

OCORRÊNCIA DE PRECURSORES HORMONAIS E DE HORMÔNIOS TIREÓIDEOS EM TUNICADO: *Dendrodoa grossularia* — (VAN BENEDEN — 1847)

ARY DOMINGOS DO AMARAL

Departamento de Fisiologia Geral e Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, Caixa Postal n.º 11230, São Paulo, 10000, Brasil.

1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
3. RESULTADOS E CONCLUSÕES	47
4. DISCUSSÃO	77
5. RESUMO E CONCLUSÕES FINAIS	89
6. BIBLIOGRAFIA	91

RESUMO — Demonstrou-se por cromatografia em camada delgada a presença de monoiodotirosina, diiodotirosina e tiroxina em extratos butanólicos da túnica e do corpo total de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

A técnica é a seguinte: uma série de animais incubados com ^{125}I na forma de iodeto de sódio, após 8 a 30 dias de incubação, seus componentes foram dissecados separando a túnica do resto do corpo.

Preparou-se um homogeneizado em tampão pH 7,2 a 0,5% da túnica e do corpo.

Em seguida, o homogeneizado foi hidrolizado enzimaticamente com Pronase (protease Bacteriana) e submetido a extração butanólica seletiva para os compostos iodados proposta por Zappi (1967).

Os extratos agora são concentrados ao menor volume em um evaporador a vácuo e aplicado em placa de cromatografia em camada delgada.

Trabalho realizado graças a bolsa da C. N. E. N. (Comissão Nacional de Energia Nuclear — Brasil) e da I. A. E. A. (International Atomic Energy — Agency) — Viena.

Usaram-se seis solventes diferentes para a análise cromatográfica e após o desenvolvimento do cromatograma revelaram-se somente as substâncias padrões colocadas ao lado do extrato e raspam-se as regiões dos cromatogramas correspondentes aos compostos pesquisados, que foram agora colocados em tubos plásticos para medidas radioativas.

Após a medida radioativa em detetor de cintilação do tipo poço compararam-se as atividades dos compostos iodados encontrados na túnica e no corpo dos animais.

Poder-se-á concluir a presença de monoiodotirosina, diiodotirosina e tiroxina e ainda a presença de um possível mecanismo de "feed back" diferente nas duas regiões do animal.

EVIDENCE FROM THIN-LAYER* CHROMATOGRAPHY INDICATING THE PRESENCE OF MONOIODOTYROSINE, DIIODOTYROSINE AND THYROXINE IN EXTRACTS OF THE TUNIC AND OF THE BODY (SOFT PARTS) OF *DENDRODA GROSSULARIA*

ABSTRACT — The present work gives the results of identifying iodothyrosines in extracts of *Dendrodoa*.

Specimens were maintained at an optimal temperature of 10°C; for radioiodination groups of 10 to 20 animals were placed for 8 to 30 days in 2 litres of sea water containing 200 μ Ci/litre of 125 I.

After radioiodination the tunics were then dissected from the body (soft parts) and the two regions pooled separately and homogenised.

The homogenates were hydrolysed with Pronase and after that, extracted three times with n-butanol according to Zappi (1967).

Aliquots of the butanol and aqueous phase were applied to plates for thin-layer chromatography, non-radioactive marker drops of monoiodotyrosine, diiodotyrosine, triiodothyronine and thyroxine were run at the sides of samples to identify the unknowns.

After the development of the chromatogras, the spots were visualised in ultraviolet light, outlined with pencil, and then scraped of and eluted in water.

Radioactivities of the eluates were measured in an auto-gamma analyser attached to a Packard 3375 trichannel scintillation counter.

We conclude that thyroxine is demonstrable in both the tunic and the body (soft parts) of *Dendrodoa* within the limits of thinlayer chromatography and monoiodotyrosine and diiodotyrosine are also present and the possibility of a different mechanism of "feed back" may be present in the two regions of the animal (tunic and soft parts).

The possibility that triiodo thyronine may be present needs further study.

I.

INTRODUÇÃO

Data de 1910 o início dos estudos tendentes a relacionar pequenas quantidades de iodo com o funcionamento da glândula tireóide no homem (Hunter). Coube a Kendall (1914), determinar o iodo relacionando-o com a atividade tireóidea mas só após o emprego de isótopos radioativos é que a fisiologia da glândula passou a ser melhor entendida, bem como a biossíntese hormonal foi, pouco a pouco esclarecida e acompanhada em todos os pormenores.

Os trabalhos pioneiros que se seguiram cronologicamente foram o de Cameron (1914-1915) que fez ótimo estudo sobre a distribuição do iodo em tecidos de plantas e animais; após a descoberta da tiroxina por Kendall, surgiu o método bioquímico para a determinação do teor de tiroxina na glândula tireóide (Leland e Foster, 1932; Blau, N. F., 1933) bem como de outras substâncias com atividade biológica semelhante a ela (Pitt-Rivers, 1950).

Com a continuação das pesquisas, surgiu a identificação de outra substância além da L-tiroxina, presente na glândula e com atividade hormonal, a 3,5,3' triiodotironina (Gross e Pett-Rivers, 1954).

Seguiu-se a identificação dos precusores hormonais: monoiodotirosina e diiodotirosina, substâncias sem atividade hormonal, mas

necessárias para a biossíntese dos hormônios da glândula (Pitt-Rivers e Cavalière, 1962-1963).

Como se vê, pouco a pouco a biossíntese hormonal foi identificada em todos os seus passos (Pitt-Rivers, 1963) e, hoje contam-se várias revisões do assunto (Pitt-Rivers e Trotter, 1964) com descrição de toda a biossíntese hormonal, passo a passo e rica em informações (Rocha e Michel, 1955). Sisson em 1965 forneceu uma boa revisão dos princípios e falhas nos testes de função tireóidea na qual se encontra uma completa atualização dos métodos usados para o estudo da função hormonal da glândula tireóide.

Ao mesmo tempo, com a introdução do iodo radioativo no estudo da fisiologia tireóidea, houve completo esclarecimento de ser o folículo tireóideo a unidade morfo-fisiológica glandular, e logo a seguir vários pesquisadores passaram a estudar a função tireóidea nos Vertebrados Superiores e nos Inferiores, nos Protocordados e também nos Invertebrados.

Com relação aos Invertebrados e plantas pode-se afirmar o seguinte: vários trabalhos foram feitos, alguns em Gorgônia (Roche e Jouan, 1956; Roche *et al.*, 1951); outros em Espongiários, Antozoários e Briozoários (Roche, 1952; Roche *et al.*, 1962); outros em *Mytilus* (Roche *et al.*, 1960; Covelli *et al.*, 1960); outros em algas marinhas (Roche e André, 1962) e finalmente em Anelídeos e Molluscos (Gorbman *et al.*, 1954). Uma boa revisão foi apresentada por Antheunisse e Lever (1956).

Todos estes trabalhos provaram apenas que o iodo se acha ligado a proteínas inertes, as escleroproteínas, as quais, como se sabe, resistem à hidrólise enzimática e entram na estrutura do corpo destes animais. Além disso, a hidrólise dessas proteínas libera somente iodo, monoiodotirosina e diiodotirosina, não sendo detectadas até agora, substâncias hormonais tireóideas nos Invertebrados.

Com relação aos Vertebrados, porém, o problema ficou bem esclarecido. Dos Mamíferos até os Ciclostomos ocorre uma função tireóidea definida.

Do ponto de vista comparativo, várias têm sido as revisões, como as de Dodd e Mathy (1964), Gorbman (1965), Leloup e Fontaine (1960) e outros.

Como se sabe, a tireóide nos Vertebrados, tanto inferiores como superiores, apresenta como característica fundamental a presença do folículo, provido do colóide e da iodoproteína que recebeu o nome de tireoglobulina. Pela ultracentrifugação verificou-se ocorrer esta iodoproteína em todos os Vertebrados (Roche *et al.*, 1968; Salvatore *et al.*, 1965).

O problema seria o de saber em que animais aparece pela primeira vez síntese tireóidea; ocorrerá esta síntese em animais sem folículo, isto é, serão eles capazes de efetuar a biossíntese hormonal?

Sabe-se que nos ciclóstomos, não há uma tireóide típica, durante a fase larvária, mas uma estrutura conhecida como endóstilo ou saco glandular subfaríngeo que, apesar de não possuir ainda folículos diferenciados, produz hormônios e efetua uma biossíntese hormonal já relativamente bem conhecida (Salvatore, 1969): este mesmo órgão no animal adulto, transforma-se em uma tireóide característica (Gorbman e Creaser, 1942).

O problema que agora se apresenta é o seguinte: seria o endóstilo ou saco glandular subfaríngeo homólogo ao mesmo endóstilo dos Protocordados (Cefalocordados e Urocordados) e, portanto, a biossíntese apareceria primeiro antes do órgão, pois nos Protocordados o endóstilo é persistente durante toda a vida do animal, não sofrendo nenhuma transformação posterior do ponto de vista morfológico?

Alguns autores defendem o ponto de vista favorável à homologia (Barrington, 1964; Berg *et al.*, 1959), porém o problema não é assim tão simples.

Com relação aos Cefalocordados há trabalhos que admitem a fixação de iodo no endóstilo (Barrington, 1958; Covelli *et al.*, 1960; Roche *et al.*, 1961). Os resultados das experiências efetuadas não são muito conclusivos; embora o endóstilo fixe iodo e produza hormônio, não parece ser o único órgão a fazer a síntese, havendo outros tecidos que apresentam a mesma propriedade (Tong, Kerkof e Chaikoff, 1962). O assunto exige, portanto, estudo mais aprofundado que possibilite uma conclusão definitiva.

Com relação aos Tunicados, há uma série de trabalhos, porém as conclusões também ainda não são definitivas.

Embora se procure relacionar a origem dos Vertebrados com os Tunicados (Whitear, 1957; Bone, 1960; Barrington, 1954 e 1965) a distribuição do iodo no endóstilo nestes animais ainda é controversa.

Com o primeiro trabalho de Gorbman em 1941, descrevendo a presença de um tecido capaz de concentrar iodo em *Ciona intestinalis* L. apareceu o problema; logo depois Barrington e Franchi (1956), descrevem novamente a capacidade de ligar iodo no endóstilo de *Ciona*, dividindo-se ainda o mesmo órgão em várias regiões de acordo com esta capacidade.

Assim, o grupo de Barrington realizou vários trabalhos em *Ciona* (1957, 1960, 1963 e 1965) advogando a função do endóstilo, e também a presença de iodo ligado na túnica destes animais, apresentando também algumas provas bioquímicas da presença hormonal nestes animais, porém não conseguiram de modo conclusivo detectar a presença do hormônio em outro Tunicado — *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

Todavia, os trabalhos de Barrington e seus colaboradores, relativos ao endóstilo não puderam ser confirmados por outro pesquisador (Olsson, 1963-1965-1969) e mais ainda a parte bioquímica sofreu contestações de Roche que também estudou o problema.

Roche e col. descrevem a presença de hormônios tireóideos em *Ciona intestinalis* L. e também em dois outros Tunicados *Salpa maxima* Forskal (1962) e *Clavelina lepadiformis* (1960), porém, durante a série de seus trabalhos admitem a presença de iodo ligado ao endóstilo, mas dá como a região mais provável produtora da síntese hormonal a parte interna da túnica (Roche *et al.*, 1962-1963-1964) e ainda seus colaboradores apresentam a identificação de uma proteína com pico semelhante à tireoglobulina na camada interna da túnica (Varrone, 1966).

Como se vê, a existência de verdadeiros hormônios tireóideos (T_2 e T_4) nos Tunicados ainda é assunto aberto, que demanda novos estudos. Dever-se-á, principalmente, ter em conta as divergências entre os grupos de interessados que abordam o mesmo problema.

Assim, tendo-se em conta estas informações, propus-me a estudar um tunicado cuja presença hormonal ainda era duvidosa. No

laboratório do Prof. Barrington, foi-me possível abordar os seguintes tópicos no estudo de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden):

1. Determinação da captação e eliminação do Iodo-125 e a influência de hormônio exógeno e droga antitireóidea;
2. Verificação da ocorrência de hormônio tireóideo (3,5,3' triiodotironina e L-tiroxina) no corpo do animal;
3. Pesquisar se há produção de precusores hormonais (MIT e DIT) e de substâncias hormonais marcados após incubação com iodo radioativo;
4. Investigar a influência de hormônio exógeno e droga antitireóidea na velocidade de síntese de compostos marcados, tanto MIT e DIT como T_3 e T_4 .
5. Desta maneira, no presente trabalho, procurar-se-á provar existência de uma verdadeira síntese hormonal tireóidea neste Tunicado.

2.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Origem e preparo dos animais:

Foram utilizados ratos de raça *Rattus norvegicus albinus* e o Tunicado *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

Os Tunicados provieram do "Plymouth Laboratory of the Marine Biological Association" e remetidos ao Departamento de Zoologia da Universidade de Nottingham, Inglaterra. As *Dendrodoa* foram primeiramente colocadas em ambiente de temperatura constante por 48 horas, para a adaptação ao laboratório.

Sendo a temperatura um fator crítico na síntese de iodoamino ácidos (Roche *et al.*, 1964) todo o trabalho foi realizado em câmara de temperatura constante a 10°C com água do mar sempre nova e trocada diariamente.

