aproximadamente 105 kDa) que cataliza tanto a oxidação do iodeto quanto sua incorporação aos radicais tirosila da molécula de Tg e localiza-se na membrana apical do tireócito, com seu sítio catalítico orientado para o colóide.<sup>31</sup> Ao contrário das peroxidases de fungos e vegetais, que não apresentam ligações heme covalentes e têm cerca de 300 resíduos de aminoácidos em suas cadeias, as peroxidases de mamíferos são grandes proteínas com mais que 700 resíduos de aminoácidos em sua composição e provavelmente todas apresentam ligações heme covalentes.<sup>36,31</sup>

A TPO humana encontra-se amplamente disseminada em diferentes localizações subcelulares, tais como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e vesículas próximas à membrana apical do tireócito, na interface citosol-colóide.<sup>37</sup> O gen responsável pela codificação da TPO humana situa-se no braço curto do cromossomo 2 e sua sequência completa apresenta 3048 nucleotídeos.<sup>38</sup> A síntese da TPO é estimulada por TSH e tem a molécula de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) como segundo mensageiro intracelular.<sup>39</sup> Existem outras isoformas da TPO humana, tais como a TPO-2, que apresenta 876 resíduos de aminoácidos,

e a TPO zanelli, com 929 resíduos<sup>37</sup>. A função dessas isoformas ainda não está plenamente elucidada; ao que parece, elas são decorrentes de possíveis produtos de clivagem da TPO-1 ou mesmo de *splicing* alternativo do RNA mensageiro (RNAm) da TPO-1.<sup>37</sup>

A TPO executa três reações de catálise envolvidas na biossíntese de hormônios tireoideanos: a oxidação de íons I<sup>-</sup>, a iodação da Tg e o acoplamento de iodotirosinas, formando iodotironinas.<sup>40,37</sup> Para exercer essas reações de catálise, a TPO apresenta dois sítios catalíticos, sendo um deles para ligar-se ao I<sup>-</sup> e outro para acoplar-se aos resíduos de tirosina incorporados à Tg.<sup>37</sup> Esses dois substratos da TPO sofrem oxidação utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como precursor de radicais livres necessários à incorporação de I<sup>-</sup> nos resíduos de tirosina presentes na Tg, produzindo então monoiodotirosina. A monoiodotirosina pode sofrer ainda uma segunda reação de oxidação novamente mediada pela TPO, onde outro I<sup>-</sup> é incorporado, dando origem à diiodotirosina. A TPO é também o principal componente do antígeno microsomal que corresponde ao alvo dos autoanticorpos presentes na tireoidite autoimune, causando destruição da glândula, sobretudo na doença de Hashimoto.<sup>37</sup>

A estrutura espacial da TPO ainda não foi elucidada; de fato, a mieloperoxidase (MPO) é a única peroxidase de mamíferos que teve sua estrutura espacial plenamente elucidada.<sup>41</sup> Para identificar a estrutura terciária da TPO humana seriam necessárias quantidades de proteína na ordem de miligramas em sua forma pura. Atualmente somos capazes de obter quantidades na ordem de centenas de microgramas de amostra com cerca de 60% de pureza através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Essas quantidades nesse grau de pureza são úteis para estudos que envolvem aspectos imunológicos, mas não para análises estruturais.<sup>42</sup>

## LOCALIZAÇÃO DE IMPORTANTES RESÍDUOS NA MOLÉCULA DE TIREOPEROXIDASE

A maior parte dos estudos envolvendo mecanismos de ação de peroxidases foram realizados com fungos e vegetais, de modo que podemos inferir o mecanismo de ação da TPO humana. A citocromo c peroxidase de fungos tem sido largamente utilizada para esse propósito e apresenta dois resíduos de histidina localizados nos lados opostos do grupo heme: uma histidina

proximal (His-175) que coordena o íon férrico central da protoporfirina, e uma histidina distal (His-52) localizada próxima ao sítio de ligação com o  $H_2O_2$ .<sup>43</sup> Postulou-se que tanto a histidina distal quanto sua vizinha arginina (Arg-48) participam na clivagem da ligação O-O do peróxido, com a histidina atuando como um elemento calisador.<sup>31</sup> Antes mesmo da cristalização da mieloperoxidase, em 1988 Kimura e Ikeda-Saito<sup>44</sup> propuseram a estrutura da TPO e tentaram localizar as histidinas distal e proximal na molécula de TPO utilizando a molécula de MPO como referência.<sup>45</sup>

