

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

POSSÍVEL PAPEL DO BAÇO NA ATIVIDADE TIROIDIANA

PAULO DE FREITAS MONTEIRO

RECIFE

2011

PAULO DE FREITAS MONTEIRO

POSSÍVEL PAPEL DO BAÇO NA ATIVIDADE TIROIDIANA

Dissertação que apresenta
à Universidade Federal de
Pernambuco como
requisito parcial para
obtenção do grau de
Mestre em Fisiologia.

RECIFE

2011

Monteiro, Paulo de Freitas
Possível papel do baço na atividade tiroídiana/ Marcelo Sobral Leite. –
Recife: O Autor, 1989.

63 folhas : il., fig.

Orientadora: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Fisiologia, 1989.
Inclui bibliografia

1. Tireoide 2. Iodo 3. Baço I. Título.

612.41

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-220

Robert

Amadeu

Robert

Carlos

Ata da defesa de tese do pós-graduando Paulo de Freitas Monteiros, realizada no dia 17 de janeiro de 1989. Aos dezesseis dias do mês de janeiro de 1989 às 9 horas, em sessão pública realizada na sala 1 de Pós-Graduações do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, o Prof. Dr. Carlos Peres da Costa, na qualidade de Coordenador do Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Fisiologia, instalou os trabalhos para defesa de dissertação de Mestrado do pós-graduando Paulo de Freitas Monteiros, capacitado para este evento após ter obtido todos os créditos exigidos pelo Regimento do Curso, bem como ter sido aprovado no exame final de qualificação. O Coordenador do Mestrado apresentou a banca examinadora constituída dos seguintes membros: Prof. Dr. Guilherme Wasserman, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Prof. Dr. Fernando da Costa Aguiar ^{Dr. Fernando Costa Aguiar} e Prof. Dr. Luiz Carlos de Souza Ferreira, ambos desta Universidade. O primeiro, 2º Suplente, substituiu o Prof. Dr. Waldemar Kadosky que, por motivos superiores, não compareceu, e a Prof. Dra. Dolores Odécia Wandersheer, 1º Suplente, que se encontrava de férias e ausente deste Colégio. Foi convidado para presidir a Banca Examinadora, o Prof. Dr. Fernando da Costa Aguiar que agradeceu o convite e convidou o Mestrando para expor, durante 30 minutos, seu trabalho de dissertação intitulado: "Papel do baço na atividade tissidiana". Bem seguida, o pós-graduando iniciou a sua apresentação, finalizando-a no período de 30 minutos. Prosseguiram então a discussão

of. Dr. Guillermo Wasserman, agradecendo ao mesmo, e se deslocado até aqui para participar da Banca, além disso, gentilmente, ao convite do Colegiado do curso de graduação em Ciências Biológicas - Área de Fisiologia. O Prof. Wasserman elogiou a apresentação do candidato e pediu a comentar o seu trabalho, tendo o aluno pedido reuniões para dar esclarecimentos sobre o mesmo em forma de diálogo, o que foi feito durante alguns minutos. Em continuação, o presidente solicitou ao Prof. Dr. Luiz Carlos para iniciar a sua arguição. Agradecendo o convite e pedindo desculpas por não ter tido tempo suficiente para uma análise mais aprofundada sobre o assunto, pois a sua convocação havia sido feita com uma certa urgência, para substituir o Prof. Badosky, teve várias considerações, ofereceu sugestões, verificando algumas incorreções, principalmente nas citações em inglês. Comentou cada capítulo, tendo o mestrandado dado as explicações solicitadas. Finalizou dizendo que, embora não atuar nessa área, achou o trabalho interessante. O presidente da banca, Prof. Dr. Fernando Aguiar, usando da palavra, agradeceu a escolha do seu nome para compor a banca examinadora e parabenizou o mestrandado pela garra com que fez o trabalho. Achou que a sua didática foi muito boa, teve segurança na apresentação e mostrou conhecimento do assunto, tendo esgotado os 10 minutos que lhe foram concedidos. Iniciando a sua arguição, também em forma de diálogo, considerou os diversos pontos do trabalho que chamaram a sua atenção. Finalizando a sua arguição, o Prof. Dr. Fernando Aguiar, ofereceu sugestões, recomendou algumas alterações e incentivou o mestrandado a prosseguir nas pesquisas. Em seguida, convidou os membros da banca examinadora a

se retirarem para outra sala para julgamento da dissertação. Após alguns minutos, retornaram e o presidente anunciou aos presentes que haviam decidido aprovar o candidato com o grau de plenamente. E nada mais havendo a tratar, eu, Maria José Alves da Silva, secretária do Pós-Graduação, lavrei a presente ata, que lida e achada conforme vai assinada por mim, pelos membros da banca examinadora, pelo candidato e pelos membros que o quiserem. Recife, 17 de janeiro de 1989. Maria José Alves da Silva. 1ª linha feita na 17ª linha, v. d. p. 17. nº 17.

Dr. Fernando

Dr. Wasserman X

Dr. B. B. B.

Dr. C. C. C.

Paulo

Prof. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte
Vice-Coordenadora do Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica
e Fisiologia - CCB-UFPE

Ata da defesa de Tese da Pós-graduanda Maria Izabel Almeida da Silveira, realizada no dia 18 de janeiro de 1989. Aos dezesseis dias do mês de janeiro de 1989, às 9 horas, em sessão pública realizada na sala 1 de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, o Prof. Carlos Peres da Costa, na qualidade de Coordenador do Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Fisiologia, instalou os trabalhos para defesa da dissertação de Mestrado da pós-graduanda, Maria Izabel Almeida da Silveira, capacitada para este evento após ter obtido todos os créditos exigidos pelo Regimento do Curso, bem como ter sido aprovada no exame final de qualificação. O Coordenador do Mestrado apresentou a banca examinadora, constituída dos seguintes membros: Prof. Dr. Guilherme Wasserman, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Profs. Drs. Waldemar Badosky e Luiz Bezerra de Carval

R E S U M O

RESUMO

A captação de ^{131}I Na pela glândula tiróide, foi observada utilizando o homogeneizado de membrana celular tiroídiana como modelo biológico. Os homogeneizados celulares de baço, rim e fígado, inibiram significativamente esta captação. A atividade inibitória foi crescente com a utilização de sobrenadantes, de homogeneizados de baço pré-incubado, como também com a segunda fração obtida da purificação destes sobrenadantes. O baço, de camundongos esquistossomóticos, apresentou o efeito inibitório mais pronunciado sobre a captação de ^{131}I Na pela membrana celular tiroídiana.

SUMMARY

SUMMARY

The iodide uptake by thyroid gland was observed utilizing of the thyroid plasma membrane how biological model. Celçl homogenates of the spleen, kidney and liver decreased this uptake mechanism. In the case of the spleen cell homogenate, the inhibitory activity was increased in the presence of the supernatant. Two fractions of this supernatant was separated by chromatography of Sephadex G-100. The validity of these separation procedures was observed on the iodide uptake. The protein fractions B e B' were potent inhibitors of the iodide uptake system in the thyroid. The present stady supports the idea that schistosomiasis may be a inhibitory factor of the thyroid iodide uptake.

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A José Maria, Lúcia
e Guilherme, com ca-
rinho.

A G R A D E C I M E N T O S

- A Profa. Dra. Maria Teresa Jansen de Almeida Catanho, pela orientação, estímulo, amizade e confiança.
- Ao Prof. Dr. Waldemar Ladosky, pelas sugestões e apoio durante a realização desta tese.
- Ao Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UFPB, Campus II, em especial ao Prof. Jackson Cruz, pela amizade e incentivo a realização deste trabalho.
- Ao Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães, em especial ao Prof. Dr. André Furtado, pelo fornecimento de animais infectados com Schistosoma mansoni.
- Ao LARA, em especial ao Prof. Antônio Carlos Cordeiro Silva, pelo fornecimento de camundongos, auxiliando o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos Departamentos de Bioquímica e Biofísica da UFPE, pela gentileza com que permitiram a utilização de seus equipamentos.
- Ao estagiário Marcel Rolland Ciro da Penha, por toda ajuda e colaboração.

- A Rejane de Souza Silva, pela amizade e assistência diária no Laboratório.

- As amigas Maria Izabel Almeida Silveira, Glória Isolina Boente Pinto Duarte, Zenira Cosme Xavier, por todo o apoio e estímulo muito especial.

- A Hildebrando Manoel da Silva, pela eficiência do trabalho datilográfico.

- Aos amigos, Professores Edson Vieira Barbosa e Maria Geraldina da Silva, pelo estímulo recebido durante a execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- Efeito da concentração de TCA na captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana celular tiroídiana -	29
- Estudo da captação do homogeneizado de membrana celular tiroídiana em função da concentração de ^{131}I Na	31
- Determinação da captação de ^{131}I Na em função da concentração do homogeneizado de membrana da glândula tiróide -----	32
- Cinética de captação do ^{131}I Na pela membrana tiroídiana -----	34
- Determinação da captação de ^{131}I Na pelos homogeneizados de tecidos celulares e glândula tiróide.	35
- Efeito inibidor de tecidos celulares extra-tiroídianos sobre a captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana da glândula tiróide -----	37
- Efeito inibidor do sobrenadante do homogeneizado de baço sobre a captação de ^{131}I Na pela membrana celular tiroídiana -----	38
- Efeito inibidor do sobrenadante do homogeneizado de baço, de animais esquistossomóticos, sobre a captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana da glândula tiróide -----	40

PÁGINA

- Purificação do sobrenadante do homogeneizado de baço (animais controle) -----	41
- Purificação do sobrenadante do homogeneizado de baço (animais esquistossomóticos) -----	43

Í N D I C E

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS -----	
RESUMO -----	
SUMMARY -----	
1 - INTRODUÇÃO -----	01
1.1 - Generalidades -----	01
1.2 - Alterações endócrinas na Esquistossomose-----	06
1.3 - Objetivos -----	14
2 - MATERIAL E MÉTODOS -----	15
2.1 - Material -----	15
2.1.1 - Animais -----	15
2.1.2 - Materiais Diversos -----	15
2.1.3 - Aparelhos -----	16
2.2 - Métodos -----	17
2.2.1 - Infecção experimental dos camun- dongos (<u>Mus musculus</u>) pelo <u>Schis-</u> <u>tosoma mansonii</u> -----	17

2.2.2 - Preparação de membrana celular <u>se</u> mi-purificada -----	18
2.2.3 - Determinação da concentração de proteínas nas preparações de mem- brana celular -----	19
2.2.4 - Procedimento básico de incubação da membrana celular tiroídiana com ^{131}INa -----	19
2.2.5 - Estudo da captação de ^{131}INa pelo homogeneizado de membrana tiroi- diana -----	20
2.2.5.1 - Efeito da concentração de TCA na captação de ^{131}INa pela membrana ti- roidiana -----	20
2.2.5.2 - Estudo da captação do homogeneizado de membra na celular tiroídiana em função da concentra- ção de ^{131}INa -----	21
2.2.5.3 - Determinação da capta- ção de ^{131}INa em função da concentração do homo- geneizado de membrana da glândula tiróide -----	21

2.2.5.4 - Cinética de captação do ^{131}I Na pela membrana tiroidiana -----	22
2.2.6 - Determinação da captação de ^{131}I Na pelos homogeneizados de tecidos celulares -----	22
2.2.7 - Efeito de tecidos celulares extra-tiroidianos sobre a captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana tiroidiana -----	23
2.2.8 - Efeito do sobrenadante do homogeneizado de baço sobre a captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana da glândula tiróide ----	23
2.2.9 - Purificação do sobrenadante do homogeneizado de baço em Sephadex G-100 -----	24
3 - RESULTADOS -----	28
3.1 - Estudo da captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana tiroidiana -----	28
3.1.1 - Efeito da concentração de TCA na captação de ^{131}I Na pela membrana tiroidiana -----	28

3.1.2 - Estudo da captação do homogeneiza <u>do</u> de membrana celular tiroidiana em função da concentração de ^{131}INa	30
3.1.3 - Determinação da captação de ^{131}INa em função da concentração do homogeneizado de membrana da glândula tiróide -----	30
3.1.4 - Cinética de captação do ^{131}INa pela membrana tiroidiana -----	33
3.2 - Determinação da captação de ^{131}INa pelos homogeneizados de tecidos celulares -----	33
3.3 - Efeito de tecidos celulares extra-tiroi <u>dianos</u> sobre a captação de ^{131}INa pelo homogeneizado de membrana tiroidiana -----	36
3.4 - Efeito do sobrenadante do homogeneizado de baço sobre a captação de ^{131}INa pelo homogeneizado de membrana da glândula tirói <u>de</u> -----	36
3.5 - Efeito do sobrenadante do homogeneizado de baço, de animais esquistossomóticos, sobre a captação de ^{131}INa pelo homogeneizado de membrana da glândula tiróide -----	39
3.6 - Purificação do sobrenadante do homogeneiza <u>do</u> de baço (animais controle) -----	39

PÁGINA

3.7 - Purificação do sobrenadante do homogeneiza do de baço (animais esquistossomóticos) --	42
4 - DISCUSSÃO -----	44
5 - CONCLUSÕES -----	49
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	50

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Generalidades

A produção dos hormônios tireoidianos inclui várias etapas, desde sua síntese, até a degradação nos tecidos periféricos. O primeiro passo compreende a captação do íon iodeto pela glândula, seguindo-se da oxidação desses íons, iodização da tireoglobulina, proteólise dessas moléculas, liberação dos hormônios na circulação e conversão de tiroxina em triiodotironina nos tecidos. Assim, o controle de todos esses processos se torna bastante complexo, permitindo que os mais variados fatores interfiram na função tireoidiana.

A ação do hormônio estimulante da tireóide (TSH), sobre a glândula, já está bem definida. LISSITZKY e cols. (1971) observaram que o TSH era necessário para a agregação e reorganização das células tireoidianas, em cultura, permitindo a preservação de suas funções específicas e concluíram que essas

ações eram mediadas pelo 3' - 5' monofosfato de adenosina (AMPC). Essas observações foram confirmadas por WINAND e KOHN (1975).

WADELEUX e cols. (1978) demonstraram que as células tiroídianas em cultura, na presença de TSH, apresentavam uma maior captação e organificação dos íons iodeto. Estes autores confirmaram, também, que essas ações eram dependentes de uma elevação nos níveis do AMPC.

ROGER e DUMONT (1983) verificaram que a ação do TSH dependia do estágio em que se encontrava a cultura celular, podendo estimular tanto a proliferação como a diferenciação dessas células e observaram que essas ações podiam ser reproduzidas na presença do AMPC.