Os ratos foram usados para padronização dos métodos, eram machos de 200 a 250 gramas, e mantidos com dieta balanceada no biotério da Universidade de Nottingham e provenientes de linhagem mantida há longo tempo no laboratório, podendo assim, ser considerados, dentro de certo limite, homogênea.

B. Medidas para Captação do Iodo-125 em animais totais:

A finalidade desta série de experimentos foi determinar o máximo de captação do iodo-125 e com base nos resultados, planejar todas as experiências posteriores.

Ao mesmo tempo que se fez a captação, os animais foram divididos em dois grandes lotes:

1. PRÉ-TRATAMENTO: O grupo recebeu tratamento prévio, isto é, 1/3 dos animais ficaram primeiramente em solução contendo tiroxina e 1/3 em solução contendo tiouracil e o restante constituiu o grupo de controle.

2. TRATAMENTO SIMULTÂNEO: No segundo lote, o tratamento químico, isto é, a colocação de tiroxina e tiouracil foi feita simultaneamente com a colocação de radioisótopos.

CAPTAÇÃO DO IODO-125

1.º GRUPO

Animais que Receberam Pré-Tratamento Químico

Oitenta *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden) foram selecionados e divididos em 4 grupos de vinte.

No primeiro, cada animal foi colocado dentro de uma pequena cesta de gaze cirúrgica e amarrado a um pedaço de fio, ficando assim, fácil o manuseio de cada um.

No segundo, os animais foram separados e colocados, cada um, dentro de uma pequena cesta de gaze cirúrgica e amarrados à ponta de uma haste de fio.

Cada grupo de animais foi colocado em um bquer de 5 litros contendo dois litros de água do mar e, desta maneira, os 4 béqueres continham 20 animais cada um.

O primeiro bquer ficou somente com dois litros de água do mar renovada diariamente.

No segundo, colocou-se tiroxina na água do mar na concentração de 1 mg por litro; no terceiro, adicionou-se tiouracil na concentração de 300 mg por litro e no quarto bquer depositou-se tiroxina (1 mg/1.) mais tiouracil (300 mg/1.), sendo estas soluções

renovadas diariamente e verificados também se os animais estavam em boas condições.

Este tratamento químico durou cinco dias, sendo que no sexto se iniciou a experiência de captação do iodo-125.

Em cada béquer foram colocados 200 μCi de ^{125}I na forma de iodeto de sódio por litro de água do mar.

Após permanência na solução radioativa durante certo intervalo de tempo, os animais foram retirados e rapidamente colocados em outro béquer contendo só água do mar corrente, lavados durante 10 minutos e, cada animal foi depositado dentro de um tubo plástico contendo 2 ml de água do mar e a seguir medida a radioatividade total em um contador γ acoplado a um detetor de cintilação líquida Packard 3375.

Após a medida, cada grupo de animais voltou para o respectivo béquer, que foi sempre mantido a temperatura constante de 10°C , sendo as soluções renovadas diariamente e as medidas realizadas em intervalos regulares até 120 horas.

Terminada a medida de captação, cada animal foi retirado da cesta de gaze, pesado, sendo os resultados da captação expressos em contagem por minuto por grama de tecido.

2.º GRUPO

Animais que Receberam Tratamento Simultâneo

(Drogas + Isótopos)

Outras oitenta *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden) foram selecionadas e divididas também em quatro grupos de vinte.

De cada grupo, os animais foram individualmente colocados em uma pequena cesta de gaze cirúrgica e esta, amarrada na ponta de um fio para facilitar o manuseio de cada animal.

Cada grupo de vinte animais foi colocado em um béquer de cinco litros, contendo dois litros de água.

No primeiro béquer, o primeiro grupo de vinte animais recebeu unicamente água do mar; no segundo, o outro grupo recebeu dois litros de água do mar e mais tiroxina na concentração de 1 mg/l.

No terceiro béquer com o terceiro grupo de vinte animais, havia dois litros de água do mar com tiouracil (300 mg/1.) e no quarto, com o último grupo de animais, havia dois litros de água do mar contendo tiroxina (1 mg/1.) e mais tiouracil (300 mg/1.).

Logo após a administração das drogas aos animais, colocaram-se em cada béquer 200 μ Ci/litro de iodo-125 iniciando-se assim, as experiências de captação dita simultânea, isto é, as drogas foram colocadas ao mesmo tempo que o radioisótopo.

Após a permanência na solução radioativa renovada diariamente e os animais mantidos durante todo o correr da experiência em sala de temperatura constante a 10°C, os animais eram retirados em intervalos regulares, colocados em um outro béquer contendo água do mar sem material radioativo, lavados em água do mar corrente durante 10 minutos, com a finalidade de remover o iodo adsorvido e não incorporado, sendo agora cada animal colocado dentro de um tubo plástico com 2 ml de água do mar, para medidas radioativas.

A radioatividade total de cada animal foi medida em intervalos regulares até 140 horas após a colocação dos radioisótopos em detetor acoplado a um detetor de cintilação líquida Packard 3375.

Após cada medida, os animais voltaram aos respectivos béqueres e mantidos nas condições da experiência até a próxima medida, isto se repetindo até completar as 140 horas (6 dias).

Terminadas as medidas de captação, cada animal foi retirado da cesta de gaze e depois pesado para que os resultados da captação fossem expressos em contagem por minuto/grama de tecido.

C. Medidas de eliminação do Iodo-125:

A finalidade desta experiência foi verificar a velocidade de eliminação do iodo-125. Os mesmos grupos de animais usados para a medida de captação do iodo-125 foram transferidos para outros béqueres contendo cada um somente dois litros de água do mar sem material radioativo, e as medidas radioativas foram feitas da mesma forma em intervalos regulares.

Desta maneira, conseguiram-se dois grandes grupos de animais nesta segunda série de experiências, a saber:

1. *Medidas de eliminação do iodo-125 em animais que receberam pré-tratamento químico e depois radioisótopos.*

2. *Medidas de eliminação do iodo-125 dos animais que receberam tratamento químico simultâneo com os radiosótopos.*

C-1 — MEDIDAS DA ELIMINAÇÃO DO IODO-125 EM ANIMAIS QUE RECEBERAM PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO (TIROXINA E TIOURACIL) E DEPOIS DE SEIS DIAS O RADIOISÓTOPO: dos animais do primeiro grupo de experiências, os quatro béqueres contendo respectivamente 20 animais normais, 20 tratados com tiroxina (1 mg/1.), 20 tratados com tiouracil (300 mg/1) e 20 tratados com tiroxina (1 mg/1.) + tiouracil (300 mg/1.) e que após seis dias de tratamento receberam cada grupo 200 μ Ci/litro de iodo-125 sendo a captação determinada regularmente até o sexto dia.

Após o sexto dia de captação iniciou-se a medida da eliminação do iodo-125.

Cada grupo foi transferido a béqueres contendo 2 litros de água do mar sem material radioativo e medida a radioatividade de cada um em intervalos regulares da mesma maneira em que foi feita a captação.

C-2 — MEDIDAS DA ELIMINAÇÃO DO IODO-125 EM ANIMAIS QUE RECEBERAM TRATAMENTO SIMULTÂNEO: QUÍMICO E RADIOATIVO: animais do segundo grupo de experiências, os quatro béqueres contendo respectivamente 20 animais normais, 20 animais tratados com tiroxina (1 mg/litro), 20 animais tratados com tiouracil (300 mg/1.) e 20 animais tratados com tiroxina (1 mg/1.) + tiouracil (300 mg/1) e que simultaneamente receberam cada béquer 200 μ Ci litro de iodo-125 e daí foi determinada a captação até o sexto dia. Após este período de captação iniciaram-se as medidas de eliminação do iodo-125.

Cada grupo de 20 animais foi transferido a novos béqueres de cinco litros contendo 2 litros de água do mar sem material radioativo e medida a radioatividade de cada animal em intervalos regulares da mesma maneira em que foram feitas as medidas de captação.

D. Finalidades das Medidas de Captação do Iodo-125:

Com as medidas de captação do iodo-125 procurou-se determinar o tempo ótimo de captação, isto é, até que ponto a curva deixa de ser ascendente e aparece um patamar, o que significa existên-

cia de equilíbrio dinâmico entre a quantidade de iodo que entra e a que sai.

Ainda mais, com a introdução do hormônio exógeno e do bloqueador tiouracil, pretendeu-se verificar se a curva de captação sofreu influência destas drogas. Outro parâmetro seria ainda a introdução de drogas simultaneamente com a captação.

Procurar-se-á verificar assim se as substâncias levariam algum tempo para agir ou seu efeito seria imediato à administração.

E. Finalidades das Medidas de Eliminação do Iodo-125:

A finalidade das medidas de eliminação do iodo-125 seria: após as medidas de captação onde ocorre o registro da velocidade de acúmulo do iodo no animal e ainda o efeito das drogas nesta velocidade, o de obter um patamar de equilíbrio em que a quantidade de iodo que entrar agora, em função do tempo, não sofra um grande aumento.

Se este iodo entrou no animal por difusão e não se combinou orgânicamente, após a captação e colocando o animal em água do mar sem material radioativo teríamos uma eliminação rápida deste iodo, provando não haver combinação orgânica e, se houver a eliminação será pouca, ficando portanto o iodo ligado orgânicamente no animal.

Deste modo, a finalidade das medidas de eliminação do iodo-125 será a de verificar se o iodo que entrou na captação fica mais tempo ou não no animal, isto é, se combina orgânicamente ou não.

F. Extração e Detecção dos Compostos Iodados Marcados (Hormônios Tireóideos e Respective Precusores):

A. FINALIDADE: nesta série de experiências procurou-se hidrolisar e identificar os precursores hormonais tireóideos MIT (3-monoiodotirosina), DIT (3,5 diiodotirosina) bem como os hormônios tireóideos T_3 (L-triiodotironina ou 3,5,3' L-triiodotironina) e T_4 (L-tiroxina ou 3,5,3',5' L-tetraiodotironina) através de uma série de técnicas de acordo com a finalidade que é a identificação fora de dúvidas dos hormônios tireóideos T_3 e T_4 , seus precursores MIT e DIT e ainda verificar a velocidade de formação destes compostos e se ela é alterada pela administração de drogas exógenas (tiroxina exógena) e tiouracil.

Assim, em todo o decorrer do método os materiais biológicos empregados serão: *o rato*, que é animal de tireóide bem conhecida e estudada usado como material de padronização de toda a técnica e, após a padronização, a melhor técnica será aplicada na finalidade de um estudo de endocrinologia comparada ao tunicado *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

B. IDENTIFICAÇÃO PELO EMPREGO DE COLUNA DE "SEPHADEX-GEL 25 FINE":

1. *Rato*: uma série de três ratos foram injetados intraperitonealmente com 200 μ Ci de iodo-125 cada um.

Após 24 horas foram mortos por asfixia em campânula com éter e de cada um, foi removida a glândula tireóide, seguindo-se então os passos:

a. *Homogeneização*: Tireóides homogeneizadas em um Tri-R-homogenizer com volumes de 0,2M NaCl contendo anti-oxidante (metil-mercaptoimidazol) e depois com tampão tris em solução salina, o pH ajustado a 8,3 de acordo com o método descrito por Osborn e Simpson (1969).

b. *Hidrólise enzimática*: O homogeneizado das tireóides foi em seguida hidrolizado com pancreatina (0,5%) tamponada pH 8,3 durante 48 horas sendo depois o pH reduzido a 4,5. Seguiu-se uma hidrólise em meio ácido usando agora *papaina* (0,5%) durante 24-48 horas, baseando-se nos métodos descritos por Devlin e Stephenson (1962) e também por Tong e Charkoff (1958).

c. *Concentração do hidrolisado*: Após a hidrólise enzimática o homogeneizado foi concentrado ao menor volume possível, usando-se um evaporador rotativo a vácuo — Vacuum Rotary Evaporator, "Rotavapor-R" que é o sistema atual aprimorado dos básicos descritos por Craig *et al.* (1950) e Murray (1955).

d. *Eluição do hidrolisado*: Depois de concentrado, o hidrolisado das tireóides foi dissolvido em 1 ml de solução de metanol: hidróxido de amônio concentrado (99:1) estando assim pronto para a análise.

2. *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

a. *Incubação*: três grupos de animais colocados cada um em um béquer de cinco litros contendo dois litros de água do mar e levados à câmara de temperatura constante de 10°C.

Após 48 horas nessa câmara e os animais já adaptados às condições do laboratório, iniciaram-se as seguintes experiências:

1. O primeiro béquer recebeu 200 μCi de iodo-125 por litro de água do mar, sendo esta solução renovada diariamente, isto é, filtrada para remover os detritos e borbulhados com oxigênio para assim ficar sempre em condições experimentais, sendo estes animais considerados como controle.

2. O segundo béquer, também com 200 μCi de iodo-125 por litro de água do mar mais 1 mg de L-tiroxina por litro, sendo esta solução renovada diariamente, isto é, filtrada, e removidos os animais mortos ou em más condições, borbulhada com oxigênio durante 15 minutos e ficando assim novamente fresca para as condições experimentais; representa os animais tratados com tiroxina.