As histidinas correspondentes na TPO podem ser facilmente determinadas através da comparação das sequências alinhadas da MPO e TPO. A histidina 239 na molécula de TPO é similar à histidina distal na MPO e a histidina 494 na TPO corresponde à histidina proximal na molécula de MPO. Esse alinhamento difere de forma substancial daquele proposto por Kimura e Ikeda-Saito,<sup>44</sup> no entanto, de acordo com Bikker,<sup>46</sup> a histidina 494 é na verdade a histidina proximal na molécula de TPO.

Outros resíduos de importância biológica podem ser identificados na molécula de TPO, como, por exemplo, a arginina 396, que atua no mecanismo catalítico para a formação do composto I, ou seja, o primeiro passo da reação catalisada pela TPO, na qual ocorre a oxidação do grupo prostético heme da peroxidase pelo  $H_2O_2$  e a formação de dois elétrons e de um composto intermediário no estado  $Fe^{+5}$ , consistindo do ferro oxiferril ( $O=Fe^{5+}$ ) e do cátion radical  $\pi$ porfirínico.<sup>43</sup>

A asparagina 421 na MPO está envolvida com a formação de uma ponte de hidrogênio estável com a histidina proximal, sendo que o resíduo de aminoácido que cumpre essa mesma função na TPO é a asparagina 579. Os resíduos de aminoácidos considerados relevantes para a interação com o  $Ca^{+2}$  na molécula de MPO são completamente conservados na molécula de TPO. Já o resíduo de Glu-242 foi sugerido por Zeng e Fenna em 1992<sup>47</sup> como sendo o resíduo que forma ligação covalente com o grupo heme, o que foi confirmado em estudos subsequentes conduzidos por Fenna et al.<sup>48</sup> Os mesmos autores mostraram ainda que os resíduos de Glu-242 e Asp-94 estão covalentemente ligados ao grupo prostético heme da molécula de MPO e que estes resíduos estão conservados na molécula de TPO e também em outras peroxidases de mamíferos,<sup>31</sup> sendo que na molécula de TPO os resíduos correspondentes são Glu-399 e Asp-238. É provável que tais

resíduos encontrem-se também interagindo com o grupo heme da TPO de maneira similar àquele descrito para a MPO: o grupo heme da molécula de lactoperoxidase encontra-se covalentemente ligado a resíduos de aminoácidos por meio de ligações do tipo éster.<sup>36</sup>

## TIREOPEROXIDASE-2

Uma forma alternativa da TPO foi descoberta em 1987 por Kimura et al.<sup>44</sup> e foi denominada tireoperoxidase-2 (TPO-2). Essa forma da TPO apresenta ausência de 57 resíduos de aminoácidos (resíduos 533 a 589), correspondendo ao éxon 10.<sup>44</sup> O RNAm da TPO-2 está presente na doença de Graves ainda que em menor quantidade quando comparado com o RNAm da TPO e também em uma forma de hipotireoidismo congênito descrita por Bikker<sup>46</sup> em 1996, na qual os portadores apresentavam somente RNAm para TPO-2. Como não foi detectada iodação da Tg nesses pacientes, concluiu-se que a TPO-2 é enzimaticamente inativa, sendo a possível razão sugerida para essa inatividade a ausência do resíduo distal de histidina (possivelmente a histidina 586 como previamente descrito por Kimura e Ikeda-Saito).<sup>44</sup> De fato, Niccoli et al.<sup>49</sup> demonstraram a inatividade da TPO-2 ao expressar essa proteína em linhagem celular derivada do ovário do hamster chinês, *Cricetulus griseus*. Além da His-586, outro resíduo de aminoácido crucial para a atividade da TPO-2 que se encontra ausente é a Asn-579. Representado pelo resíduo Asn-421 na molécula de MPO,<sup>50</sup> esse resíduo forma uma ponte de hidrogênio com a histidina proximal. Além desses 57 resíduos de aminoácidos faltantes e desses importantes resíduos de His e Asn, a TPO-2 apresenta ainda duas hélices e duas alças contendo resíduos hidrofóbicos de aminoácidos, os quais formam parte do sítio de acoplamento com o grupo heme (estrutura essa inferida com base na estrutura espacial da MPO).<sup>31</sup> A ausência da Asn-579 pode ser um fator importante na inatividade da TPO-2, mas a função específica da TPO-2 na glândula tireóide não é plenamente conhecida.