Durante os últimos anos, tem surgido evidências, mostrando que a glândula tiróide é ricamente inervada, não apenas por nervos adrenérgicos (MELANDER, 1977) e colinérgicos (VAN SANDE e cols., 1980), mas, também, por nervos peptidérgicos - (AHRÉN e cols., 1980), podendo, a liberação dos neurotransmissores, influenciar diretamente a atividade das células foliculares.

AHRÉN (1985) demonstrou, in vivo, que a noradrenalina estimulava, atuando em receptores alfa-adrenérgicos, a secreção basal dos hormônios tiroídianos e inibia a secreção estimulada pelo TSH. Essa última observação é confirmada por relato anterior de que a noradrenalina impede a elevação do AMPC

induzida pelo TSH (TOCCAFONDI e cols., 1983).

MELANDER e SUNDLER (1979) observaram que a acetilcolina e seus análogos, inibiam tanto a secreção basal como a secreção induzida pelo TSH na glândula tiróide. O efeito inibitório dos neurotransmissores colinérgicos, na ação do TSH, não parece ser mediada por uma inibição da síntese do AMPc e, sim, por um estímulo a sua degradação (VAN SANDE e cols. 1977).

O primeiro neuropeptídeo demonstrado, em homogeneizados de glândula tiróide, foi o peptídeo intestinal vasoativo, (VIP). Estudos preliminares tem revelado que o VIP estimula a secreção basal dos hormônios tiroidianos e potencializa, os efeitos do TSH, na glândula, por estimular a produção de AMPc (ANRÉN e cols., 1980).

A ocorrência de outros neuropeptídeos, como a substância P e a gastrina-colecistoquinina (CCK), tem sido demonstrada na glândula tiróide (AHRÉN e cols., 1983). O papel fisiológico, desses neurotransmissores peptidérgicos, não está totalmente esclarecido, mas torna evidente, que a secreção dos hormônios tiroidianos não é controlada isoladamente pelo TSH.

Numerosos compostos tem a capacidade de interferir na captação e organificação dos íons iodeto, controlando a síntese dos hormônios tiroidianos.

SAITO e cols. (1983) estudaram os mecanismos inibitórios, dos íons perclorato (ClO_4^-) e tiocianato (SCN^-), sobre

a captação de iodo pela glândula tiróide. Estes autores concluíram, através de um modelo experimental, que os íons perclorato inibiam competitivamente o transporte dos íons iodeto para a glândula, enquanto, os íons tiocianato diminuam o seu acúmulo na tiróide, sem interferir no mecanismo de transporte.

MARCOCCI e cols. (1984) observando a captação de iodo por células tiroideas em cultura, na presença do TSH, verificaram que a actinomicina D, uma droga antineoplásica, apresentava um efeito paradoxal. Quando a actinomicina D era adicionada, ao meio de cultura, nas primeiras 10 horas do período de incubação, ocorria uma diminuição na captação de iodo estimulada pelo TSH. Em contraste, quando essa droga era adicionada após 24 horas de incubação, aumentava a captação de iodo induzida pelo TSH.

RANI e FIELD (1988) compararam os efeitos do TSH, noradrenalina e carbacol, na organificação do iodo, em diferentes preparações de glândula tiróide, tais como: fragmentos de tecido, folículos isolados e cultura celular. O TSH estimulou, a organificação em todos os tipos de preparações. A noradrenalina e o carbacol estimularam a organificação em fragmentos de tiróide e folículos isolados, mas apresentaram um efeito inibitório nas células em cultura. Os autores sugeriram que esse efeito inibitório estaria relacionado à ação dessas drogas sobre a captação de iodo.

Trabalhos recentes tem procurado verificar o papel

do iodo na regulação do crescimento e função tireoidiana. NEVE e cols. (1988) observaram os efeitos do iodo, em animais submetidos a tireoidectomia parcial, sobre a ultra-estrutura glandular. O excesso de iodo causou um aumento no número de lisossomos e atividade enzimática, confirmando a existência de um controle do íon iodeto sobre a tireóide.

BECKS e cols. (1988) utilizaram células epiteliais tireoidianas, em cultura, para observar os efeitos do iodo no desenvolvimento da tireóide. O íon iodeto reduziu o conteúdo de ácido desoxirribonucléico (DNA) e o crescimento celular induzido pelo TSH, num efeito dependente da dose. Os autores demonstraram ser, essas ações, específica para as células epiteliais tireoidianas.

As proteínas transportadoras dos hormônios tireoidianos apresentam diferentes afinidades e capacidade de ligação, determinando a fração livre dos hormônios no plasma e, consequentemente, seus efeitos (McNABB e cols., 1984).

YOUNG e cols. (1988) sugeriram que um componente nutricional pode modular a ligação dos hormônios tireoidianos, com as proteínas plasmáticas. Estes autores observaram que, em ratos desnutridos e hipodesenvolvidos, ocorria um aumento da globulina transportadora de tiroxina (T_4). E, McNABB e cols. (1984), demonstraram uma menor afinidade da triiodotironina (T_3) por essa globulina.

As catecolaminas parecem exercer um importante papel na metabolização dos hormônios tiroídianos. OBREGON e cols. (1987) demonstraram que, essas drogas, tanto aumentavam quanto diminuíam a produção de uma deiodinase, existente nos adipócitos, por estímulo nos α e β -receptores, respectivamente.

Várias anormalidades da função tiroídiana tem sido associada à deficiência de insulina. Em 1981, Bagchi e cols., observaram que a resposta da tiróide ao TSH era significativamente reduzida. MACFARLANE e cols. (1984) demonstraram uma redução nos níveis plasmáticos de T_3 . E, ORTIZ-CARO e cols., (1984 a,b), relataram a diminuição do TSH, T_3 e T_4 séricos, com menor conversão de T_4 em T_3 nos tecidos periféricos, em pacientes com diabetes mellitus.

1.2 - Alterações Endócrinas na Esquistossomose.

A Esquistossomose mansônica é uma doença sistêmica, apresentando um polimorfismo lesional bastante diversificado. A forma hepato-esplênica constitui o modelo típico da esquistossomose hepática avançada, caracterizando-se clinicamente por hepato-esplenomegalia, hemorragias digestivas e hipoevolução nos pacientes jovens (ASFORA, 1976). Nessa forma são frequentes alterações bioquímicas do sangue, como: hipoalbuminemia (ASFORA, 1976; SAAD e cols., 1984); elevação de imunoglobulinas (ASFORA, 1976; COUTINHO e cols., 1982); alterações

na composição de lipoproteínas (GILLET e CARVALHO, 1985) e elevação da fosfatase alcalina (ASFORA, 1976; BORBA, 1982), apresentando alterações em suas propriedades físico-químicas, (BORBA, 1982).

Numerosos trabalhos relatam a ocorrência, em pacientes esquistossomóticos, de retardo no desenvolvimento somatogonadal e outras perturbações endócrinas, tais como: diminuição de libido, impotência sexual, escassez de pelos corporais, amenorréia e ginecomastia (MARQUES, 1944; MEIRA LINS, 1950; MEIRA, 1951; FERREIRA, 1957; MACEDO e HORWITH, 1972).

MAHDI e BASSALY (1955) verificaram a presença de genitália infantil e alterações das características sexuais secundárias nos pacientes esquistossomóticos de faixa etária variando entre os 10 e 16 anos. Estes pesquisadores realizaram esplenectomia nos pacientes com níveis reduzidos de 17-cetosteróides, observando o retorno aos valores normais no período pós-operatório.

FERREIRA (1957) descreveu lesões testiculares, alterações no espermograma e uma maior incidência de níveis baixos de 17-Cetosteróides em pacientes esquistossomóticos com hipoevolutismo somato-gonadal. Este autor relata a tendência de normalização do desenvolvimento somático e das funções gonadais, após a realização da esplenectomia, fazendo-o acreditar ser o baço, hipertrofiado e hiperfuncionante, o causador dessas alterações, pois não encontrou evidências de hipofunção hipofisária.

PARTHEMORE e cols. (1967) estudando pacientes esquistossomóticos portadores de infantilismo, não verificaram alterações importantes da função tiroídiana.

ANDRADE e cols. (1968) demonstraram a presença de atrofia testicular em esquistossomóticos na fase hepato-esplênica e procuraram relacionar essa alteração à diminuição da inativação hepática dos estrógenos e ao estado nutricional desses pacientes.

ABDEL-KADER e cols. (1972) relataram níveis elevados de estrógeno urinário em pacientes com ou sem infantilismo, níveis reduzidos de gonadotrofinas nos pacientes portadores de hipoevolução gonadal e a normalidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, verificado através de teste de tolerância à insulina. Estes pesquisadores também ressaltam o possível papel da desnutrição e do excesso de estrógeno na etiopatogenia do retardo no desenvolvimento dos esquistossomóticos.

SUCUPIRA (1972) verificou uma elevação nos níveis basais do hormônio do crescimento e uma resposta secretória normal, induzida pela insulina, em pacientes esquistossomóticos com hipodesenvolvimento somático.

MACEDO e HORWITH (1972) estudando as reservas hipofisárias dos esquistossomóticos com hipoevolução, encontraram uma diminuição nos níveis basais do hormônio luteinizante, sendo esse dado confirmado por SUCUPIRA (1972).

SILVEIRA (1976) observou que os pacientes esquistossomóticos com retardo no desenvolvimento somato-puberal, apresentavam níveis basais normais do hormônio do crescimento, mas possuíam uma limitada capacidade secretória em resposta ao estímulo hipoglicemiante, que era plenamente recuperada após esplenectomia.

FOUSADA e cols (1978) estudaram a influência da infecção esquistossomótica sobre o desenvolvimento somático e sexual dos camundongos, infectando os animais em três períodos etários distintos: ao nascer, aos 30 e aos 60 dias de vida. Os resultados indicaram não haver variação significativa do peso dos animais infectados em relação aos controles, ocorrendo retardo na maturidade dos camundongos infectados ao nascer e alterações na função gonadal dos animais infectados após a maturidade sexual. Para estes autores não há uma relação nítida entre a hepatoesplenomegalia e as alterações encontradas.

COSTA e cols. (1980) com a finalidade de estudar as manifestações da esquistossomose sobre o desenvolvimento e possíveis implicações no funcionamento endócrino, realizaram dois grupos experimentais: no primeiro, animais infectados e controles foram submetidos à avaliação antropométrica e laboratorial por um período de três meses; no segundo, os animais infectados e controles foram tratados de forma semelhante, mas ao fim do segundo mês foram submetidos à esple

nectomia. Os resultados obtidos indicaram um hipodesenvolvimento somático dos animais esquistossomóticos, ocorrendo uma retomada no crescimento após a esplenectomia.

VETTORAZZO FILHO (1980) com o intuito de avaliar a reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, relacionando-a com o grau de hepatoesplenomegalia e alterações no desenvolvimento somato-gonadal dos pacientes esquistossomóticos, realizou dosagens séricas do hormônio luteinizante (LH) e testosterona. Os dados obtidos indicaram níveis basais normais de testosterona e LH, não havendo, também, diferença significativa na reserva hipofisária de LH dos pacientes esquistossomóticos, quando comparado aos controles. O autor não encontrou relação entre as alterações no desenvolvimento e a gravidade das formas clínicas apresentadas, sugerindo que o hipodesenvolvimento estaria na dependência do estado de desnutrição desses pacientes.

Os resultados apresentados não conseguem definir um padrão endócrino para os pacientes esquistossomóticos com hipoevolução e chegam a ser contraditórios em relação as observações clínicas. Isto se deve a presença de fatores associados, como: Desnutrição proteico-calórica e alterações da função hepática, que podem influenciar nos distúrbios endócrinos dos esquistossomóticos.

PIMSTONE e cols. (1968) encontraram níveis basais altos de hormônio do crescimento (HC) em pacientes com desnu-

nutrição protéico-calórica, sendo essa observação confirmada por outros autores (BEAS e cols.,1971; SAMUEL e DESPHANDE, 1972; CHAVES e cols.,1975). MULLINOS, já em 1940, descreveu quadro de insuficiência hipofisária presente em pacientes desnutridos.

A importância do fígado, na inativação dos estrógenos, já é conhecida a várias décadas. (ZONDEK, 1934; GOLDEN e SEVRINGHAUS, 1938).

LLOYD e WILLIAMS (1948) observaram níveis baixos de gonadotrofinas em pacientes cirróticos e propuseram que o hiperestrogenismo, causado pela insuficiência hepática, levaria a uma menor secreção das gonadotrofinas hipofisárias, ocasionando uma diminuição nos níveis circulantes de testosterona. Esse fato explicaria a ocorrência de atrofia testicular nesses pacientes.

BAKER e cols. (1976) avaliaram a função endócrina de 117 pacientes cirróticos com métodos mais sofisticados. Estes autores relataram uma elevação nos níveis plasmáticos de estradiol, aumento nos níveis basais do LH e hormônio folículo estimulante (FSH), aumento na conversão periférica de testosterona em estrógeno e redução nos níveis plasmáticos de testosterona. Assim, a causa básica do hipogonadismo, nesses pacientes, seria a diminuição nos níveis de testosterona e não o hiperestrogenismo sugerido anteriormente. A ocorrência

cia de uma associação entre as alterações endócrinas e os níveis hormonais, pareceu inexistente.

A observação de que pacientes esquistossomóticos, quando esplenectomizados, apresentavam normalização de seu desenvolvimento e função gonadal (MARQUES, 1944; MAHDI e BASSALY, 1955; FERREIRA, 1957; COSTA e col. 1980), fez surgir as hipóteses de que o baço produziria um fator inibidor da liberação dos hormônios hipofisários (GORDON e cols. 1937) ou, mesmo, inativaria esses hormônios (GORDON e cols. 1969).

Vários autores realizaram transplantes tireoidianos para o baço e relataram a ocorrência, evidenciada histologicamente, de uma hiperatividade desses órgãos transplantados, indicando uma provável inativação dos hormônios tireoidianos pelo fígado. (GABE e ARVY, 1947; CORDIER e cols. 1951; DESAIVE e cols. 1951).

HAMOLSKY e GIERLACH (1952) relataram uma diminuição de iodo radiativo ligado as proteínas plasmáticas, quando realizavam transplantes tireoidianos para o baço e, também, concluíram haver uma inativação dos hormônios tireoidianos pelo parênquima hepático.

PORTELA LADOSKY (1977) estudando o papel do fígado na inativação dos hormônios tireoidianos, realizou transplantes, totais e parciais, da glândula para as cápsulas esplênica e renal. Após um período de 60 e 121 dias, fez uma análise

histológicas dos tecidos transplantados e determinou os níveis plasmáticos dos hormônios tiroidianos, concluindo que o fígado, em condições fisiológicas, não pareceu exercer um papel importante na degradação desses hormônios, no que é corroborada por outros pesquisadores (BONDY, 1951; RUPP, 1952; McCORKLE, 1955).