3. O terceiro béquer, igualmente com 200 μCi de iodo-125 por litro de água do mar, mais 300 mg de tiouracil por litro. A solução é também renovada diariamente, isto é, filtrada e removidos os animais mortos ou em más condições, borbulhado oxigênio durante 15 minutos de modo a água permanecer novamente fresca para as condições experimentais.

Este terceiro béquer contém os animais tratados com tiouracil sendo, portanto, animais bloqueados com substância anti-tireóidea.

Os três grupos de animais foram mantidos nestas condições experimentais durante vinte a trinta dias sendo cuidados diariamente durante todo esse período de incubação.

b. *Homogeneização dos tecidos*: após o período de incubação, os três béqueres contendo os animais normais, animais tratados com tiroxina e tratados com tiouracil, foi cada grupo lavado com água do mar corrente, isentos de material radioativo, com a finalidade de remover todo o iodo adsorvido e não incorporado.

De cada grupo separou-se a túnica de cada animal isoladamente; desprezou-se a túnica, pois esta primeira parte destinou-se a verificar se existe tiroxina no corpo dos animais e fez-se um "pool" até conseguir 1 grama de tecido.

Assim, no final da dissecação obteve-se 1 grama de tecido do corpo dos animais normais, dos tratados com tiroxina e dos tratados com tiouracil.

Cada grama de tecido é em seguida homogeneizada em um Tri-R-homogenizer com volumes de tampão tris frio (6°C) contendo anti-oxidante metilmercaptoimidazol (0,01%) e o tampão dissolvido em solução salina com o pH ajustado para 8,3.

Após a homogeneização acertou-se o volume final das soluções de forma a se ter um homogeneizado a 0,5% em tris-salina pH 8,3.

c. *Hidrólise enzimática*: Após a homogeneização, os três homogeneizados foram submetidos à hidrólise enzimática, primeiro com pancreatina a 0,5% pH 8,3 durante 48 horas em atmosfera de nitrogênio em banho de temperatura constante a 37° e constante agitação, em ambiente escuro.

Seguindo-se a hidrólise pancreática, o pH de cada homogeneizado é reduzido a 4,5 e faz-se então, uma hidrólise ácida com papaina ativada com H₂S em atmosfera de nitrogênio em temperatura constante (37°M), agitação constante (banho maria com controle de temperatura em ambiente escuro), baseando-se nos métodos descritos por Devlin e Stephenson (1962) e Tong e Chaikoff (1958).

C. CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO: seguindo-se à hidrólise enzimática, ajustou-se cada hidrolisado ao pH 7,4 e concentrou-se cada um, para se reduzir ao menor volume possível, no evaporador rotativo a vácuo "Vacuum Rotary Evaporator" — Rotavapor — "R" sistema atual aprimorado dos básicos descritos por Craig *et al.* (1950) e Murray (1955).

D. ELUIÇÃO DO HIDROLISADO: depois de concentrado ao menor volume possível (\approx 0,2 ml) os hidrolisados de cada grupo de *Dendrodoa* (normal, tratado com tiroxina e tratado com tiouracil) foram eluídos em solução de metanol hidróxido de amônio concentrado (99:1) chegando-se ao volume final de 1 ml de cada homogeneizado, ficando assim pronto para a análise.

E. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS IODADOS USANDO A COLUNA DE SEPHADEX-GEL DE DEXTRANA:

Preparo da Coluna: como se sabe, no sephadex-gel as macromoléculas de dextrana estão em forma de ligações cruzadas, dando assim uma rede tridimensional de cadeias de polissacarídeos.

Devido ao fato de possuir grandes quantidades de radicais hidroxilas, as colunas de sephadex-gel possuem uma grande atividade

hidrofílica e suas partículas ou esferas “incham” consideravelmente quando em contato com água ou soluções de eletrólitos.

Há vários tipos de sephadex de acordo com sua propriedade de embebição, sendo ainda o grau de embebição uma característica importante do gel considerado (Laurent e Killander, 1964).

Para o presente trabalho, usou-se uma coluna de sephadex Gel-25 “Fine”, indicada para a separação de peptídeos e pequenas proteínas globulares de peso molecular entre 1.000 a 5.000.

Todo o sistema foi baseado em Osborn e Simpson (1968) e consta do seguinte: Tubo-coluna de sephadex tipo K 15/90 produzida pela “Pharmacy Fine Chemicals”, Uppsala, Suécia, de tamanho $1,5 \times 90$ cms ligado a um reservatório produzido pela mesma firma, de número R 25, que pode funcionar tanto como reservatório ou como frasco de mariotte.

Preparo da coluna: Sephadex Gel 25 “Fine” foi previamente equilibrado, por um tempo mínimo de 3 horas em um tampão de pH 5,6 da seguinte composição: piridina + ácido acético + água (45:11,5:1943,5) e, em seguida formada uma coluna de $1,5 \times 15$ cms no tubo de sephadex, que será alimentado continuamente pelo reservatório contendo o mesmo tampão.

O eluente da coluna sai por um tubo de polietileno que vai passar dentro de um detector de cintilação tipo poço de um analisador automático para radiações (“Auto-Gama Tandem System Packard”) acoplado a um Espectrômetro de cintilação líquida, Modelo 3375 (“Tri-Carb Spectrometer-Packard”) e que trabalha em conjunto, isto é, o pulso elétrico que vem do auto gama vai ao cintilador líquido e ao mesmo tempo a um registrador gráfico da Panax (Flat Bed Chart Recorders — SREC-2”).

Assim, a radioatividade do eluente que sai da coluna do sephadex gel será registrada em contagem por minuto no cintilador líquido e ao mesmo tempo obtém-se um registro contínuo no registrador gráfico de cada composto em questão.

O processo é baseado em Osborn e Simpson (1968). Usaram-se as tireóides de ratos para padronização do sistema e depois aplicaram-se os três extratos de *Dendrodoa* para verificar a existência ou não de tiroxina nesses animais.

Técnica: colocaram-se 0,5 ml de extrato na coluna de sephadex gel na qual se passou em seguida o eluente: piridina, ácido acético, água (45:11,5:1943,5) com uma velocidade de fluxo de 0,3-0,5 ml por minuto.

Após a passagem de 100 a 150 ml de eluente todas as iodotirosinas foram removidas da coluna ficando somente as iodotironinas retidas na coluna.

Para a eluição das iodotironinas passou-se agora pela coluna o segundo tampão: álcool amílico terciário saturado com amônia 2 N.

Os eluentes são coletados em tubos separados para posterior concentração e confirmação dos compostos pela cromatografia em camada delgada.

Este processo serviu para dar as primeiras provas da existência de tiroxina nestes animais, mas apresentou inconvenientes.

Quando se aplicou o método para as tireóides de mamíferos, o problema não apareceu, pois, após a eluição da coluna fez-se novamente a concentração a vácuo e reaplicou-se o composto.

No caso de *Dendrodoa*, porém, o problema ficou mais complexo, pois, após a passagem do extrato pela coluna de sephadex os iodoamino ácidos agora ficavam muito diluídos em volumes relativamente grandes de solventes \approx 100 ml e portanto com baixíssima atividade específica.

E ainda mais, a reconcentração embora seja controlada sempre implica em uma deiodização dos compostos, reduzindo assim, mais ainda a atividade específica, para posterior identificação e confirmação dos compostos pesquisados.

Portanto, procurou-se aprimorar todos os passos de método e trabalhar com os extratos possuindo alta atividade específica e não diluindo mais, isto é, abandonou-se a coluna de sephadex e passou-se à identificação por cromatografia em camada delgada.

G. EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS IODADOS (MIT — DIT — T₃ — T₄) POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA: Após as experiências com a coluna de sephadex-Gel-25 "Fine" de que resultaram as primeiras provas da possível existência de tiroxina em *Dendrodoa*, seguiu-se uma série nova de experimentos em que foi possível seguir todos os passos da metodologia, procurando assim obter o maior rendimento possível

além das provas e contra-provas da existência de tiroxina nestes animais.

Assim, as séries de cinco experiências que agora se seguem foram baseadas em métodos descritos pelos especialistas do ramo, chegando-se aos resultados finais.

I — ADMINISTRAÇÃO OU INCUBAÇÃO COM AS DROGAS E MATERIAL RADIOATIVO:

1. RATOS: Três ratos receberam na cavidade peritoneal, 200 μ Ci de iodo-125 cada um.

Após 24 horas os animais foram mortos por asfixia em câmara com éter, removida a glândula tireóide de cada um e a seguir, fizeram-se as operações:

a. HOMOGENEIZAÇÃO: As glândulas são homogeneizadas num homogeneizador Tri-R, primeiro usando água gelada (0,25 ml/glândula) em seguida adicionando-se tampão tris-salina contendo anti-oxidante (metilmercaptoimidazol), chegando-se no final à seguinte concentração dos componentes: 0,11M NaCl; 0,04M tris*; 0,001M metilmercaptoimidazol e nesta concentração fez-se um homogeneizado de glândula a 6% P/V baseado no método descrito por Rosemberg e La Roche (1964).

b. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA: Após a homogeneização o pH do homogeneizado foi ajustado a 8,0 adicionando algumas gotas de tolueno para evitar a putrefação do material orgânico.

Passou-se à hidrólise enzimática com Pronase — enzima proteolítico de origem bacteriana (*Streptomyces griseus protease*) — cuja concentração final será a 0,5% baseado no método de Tong, Raghupathy e Chaikoff (1963).

Os homogeneizados foram colocados em tubos de Thumberg feito o vácuo em cada um e colocados num banho maria a 37°C com agitação constante, tendo a concentração do anti-oxidante (metilmercaptoimidazol) sido elevada a 0,02M de acordo com os trabalhos de Inoue (1966-1967) e a hidrólise foi feita em câmara escura durante 6 horas (Rosemberg, 1966).

Após a realização do vácuo em cada tubo introduziu-se nitrogênio e em seguida fez-se a hidrólise enzimática em câmara escura a

* Tris = tris (hydroximetil) amino metano. 7 c. & Ab.

37°C, com agitação constante (banho maria com agitador e temperatura controlada).

c. **EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS MARCADOS (MIT—DIT—T₃—T₄):** Seguindo-se a hidrólise o homogeneizado foi acidificado ($\text{pH} \leq 2$) com gotas de NH_4Cl e, em seguida, extraído três vezes com metade do volume total do homogeneizado com butanol (Zappi, 1967).

Remoção de MIT e DIT do extrato butanólico: O extrato butanólico foi em seguida alcalinizado com gotas de 0,05 N-NaOH a $\text{pH} \geq 7,5$ e em seguida lavado duas vezes com água.

Desta maneira cerca de 80 a 90% das iodotirosinas passam à fase aquosa (1) ficando no extrato butanólico somente as iodotirosinas e pequena parte das iodotirosinas (10 a 20% do total).

O extrato butanólico é agora novamente alcalinizado com solução aquosa de NaOH — 0,05N a $\text{pH} \geq 7,5$ separando-se duas camadas: a butanólica e a aquosa.

A camada butanólica (1) é separada pois contém as iodotirosinas e a camada aquosa (2) é novamente acidificada com gotas de N-HCl a $\text{pH} \geq 2$ e submetida a nova extração butanólica.

Juntaram-se os dois extratos butanólicos que contém todas as iodotirosinas e os dois extratos aquosos providos de todas as iodotirosinas, ficamos então com dois extratos, um butanólico contendo T₃ + T₄ e outro aquoso contendo MIT e DIT. Este processo representa a atualização dos métodos de extração butanólica primeiramente descritos por: Blau (1933-1935) e por Leland e Foster (1932), sendo mais tarde revisto por Man (1952) e atualizado por Zappi (1967).

d. **CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS:** O extrato butanólico (T₃ + T₄) e o extrato aquoso (MIT-DIT) foram a seguir reduzidos ao menor volume possível no evaporador rotativo a vácuo (Rotavapor — R) da firma suíça Büchl que é o aperfeiçoamento do sistema descrito por Craig *et al.* (1950) e Murray (1955).

e. **ELUIÇÃO DOS CONCENTRADOS:** Seguindo-se à concentração, os extratos foram eluídos em 0,2 ml da solução de etanol (95%) e NH_4OH concentrado (1:1 V/V) contendo metilmercaptoimidazol (0,01M) de acordo com Osborn e Simpson (1969) es-

tando assim prontas para a análise por cromatografia em camada delgada.

f. ANÁLISE POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA: *Preparo das placas*: Usaram-se como adsorventes para placas de cromatografia em camada delgada, celulose em pó e sílica gel-G.

Placas de Cromatografia em camada delgada tendo como adsorventes celulose em pó: Antes do preparo, as cromatoplasmas de vidro foram lavadas com detergentes e secas ao ar durante 24 horas.

30 gramas de celulose em pó (Whatman C-41) foram dissolvidas em 75 ml de água destilada e depois homogeneizadas em um homogeneizador elétrico por cinco minutos.

A suspensão é transferida ao aplicador da Shandon Scientific Co. e as placas foram preparadas todas com espessura de 250 μ e em seguida secas em estufa a 37°C não necessitando de nenhuma ativação posterior, estando assim prontas para uso.

Todo o preparo das placas de celulose bem como os solventes usados são uma coletânea dos métodos descritos por: Sofianides *et al.* (1966); Hollingsworth *et al.* (1963); Faircloth *et al.* (1965); Patterson e Clements (1964) e Favino *et al.* (1967).