## AS ENZIMAS DUAL OXIDASES

A síntese de peróxido de hidrogênio é condição essencial para a síntese de hormônios tireoideanos e tem sido bem documentada por décadas. Em função de sua natureza dual, ou seja, apresentarem um domínio para NADPH-

oxidase e outro para a peroxidase tireóidea, essas enzimas são denominadas dual oxidases 1 e 2 (DUOX-1 e DUOX-2) e, às vezes, oxidases tireóideas (THOX). Elas apresentam cerca de 88% de homogeneidade entre si.<sup>51</sup> Os gens que transcrevem tanto a DUOX-1 quanto a DUOX-2 situam-se no cromossomo 15q15.3, sendo que o gen para a DUOX-1 apresenta 35 éxons, enquanto que o gen para a DUOX-2 apresenta 34 éxons.<sup>52</sup> As peroxidases são heme-proteínas, contudo as DUOX provavelmente não contêm grupos heme, uma vez que não dispõem de resíduos de aminoácidos capazes de dar suporte ao acoplamento com grupos heme que estão presentes em outras peroxidases (incluindo a TPO) e são altamente conservados.<sup>52</sup> Das duas DUOX clonadas a partir de tecido tireoideano, somente a DUOX-2 teve sua funcionalidade estabelecida de forma plena: localiza-se na membrana apical do tireócito, em íntima associação com a TPO.<sup>53</sup>

Além da glândula tireóide, a expressão das DUOX ocorre em tecidos como, por exemplo, mucosas, onde sua função parece integrar parte do sistema de defesa do organismo.<sup>54</sup> Ambas as DUOX são expressas no epitélio das vias aéreas, embora a mucosa traqueal e a dos brônquios de grosso calibre expressem preferencialmente a DUOX-2, a qual é também largamente expressa

no trato gastrointestinal, sobretudo na membrana apical dos enterócitos, no ceco e no cólon sigmóide.<sup>55</sup> No tecido tireoideano a presença de RNAm para DUOX-2 é cerca de 1,5 a 5 vezes maior quando comparada à presença de RNAm para DUOX-1.<sup>56</sup> A DUOX-1 apresenta expressão constitutiva nos epitélios das vias aéreas,<sup>55</sup> ao passo que a DUOX-2 é expressa na vigência de alterações fisiopatológicas. A DUOX-2 é expressa na bexiga urinária e nas glândulas salivares.<sup>57</sup>

A DUOX-2 é uma proteína com 1548 resíduos de aminoácidos na cadeia, enquanto que a DUOX-1 apresenta 1551 resíduos.<sup>58</sup> Ambas são glicoproteínas e apresentam alto grau de homologia. Ambas apresentam sete alças transmembrânicas e 500 resíduos de aminoácidos que se projetam para o meio extracelular, formando a porção N-terminal com 43% de homologia com a TPO (Figura 3). Uma longa alça intracelular comunica seis alças transmembranares C-terminais com uma alça transmembranar localizada na porção mais N-terminal. Essa alça intracelular apresenta o motivo em mão-EF (um dos motivos espaciais adquiridos pelas proteínas durante seu enovelamento para aquisição da estrutura nativa) e, provavelmente, este seja o sítio de atividade da NADPH oxidase e também de interação com o íon Ca<sup>+2</sup>.<sup>51</sup>