1.3 - Objetivos

A etiopatogenia dos distúrbios endócrinos na esquistossomose, não está elucidada até o presente momento. A indicação de que a deficiência dos hormônios tireoidianos circulantes, pode levar a uma diminuição dos níveis séricos do hormônio do crescimento (ORTIZ-CARO e cols., 1984 a), somada a observação de hipofunção hipofisária nos pacientes esquistossomóticos (MULLINOS, 1940) e as evidências de que a esplenectomia reverte o hipoevolutismo somático e gonadal, encontrado nesses pacientes (MARQUES, 1944; MAHDI E BASSALY, 1955; FERREIRA, 1957; COSTA e cols., 1980), nos induziu a investigar o papel do baço na função tireoidiana, estudando seus efeitos sobre a captação de ^{131}I Na, pelas preparações de membrana celular, da tireóide de camundongos. Assim, o presente trabalho tem como objetivos principais:

- 1) Caracterizar a captação de ^{131}I Na pelas preparações de membrana celular da glândula tireóide de camundongos.
- 2) Determinar a ação do homogeneizado de baço, de animais normais e infectados com cercárias de Schistosoma mansoni, sobre essa captação.
- 3) Purificação da fração sobrenadante do homogeneizado de baço, determinando-se suas atividades.

MATERIAL E MÉTODOS

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

2.1.1 - Animais

Foram utilizados camundongos suíços (Mus mus culus), machos, adultos, normais e contaminados com cercárias.

2.1.2 - Materiais Diversos

Ácido Clorídrico

MERCK, Brasil

Ácido Tricloro Acético

E. MERCK, Alemanha

Albumina Bovina

Sigma Chemical Company, U.S.A.

Blue Dextran

Sigma Chemical Company, U.S.A.

Carbonato de Sódio, P.A.

REAGEN, Brasil

Folin-ciocalteus phenol reagens

E. MERCK, Alemanha

Hidróxido de Sódio, P.A.

REAGEN, Brasil

Iodo Radiativo (^{131}I Na)

CNEN, Brasil

Sacarose

MERCK, Brasil

Sephadex G - 100

Pharmacia Fine Chemicals, Suécia

Sulfato de Cobre II, P.A.

VETEC, Brasil

Tartarato de Sódio

Carlos Erba, Brasil

Tris-(hidroximetil)-Aminometano

MERCK, Brasil

2.1.3 - Aparelhos

Agitador

COLE-PALMER, U.S.A.

Balança de precisão

METTLER, Suíça.

Banho de Órgão

BLUE LINE, U.S.A.

Centrífuga Refrigeraada

SORVALL, U.S.A.

Coluna de Purificação, Tipo K16/100

Pharmacia Fine Chemicals, Suécia

Contador Gama -

G3000, Alemanha

Espectrofotômetro

VARIAN, Brasil

Potenciômetro

METRONIC, Brasil.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Infecção Experimental dos Camundongos (Mus musculus) pelo Schistosoma manso ni.

Os animais, gentilmente cedidos pelo Centro de Pesquisas Azeu Magalhaães da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, foram infectados com cercárias, utilizando-se o método de imersão parcial, descrito por Azevedo (1976).

Os camundongos foram, inicialmente, colocados em contato com água, para estimular a atividade ex-

cretória, evitando-se o contato posterior de suas fezes e urina com as cercárias. Após esta fase, os animais foram colocados, isoladamente, em bequeres, contendo cerca de 120 cercárias por ml de água e expostos a luz artificial, durante 40 minutos, para maior atividade das mesmas. A infecção se dá pela penetração das cercárias através das patas e calda do animal, que ficam imersas no líquido.

2.2.2 - Preparação de Membrana Celular Semi-Purificada.

O procedimento para homogeneização da glândula tiróide e demais órgãos, foi realizado pelo método descrito por BHATTACHARYYA e WOLFF (1975) modificado.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo, então, retirada a tiróide e colocada em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,4, a 4°C, que foi renovado, por três vezes, após fragmentação do material para homogeneização.

A glândula foi homogeneizada em tampão Tris-HCl 10 mM, com sacarose 0,3 M, pH 7,4, a 4°C, sendo, em seguida, centrifugada (1000 rpm - 10 minutos). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante, novamente centrifugado (7.500 rpm - 60 minutos). O precipitado, então obtido, foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, a 4°C e agitado

até sua homogeneização. Todo o processo de centrifugação foi realizado com a temperatura oscilando entre 0° a 4°C. Os homogeneizados foram armazenados a - 10°C.

2.2.3 - Determinação da Concentração de Proteínas nas Preparações de Membrana Celular.

A concentração de proteínas nas preparações de membrana celular, foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY e cols., 1951), utilizando-se como padrão albumina bovina (BSA).

O perfil de proteínas, nos tubos obtidos da purificação da fração sobrenadante do homogeneizado de baço, foi determinado através da absorção de luz ultravioleta, no comprimento de onda de 280 nm.

2.2.4 - Procedimento Básico de Incubação da Membrana Celular Tiroidiana com ^{131}I Na

O homogeneizado de membrana tiroidiana foi incubado, numa concentração de $63,28 \pm 2,78$ $\mu\text{g/ml}$, em Tris HCl 10 mM, pH 7,4, com 0,1% de BSA (P/V), a temperatura ambiente e exposto ao ^{131}I Na ($1.530.919 \pm 83.339$ cpm/ml), por um período de 120 minutos. O volume final dos tubos de incubação foi de 500 μl . Após o término do período de incubação, a rea-

ção foi paralisada e as proteínas precipitadas, acrescentando-se 500 μ l de solução, a 4°C, de TCA a 20% (P/V) nos tubos de incubação. A concentração de TCA no volume final destes tubos foi de 10% (P/V). A mistura foi agitada vigorosamente e, após 10 minutos, centrifugada (3.000 rpm - 30 minutos - 4°C), sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado levado ao contador gama.

A captação específica foi determinada, subtraindo-se da captação do homogeneizado tiroídiano, a captação dos tubos brancos, que não continham membrana tiroídiana.

2.2.5 - Estudo da Captação de ^{131}I Na pelo Homogeneizado de Membrana Tiroídiana.

2.2.5.1 - Efeito da Concentração do TCA na Captação de ^{131}I Na pela Membrana Tiroídiana.

A membrana tiroídiana, numa concentração de 63,50 μ g/ml, foi incubada na presença de ^{131}I Na ($1,4 \times 10^6$ cpm/ml). A concentração de TCA utilizada variou de 5 a 60% (P/V), obtendo-se uma concentração final nos tubos de incubação de 2,5 a 30% (P/V). O TCA, nas mesmas concentrações, foi acrescentado a tubos, sem membrana tiroídiana, para determinação da captação específica. Os procedimentos de incubação seguiram o método descrito anteriormente.

2.2.5.2 - Estudo da Captação do Homogeneizado de Membrana Celular Tiroidiana em Função da Concentração de ^{131}I Na.

O homogeneizado de membrana da glândula tiróide, na concentração de 69,42 $\mu\text{g/ml}$, foi incubado com diferentes concentrações de ^{131}I Na, que variaram de $5,3 \times 10^4$ a $1,9 \times 10^6$ cpm/ml, seguindo o método descrito em 2.2.4. A captação específica da membrana celular tiroidiana foi obtida, subtraindo-se da captação total destes homogeneizados, a captação de tubos brancos, sem membrana tiroidiana, incubados com as mesmas concentrações de ^{131}I Na e seguindo o mesmo método.

2.2.5.3 - Determinação da Captação de ^{131}I Na em Função da Concentração do Homogeneizado de Membrana da Glândula Tiróide.

Com o objetivo de determinar a concentração do homogeneizado de membrana celular tiroidiana a ser utilizado em nossos trabalhos experimentais, foi necessário incubar concentrações diferentes do homogeneizado, variando de 10,04 a 160,64 $\mu\text{g/ml}$, em presença de ^{131}I Na constante, numa concentração de $1,7 \times 10^6$ cpm/ml. O processo de incubação foi feito de acordo com o descrito anteriormente, em 2.2.4. A verificação da captação de tubos sem membrana tiroidiana, incubados

nas mesmas condições experimentais, permitiu a obtenção da captação específica dos homogeneizados de membrana celular tiroidiana.

2.2.5.4 - Cinética de Captação do ^{131}I Na pela Membrana Tiroidiana.

Seguindo-se a metodologia descrita anteriormente, a membrana celular tiroidiana foi incubada, na concentração de 80,50 $\mu\text{g/ml}$, em presença de ^{131}I Na ($1,9 \times 10^6$ cpm/ml), por períodos de tempo que variaram de 5 a 240 minutos. Em todos os tempos de incubação, foram acrescentados tubos que não receberam a membrana celular, possibilitando a determinação da captação específica, do homogeneizado de membrana, nos tempos da cinética.

2.2.6 - Determinação da Captação de ^{131}I Na pelos Homogeneizados de Tecidos Celulares.

As membranas celulares dos tecidos extra-tiroidianos, nas concentrações de 59,24 $\mu\text{g/ml}$ (baço), 71,72 $\mu\text{g/ml}$ (coração), 79,44 $\mu\text{g/ml}$ (rim) e 56,44 $\mu\text{g/ml}$ (fígado), foram incubadas na presença de ^{131}I Na ($1,5 \times 10^6$ cpm/ml), em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, com 0,1% de BSA (P/V), por um período de 120 minutos, a temperatura ambiente. A incubação foi realizada no volume final de 500 μl . A reação foi paralisada por adição de

TCA a 20% (F/V), a 4°C, 500 µl por tubo, agitando-se vigorosamente e, após 10 minutos, centrifugando-se (3.000 rpm - 30 minutos - 4°C). Os precipitados foram levados ao contador gama e, das captações obtidas, foi retirada a captação dos tubos sem homogeneizados de membrana, para obtenção da captação específica da membrana celular de cada tecido.

2.2.7 - Efeito de Tecidos Celulares Extra-tiroi- dianos sobre a Captação de ¹³¹INa pelo Homogeneizado de Membrana Tiroidiana.

A membrana celular obtida da glândula tiróide, na concentração de 65,56 µg/ml, foi incubada na presença de homogeneizados de membrana de baço (59,24 µg/ml), coração (71,72 µg/ml), rim (79,44 µg/ml), fígado (56,44 µg/ml) e baço infectado por Schistosoma mansoni (56,96 µg/ml), com ¹³¹INa (1,5 × 10⁶ cpm/ml). O procedimento de incubação e a determinação da captação específica foi feita de acordo com metodologia descrita anteriormente, em 2.2.4.

2.2.8 - Efeito do Sobrenadante do Homogeneizado de Baço sobre a Captação de ¹³¹INa pelo Homogeneizado de Membrana da Glândula Tiróide.

O homogeneizado de membrana celular do baço, de animais normais e infectados com esquistossomose, foi

pré-incubado em tampão Tris-HCl, pH 7,4, por 30 minutos, a 37°C, com agitação contínua, sendo, em seguida, centrifugado (3.000 rpm - 15 minutos - 4°C). O sobrenadante obtido foi incubado em diferentes concentrações, variando de 2,46 a 22,32 µg/ml, na presença de homogeneizado de membrana tiroídiana - (49,56 µg/ml) e ^{131}I Na ($1,4 \times 10^6$ cpm/ml), como descreve o método 2.2.4. A incubação de tubos sem os homogeneizados de membrana celular, permitiu a determinação da captação específica da membrana tiroídiana, em presença do sobrenadante do homogeneizado de baço.

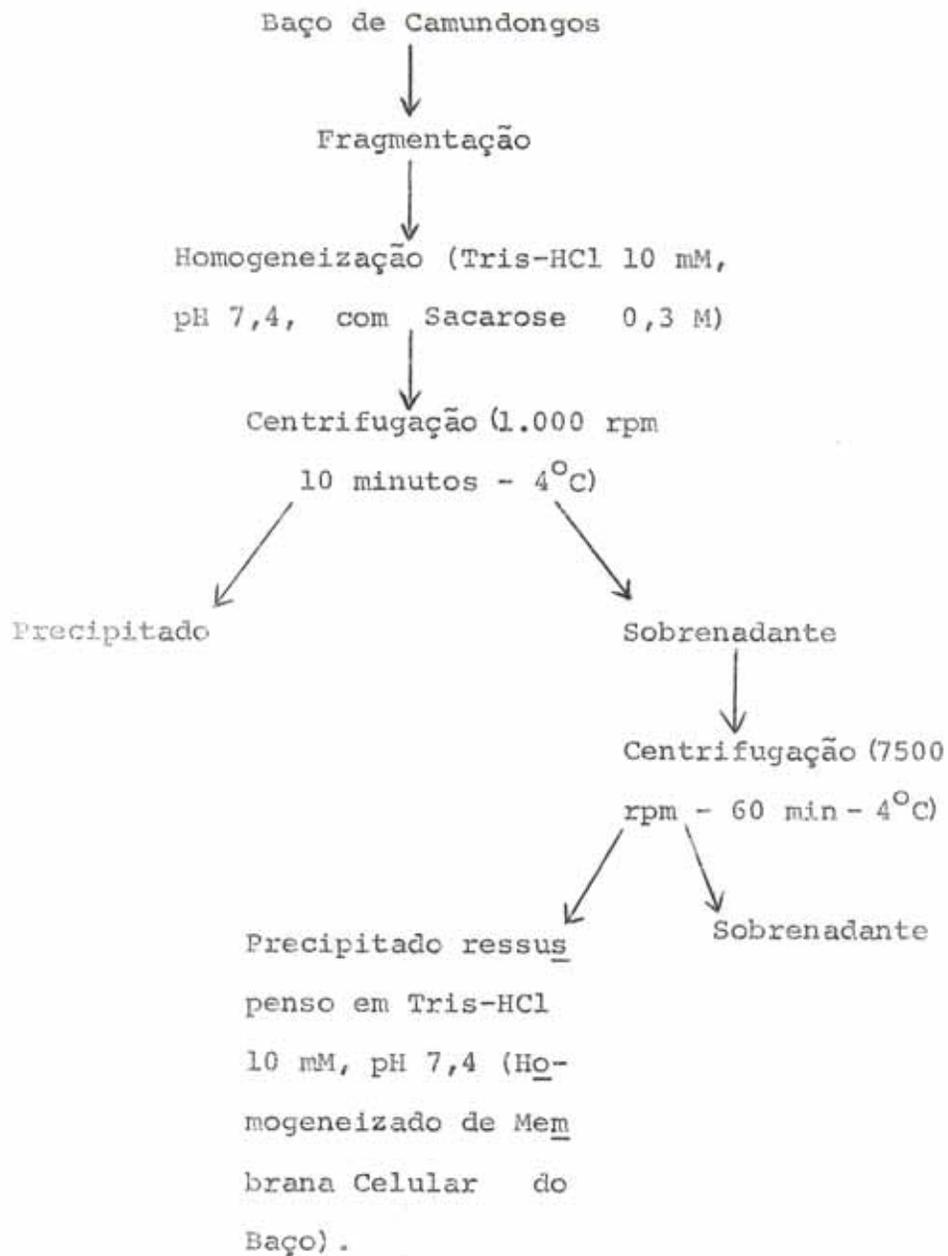
2.2.9 - Purificação do Sobrenadante do Homogeneizado de Baço em Sephadex G-100.