Placas de cromatografia em camada delgada tendo como adsorventes sílica gel-G: As placas de vidro foram lavadas em detergente, 24 horas antes do preparo, e secas à temperatura ambiente.

30 gramas de sílica gel-G Merck foram misturadas com 60 ml de água destilada e em seguida homogeneizada em um homogeneizador elétrico por cerca de 3 a 5 minutos.

A suspensão foi transferida ao aplicador da Shandon Scientific Co. para cromatografia em camada delgada e as placas foram todas também preparadas com espessura de 250 μ e em seguida colocadas em estufa apropriada não necessitando de nenhuma ativação posterior, estando assim prontas para uso.

O preparo das placas de sílica gel-G, bem como os solventes usados representam uma coletânea dos métodos descritos por Shapiro e Gordon (1966); West *et al.* (1965); Heider e Bronk (1965); Lemmon *et al.* (1964); Frey (1964).

Preparo das soluções padrões dos compostos em estudo (MIT, DIT, T₃, T₄): Prepararam-se soluções padrões de MIT, DIT, T₃ e

T₄ contendo cada uma 100 µg/10 µl usando sempre, em cada cromatograma, 25 µg dos padrões ao lado das amostras cuja finalidade foi compensar as variações que aparecem no valor do Rf*, no desenvolvimento de cada cromatograma.

Preparo das placas: Cada placa de cromatografia em camada delgada recebeu 20 µl do extrato butanólico das tireóides mais 20 µl de extrato aquoso das glândulas e 25 µg de cada padrão ao lado dos extratos.

Todas as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio para evitar a oxidação e conseqüente deiodização dos compostos na placa: (Heider e Bronk, 1965).

Assim foi preparada uma série de placas e desenvolvidas nos solventes selecionados na Tabela I, baseando-se na literatura especializada, já citada anteriormente.

g. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS: Após o desenvolvimento das placas nos solventes relacionados na Tabela I, foram elas secas à temperatura ambiente em câmara escura e submetidas a uma série de tratamento para a identificação de cada composto em questão:

1. *Varredura das placas:* Após a secagem, as placas foram varridas ("Scanning") num sistema semelhante ao descrito por Osborn e Simpson (1968) e que consta de um detetor de cintilação com janela adaptada para ¹²⁵I ligado a um espectômetro γ acoplado a um registrador gráfico ("Flat-bed chart recorder SREC-2").

2. *Revelação das manchas:* Após a varredura, as placas foram vaporizadas com diferentes misturas: Ninhidrina a 0,2% para amino grupos; Cloreto de paládio a 0,1% para iodo e a reação de F. F. C. A. (Cloreto férrico-ferricianeto de potássio e ácido arsenioso) e ainda a mistura de sulfato cérico-arsenito de sódio mais azul de metileno, duas reações específicas para iodoaminoácidos; todas estas reações foram baseadas nos processos descritos por Shapiro e Gordon (1966); Osborn e Simpson (1969); Patterson e Clement (1964); West *et al.* (1965); Mandl e Block (1959); Postmes (1963); Postmes (1964); Gmelin e Virtanen (1959); Zappi (1967); e Zappi e Bublitz (1968).

* Rf = Rate flow = velocidade de corrida.

3. *Recuperação dos compostos das placas:* Foram feitas triplicatas de cada placa para cada solvente relacionado na Tabela I.

TABELA I

Solventes usados nas análises de hidrolisados de tireóide de ratos e de

Dendrodoa grossularia (Van Beneden)

Solventes alcalinos tendo como absorventes:

Silica Gel G

- I Alcól amílico terciário: acetona: 2N-NH₄OH (25:8:7)
- II Acetato de etila:metanol: 2N-NH₄OH (100:40:60) usar a fase superior
- III π Butanol saturado com 2N-NH₄OH

Solventes ácidos tendo como absorventes:

Celulose em pó

- IV Ácido fórmico: água (1:5) com 0,3 g/1 de tiosulfato de sódio.
- V Acetona: 0,5 N ácido acético (2:8)
- VI Butanol terciário: 2N-NH₄OH: clorofórmio (376:70:60)

Fig. 1 — Representa os solventes usados para cromatografia em camada delgada nas análises dos hidrolisados de Rato e de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

Assim, pós a identificação química dos compostos de uma placa de cada solvente, raspam-se as manchas correspondentes aos compostos MIT, DIT, T₃, T₄, e dissolveu-se em 2 ml de água num tubo plástico para medidas radioativas. A radioatividade de cada um foi determinada em um analisador autogama acoplado a um contador de cintilação de três canais, da Packard n.º 3375 (“Trichannel scintillation counter”).

Pode-se, deste modo, calcular a radioatividade de cada composto e a percentagem de cada um na mistura, fator de controle de uma boa hidrólise enzimática.

A segunda placa de cada solvente não foi revelada quimicamente e raspou-se continuamente de cm em cm toda a placa sendo cada amostra dissolvida também em 2 ml de água em um tubo plástico e determinou-se a radioatividade de cm a cm da placa.

A finalidade desta segunda placa é verificar se há uma deiodização dos compostos durante a cromatografia e conseqüente espalhamento (cauda) do iodo ao longo de toda a placa.

4. *Autoradiografia*: A terceira placa também não foi revelada sendo colocada após o desenvolvimento e secagem, em contato com um filme de raio X Kodak "blue band X-Ray" durante sete dias em câmara escura para obtenção da autoradiografia dos compostos.

Após sete dias de contato, o filme de raio X foi revelado e as manchas agora foram comparadas com a varredura das placas para a comprovação da coincidência dos picos obtidos.

2. DENDRODOA GROSSULARIA (VAN BENEDEN):

INCUBAÇÃO DOS ANIMAIS: foi realizada uma série de cinco experiências durante as quatro estações do ano: realizaram-se duas no verão, uma na primavera, uma no outono e uma no inverno; isto porém foi feito devido ao espaço de tempo, pois as experiências todas foram efetuadas em sala de temperatura constante, sem a interferência de variações sazonais e dentro das condições ótimas já pré-determinadas para estes animais (Roche *et al.*, 1964).

Em cada experiência, após os resultados e padronização com os ratos, observaram-se os seguintes passos:

Incubação: Cada experiência, comportou os animais separados em três grupos e colocados cada um em um béquer de cinco litros contendo dois litros de água do mar e colocados em câmara de temperatura constante a 10°C.

Após 48 horas em câmara de temperatura constante, estando os animais adaptados às condições do laboratório, fez-se o seguinte tratamento:

No primeiro béquer, colocaram-se 200 μ Ci de iodo 125 por cada litro de água do mar, sendo esta solução renovada diariamente, isto é, filtrada para remover os detritos e borbulhada de oxigênio puro para ficar sempre em condições experimentais, verificando-se sempre diariamente as condições dos animais, removendo os mortos

ou em mau estado e sendo este primeiro grupo de animais os considerados como testemunhas ou normais.

No segundo béquer, colocaram-se também 200 μCi de iodo-125 por litro de água do mar e mais 1 mg de L-tiroxina por litro, sendo também esta solução renovada diariamente, filtrada, removidos os animais mortos ou em má condição, borbulhada com oxigênio durante 15 minutos, ficando assim novamente ótima para as condições experimentais.

Este segundo béquer corresponde aos animais tratados com tiroxina, ou seja, com hormônio exógeno.

No terceiro béquer, também com 200 μCi de Iodo-125 por litro de água do mar, mais 300 mg de tiouracil por litro de água do mar, sendo também renovada diariamente, filtrada, removidos os animais mortos ou em má condição, borbulhado oxigênio durante 15 minutos e assim a água está novamente pronta para as condições experimentais.

Este terceiro béquer representa os animais tratados com tiouracil, sendo portanto o grupo dos animais bloqueados com substância anti-tireóidea.

Os três grupos de animais foram mantidos nestas condições experimentais durante vinte a trinta dias, sendo verificadas diariamente suas condições durante todo o período de incubação.

HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS: após o período de incubação os três béqueres contendo os animais normais, tratados com tiroxina e tratados com tiouracil foram, cada um lavado separadamente com água do mar isenta de material radioativo com a finalidade de remover todo o iodo adsorvido e não incorporado.

De cada grupo de animais separou-se a túnica do corpo de cada animal individualmente e fez-se um "pool" de todos os corpos e de todas as túnicas até se obter um grama de tecido de cada um (corpo e túnica).

Cada grama de tecido foi homogeneizada em um Tri-R-homogenizer usando primeiro 2 ml de água gelada e em seguida adicionou-se tris-salina contendo antioxidante (metilmercaptoimidazol) sendo a concentração final dos componentes a seguinte: 0,11M NaCl; 0,04M Tris; 0,002M metilmercaptoimidazol e nesta concentração fizemos um homogeneizado de tecido (túnica e corpo) a 6% P/V com

pH ajustado a 8,0 baseando no método descrito por Rosemberg e La Roche (1964).

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA: ao homogeneizado adicionaram-se algumas gotas de tolueno para evitar a putrefação e foi o mesmo submetido à hidrólise enzimática com *Pronase*, enzima proteolítico de origem bacteriana (*Streptomyces griseus protease*) cuja concentração final no homogeneizado foi de 0,5% segundo o método de Tong, Raghupathy e Chaikoff (1963).

Os homogeneizados foram colocados em tubos de Thumborg, feito o vácuo em cada um e, em seguida, introduzido em cada, uma atmosfera de nitrogênio e depois realizada a hidrólise enzimática em câmara escura, em banho maria a 37°C com agitação constante durante 6 horas (Rosemberg, 1966).

EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS MARCADOS (MIT, DIT, T₃, T₄): seguindo-se a hidrólise enzimática cada homogeneizado foi acidificado (pH \leq 2) com gotas de NHCl e em seguida extraído três vezes com metade do volume total do homogeneizado com nbutanol (Zappi, 1967).

Remoção de MIT e DIT do extrato butanólico: o extrato butanólico foi em seguida alcalinizado com gotas de 0,05N NaOH a pH \geq 7,5 e em seguida lavado duas vezes com água.

Desta maneira, cerca de 80 a 90% das iodotirosinas passam para a fase aquosa (1) ficando no extrato butanólico somente as iodotironinas e pequena parte das iodotirosinas (10 a 20% do total).

O extrato butanólico é novamente alcalinizado com solução aquosa de NaOH a 0,05N a pH \geq 7,5 separando-se duas camadas: a butanólica e a aquosa.

A camada butanólica (1) é separada, pois contém somente as iodotironinas (T₃ + T₄) e a camada aquosa (2) é novamente acidificada com gotas de HCl e concentrado a pH \leq 2 e submetida a nova extração butanólica.

Juntaram-se os dois extratos butanólicos que contém todas as iodotironinas e os dois extratos aquosos que contém todas as iodotirosinas, ficando-se somente com dois extratos de cada homogeneizado — o butanólico contendo T₃ + T₄ e o aquoso provido de MIT + + DIT. Este processo é a atualização da extração butanólica descrita por Zappi (1967).

Concentração dos extratos: o extrato butanólico e o extrato aquoso de cada homogeneizado foram reduzidos ao menor volume possível no evaporador rotativo ("Rotavapor-R") da firma suíça Büchl.

Eluição dos concentrados: seguindo-se a concentração, os extratos butanólicos foram eluídos em 0,2 ml de solução de etanol (95%) e NH_4OH concentrado (1:1 V/V) contendo antioxidante (metilmercaptoimidazol — 0,01M) de acordo com Osborn e Simpson (1969) estando assim prontas para a análise por cromatografia em camada delgada.

ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA:

Preparo das placas: Usaram-se como adsorventes para cromatografia em camada delgada dos homogeneizados de *Dendrodoa*, celulose em pó e sílica gel-G.

a. *Placas de celulose:* antes do preparo, as cromatoplasmas de vidro foram lavadas com detergente e secas ao ar durante 24 horas.

30 gramas de celulose em pó (Whatman C-41) foram dissolvidas em 75 ml de água destilada e depois homogeneizadas em um homogeneizador elétrico por cinco minutos.

A suspensão foi transferida ao aplicador para cromatografia em camada delgada da Shandon Scientific Co. e as placas todas preparadas com espessura de 250 μ e, em seguida, secas em estufa a 37°C e não necessitando de nenhuma ativação posterior, estando então prontas para o uso.

Para a análise dos homogeneizados de *Dendrodoa*, após as experiências de padronização com os ratos, selecionou-se o solvente n.º IV da Tabela I — ácido fórmico + água (1:5).

b. *Placas de Sílica Gel-G:* As cromatoplasmas de vidro foram lavadas em detergente 24 horas antes do preparo e secas à temperatura ambiente.

30 gramas de sílica gel-G Merck foram misturadas com 60 ml de água destilada e em seguida homogeneizadas em um homogeneizador elétrico por cerca de 3 a 5 minutos.

A suspensão foi transferida ao aplicador para cromatografia em camada delgada da Shandon Scientific Co. e as placas foram

todas preparadas com espessura de 250 μ e em seguida colocadas em estufa apropriadas (37°C) não necessitando nenhuma ativação posterior, ficando assim prontas para o uso.

PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DOS COMPOSTOS EM ESTUDO: Preparam-se soluções padrões de MIT, DIT, T₃, T₄ contendo cada 100 μ g/10 μ l em etanol (95%) e NH₄OH concentrado (1:1 V/V) com metilmercaptoimidazol (0,02M) como antioxidante.