**TPO:** 156 GACNNRDHPRWGASNTALARWLPPVYEDGFSQPRGW----NPGFLYNGFPLPPVREVTRH 211  
G NN RWG+ + L R + P Y DG QP G NP L N P

**DUOX1:** 34 GWYNNLMEHRWGSKGSRLQRLVPASYADGVYQPLGEPHLPNPRDLSNTISRGPA----- 88

**TPO:** 212 VIQVSNEVVTDDDRYSDLLMAWQYIDHDIATFPQSTSKAAFGGGADQCMTCEQNPCPF 27  
+ + N V L + + G + + D + A F + + P F

**DUOX1:** 89 LASLRNRTV-----LGVFFGYHVLSDLVSVETPGCPAEF-----LNIRIPPGDPMFD 135

**TPO:** 272 IQLPEEARPAAGTACLPFYRSSAACGTGDQALFGLNLTANPRQMQMGLTSFLDASTVYG 331  
P++ G LPF RS TG S +NPR N +T +LD S +YG

**DUOX1:** 136 ---PDQR---GDVVLFPQRSRWDPETGR-----SPSNRPDPANQVTGWLDGSAIYG 180

**TPO:** 332 SSPALERQLRNWTSAEGLLRVHARL-RDSGRAYLPFVPPRAPAACAPEPGIPGETRGPCF 390  
SS + LR+++ + RDS L + AP+P +

**DUOX1:** 181 SSSWSWDALRSFSRQLASGPDPAFPRDSQNPLLMWA-----APDPATGQNGPRGLY 232

**TPO:** 391 LAGDGRASEVPSLTALHTLWLREHNRLAAALKALNAHWSADAVYGEARKVVGALHQIITL 450

**DUOX1:** 233 AFGAERGNREPFLQALGLLWFRYHNLWAQRLARQHPDWEDEELFHQARKRVIATYQNIQAV 292  
G R + P L AL LW R HN A L + W + + + Q ARK V A + Q I +

**TPO:** 451 RDYIPRILGPEAFQYVGPYEGYDSTANPTVSNVSTAAFRFGHATHIPLVRRLDAS--F 508

**DUOX1:** 293 YEWLPSFL----QKTLPEYTGYPFLDPSISSEFVAASEQFLSTMVPPGVYMRNASCHF 347  
+++P L Q+ + Y GY +P++S+ F A+ +F + P V +AS F

**TPO:** 509 Q---EHPDLPLGLWLHQAFFSPW--TLRGGGLDPLIRGLLARPAKLVQDQQLMNEELT 561

**DUOX1:** 348 QGVINRNSSVSRALRVCSNSYWSREHPSLQSAEDVDALLGMSAQIA--EREDHVLVEDVR 405  
Q L + + + + S + L + D L + G + + + A + + D + + E + +

**TPO:** 562 ERLFVLSNSSTLDLASINLQGRDRHGLPGYNEWREFCGLPRLETPADLSTAIASRSVADK 621  
+ S D + LQRGRD GLP Y + R GL + D++ A+ SRS D

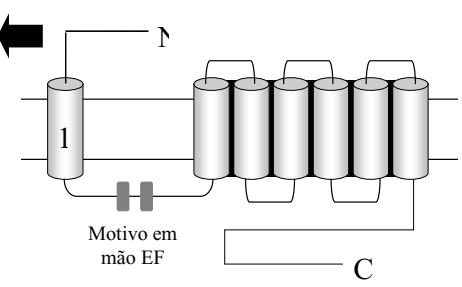
**DUOX1:** 406 DFWPGPLKFSRDTDLASCLQRGRDLGLPSYTKARAALGLSPITRWQDINPAL-SRS-NDT 463

**TPO:** 622 ILDLYKHPNDIV-WL----GGLAENFLPRARTGPLFACLIGQMKALRDGDWFWWENSH 676  
+L+ N D+ WL GGL E+ GPLF+ + + Q LRDGD +W+EN+