Os sobrenadantes dos homogeneizados de baço, de animais normais e infectados por *Schistosoma*, obtidos pelo método 2.2.8, foram eluídos em coluna de Sephadex G-100, medindo 1,5 centímetro de diâmetro e 75 cm de comprimento, com um volume de 132,54 ml (Volume morto, determinado pelo Blue dextran, de 36 ml) e um fluxo de 0,8 ml/min. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 e as frações foram coletadas em períodos de 5 minutos.

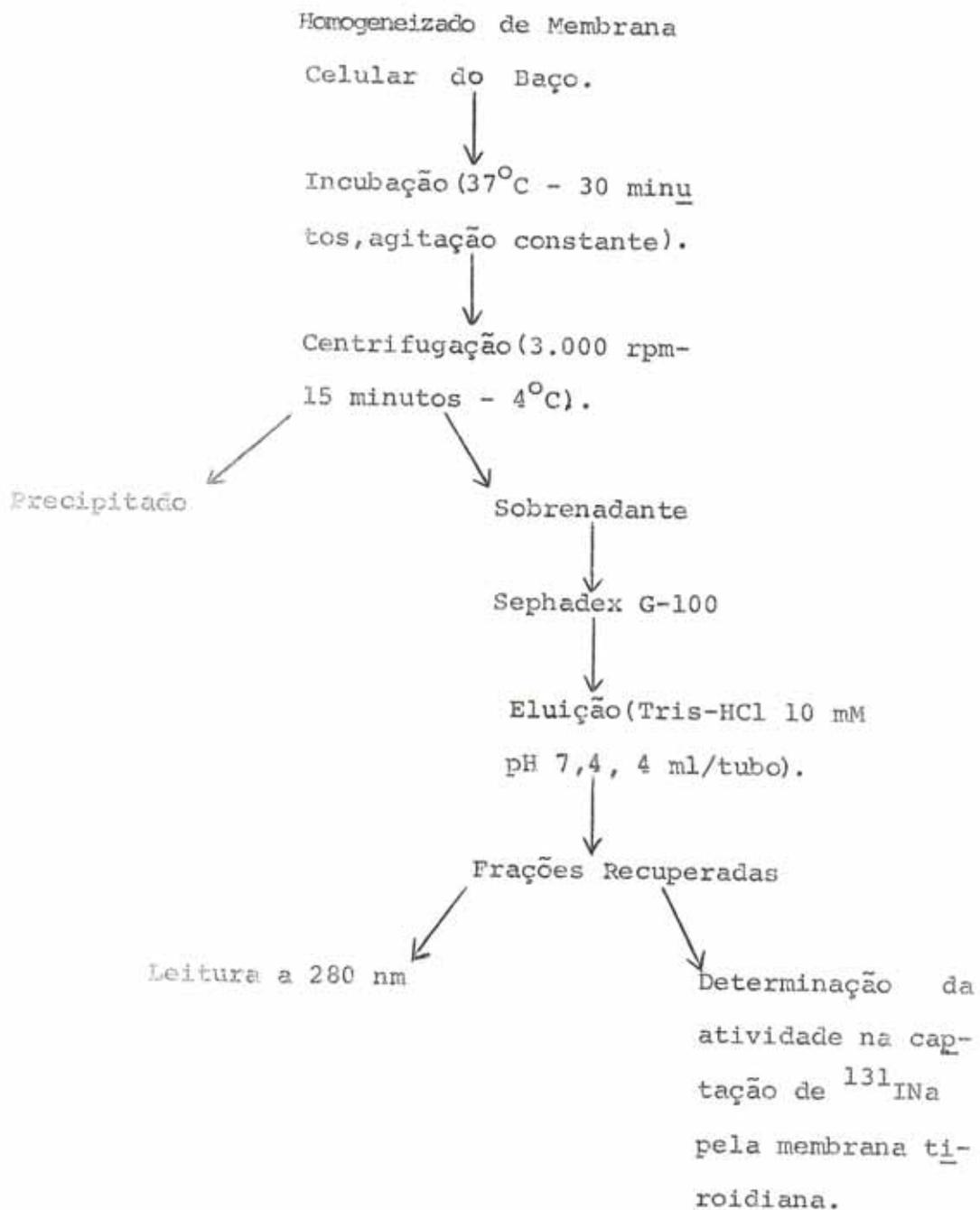
O perfil de proteínas das frações coletadas, foi obtido através de metodologia descrita em 2.2.3. A atividade das frações recuperadas foi avaliada através da determinação de captação de ^{131}I Na ($1,3 \times 10^6$ cpm/ml) pela

membrana celular tiroídiana (50,82 $\mu\text{g/ml}$). Para tal, foram re_
tiradas amostras de 50 μl dos tubos 14, 15, 16, 37, 38 e 39
(32,38, 33,11, 34,16, 9,09, 9,82 e 9,54 $\mu\text{g/ml}$, respectivamen_
te), da filtração do homogeneizado de baço de animais controle e
dos tubos 16, 17, 18, 39, 40 e 41 (32,35, 33,37, 33,59, 13,48,
14,18 e 9,95 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), da filtração do homogenei_
zado de baço de animais esquistossomóticos.

Esquema I: Purificação do Homogeneizado de Baço.
 1.^a Parte: Metodologia de Homogeneização do Tecido.



Esquema I: Purificação do Homogeneizado de Baço
2^a. Parte: Procedimento para Isolar a Proteína de Membrana do Baço



RESULTADOS

3 - RESULTADOS

3.1 - Estudo da Captação de ^{131}I Na pelo Homogeneizado de Membrana Tiroidiana.

3.1.1 - Efeito da Concentração de TCA na Captação de ^{131}I Na pela Membrana Tiroidiana.

As proteínas do homogeneizado de membrana tiroidiana, incubadas com ^{131}I Na, foram precipitadas com solução de TCA, variando de 5 a 60% (P/V). Os tubos com TCA a 20% (P/V) apresentaram a maior captação específica de ^{131}I Na pelo homogeneizado tiroidiano (6.287 ± 424 cpm/ μg), o que representou um acréscimo de 1,8 vezes, quando comparado aos tubos com TCA a 10% (3.333 ± 416 cpm/ μg) e de mais de 3 vezes, em relação aos tubos com TCA a 5,40 e 60% (P/V), como pode ser observado na figura I.

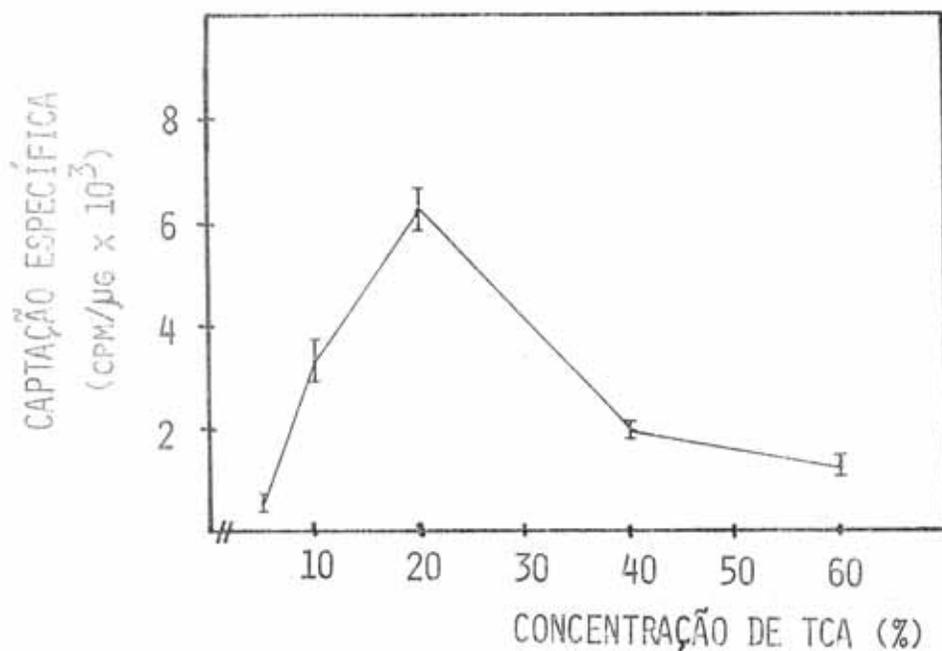


FIGURA I: Efeito da concentração de TCA na captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana celular tireoidiana.

A membrana tireoidiana foi incubada - (63,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) com ^{131}I Na ($1,4 \times 10^6$ cpm/ml), em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, com 0,1% de BSA (P/V), a temperatura ambiente, por 120 minutos. A concentração da solução, resfriada a 4°C , de TCA, utilizada para paralisar a reação e precipitar as proteínas, variou de 5 a 60% (P/V). Os resultados são a média \pm erro padrão da captação específica, destas membranas, em três experimentos isolados.

3.1.2 - Estudo da Captação do Homogeneizado de Membrana Celular Tiroidiana em Função da Concentração de ^{131}I Na.

Utilizando-se concentrações crescentes de ^{131}I Na, diluídas em Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), que variaram de $5,3 \times 10^4$ a $1,9 \times 10^6$ cpm/ml, mantendo-se constante a concentração do homogeneizado de membrana celular tiroidiana e o tempo de incubação, podemos observar, como mostra a figura II, que a captação específica da membrana tiroidiana, entre 1.000×10^3 e 2.000×10^3 cpm/ml, atingiu mais de 25%, sendo 2 vezes maior do que a ocorrida com $5,3 \times 10^4$ cpm/ml.

3.1.3 - Determinação da Captação de ^{131}I Na em Função da Concentração do Homogeneizado de Membrana da Glândula Tiróide.

Para obtermos a concentração ótima da membrana tiroidiana a ser utilizada em nossos experimentos, incubamos diferentes concentrações do homogeneizado de membrana (10,04 a 160,64 $\mu\text{g/ml}$), na presença de uma concentração constante de ^{131}I Na, por um tempo de 2 horas. A figura III mostra que a captação específica da membrana tiroidiana, foi acima de 25% do total de ^{131}I Na utilizado, quando a concentração do homogeneizado, nos tubos, foi maior do que 40 $\mu\text{g/ml}$, ocorrendo a percentagem de captação específica máxima ($27,97 \pm 0,67\%$) com 80,32 $\mu\text{g/ml}$ da membrana tiroidiana semi-purificada.

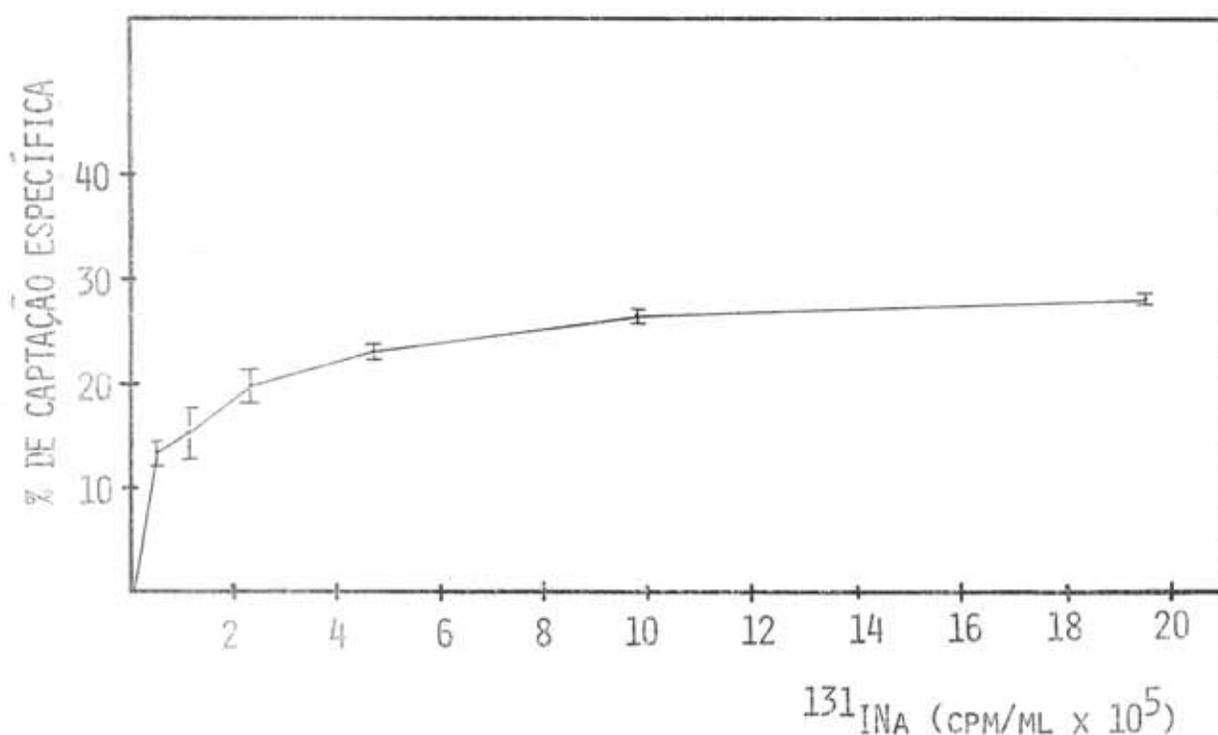


FIGURA II: Estudo da captação do homogeneizado de membrana celular tiroideana em função da concentração de $^{131}\text{I-INA}$.

O homogeneizado de membrana tiroideana foi incubado (69,42 $\mu\text{g/ml}$), em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, com 0,1% de BSA (P/V), na presença de diferentes concentrações de $^{131}\text{I-INA}$ ($5,3 \times 10^4$ a $1,9 \times 10^6$ cpm/ml), a temperatura ambiente. Após 120 minutos, a reação foi paralisada com TCA a 20% (P/V), resfriado a 4°C . Os resultados representam a média \pm erro padrão da porcentagem de captação específica, destas membranas, em três experimentos isolados.