Usaram-se em cada cromatograma 25 μ g de cada padrão ao lado as amostras com a finalidade de identificação exata e compensar assim, as possíveis variações no R_f, de desenvolvimento a desenvolvimento dos cromatogramas.

PREPARO DAS PLACAS DOS HOMOGENEIZADOS: colocaram-se em cada placa de cromatografia em camada delgada 20 μ l do concentrado butanólico mais 20 μ l do concentrado aquoso de cada homogeneizado e 25 μ g de cada padrão ao lado dos concentrados.

Todas as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio para evitar a oxidação e conseqüente deiodização dos compostos na placa (Heider e Bronk, 1865).

Preparou-se assim uma série de placas sendo as de sílica Gel-G desenvolvidas nos solventes n.º I e II da Tabela I e as de celulose no solvente n.º IV da Tabela I.

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS:

Após o desenvolvimento das placas nos solventes relacionados, foram secas à temperatura ambiente em câmara escura e submetidas a uma série de tratamentos para a identificação:

Revelação das manchas: As placas contendo o concentrado do extrato butanólico do corpo dos Dendrodoas normais foram vaporizadas com solução de ninhidrina a 0,25% servindo assim para identificação da presença de T₃ e T₄ no corpo destes animais.

Recuperação dos compostos das placas e determinação da radioatividade de cada composto em questão: As placas de celulose após o desenvolvimento foram visualizadas sob luz ultra-violeta de pequeno comprimento de onda 253-7 m μ ("Chromatolite U. V. Ha-

novia Equipment”) e em cada composto em questão fez-se um círculo com lápis, delimitando assim, a área de cada um.

Cada composto delimitado foi agora raspado da placa e colocado em tubo plástico contendo 2 ml de água destilada, para medidas em detetor de cintilação do tipo poço.

Fez-se isto para todos os homogeneizados (túnica e corpo) dos animais normais, tratados com tiroxina e tratados com tiouracil.

Determinou-se a radioatividade de cada amostra em um analisador autogama acoplado a um contador de cintilação de três canais da Packard (“Autogamma Analyser Attached to a Packard n.º 3375 Trichannel Scintillation Counter”).

Foi possível assim, calcular a radioatividade de cada composto e o efeito das drogas, tiroxina e tiouracil, na produção de tiroxina marcada em *Dendrodoa*.

3.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os principais resultados acham-se indicados nas tabelas correspondentes a cada série de tratamento a que os animais foram submetidos.

Os gráficos e tabelas de cada tratamento e as respectivas conclusões obtidas em cada conjunto de tratamento são dados a seguir. Após a discussão, haverá um resumo das conclusões finais.

a. Resultado da Captação do Iodo-125

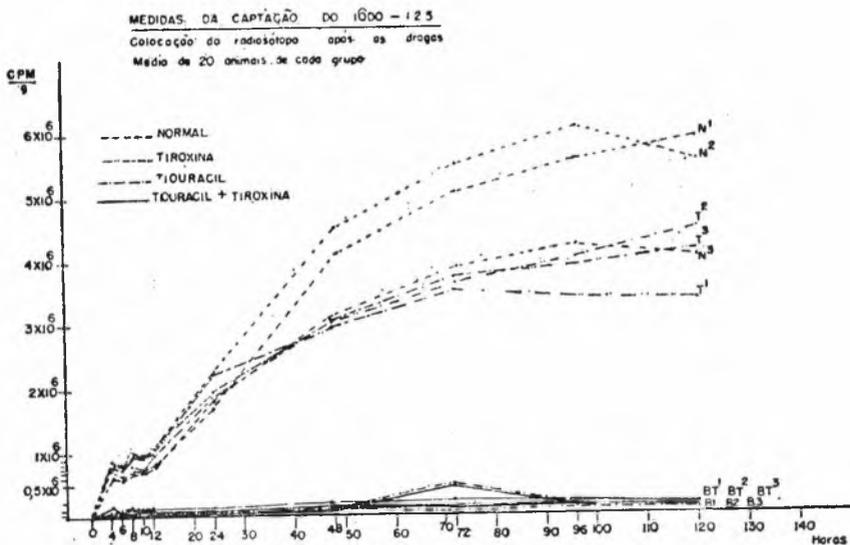


Fig. 2

Cada curva representa o valor médio dos resultados obtidos com 20 animais.

N₁, N₂, N₃ — Animais normais

T₁, T₂, T₃ — Animais tratados com L-tiroxina

B₁, B₂, B₃ — Animais tratados com tiouracil

BT₁, BT₂, BT₃ — Animais tratados com L-tiroxina + tiouracil

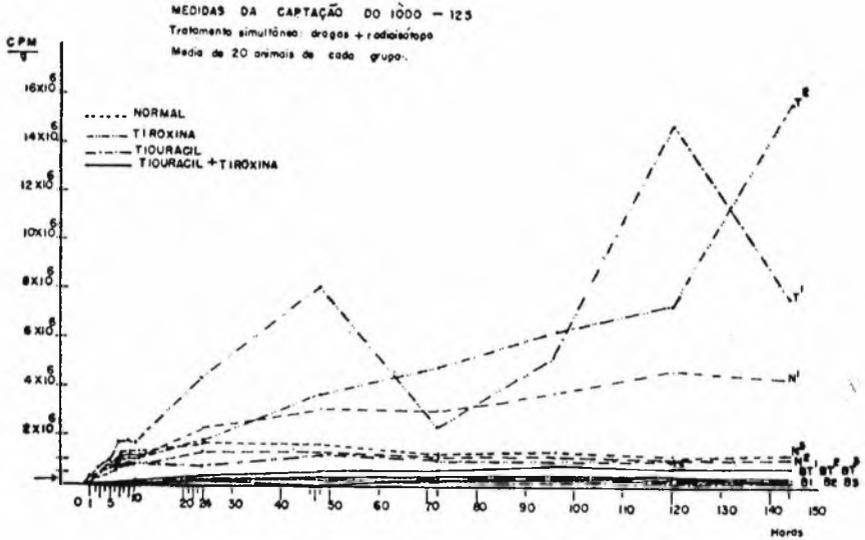


Fig. 3 — Medidas da captação do Iodo-125 — Representa o grupo de animais que receberam tratamento simultâneo: drogas (L-tiroxina + tiouracil) + radioisótopos.

Cada curva representa o valor médio dos resultados das experiências com 20 animais.

N₁, N₂, N₃ — Animais normais

T₁, T₂, T₃ — Animais tratados com L-tiroxina

B₁, B₂, B₃ — Animais tratados com tiouracil

BT₁, BT₂, BT₃ — Animais tratados com L-tiroxina + tiouracil.

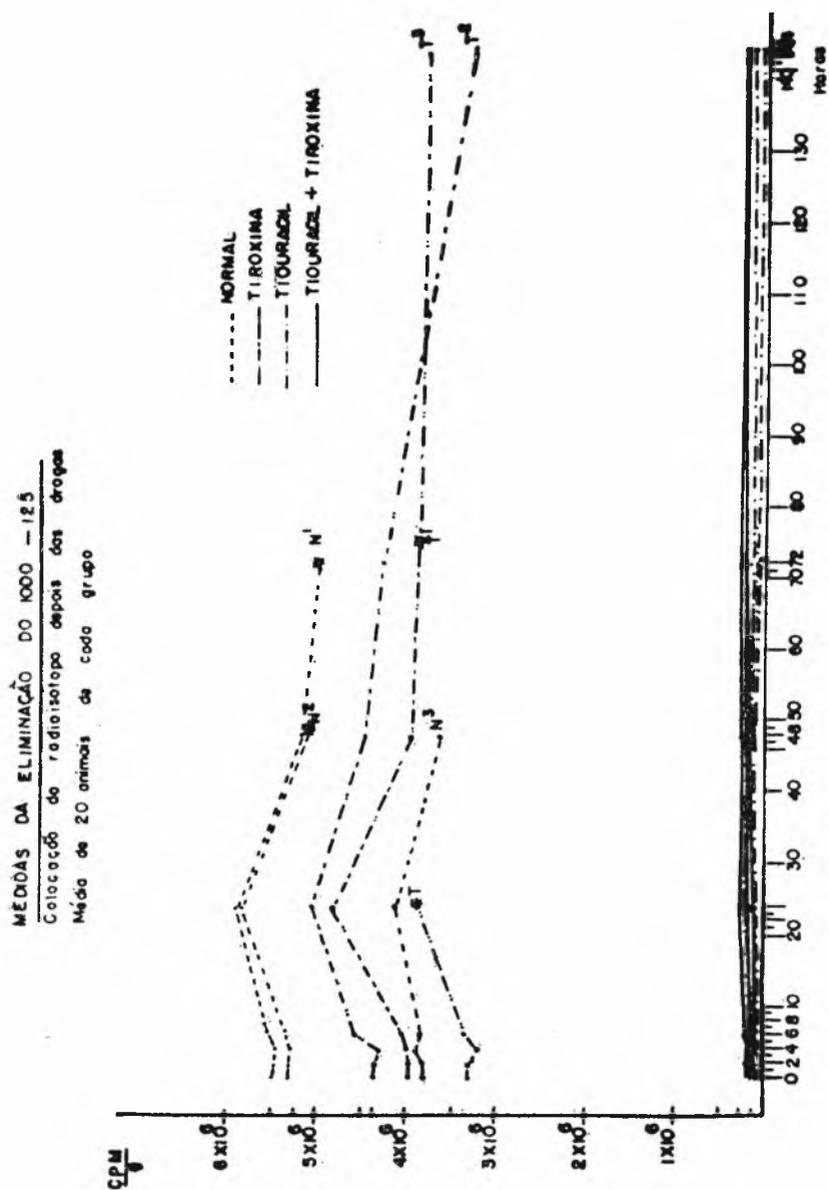


Fig. 4 — Medidas da Eliminação do Iodo-125 — Representa as medidas com o mesmo grupo usado na captação, no qual o radioisótopo foi adicionado após as drogas.

N_1, N_2, N_3 — Animais normais

T_1, T_2, T_3 — Animais tratados com tiroxina

B_1, B_2, B_3 — Animais tratados com tiouracil

BT_1, BT_2, BT_3 — Animais tratados com tiroxina + tiouracil

NOTA: As determinações foram feitas até o ponto em que os animais foram considerados em perfeitas condições e interrompidas quando se julgou que já não estavam em condições satisfatórias, isto é, apresentavam mudanças na cor da túnica externa e diminuição na turgescência do corpo ao toque com pinça cirúrgica.

As linhas inferiores do gráfico representam B_1, B_2, B_3 e BT_1, BT_2, BT_3 .

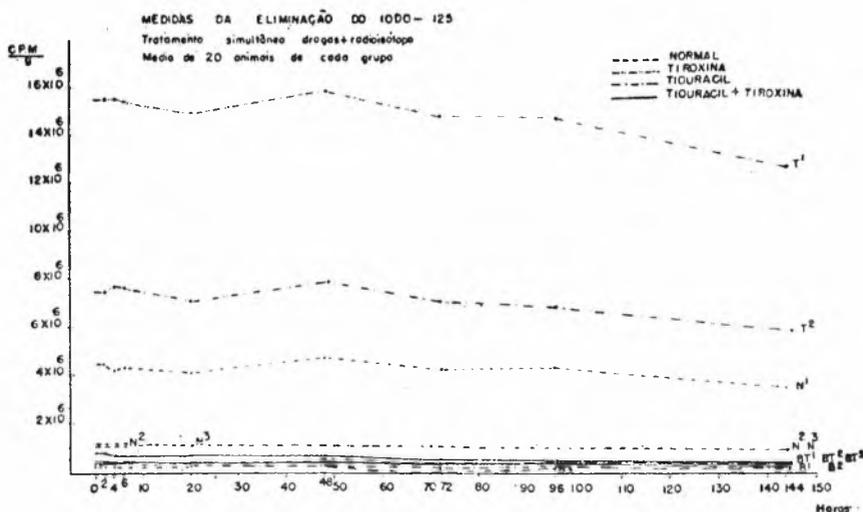


Fig. 5 — Medidas da Eliminação do Iodo-125 — Representa também as medidas do mesmo grupo usado na captação quando os animais receberam tratamento simultâneo: drogas + radioisótopos.