**DUOX1:** 464 VLEATAALYNQDLSWLELLPGGLLES---HRDPGFLFSTIVLEQFVRLRDGDYWFENTR 520

**TPO:** 677 VFTDAQRRELEKHSLSRVI 695  
+F+ + E+ +L V+

**DUOX1:** 521 NGLFSKKEIEIRNTTLQDVL 541



**Figura 3** – A figura mostra à direita um modelo esquemática das DUOX-1 e 2. Essas proteínas são transmembranares, apresentam sete hélices transmembranares, sendo que seis dessas hélices são unidas à sétima hélice por uma alça intracelular à qual abriga o motivo "mão-EF". A porção aminoterminal representada pela linha tracejada apresenta homologia com a tireoperoxidase e essa homologia está projetada na sequência de resíduos de aminoácidos de ambas proteínas à esquerda.

Testes de *western blot* evidenciaram que as proteínas DUOX apresentam massa molecular de 180 a 190 kDa, sendo que 10 a 20 kDa desse peso são decorrentes de N-glicosilações.<sup>59</sup> O controle da expressão das DUOX apresenta certas particularidades, como, por exemplo, os promotores para ambas as DUOX serem diferentes de outros elementos promotores tireoideanos. O promotor da DUOX-1 é rico em citosina e guanina e apresenta três elementos ligantes ao fator de transcrição gênico SP1.<sup>56</sup> Embora essas diferenças estruturais possam sugerir mecanismos de regulação distintos, isto não é observado na glândula tireóide, na qual tecidos fisiologicamente íntegros e também em condições de adenoma e carcinoma expressam tanto a DUOX-1 quanto a DUOX-2, sugerindo assim que a regulação da expressão de ambas as enzimas é feita por mecanismos similares.<sup>59</sup>

Em cães, a expressão das DUOX é mediada pela via do AMPc, no entanto, no homem essa via de regulação parece ser pouco provável.<sup>51</sup> Embora possa parecer um contrassenso que os níveis de AMPc não estimulem a atividade dos promotores das DUOX, na realidade esse fato previne possíveis danos oxidativos às células tireoideanas. Se porventura a expressão das DUOX aumentasse na presença de AMPc, a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na condição de hipotireoidismo aumentaria concomitantemente, já que no hipotireoidismo os níveis de TSH encontram-se aumentados em razão da ausência de *feedback* negativo, proporcionado pela tireóide na adenohipófise.<sup>41</sup> Nesse caso, a citotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia evocar danos importantes em biomoléculas, tais como lipídeos de membrana e cadeias de DNA, comprometendo ainda mais a integridade celular e reduzindo as chances de retorno à condição de eutireoidismo.<sup>51</sup> Outra forma de regular surtos de espécies reativas decorrentes da atividade da DUOX é a contenção dessas enzimas no interior de organelas, tais como complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Este repertório de enzimas nesses compartimentos representa uma forma pré enzima capaz de ser rapidamente ancorada à membrana plasmática do tireócito em situações em que há aumento da síntese de hormônios tireoideanos.<sup>51</sup>

## CONCLUSÕES

O profundo conhecimento relacionado à estrutura das proteínas envolvidas na síntese de hormônios tireoideanos pode trazer benefícios

que envolvem a plena compreensão dos processos patológicos que acometem a glândula tireóide, tais como as tireoidites. De fato, o entendimento da bioquímica e da fisiologia da glândula tireóide nesse nível possibilitará maior clareza, por exemplo, sobre os processos que desencadeiam o ataque de imunocomplexos contra essas proteínas, condição esta presente em morbidades tais como a Doença de Graves. Além disso, estudos estruturais podem ser de suma importância no desenvolvimento de medicamentos cujo objetivo é tratar os distúrbios tireoideanos de modo mais preciso, eficaz e completo.