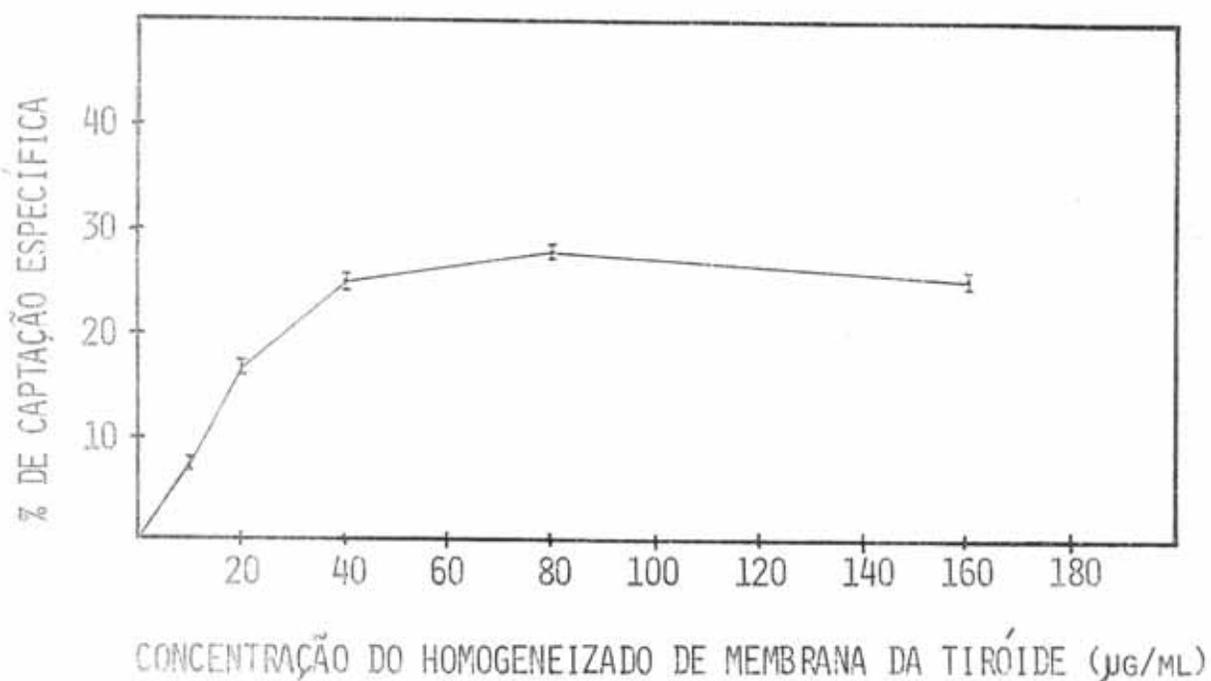


FIGURA III: Determinação da captação de ^{131}I Na em função da concentração do homogeneizado de membrana da glândula tireóide.

O homogeneizado de membrana tireoidiana, em concentrações que variaram de 10,04 a 160,64 µg/ml, foi incubado com ^{131}I Na ($1,7 \times 10^6$ cpm/ml), em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, com 0,1% de BSA (P/V), a temperatura ambiente. Após 120 minutos, a reação foi paralisada com solução, resfriada a 4°C, de TCA a 20% (P/V). Os resultados apresentados são a média \pm erro padrão da percentagem de captação específica das membranas tireoidianas, em três experimentos isolados.

3.1.4 - Cinética de Captação do ^{131}I Na pela Membrana Tiroidiana.

Utilizando-se tempos de incubação que variaram de 5 a 240 minutos, mantendo-se constante a concentração do homogeneizado de membrana celular tiroidiana e de ^{131}I Na, podemos observar que a captação específica, deste homogeneizado, foi acima de 6.000 cpm/ μg , quando foram utilizados tempos de incubação maiores, ou iguais, a 60 minutos, como mostra a figura IV, sendo a percentagem de captação específica, nestas condições, maior que 25%, em relação ao total de ^{131}I Na encontrado nos tubos.

3.2 - Determinação da Captação de ^{131}I Na pelos Homogeneizados de Tecidos Celulares.

Os homogeneizados de membrana de glândula tireóide, baço, coração, rim e fígado, foram incubados com ^{131}I Na ($1,5 \times 10^6$ cpm/ml), por 120 minutos. A figura V mostra que o homogeneizado de membrana tiroidiana apresentou uma percentagem de captação específica ($28,70 \pm 0,41\%$) 2,3 vezes acima da captação do homogeneizado de baço ($12,11 \pm 1,83\%$), 3 vezes maior do que a captação do homogeneizado de coração ($9,33 \pm 1,14$) e 6,9 vezes, ou mais, acima da captação obtida pelos homogeneizados de rim ($4,12 \pm 1,21\%$) e fígado ($3,60 \pm 0,98\%$), indicando ser a captação do ^{131}I Na, uma função especializada do tecido tiroidiano.

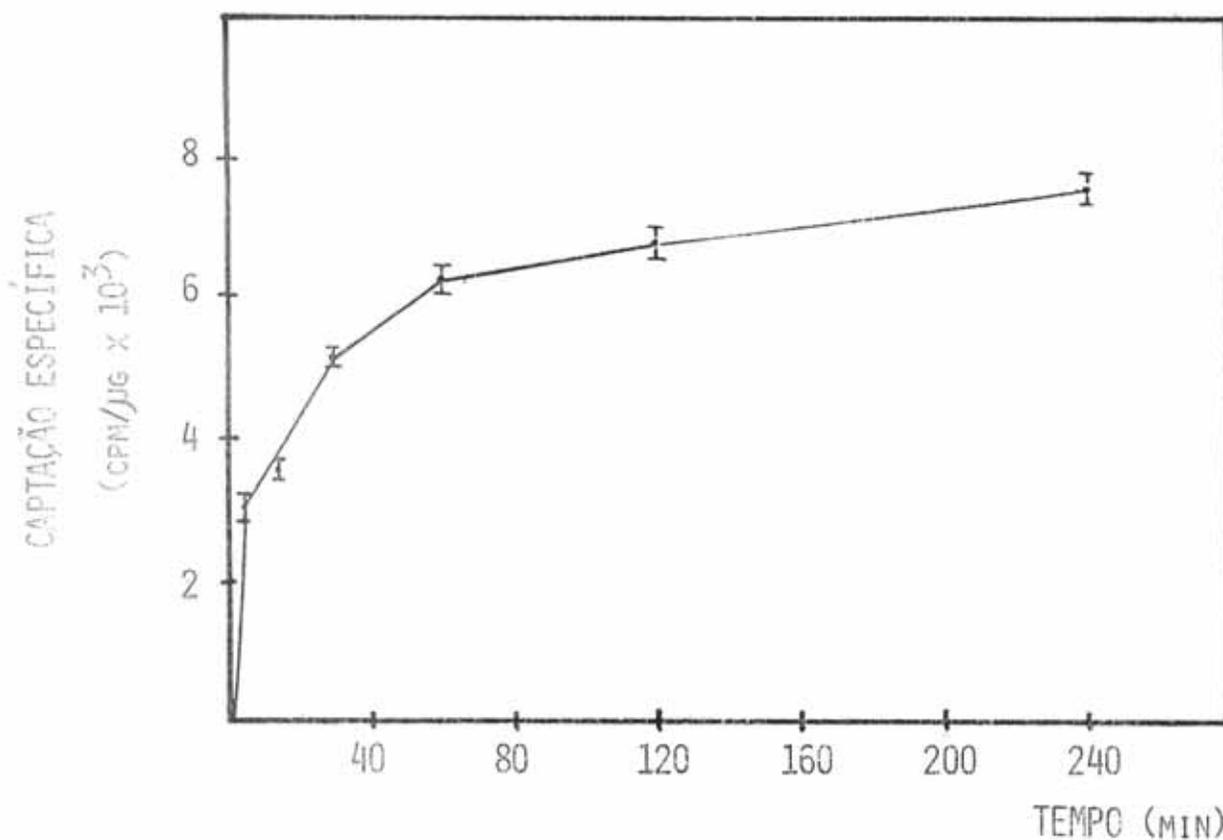


FIGURA IV: Cinética de captação do ^{131}I Na pela membrana tireoidiana.

A membrana tireoidiana foi incubada (80,50 $\mu\text{g/ml}$) com ^{131}I Na ($1,9 \times 10^6$ cpm/ml), em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, com 0,1% de BSA (P/V), a temperatura ambiente, por períodos de tempo que variaram de 5 a 240 minutos. A reação foi paralisada com TCA a 20% (P/V), a 4°C . Os resultados obtidos em três experimentos isolados, foram expressos em média \pm erro padrão.

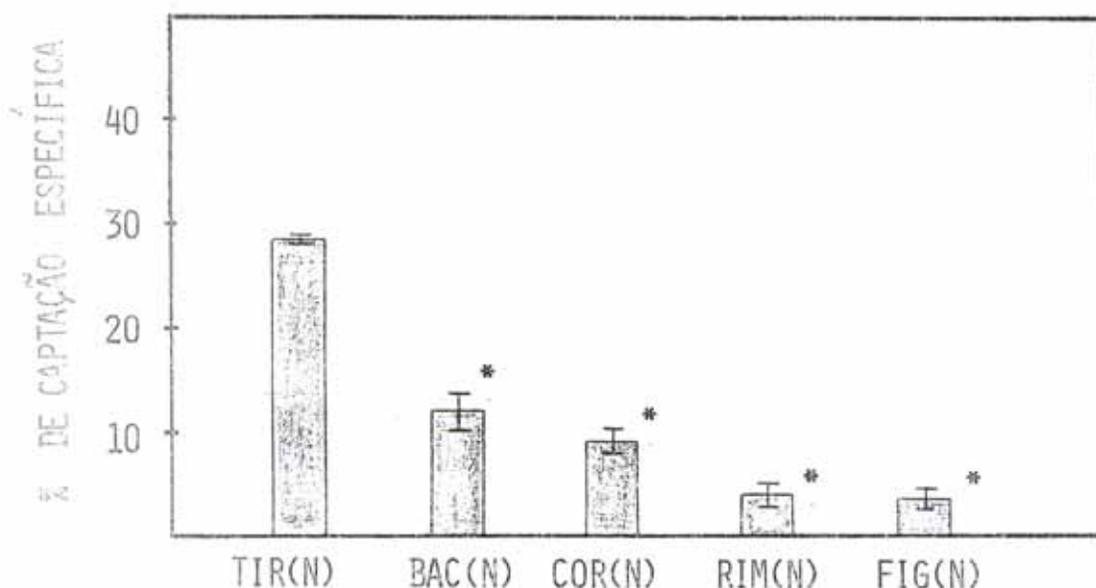


FIGURA V: Determinação da captação de ^{131}I Na pelos homogeneizados de tecidos celulares e glândula tiróide.

Os homogeneizados de membrana de tiróide ($63,28 \pm 2,78 \mu\text{g/ml}$), baço ($59,24 \mu\text{g/ml}$), coração ($71,72 \mu\text{g/ml}$), rim ($79,44 \mu\text{g/ml}$) e fígado ($56,44 \mu\text{g/ml}$), de animais normais, foram incubados com ^{131}I Na ($1,5 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$), em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, com 0,1% de BSA (P/V), por um período de 120 minutos, a temperatura ambiente. A reação foi paralisada com TCA a 20% (P/V), a 4°C . Os dados são a média \pm erro padrão da percentagem de captação específica, destes homogeneizados de membrana, em cinco ou mais experimentos.

* $P < 0,01$ em relação ao valor obtido pelo homogeneizado de membrana tiroídiana ("t" de Student).

3.3 - Efeito de Tecidos Celulares Extra-tiroidianos sobre a Captação de ^{131}I Na pelo Homogeneizado de Membrana Tiroidiana.

A percentagem de captação específica da membrana tiroidiana incubada isoladamente ($28,70 \pm 0,41\%$) ou na presença de homogeneizados de membrana de coração ($26,12 \pm 1,68\%$), baço ($20,26 \pm 1,79\%$), rim ($9,65 \pm 1,87\%$), fígado ($7,23 \pm 1,45\%$) e baço de animais esquistossomóticos ($3,88 \pm 1,65\%$), com ^{131}I Na, pode ser observada na figura VI. Os resultados obtidos demonstram uma inibição significativa, pelos homogeneizados de baço (29,4%), rim (66,4%), fígado (74,8%) e baço infectado por Schistosoma mansoni (86,5%), sobre a captação específica de ^{131}I Na, pelo homogeneizado de membrana de glândula tiróide.

3.4 - Efeito do Sobrenadante do Homogeneizado de Baço sobre a Captação de ^{131}I Na pelo Homogeneizado de Membrana da Glândula Tiróide.

Na tentativa de isolar a substância que possui ação inibitória sobre a membrana tiroidiana, incubamos esta membrana ($49,56 \mu\text{g/ml}$) com sobrenadante do homogeneizado de baço pré-incubado, de animais controle, em concentrações que variaram de $2,79$ a $22,32 \mu\text{g/ml}$, na presença de ^{131}I Na ($1,2 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$). A figura VII mostra uma inibição crescente da captação específica de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana da glândula tiróide, que atingiu $12,13 \pm 1,50\%$ com $22,32 \mu\text{g/ml}$ do sobrenadante

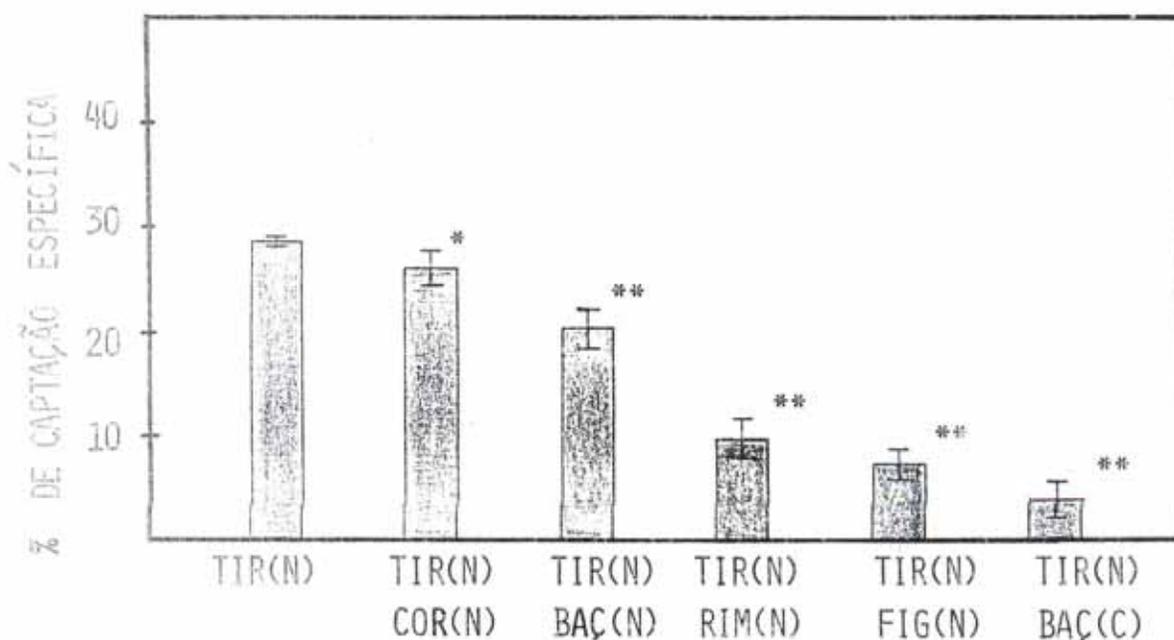


FIGURA VI: Efeito inibidor de tecidos celulares extra-tiroidianos sobre a captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana da glândula tiróide.