N_1, N_2, N_3 — Animais normais

T_1, T_2, T_3 — Animais tratados com tiroxina

B_1, B_2, B_3 — Animais tratados com tiouracil

BT_1, BT_2, BT_3 — Animais tratados com tiroxina + tiouracil

I. CONCLUSÕES: Tiradas nas medidas de captação e eliminação do Iodo-125 em *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden)

Baseando-se nas medidas de captação e eliminação do Iodo-125 em *Dendrodoa*, poder-se-ão tirar as seguintes conclusões:

1. Tanto os animais normais (N_1 , N_2 , N_3) como os tratados com tiroxina (T_1 , T_2 , T_3), captam ativamente o Iodo-125.
2. A captação alcança o seu pico máximo após 120 horas (5 dias), o que concorda com os trabalhos de outros autores que usaram outra espécie de tunicado: Roche, Salvatore e Rametta (1962).
3. Uma lenta velocidade ou taxa da captação do Iodo-125 e também uma lenta velocidade ou taxa de eliminação do Iodo-125 leva a supor que o animal usa este iodo para organificação.
4. Não há diferença significativa na captação do Iodo-125 pelos animais que receberam tratamento prévio e os que receberam simultaneamente as drogas (L-tiroxina e tiouracil), isto é, tanto faz adicionar antes as drogas e dias depois fazer a captação, como adicionar as drogas e fazer a captação imediatamente em seguida. O efeito parece ser o mesmo nestas condições experimentais.
5. O tiouracil, sem dúvida, bloqueia a captação do Iodo-125 tendo, porém, pouco efeito na eliminação.
6. Não há também diferença significante nestas condições experimentais, na entrada de Iodo-125 e perda de Iodo-125, nos animais normais e nos tratados com tiroxina: o efeito é o mesmo (Fig. 2 e 3).
7. A adição de tiroxina juntamente com tiouracil não compensou significativamente o efeito depressor do tiouracil.
8. Os resultados da captação e eliminação de Iodo-125 aqui apresentados são originais para *Dendrodoa*, contando-se até hoje na literatura especializada, somente os trabalhos de Roche, Rametta e Salvatore (1961) e Roche, Salvatore e Rametta (1962).

b. Resultados da Identificação da Presença de Tiroxina no Hidrolizado do corpo de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

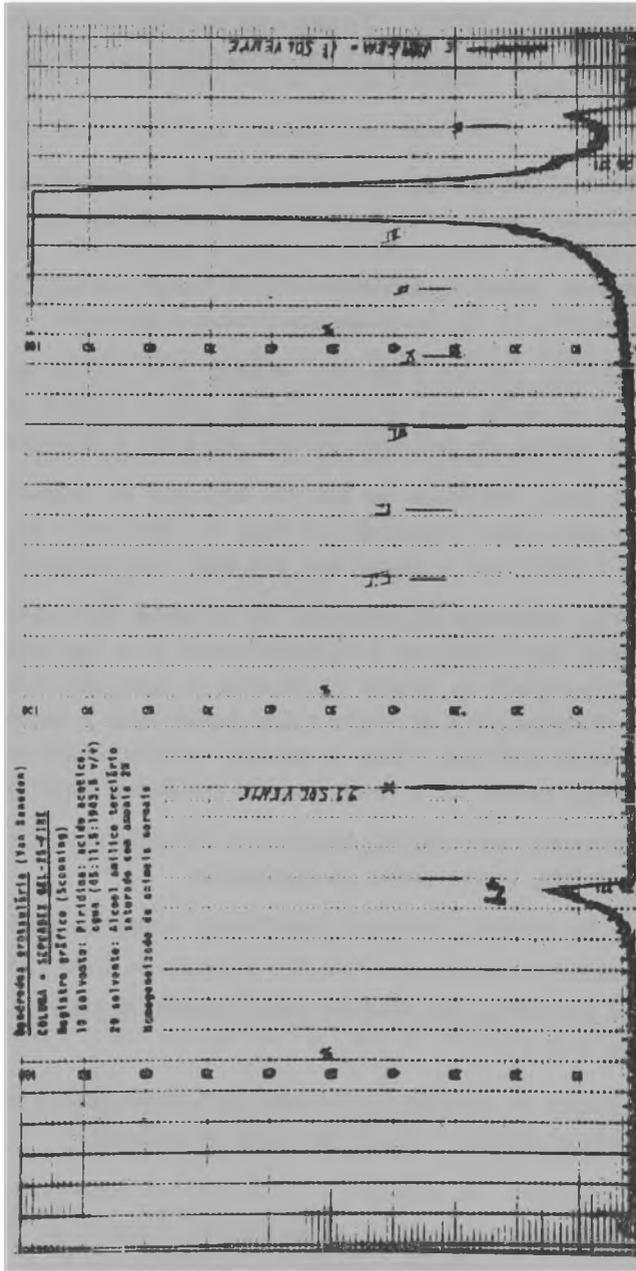


Fig. 6 — Registro do eluato da coluna de Sephadex-Gel-25-“Fine” que passou através de detector de cintilação tipo poço acoplado a um registrador gráfico.

1. *Homogeneizado dos animais normais: Método baseado em Osborn e Simpson (1968).*

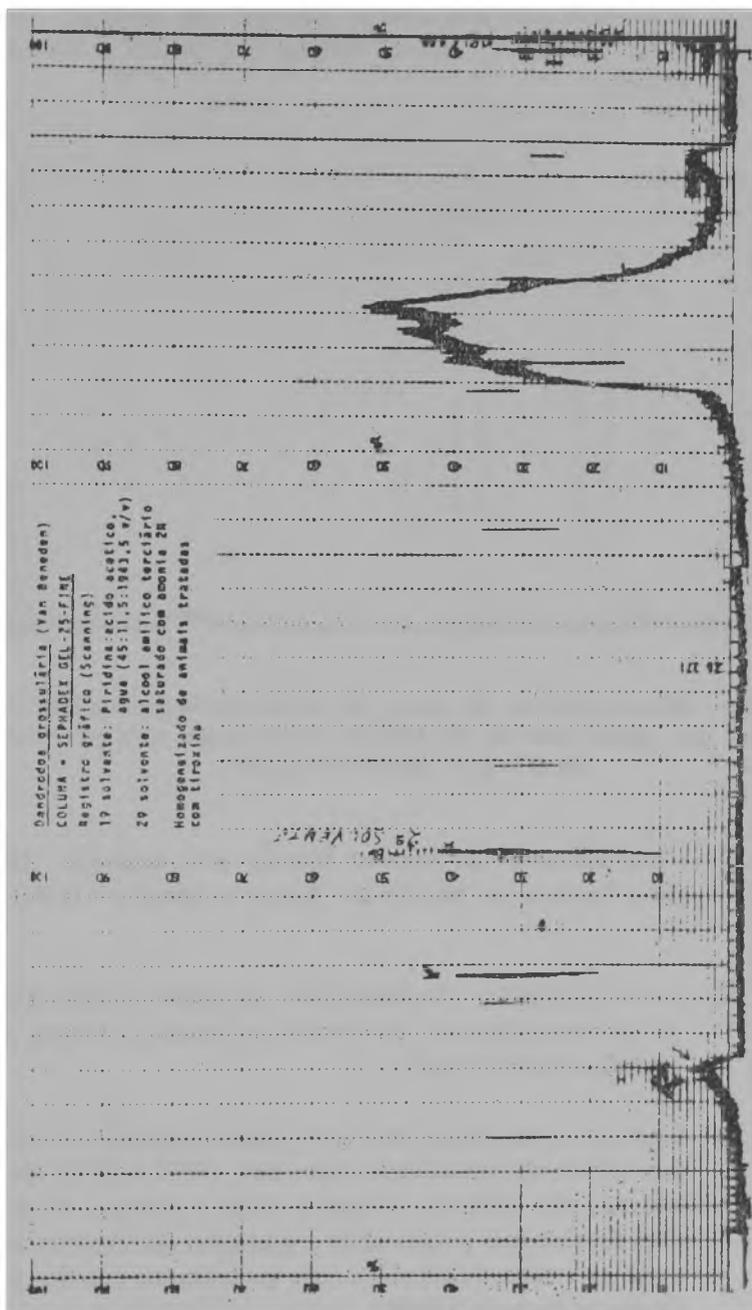


Fig. 7 — Registro gráfico do eluato da coluna de Sephadex-Gel-25-
 -"Fine" que passou através de detector de cintilação tipo poço aco-
 plado a um registrador gráfico.

2. *Homogeneizado dos animais tratados com tiroxina: Registro baseado no método descrito por Orborn e Simpson (1968).*

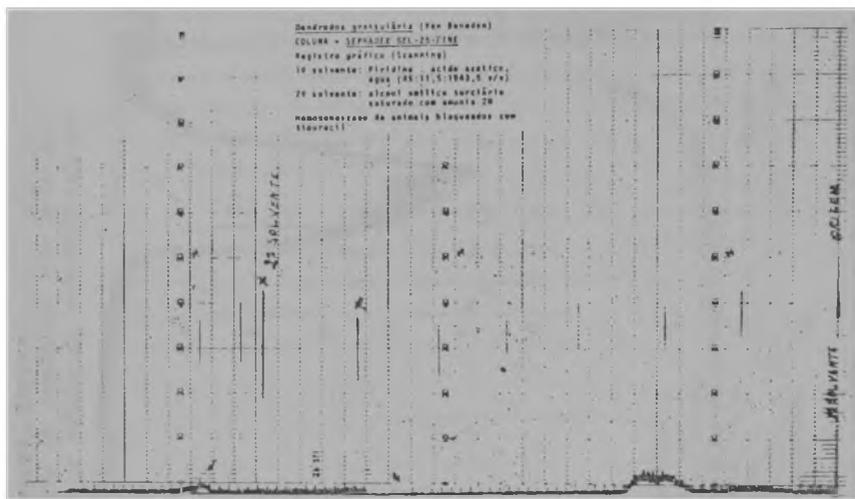


Fig. 8 — Registro gráfico do eluato da coluna de Sephadex-Gel-25-“Fine” que passou através de detetor de cintilação tipo poço acoplado a um registrador gráfico.

3. *Homogeneizado dos animais tratados com tiouracil: Registro baseado no método de Osborn e Simpson (1968).*

II. **CONCLUSÕES:** Fundamentadas na análise do hidrolisado do homogeneizado de *Dendrodox* usando a coluna de Sephadex-Gel-25-“Fine”.

1. Baseando-se no gráfico da Fig. 6, pode-se afirmar que existem substâncias precursoras hormonais (MIT e DIT) identificadas pelo primeiro solvente e ainda a presença de possível tiroxina que é vista após a passagem do segundo solvente na coluna, baseando-se este processo no descrito por Osborn e Simpson (1968).

2. Nos animais tratados com tiroxina exógena (Fig. 7) nota-se haver uma redução na síntese dos precursores hormonais, MIT e DIT) e também no pico correspondente à tiroxina, levando a supor a existência de um mecanismo de "feed-back" para tiroxina nestes animais.
3. Nos animais tratados com tiouracil há um completo bloqueio tanto na síntese dos precursores hormonais como no pico correspondente à tiroxina, podendo-se afirmar que a droga bloqueou a síntese de tiroxina (Fig. 8).

RESULTADO DA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

1. Resultados do hidrolisado da tireóide de Ratos:

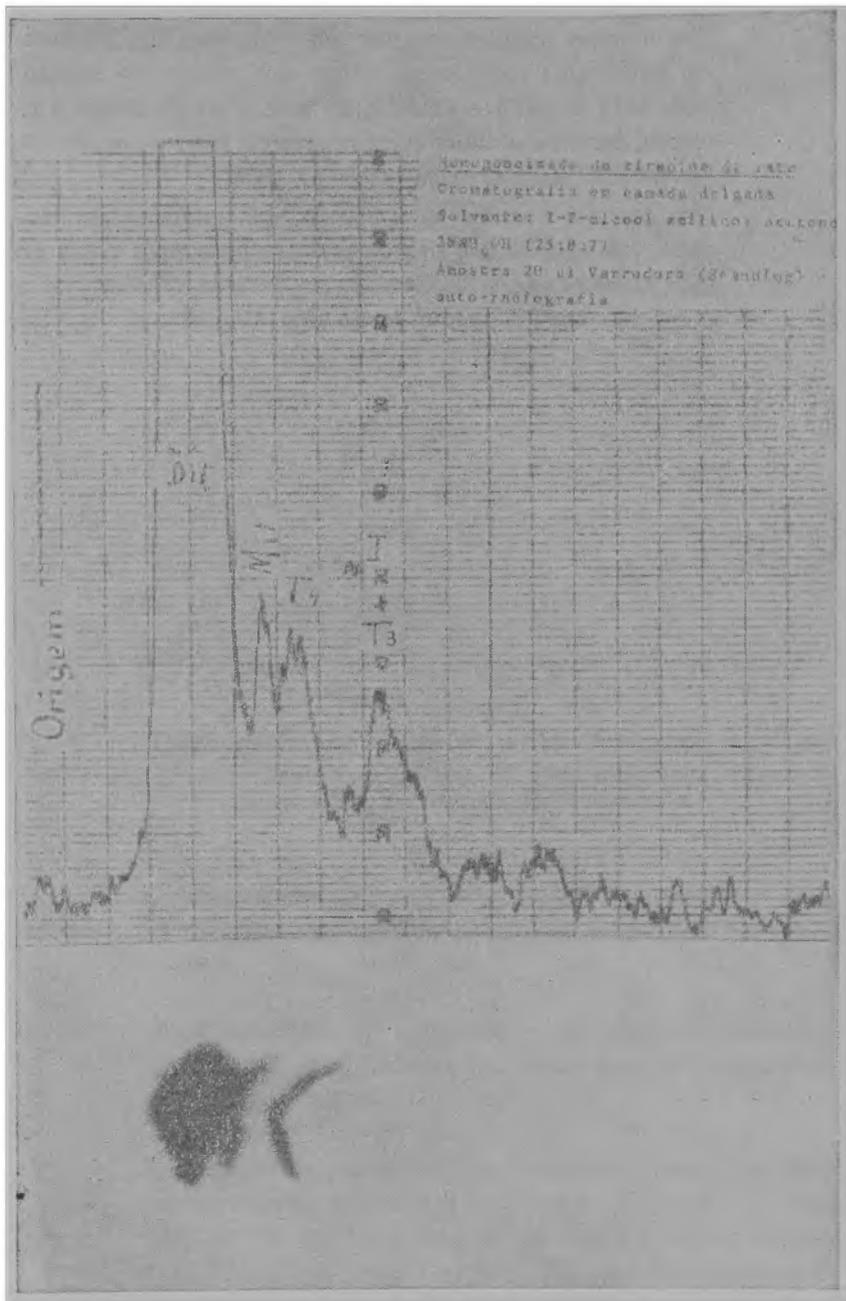


Fig. 9 — Representa o registro gráfico da varredura feita no cromatograma do hidrolisado de tireóide de rato usando o solvente n.º I da Fig. 1 (Tabela I) e ainda a auto radiografia do mesmo cromatograma mostrando a concordância entre o resultado dos dois métodos (pico e mancha).