## REFERÊNCIAS

1. Bizhanova A, Kopp P. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology*. 2009;150:1084-90.
2. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*. 2001;11:407-14.
3. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, et al. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. 2003;24:48-77.
4. Kopp P. Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman L, Utiger R, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 9<sup>th</sup> ed. New York: Lippincott Williams Wilkins; 2005. p.52-76.
5. Arvan P, Di Jeso B. Thyroglobulin structure, function, and biosynthesis. In: Braverman L, Utiger R, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. New York: Lippincott Williams Wilkins; 2005. p.77-95.
6. Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, et al. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:4221-6.
7. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet*. 1999;21:440-3.
8. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*. 1999;274:37265-9.
9. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*. 2000;275:23227-33.
10. Wang D, De Deken X, Milenkovic M, Song Y, Pirson I, Dumont JE, et al. Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein. *J Biol Chem*. 2005;280:3096-103.
11. Mendive FM, Rivolta CM, Moya CM, Vassart G, Targovnik HM. Genomic organization of the human thyroglobulin gene: the complete intron-exon structure. *Eur J Endocrinol*. 2001;145:485-96.
12. Hamdan H, Liu H, Li C, Jones C, Lee M, de Lemos R, et al. Structure of the human Nkx2.1 gene. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1396:336-48.



13. Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di Lauro R. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie*. 1999;81:433-40.
14. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*. 2001;11:407-14.
15. Kim PS, Kim KR, Arvan P. Disulfide-linked aggregation of thyroglobulin normally occurs during nascent protein folding. *Am J Physiol*. 1993;265:C704-C711.
16. Kim PS, Arvan P. Folding and assembly of newly synthesized thyroglobulin occurs in a pre-Golgi compartment. *J Biol Chem*. 1991;266:12412-8.
17. Di Jeso B, Park YN, Ulianich L, Treglia AS, Urbanas ML, High S, et al. Mixed-disulfide folding intermediates between thyroglobulin and endoplasmic reticulum resident oxidoreductases ERp57 and protein disulfide isomerase. *Mol Cell Biol*. 2005;25:9793-805.
18. Sargsyan E, Baryshev M, Szekely L, Sharipo A, Mkrtchian S. Identification of ERp29, an endoplasmic reticulum luminal protein, as a new member of the thyroglobulin folding complex. *J Biol Chem*. 2002;277:17009-15.
19. Kim PS, Bole D, Arvan P. Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP. *J Cell Biol*. 1992;118:541-9.
20. Consiglio E, Acquaviva AM, Formisano S, Liguoro D, Gallo A, Vittorio T, et al. Characterization of phosphate residues on thyroglobulin. *J Biol Chem*. 1987; 262: 10304-14.
21. Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J*. 2008;275:4700-4727.
22. Malthiéry Y, Lissitzky S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur J Biochem*. 1987;165:491-8.
23. Burek CL, Rose NR. Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmun Rev*. 2008;7:530-7.
24. Rivolta CM, Targovnik HM. Molecular advances in thyroglobulin disorders. *Clin Chim Acta*. 2006;374:8-24.
25. Saboori AM, Rose NR, Bresler HS, Vladut-Talor M, Burek CL. Iodination of human thyroglobulin (Tg) alters its immunoreactivity. I. Iodination alters multiple epitopes of human Tg. *Clin Exp Immunol*. 1998;113:297-302.
26. Herzog V, Berndorfer U, Saber Y. Isolation of insoluble secretory product from bovine thyroid: extracellular storage of thyroglobulin in covalently cross-linked form. *J Cell Biol*. 1992;118:1071-83.
27. Berndorfer U, Wilms H, Herzog V. Multimerization of thyroglobulin (TG) during extracellular storage: isolation of highly cross-linked TG from human thyroids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:1918-26.
28. Baudry N, Lejeune PJ, Delom F, Vinet L, Carayon P, Mallet B. Role of multimerized porcine thyroglobulin in iodine storage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242:292-6.
29. Delom F, Lejeune PJ, Vinet L, Carayon P, Mallet B. Involvement of oxidative reactions and extracellular protein chaperones in the rescue of misassembled thyroglobulin in the follicular lumen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;255:438-43.
30. Marino C, Martinelli M, Monacelli G, Stracci F, Stalteri D, Mastrandrea V, et al. Evaluation of goiter using ultrasound criteria: a survey in a middle schoolchildren population of a mountain area in Central Italy. *J Endocrinol Invest*. 2006;29:869-75.
31. Taurog A. Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie*. 1999;81:557-62.
32. Astwood EB. Mechanism of action of antithyroid compounds. *Brookhaven Symp Biol*. 1955;7:61-73.
33. Shaw PD, Hager LJ. Chloroperoxidase: a component of the  $\beta$ -keto-adipate-chlorinase system. *J Biochem Chem*. 1996;241:1329-1339.
34. Hosoya T, Morrison M. A study of the hemoproteins of thyroid microsomes with emphasis on the thyroid peroxidase. *Biochemistry*. 1967;6:1021-6. javascript:PopUpMenu2\_Set(Menu4382244)
35. Coval ML, Taurog A. Purification and iodinating activity of hog thyroid peroxidase. *J Biol Chem*. 1967;242: 5510-23.
36. DePillis GD, Ozaki S, Kuo JM, Maltby DA, Ortiz de Montellano PR. Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic group. *J Biol Chem*. 1997;272: 8857-60.
37. Vaisman M, Rosenthal D, Carvalho DP. Enzimas Envolvidas na organificação tireoideana do iodo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48:7-13.
38. Moura EG, Rosenthal D, Carvalho-Guimarães DP. Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. *Braz J Med Biol Res*. 1989; 22:31-9.
39. Gérard CM, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE, et al. Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol*. 1989; 3:2110-8.
40. Larsen PR, Davies TF, Schlumberger MJ, Hay ID. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams' textbook of endocrinology*. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B.Saunders 2003. p.331-73.
41. Zeng J, Fenna RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol*. 1992;226:185-207.
42. Banga JP, Mahadevan D, Barton GJ, Sutton BJ, Saldanha JW, Odell E, McGregor AM. Prediction of domain organisation and secondary structure of thyroid peroxidase, a human autoantigen involved in destructive thyroiditis. *FEBS Lett*. 1990;266:133-41.
43. Uliana CV, Riccardi CS, Yamanaka H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalícilico. *Eclét Quím*. 2008;33:57-62.
44. Kimura S, Ikeda-Saito M. Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family. *Proteins*. 1988;3: 113-20.
45. Nishikawa T, Rapoport B, McLachlan SM. Exclusion of two major areas on thyroid peroxidase from the immunodominant region containing the conformational epitopes recognized by human autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79:1648-54.
46. Bikker H, Baas F, De Vijlder JJ. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:649-53.
47. Zeng J, Fenna RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol*. 1992; 226:185-207.