A membrana celular tireoidiana ($65,56 \mu\text{g/ml}$) foi incubada na presença de homogeneizados de membrana do coração ($71,72 \mu\text{g/ml}$), baço ($59,24 \mu\text{g/ml}$), fígado ($56,44 \mu\text{g/ml}$) e baço, BAÇ (C), de animais esquistosomóticos ($56,96 \mu\text{g/ml}$), com ^{131}I Na ($1,5 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$), seguindo metodologia descrita em 2.2.4. Os valores obtidos em três ou mais experimentos, foram expressos como média \pm erro padrão da % de captação específica do homogeneizado de membrana da glândula tiróide, nestas condições experimentais.

* Resultado não significativo

** $P < 0,025$ comparado com os valores obtidos pela membrana tireoidiana ("t" de Student).

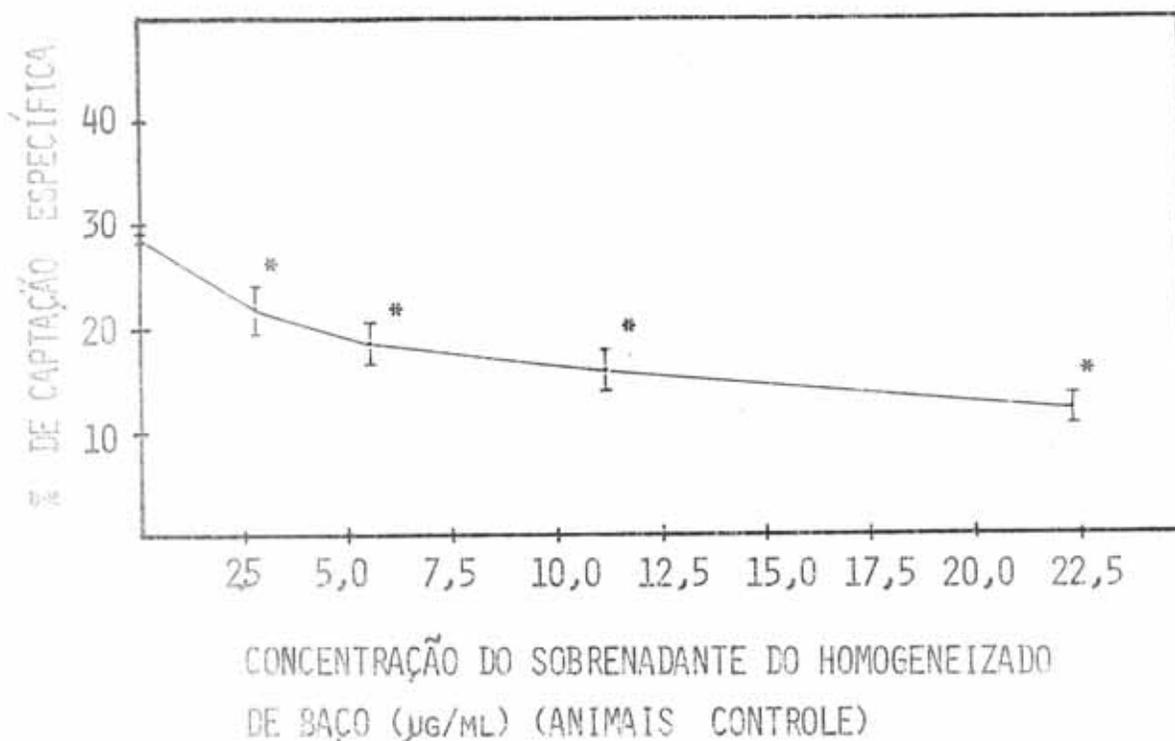


FIGURA VII: Efeito inibidor do sobrenadante do homogeneizado de baço sobre a captação de ^{131}I Na pela membrana celular tireoidiana.

A incubação foi realizada com quantidades crescentes do sobrenadante do homogeneizado de baço (2,79, 5,58, 11,16 e 22,32 µg/ml) e uma quantidade constante de membrana tireoidiana (49,56 µg/ml), na presença de ^{131}I Na ($1,2 \times 10^6$ cpm/ml). Os resultados são média \pm erro padrão da % de captação específica do homogeneizado de membrana da glândula tireoide, na presença do sobrenadante do homogeneizado de baço, de cinco ou mais experimentos isolados.

* $P < 0,01$ comparado ao controle ("t" de Student).

do homogeneizado de baço

3.5 - Efeito do Sobrenadante do Homogeneizado de Baço, de Animais Esquistossomóticos, sobre a Captação de ^{131}I Na pelo Homogeneizado de Membrana da Glândula Tiróide.

A membrana tiroidiana (57,94 $\mu\text{g/ml}$) incubada com o sobrenadante do homogeneizado de baço pré-incubado, de animais esquistossomóticos (2,46 a 19,68 $\mu\text{g/ml}$), na presença de ^{131}I Na ($1,4 \times 10^6$ cpm/ml), apresentou um decréscimo da percentagem de captação específica de ^{131}I Na, que atingiu seu ponto mínimo - ($1,76 \pm 1,63\%$) com a maior concentração (19,68 $\mu\text{g/ml}$) utilizada do sobrenadante do homogeneizado de baço, destes animais, como podemos observar na figura VIII.

3.6 - Purificação do Sobrenadante do Homogeneizado de Baço (Animais Controle).

O sobrenadante do homogeneizado de baço, de animais controle, eluído em coluna de Sephadex G-100, apresentou duas frações (A e B). A incubação de alíquotas (50 μl) de tubos contidos nestas frações, com membrana tiroidiana (50,82 $\mu\text{g/ml}$), na presença de ^{131}I Na ($1,3 \times 10^6$ cpm/ml), demonstrou um maior efeito inibitório da fração B sobre a percentagem de captação específica da membrana tiroidiana, que foi de menos de 5%, atingindo seu ponto mínimo no tubo 39 ($3,19 \pm 0,53\%$), como mostra a figura IX.

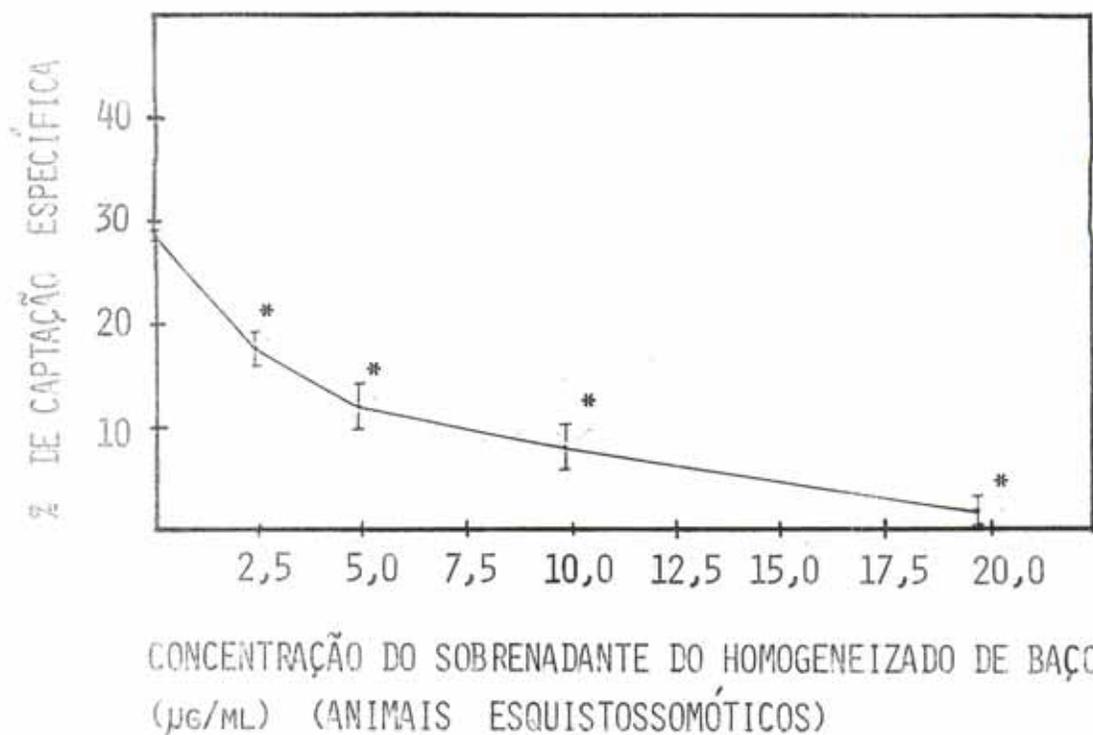


FIGURA VIII: Efeito inibidor do sobrenadante do homogeneizado de baço, de animais esquistossomóticos, sobre a captação de ^{131}I pelo homogeneizado de membrana da glândula tiróide.

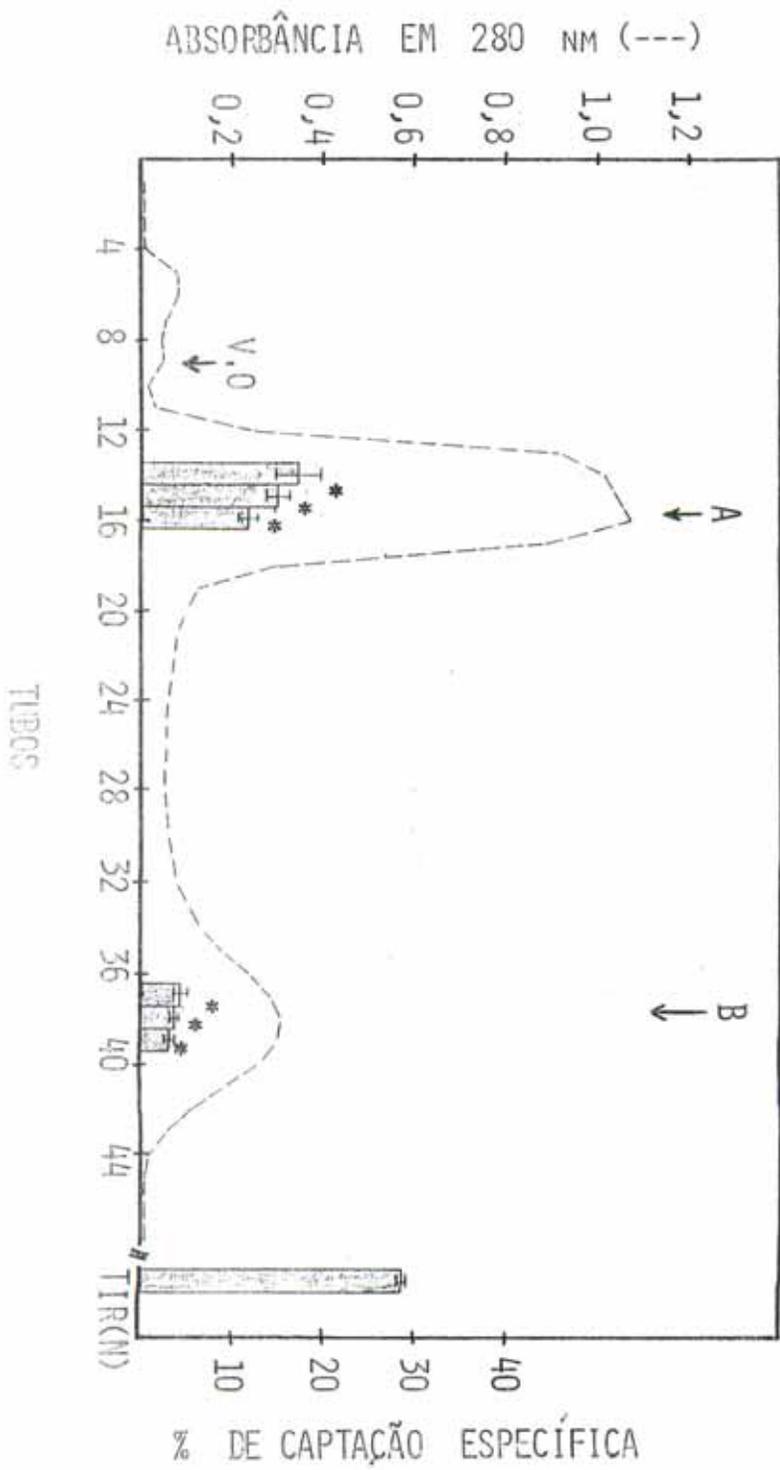
A incubação foi realizada com diferentes concentrações do sobrenadante do homogeneizado de baço, de animais esquistossomóticos (2,46, 4,92, 9,84 e 19,68 $\mu\text{g/mL}$), e uma concentração constante da membrana tiroidiana (57,94 $\mu\text{g/mL}$), na presença de ^{131}I Na ($1,4 \times 10^6$ cpm/ml). Os resultados representam média \pm erro padrão da % de captação específica da membrana tiroidiana, nestas condições experimentais, de quatro ou mais experimentos isolados.

* $P < 0,01$ em relação ao controle. ("t" de Student).

FIGURA IX: Purificação do sobrenadante do homogeneizado de baço
(Animais Controle).

O sobrenadante do homogeneizado de baço, de animais normais, foi filtrado em coluna de Sephadex G-100, com dimensões de 75 x 1,5 cm, equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,4). A atividade das frações recuperadas foi então avaliada, incubando-as com membrana tiroídiana, na presença de ^{131}I Na e a % de captação específica da glândula tiróide é expressa como média \pm erro padrão, de três ou mais experimentos isolados.

* $P < 0,01$ comparado ao controle (TIR(N)) ("t" de Student).