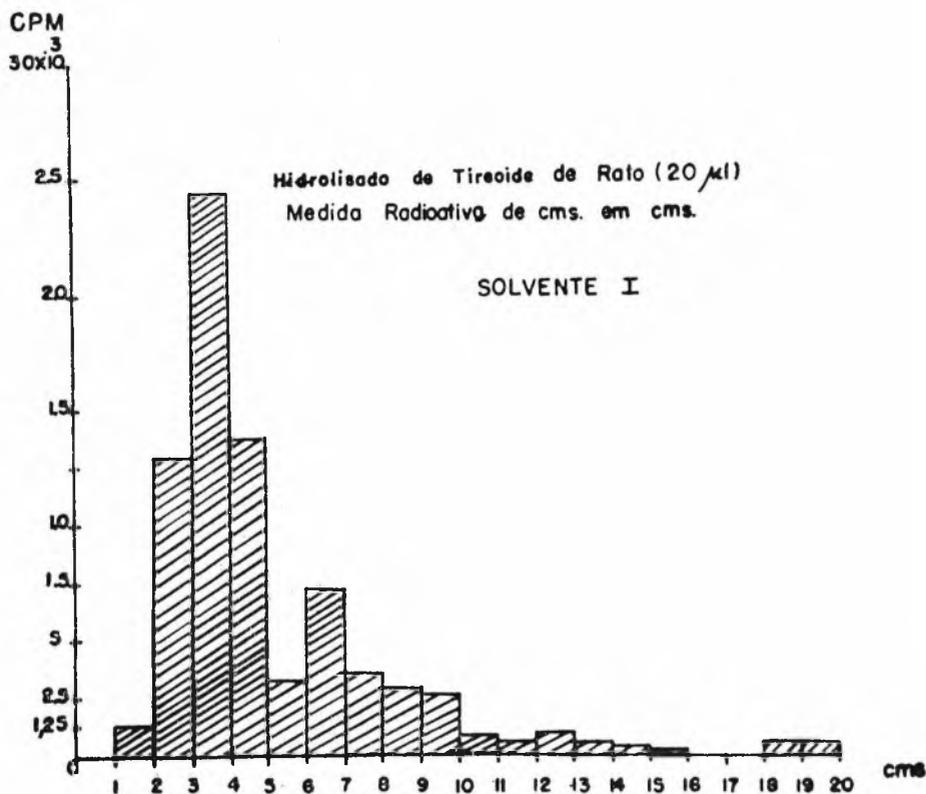


Fig. 10 — Representa o gráfico as medidas radioativas feitas na mesma placa da Fig. 9, usando portanto o solvente n.º I da Fig. 1 (Tabela I) e raspando a placa de cm em cm e medindo a radioatividade de cada cm em detetor de cintilação do tipo poço.

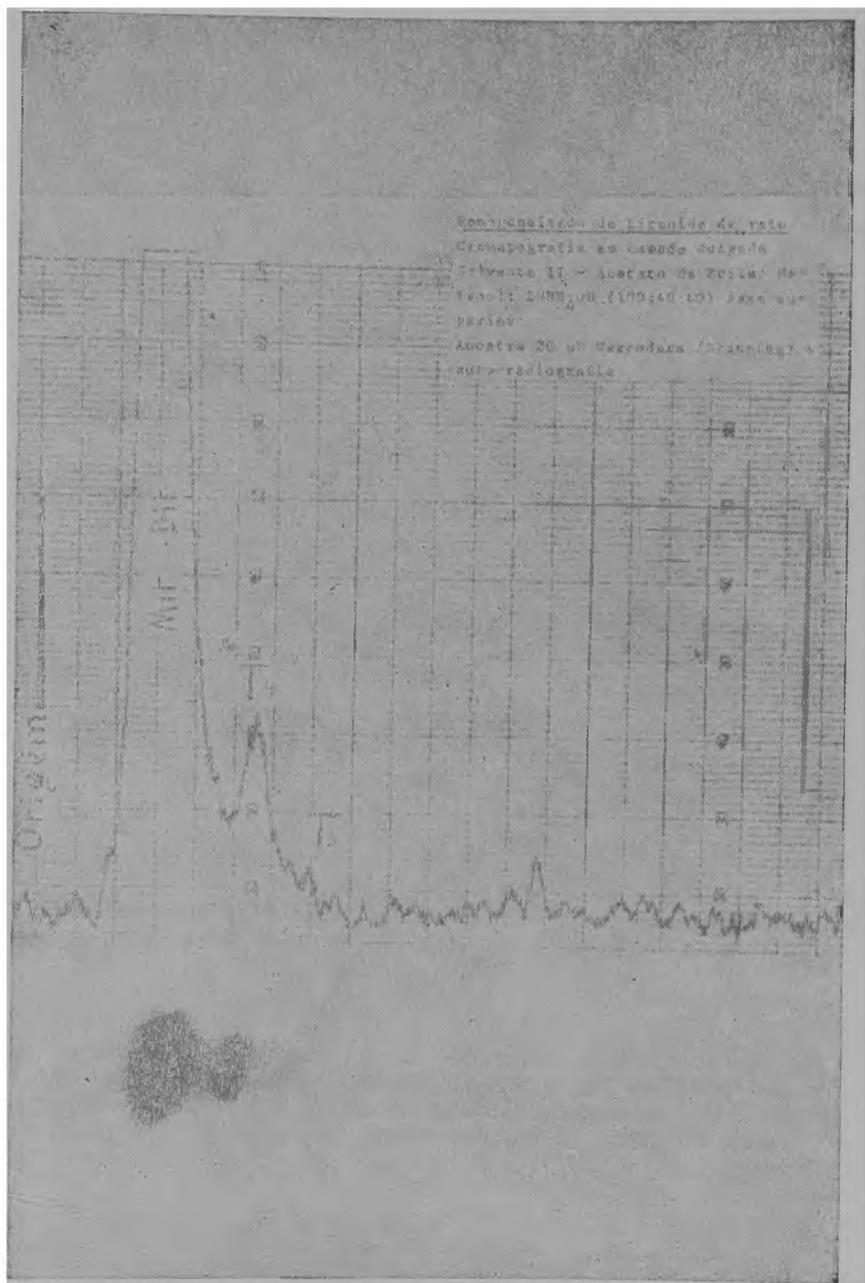


Fig. 11 — Gráfico da varredura feita no cromatograma do hidrolisado de tireoide de rato, usando o solvente n.º II da Fig. 1 (Tabela I) e a auto-radiografia do mesmo cromatograma mostrando a concordância entre os resultados dos dois métodos (pico e mancha).

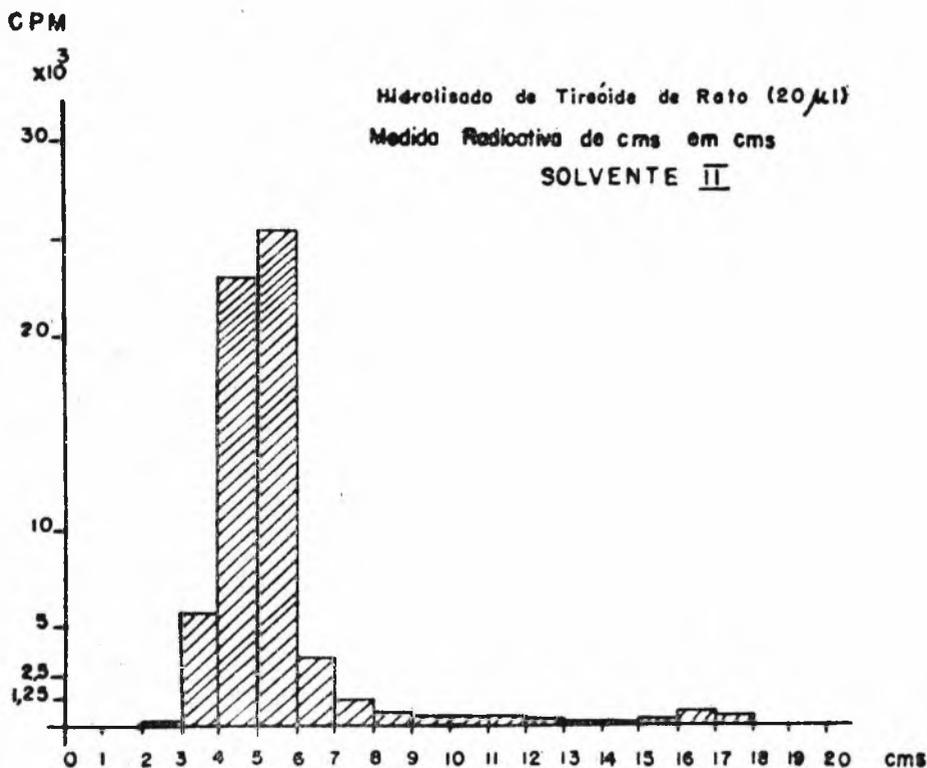


Fig. 12 — Gráfico das medidas radioativas feitas na mesma placa da Fig. II, usando o solvente n.º II da Fig. 1 (Tabela I) e raspando a placa de cm em cm e medindo a radioatividade de cada cm, em detetor de cintilação do tipo poço.

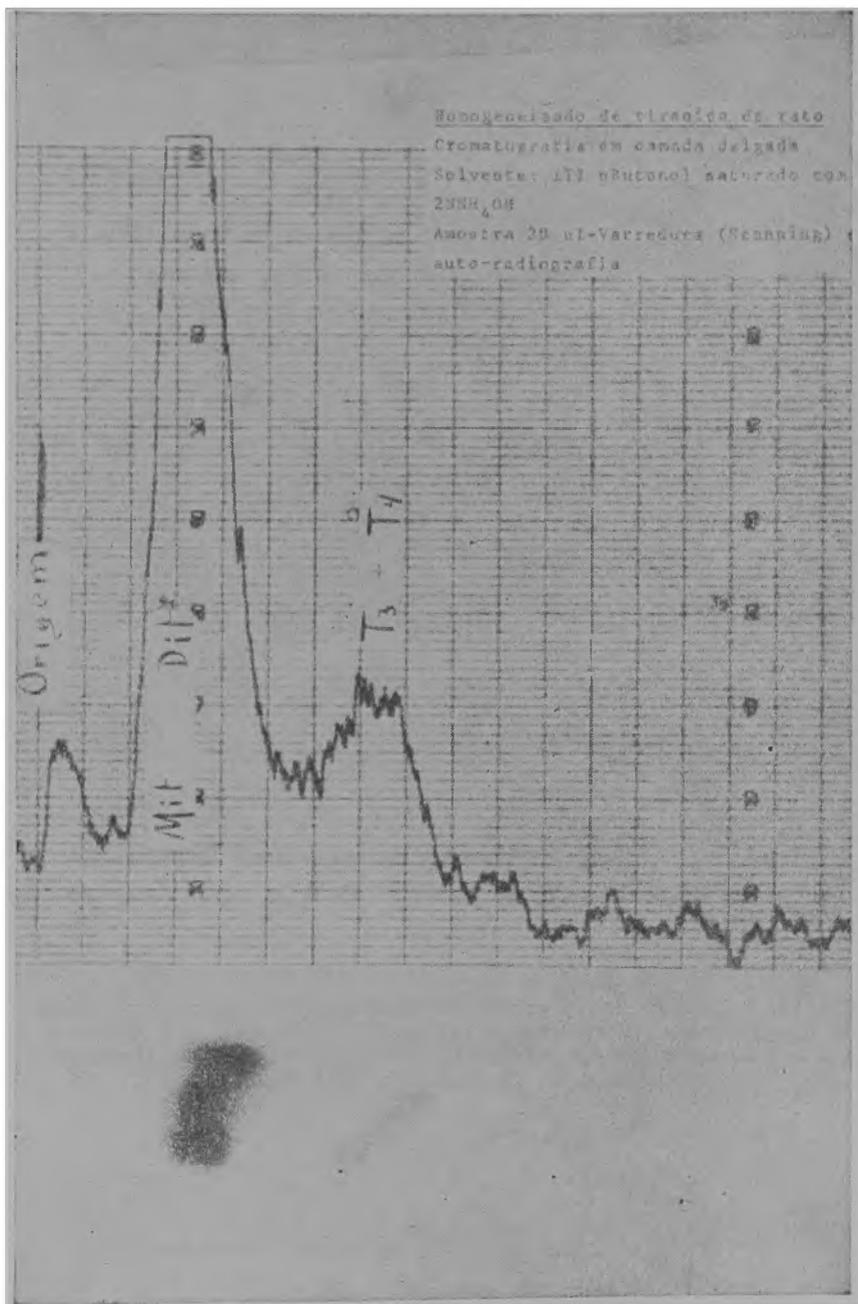


Fig. 13 — Gráfico da varredura, feita no cromatograma do hidrolisado de tireoide de rato, usando o solvente III da Fig. 1 (Tabela I) e a auto-radiografia do mesmo cromatograma mostrando a concordância entre os resultados dos dois métodos (scanning e autoradiografia).