48. Fenna R, Zeng J, Davey C. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316:653-6.
49. Niccoli P, Fayadat L, Panneels V, Lanet J, Franc JL. Human thyroperoxidase in its alternatively spliced form (TPO2) is enzymatically inactive and exhibits changes in intracellular processing and trafficking. *J Biol Chem*. 1997;272:29487-92.
50. Taurog A, Wall M. Proximal and distal histidines in thyroid peroxidase: relation to the alternatively spliced form, TPO-2. *Thyroid*. 1998;8:185-91.
51. Ris-Stalpers C. Physiology and pathophysiology of the DUOXes. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1563-72.
52. Donkó A, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360:2301-8.
53. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*. 2002;347:95-102.
54. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*. 2003;17:1502-4.
55. Shao MX, Nadel JA. Dual-1 oxidase dependent MUC5AC expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:767-72.
56. Pachucki J, Wang D, Christophe D, Miot F. Structural and functional characterization of the two human ThOX/Duox genes and their 5'-flanking regions. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;214:53-62.
57. Ameziane-El-Hassani R, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, et al. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G933-42.
58. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*. 2000;275:23227-33.
59. Caillou B, Dupuy C, Lacroix L, Nocera M, Talbot M, Ohayon R, et al. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3351-8.

**Endereço para correspondência:**  
WAGNER DE JESUS PINTO  
Rua Rui Barbosa, 325 - Centro  
CEP 69908-972, Rio Branco, AC, Brasil  
E-mail: wagnerjp70@gmail.com