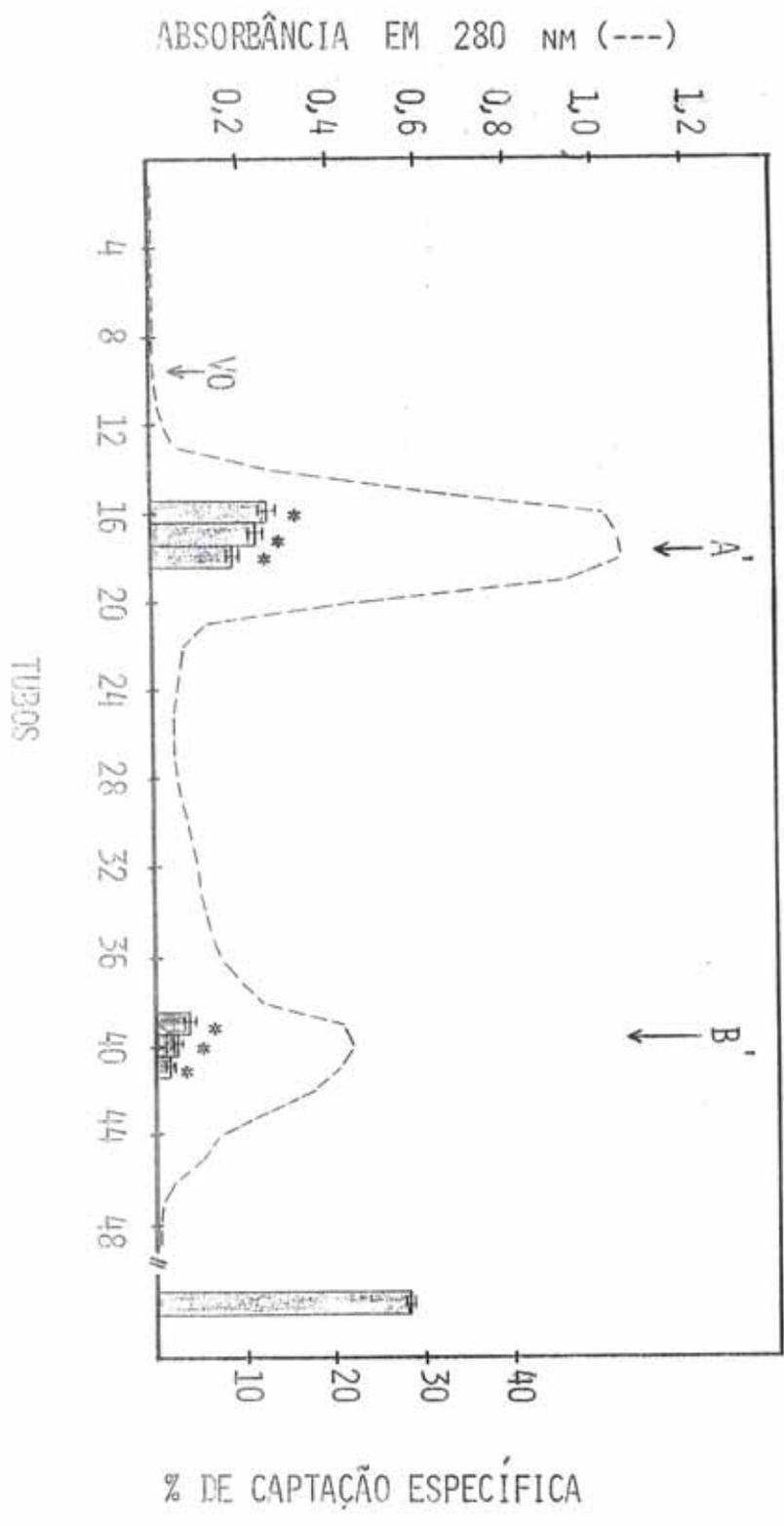
3.7 - Purificação do Sobrenadante do Homogeneizado de Baço (Animais Esquistossomóticos).

O homogeneizado de baço, de animais esquistossomóticos, foi pré-incubado com tampão tris-HCl 10 mM (pH 7,4), sendo o seu sobrenadante eluído em coluna de Sephadex G-100, obtendo-se duas frações (A' e B'). A fração B' apresentou um maior efeito inibitório sobre a percentagem de captação específica de ^{131}I Na do homogeneizado de membrana tiroídiana que, na presença de alíquotas (50 μ l) de tubos desta fração, captou menos de 4%, atingindo a captação mínima de $1,74 \pm 0,49\%$, como podemos observar na figura X.

FIGURA X: Purificação do sobrenadante do Homogeneizado de baço
(Animais Esquistossomóticos).

O sobrenadante do homogeneizado de baço, de animais esquistossomóticos, foi filtrado em coluna de Sephadex G-100, medindo 75 x 1,5 cm, equilibrada com Tris-HCl 10 mM (pH 7,4). As frações foram incubadas com membrana tiroidiana e $^{131}\text{I}\text{Na}$, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão de três ou mais experimentos isolados.

* $P < 0,01$ em relação ao controle (TIR(N)) ("t" de Student).



DISCUSSÃO

4 - DISCUSSÃO

Nossos estudos sobre a captação de ^{131}I Na pela glândula tireóide, foram realizados utilizando, como modelo biológico, o homogeneizado de membrana tiroídiana.

WOLFF (1964) afirmou ser necessário haver uma integridade celular, para que ocorresse o transporte de iodo e concluiu não haver uma concentração significativa, desses íons, nos homogeneizados tiroídianos.

LISSITZKY e cols. (1971) incubaram células tiroídianas em cultura (200 e 300 μg de DNA), com ^{125}I Na (0,4 a 0,8 $\mu\text{Ci/ml}$), a 35°C e após um tempo variável (0 a 6 horas), precipitaram as proteínas com TCA a 10% (P/V). As células incubadas com TSH (40 mU/ml), no 69 dia de cultura, por 2 horas, apresentaram uma captação de 25% do ^{125}I Na total, entretanto, na ausência de TSH, esta captação ficou em torno de 2%. Como o TSH estimula a diferenciação dessas células, estes autores concluíram

que o transporte de iodo era dependente de características morfológicas e bioquímicas da membrana tiroídiana, explicando que os diferentes resultados obtidos, por células tiroídianas isoladas, se deve a proporção variável de células diferenciadas ou não, existentes no experimento.

WINAND e KOHN (1975) demonstraram que as células tiroídianas permaneciam em monocamadas, quando o TSH era adicionado ao meio de incubação após 48 horas de cultivo celular e não apresentavam características de células foliculares, possuindo uma menor capacidade de captar e organificar o iodo, confirmando relato anterior. No entanto, WADELEUX e cols. em 1978, incubando células tiroídianas em cultura, com $^{125}\text{I}\text{Na}$ ($5\mu\text{ci/ml}$), a 37°C , por 6 horas, na presença ou ausência de TSH ($0,5\text{ UI/ml}$), obtiveram uma captação (Controle) de $5.500\text{ cpm}/\mu\text{g DNA}$ e observaram que as células em monocamadas captavam $^{125}\text{I}\text{Na}$ na mesma proporção que as células foliculares, embora apresentassem uma organificação deficiente.

Outros autores, incubando células tiroídianas em cultura, com $^{125}\text{I}\text{Na}$ e $^{131}\text{I}\text{Na}$ ($2\mu\text{ci/ml}$), por 2 horas, a 37°C , obtiveram uma captação de aproximadamente 10% do iodo utilizado (ROGER e DUMONT, 1983; CHAZENBALK e cols. 1985).

O nosso modelo experimental foi inicialmente apoiado pelas conclusões de TYLER e cols. (1968), de que o processo de captação de iodo ocorria através de um carreador de membrana, que era Na^+ dependente. SAITO e cols. (1983), utilizando um novo modelo biológico (vesículas de membrana tiroídiana), verifi

caram ser o transporte, do íon iodeto pela membrana tiroidiana, dependente de um gradiente de Na^+ e que os processos de organificação dos íons captados, bem como, a hidrólise do ATP, não interferiam nesse mecanismo.

RANI e FIELD (1988) incubando fragmentos de tecido tiroidiano, folículos e células em cultura, com ^{125}INa (1 μ ci/ml), a $37^{\circ}C$, por 2 horas, obtiveram uma captação de ^{125}INa pelos fragmentos de tecido ($4,5 \times 10^{-3}$ cpm/mg), mais significativa do que a captação das células em cultura e folículos isolados. Estes autores observaram que a noradrenalina e o carbacol, estimulavam a captação em fragmentos de tecido tiroidiano e folículos, entretanto, inibiam a captação a nível de células em cultura, o que indicava ser uma propriedade inerente dessas células.

O uso de fragmentos de tecido tiroidiano, folículos isolados ou células em cultura, na avaliação de funções da glândula, apresentam algumas desvantagens. Os fragmentos de tecido, por possuírem várias camadas celulares, necrosam facilmente e não apresentam boa difusão do meio de incubação. A utilização de enzimas para preparação de folículos isolados (Tripsina e Colagenase), podem alterar suas propriedades de membrana. A resposta inibitória diferenciada das células tiroidianas em cultura (RANI e FIELD, 1988), nos obrigam a uma melhor avaliação desses modelos.

A captação de ^{131}INa pelos homogeneizados de membrana ti-

roidiana ($28,70 \pm 0,41\%$), foi bem mais significativa do que os resultados obtidos através de outros modelos experimentais, descritos anteriormente.

Nossos resultados demonstraram que o homogeneizado de membrana tiroidiana, apresentou uma captação bem mais elevada do que os homogeneizados de outros tecidos, comprovando, assim, a validade de nosso modelo biológico. Observamos que a captação é inibida significativamente na presença de homogeneizados celulares de baço, fígado e rim, em condições normais. O homogeneizado de baço, de animais esquistossomóticos, apresentou uma inibição da captação de ^{131}I Na mais pronunciada do que os valores observados para o fígado e rim, sendo estes órgãos ricos em deiodinases nas suas frações microssomais como demonstram CHOPRA e cols. 1978 e GOSWAMI e ROSEMBERG, 1984.

Como a membrana celular é rica em proteínas e receptores que são capazes de modular a ação fisiológica das células (DJIANE e cols. 1981), nós tentamos isolar uma proteína que apresente características inibitórias sobre a glândula tireóide. Este estudo foi específico em função do baço, visto que, na literatura temos várias citações de sua importância nos distúrbios endócrinos ocorridos na esquistossomose (MARQUES, 1944; MAHDI e BASSALY, 1955; FERREIRA, 1957; COSTA e cols. 1980). Assim, observamos que o sobrenadante, obtido após pré-incubação do homogeneizado de baço, incubado na presença de glândula tireóide, com ^{131}I Na, apresentou uma inibição significativa, maior

do que a obtida com homogeneizados, da captação do radioisótopo pela membrana tiroídiana. Esta ação, foi mais acentuada com o sobrenadante de baço de animais infectados por Schistosoma mansoni, como foi observado nas figuras VII e VIII.

Após a verificação da atividade inibitória desta proteína, purificamos o sobrenadante em coluna de Sephadex G-100, onde obtivemos duas frações. A fração B (animais controle) e B' (animais esquistossomóticos), figuras IX e X, apresentaram um maior efeito inibitório, sendo este efeito mais acentuado na fração B', o que confirmou resultados anteriormente obtidos.

A ação inibitória do baço sobre a glândula tiróide, foi inicialmente demonstrada por PORTELA LADOSKY (1977), que transplantando lobos tiroidianos para o baço e rim, mantendo os animais a temperatura ambiente, observou um decréscimo significativo do T_4 sérico, após 60 dias do transplante.

A caracterização da proteína do baço, bem como, o estudo do mecanismo através do qual, esta proteína, inibe a captação de ^{131}I Na pela membrana celular tiroídiana, terá prosseguimento em nosso laboratório, visando dar um maior esclarecimento sobre a fisiopatologia dos distúrbios endócrinos encontrados na esquistossomose.

CONCLUSÕES

5 - CONCLUSÕES

- A captação de ^{131}I Na pelo homogeneizado de membrana tiroidiana, demonstrou ser uma função específica destes tecidos, confirmando a eficácia do modelo biológico utilizado em nossos experimentos.
- Os homogeneizados celulares de baço, rim e fígado, inibiram significativamente a captação de ^{131}I Na pela membrana tiroidiana.
- Os sobrenadantes, do homogeneizado de baço pré-incubado, apresentaram uma maior atividade inibitória quando comparado aos homogeneizados celulares.
- Na tentativa de isolar a proteína do sobrenadante, de homogeneizado de baço, obtivemos uma fração com maior efeito inibitório.
- O baço de animais esquistossomóticos, apresentou uma ação inibitória mais acentuada sobre a captação de ^{131}I Na pela membrana tiroidiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL - KADER, M.M.; ABDEL-AZIZ, M.T.; GOBBA, S.; GIRGIS, M.; FAYEZ, M.; ELSHEIKH, A.; AZIZ, S.; ELGENGEHY, M.T. Biochemical and endocrinological studies in parasited infested patients with and without infantilism. Acta. Pediatr. Ac. Sci. Hungr., 13: 357, 1972.

- AHRÉN, B.; ALUMETS, J.; ERICSSON, M.; FAHRENKRUG, J.; FAHRENKRUG, I.; HAKANSON, R.; HEDNER, P.; LOREN, I.; MELANDER, A.; RERUP, C.; SUNDLER, F. VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion. Nature, 287: 343, 1980.

- AHRÉN, B. Effects of α -adrenoceptor agonists and antagonists on thyroid hormone secretion. Acta Endocrinol (Copenh) 108: 134, 1985.

- 51
- AHRÉN, B.; GRUNDITZ, T.; EKMAN, R.; HAKANSON, R.; SUNDLER, F.; UDDMAN, R. Neuropeptides in the thyroid gland: distribution of substance P and gastrin/cholecystokinin and their effects on the secretion of iodothyronine and calcitonin. Endocrinology, 113: 379, 1983.
 - ANDRADE, Z. A.; QUEIROZ, A.C.; GUEDES, D.B. Lesões testiculares em portadores de esquistossomose hēpato-esplēnica. Gaz. Méd. Bahia, 68(3):132, 1968.
 - ASFORA, J. Classificação clínico-patolōgica da esquistossomose mansoni e fatores que influenciam o potencial evolutivo da doença. Folha Méd., 72(6): 623, 1976.
 - AZEVEDO, D.S. Infecção experimental do camundongo albino pelo *Schistosoma mansoni*: estudo comparativo da eficácia de diferentes vias de infecção. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 10(4): 213, 1976.
 - BAGCHI, N.; BROWN, T. R.; SHIVERS, B.; LUCAS, S.; MACK, R.E. Decreased thyroidal response to thyrotropin in diabetic mice. Endocrinology, 109: 1428, 1981
 - BAKER, H.W.G.; BURGER, H.G.; KRETZER, D.M.; DULMANIS, A.; HUDSON, B.; O'CONNOR, S.; PAULSEN, C.A.; PURCELL, N.; RENNIE, G.C.; SEAH, C.S.; TAFT, H.P.; WANG, C. A Study of the endocrine manifestation of hepatic cirrhosis. Quart. J. Med. 45: 145, 1976.

- 32
- BEAS, F.; CONTRERAS, I.; MACIONI, A.; ARENAS, S. Growth hormone in infant malnutrition: the arginine test in marasmus and kwashiorkor. Br. J. Nutr., 26: 169, 1971.

 - BECKS, G.P.; EGGO, M.C.; BURROW, G.N. Organic iodine inhibits deoxyribonucleic acid synthesis and growth in FRTL - 5 thyroid cells. Endocrinology, 123: 545, 1988.

 - BHATTACHARYYA, B. & WOLFF, J. Membrane-bound tubulin in brain and thyroid tissue. The Journal of Biological Chemistry, 250(19): 7639, 1975.

 - BONDY, P. K. Maintenance of normal thyroid activity after transplantation of thyroid gland into spleen or kidney. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 77: 638, 1951.

 - BORBA, M.O.P. Estudo da fosfatase alcalina sérica e formas isodinâmicas na esquistossomose mansônica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 15(1):1, 1982.

 - CHAVES, N.; GUIMARÃES, E.D.; AGUIAR, F.; VIANA, T.; MATOS, E.; MEDEIROS, R.B.; MARTINS, G.C.; BAZANTE, M.O.; PIMENTA, P. P. Influência da nutrição sobre a secreção hormonal. I. Estudo em água preta. Rev. Bras. Pesq. Med. & Biol., 8:261 1975.

- CHAZENBALK, G.D.; PISAREV, M.A.; JUVENAL, G.J.; KLEIMAN DE PISAREV, D.L.; MERCURI, H.; TOMÁS, M. Biosynthesis and regulation of iodolipids in calf thyroid. Acta Endocrinol., 108: 72, 1985.

- CHOPRA, I.J.; SOLOMON, D.H.; CHOPRA, U.; WU, S.Y.; FISHER, D.A.; NAKAMIRA, Y. Pathways for metabolism of thyroid hormones. Recent. Prog. Horm. Res., 34: 521, 1978.

- CORDIER, R.; CRAPS, L. & MARTINI, Ph. Modifications histologiques de la thyroïde après transplantation en territoire portal ou extraportal. Ann. Endocr. (Paris), 12: 244, 1951.

- COSTA, J.S.; DIAS, C.N.; BURGOS, M.P.P.; TRINDADE, F.; COSTA, O.L.N. Perturbações endócrinas na esquistossomose. Aspectos experimentais da esquistossomose hepatoesplênica em camundongos. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 22(5): 246, 1980.

- COUTINHO, A.D.; ANTUNES, M.T.A.; DOMINGUES, A.L.C. Estudo da imunidade humoral e celular na doença hepática esquistossomótica. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 24(5):282 1982.

- DESAIVE, P.; MEWISSEN, D. & CLOSON, J. Étude des greffes thyroïdiennes intraspléniques principalement au point de vue de leur réponse à l'iode radio-actif ^{131}I . J. Physiol. Path. Gen., 43: 703, 1951.

- DJIANE, J.; HOUEBINE, L.M. & KELLY, P. A. Prolactin-like activity of anti-prolactin receptor antibodies on casein and DNA synthesis in the mammary gland. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78:7445, 1981.

- FERREIRA, J. M. Aspectos endócrinos da esquistossomose mansônica hépato-esplênica. Tese de livre docência. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1957 apud VETTORAZZO FILHO, H. Esquistossomose mansônica: Aspectos endócrinos e avaliação da reatividade do eixo hipotalâmico-hipofíseo - testicular. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1980.

- GABE, M. & ARVY, L. Les effets de l'autotransplantation préportale de la thyroïde chez la rate. Experientia, 3:193, 1947.

- GILLETT, M. P. T. & CARVALHO, V. C. O. Inhibitory effect of high-density lipoproteins from plasma of schistosomiasis mansoni patients on the binding of normal low-density lipoproteins to cultured skin fibroblasts. Brazilian J. Med. Biol. Res., 18: 415, 1985.

- GOLDEN, J. B. & SEVRINGHAUS, E. L. Inactivation of estrogenic hormone of the ovary by the liver. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 39: 361, 1938 apud PORTELA LADOSKY, E. M. Estudo histológico e hormonal da tireóide após transplante em território portal e extra-portal. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1977.
- GORDON, A. S.; KLEINBERG, W. & CHARIPPER, H.A. The reticulo-endothelial system and hormone refractoriness. J. Exp. Med. 70: 333, 1969 apud COSTA, J.S.; DIAS, C.N.; BURGOS, M. P.P.; TRINDADE, F.; COSTA, O.L.N. Perturbações endócrinas na esquistossomose. Aspectos experimentais da esquistossomose hepatoesplênica em camundongos. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 22(5): 246, 1980.
- GORDON, A.S.; KLEINBERG, W. & CHARIPPER, H.A. The reticulo-endothelial system and the concept of the "anti-hormone". Science, 86: 62, 1937 apud COSTA, J.S.; DIAS, C.N.; BURGOS, M.P.P.; TRINDADE, F.; COSTA, O.L.N. Perturbações endócrinas na esquistossomose. Aspectos experimentais da esquistossomose hepatoesplênica em camundongos. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 22(5): 246, 1980.
- GOSWAMI, A. & ROSEMBERG, I.N. Iodothyronine 5'-deiodinase in rat kidney microsomes: Kinetic behavior at low substrate concentrations. J. Clin. Invest., 74: 2097, 1984.

- HAMOLSKY, M. W. & GIERLACH, Z.S. Hepatic catabolism of thyroid hormone studied by radioactive iodine in splenic autotransplants. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 30: 288, 1952.

- LISSITZKY, S.; FAYET, G.; GIRAUD, A.; VERRIER, B.; TORRESANI, J. Thyrotrophin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine-thyroid cells. Eur. J. Biochem., 24: 88, 1971.

- LLOYD, C. W. & WILLIAMS, R. H. Endocrine changes associated with laennec's cirrhosis of the liver. Amer. J. Med. 4: 315, 1948.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.

- MACEDO, A.C.C. & HORWITH, M. Hepatosplenic schistosomiasis mansoni associated with retarded growth and sexual development-endocrine evaluation. Gaz. Med. Bahia, 72:69, 1972.

- MacFARLANE, A.; SHEPPARD, M. C.; BLACK, E. G.; GILBEY, S.; WRIGHT, A.D. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in type 1 diabetes: influence of diabetic metabolic control. Acta Endocrinol., 106: 92, 1984.

- MAHDI, M.A.H. & BASSALY, M. Endocrine imbalance in hepatosplenic bilharziasis. Gaz. Kars. El-Aini Fac. Med., 21: 71, 1955 apud VETTORAZZO FILHO, H. Esquistossomose mansônica: Aspectos endócrinos e avaliação da reatividade do eixo hipotalâmico-hipofíseo-testicular. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1980.

- MARCOCCI, C.; COHEN, J. L. & GROLLMAN, E. F. Effect of actinomycin D on iodide transport in FRTL-5 thyroid cells. Endocrinology, 115: 2123, 1984.

- MARQUES, A. Infatilismo esplênico. Rev. Med. Panam., 2:213, 1944 apud POUSADA, J. M.D.C.; COSTA, J.S.; RABELO, M.M.; CRUZ, T.R.P.; OLIVEIRA, V. Esquistossomose experimental em camundongos: influência no desenvolvimento somático e na função gonadal. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 20(2): 87, 1978.

- McCORKLE, H.J.; DERIEMER, R.H.; HINE, D.E.; MINETA, A. K.; OPPENHEIMER, R.O.F.; KERR, E.E. The experimental transplantation of regenerated and fetal thyroid tissue to the spleen. Surgical Forum, 6: 440, 1955.

- McNABB, F.M.A.; LYONS, L.J. & HUGHES, T.E. Free thyroid hormones in altricial (ring doves) versus precocial (japanese quail) development. Endocrinology, 115: 2133, 1984.

- MEIRA, J.A. Esquistossomiase mansoni hepato-esplênica. Tese, concurso de cátedra, São Paulo, 1951 apud POUSADA, J.M.D. C.; COSTA, J.S.; RABELO, M.M.; CRUZ, T.R.P.; OLIVEIRA, V. Esquistossomose experimental em camundongos: influência no desenvolvimento somático e na função gonadal. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 20(2): 87, 1978.

- MEIRA LINS. Esquistossomose mansoni na infância em Pernambuco. Aspectos médico-sociais. Tese, concurso de cátedra, Recife, 1950 apud SILVEIRA, G.K. Efeito da esplenectomia sobre o hormônio de crescimento em pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica e hipodesenvolvimento somático. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 1976.

- MELANDER, A. Aminergic regulation of thyroid activity: importance of the sympathetic innervation and of the mast cells of the thyroid gland. Acta Med. Scand., 201: 257, 1977.

- MELANDER, A. & SUNDLER, F. Presence and influence of cholinergic nerves in the mouse thyroid. Endocrinology, 105:7, 1979.

- MULLINOS, M. G. Pseudo-hypophysectomy produced by malnutrition. J. Nutrition, 19: 493, 1940.

- NEVE, P.; STARLING, J.R.; GOLSTEIN, J.; KRUPP, P. P. Effects of iodine intake on thyroid secondary lysosomes after subtotal thyroidectomy. Endocrinology, 123: 478, 1988.
- OBREGON, M. J.; MILLS, I.; SILVA, J.E.; LARSEN, P.R. Catecholamine stimulation of iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat dispersed brown adipocytes. Endocrinology, 120: 1069, 1987.
- ORTIZ-CARO, J.; GONZÁLEZ, C. & JOLIN, T. Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food-restricted rats. Endocrinology, 115: 2227, 1984.
- ORTIZ-CARO, J.; OBREGÓN, M.J.; PASCUAL, A.; JOLIN, T. Decreased T_4 to T_3 conversion in tissues of streptozotocin-diabetic rats. Acta Endocrinol., 106: 86, 1984.
- PARTHEMORE, J.; CARVALHO, A.C.M.; VIANNA, B.; FURTH, E.D. Thyroidal radioiodine uptakes in hepatoesplenic schistosomiasis. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 9:79, 1967.
- PIMSTONE, B.L.; BARBEZAT, G.; HANSEN, J. D. L.; MURRAY, P. Studies on growth hormone secretion in protein-calorie malnutrition. Amer. J. Clin. Nutri., 21: 482, 1968 apud VETTORAZZO FILHO, H. Esquistossomose mansônica: aspectos endócrinos e avaliação da reatividade do eixo hipotalâmico-hipofíseo - testicular. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1980.

- PORTELA LADOSKY, E. M. Estudo histológico e hormonal da ti-
róide após transplante em território portal e extra-por-
tal. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambu-
co, Recife, 1977.

- POUSADA, J.M.D.C.; COSTA, J.S.; RABELO, M.M.; CRUZ, T.R.P.;
OLIVEIRA, V. Esquistossomose experimental em camundongos:
influência no desenvolvimento somático e na função gona-
nal. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 20(2): 87, 1978.

- RANI, C.S.S. & FIELD, J. B. Comparison of effects of thyro-
tropin, phorbol esters, norepinephrine and carbachol on
iodide organification in dog thyroid slices, follicles,
and cultured cells. Endocrinology, 122: 1915, 1988.

- ROGER, P.P. & DUMONT, J. E. Thyrotrophin and the differ-
ential expression of proliferation and differentiation in
dog thyroid cells in primary culture. J. Endocr., 96:241,
1983.

- RUPP, J.J. Action of liver on thyroid hormone following in-
trasplenic implantation of the thyroid. Endocrinology, 51:
306, 1952.

- SAAD, A.M.; HUSSEIN, M.F.; BUSHARA, H.O.; DARGIE, J. D.; TAY-
LOR, M.G. Erythro kinetics and albumin metabolism in pri-
mary experimental schistosoma-bovis infections in Zebu
calves. J. Comp. Pathol., 94(2): 249, 1984.

- SAITO, K.; YAMAMOTO, K.; TAKAI, T.; YOSHIDA, S. Inhibition of iodide accumulation by perchlorate and thiocyanate in a model of the thyroid iodide transport system. Acta Endocrinol., 104: 456, 1983.

- SAMUEL, A. M. & DESPHANDE, U.R. Growth hormone levels in protein calorie malnutrition. J. Clin. Endocrinol. Metab., 35: 863, 1972.

- SILVEIRA, G. K. Efeito da esplenectomia sobre o hormônio do crescimento em pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica e hipodesenvolvimento somático. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1976.

- SUCUPIRA, M.S. Estudo de aspectos endócrinos do hipodesenvolvimento somático de portadores de esquistossomose mansônica. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972 apud SILVEIRA, G.K. Efeito da esplenectomia sobre o hormônio do crescimento em pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica e hipodesenvolvimento somático. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1976.

- TOCCAFONDI, R.S.; BRANDI, M.L.; ROTELLA, C.M.; ZONEFRATI, R.
Studies of catecholamine effect on cyclic AMP in human cultured thyroid cells: their interaction with thyrotrophin receptor. Acta Endocrinol. (Copenh.), 102:62, 1983.

- TYLER, D.; GONZE, J.; LAMY, F.; DUMONT, J. E. Influence of mitochondrial inhibitors on the respiration and energy-dependent uptake of iodide by thyroid slices. Biochem. J., 106: 123, 1968

- VAN SANDE, J.; DUMONT, J.E.; MELANDER, A.; SUNDLER, F. Presence and influence of cholinergic nerves in the human thyroid. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51: 500, 1980.

- VAN SANDE, J.; ERNEUX, C. & DUMONT, J.E. Negative control of TSH action by iodide and acetylcholine: mechanism of action in intact thyroid cells. J. Cyclic Nucleotide Res., 3: 335, 1977.

- VETTORAZZO FILHO, H. Esquistososemose mansônica: aspectos endócrinos e avaliação da reatividade do eixo hipotalâmico hipofíseo-testicular. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1980.

- YOUNG, R.A.; MEYERS, B.; ALEX, S.; FANG, S.; BRAVERMAN, L.E. Thyroxine binding to serum thyronine-binding globulin in thyroidectomized adult and normal neonatal rats. Endocrinology, 122: 2318, 1988

- WADELEUX, P.A.; ETIENNE-DECERF, J.; WINAND, R.J.; KOHN, L.D.
Effects of thyrotropin on iodine metabolism of dog thyroid cells in tissue culture. *Endocrinology*, 102:889, 1978.
- WINAND, R. J. & KOHN, L.D. Thyrotropin effects on thyroid cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 250(16): 6534, 1975.
- WOLFF, J. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. *Physiol. Rev.*, 44: 45, 1964.
- ZONDEK, B. Ueber das schicksal des follikelhormons (folikulin) im organismus. *Skand. Arch. Physiol.*, 70: 133, 1934
apud VETTORAZZO FILHO, H. Esquistossomose mansônica: aspectos endócrinos e avaliação da reatividade do eixo hipotalâmico-hipofíseo-testicular. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1980.