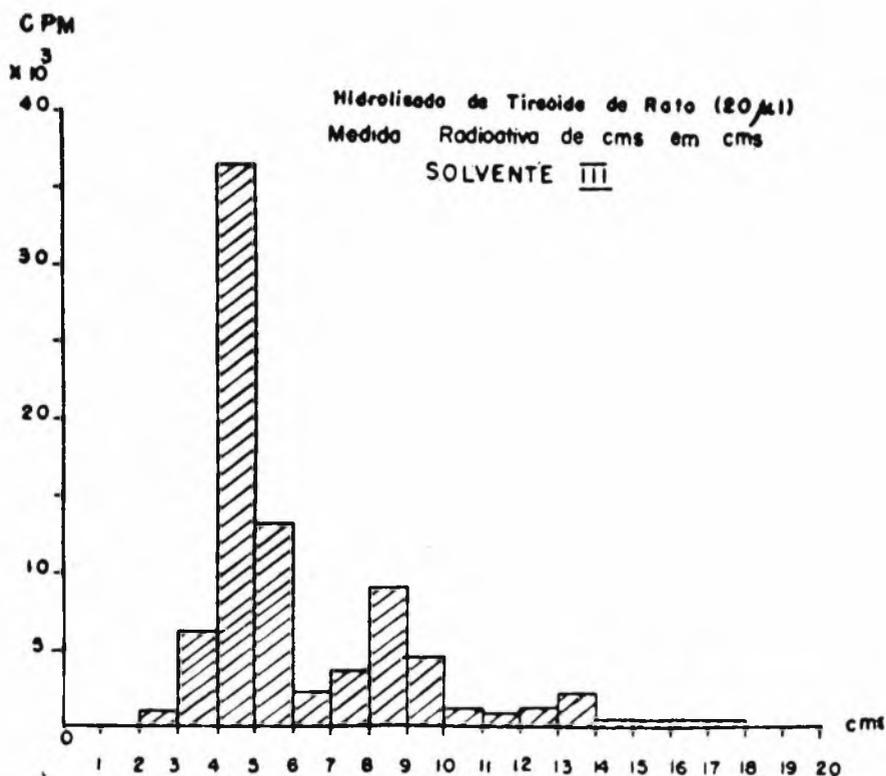


Fig. 14 — Gráfico das medidas radioativas feitas na mesma placa da Fig. 13, usando o solvente III da Fig. 1 (Tabela I) raspando a placa de cm em cm e medindo a radioatividade de cada cm em detetor de cintilação tipo poço.

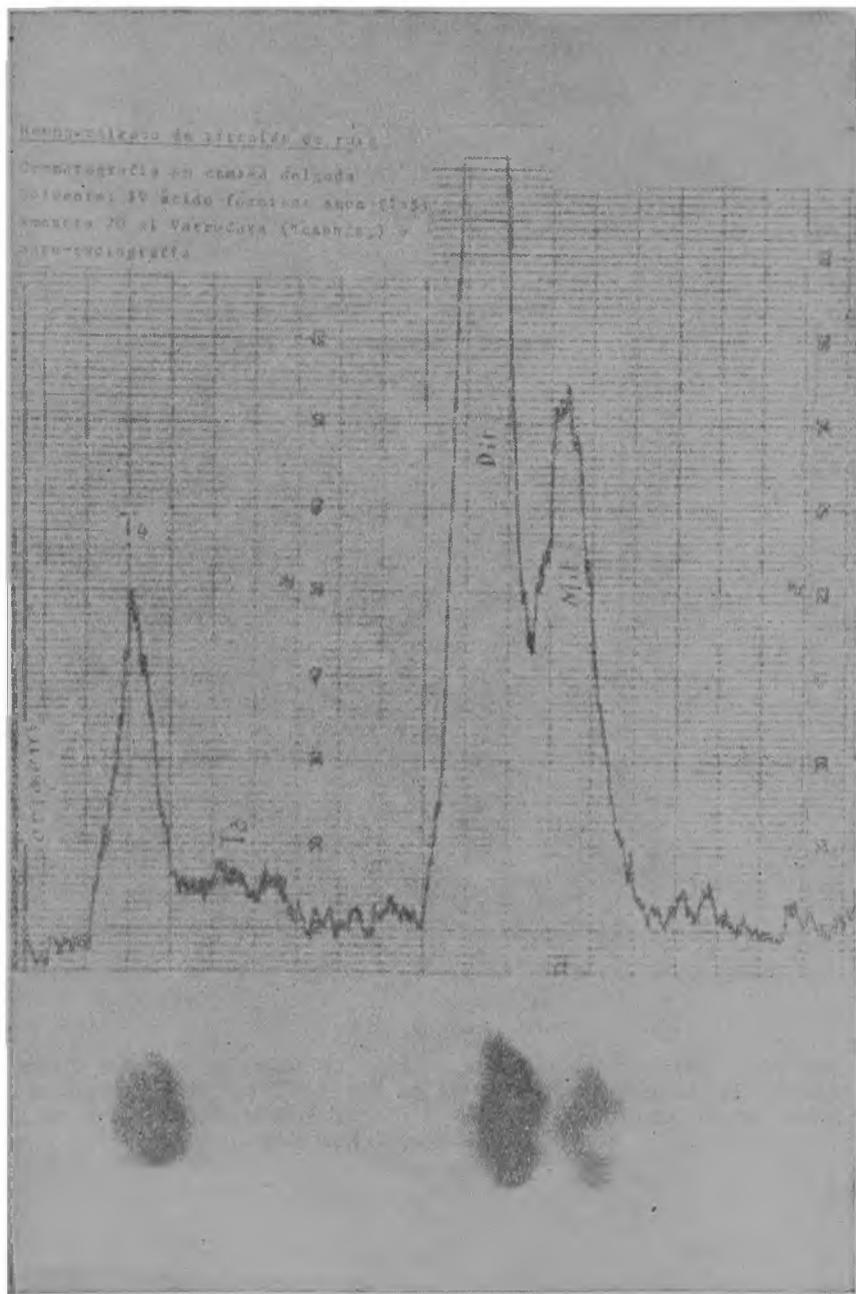


Fig. 15 — Gráfico da varredura feita no cromatograma do hidrolisado de tireoide de rato usando o solvente n.º IV da Fig. 1 (Tabela I) e a auto-radiografia do mesmo cromatograma mostrando a concordância entre os resultados dos dois métodos (pico e mancha).

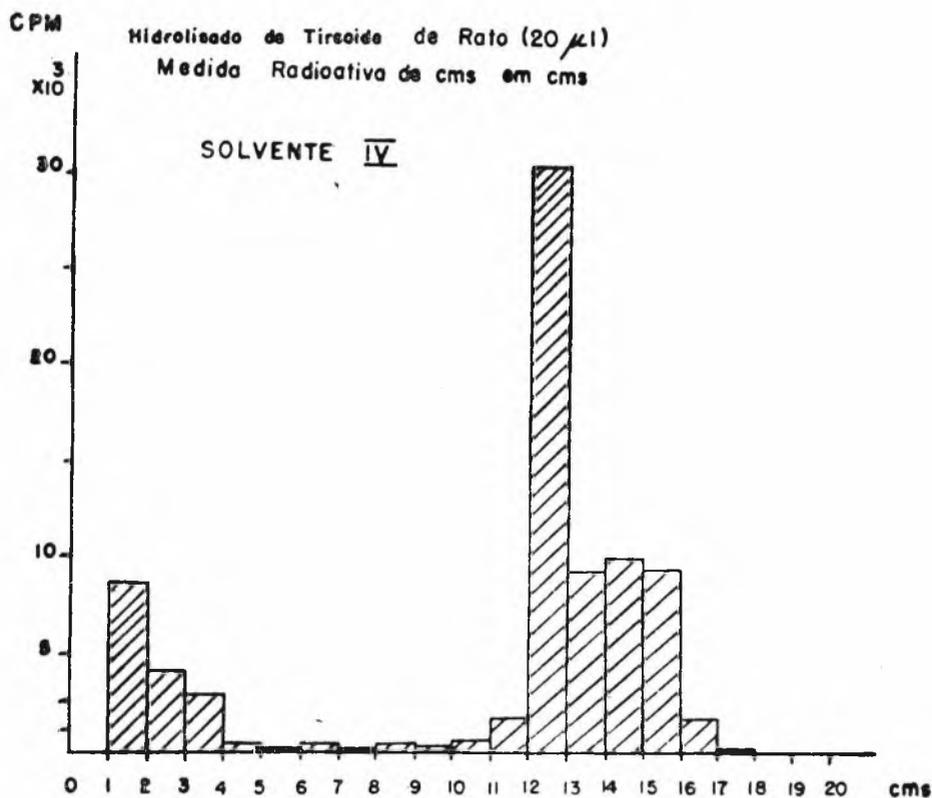


Fig. 16 — Gráfico das medidas radioativas feitas na mesma placa da Fig. 15, usando o solvente n.º IV da Fig. 1 (Tabela I) raspando a placa de cm em cm e medindo a radioatividade de cada cm em detector de cintilação do tipo poço.

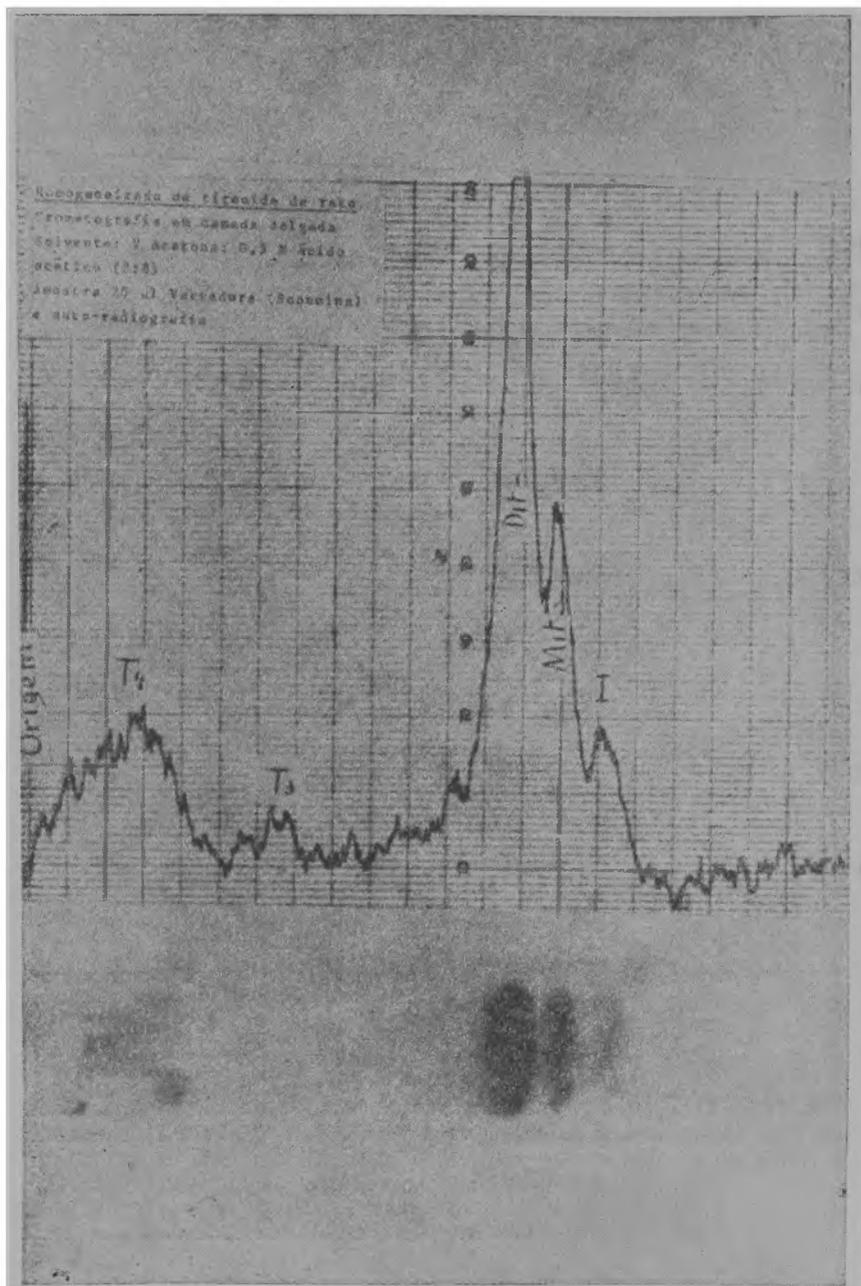


Fig. 17 — Gráfico da varredura feita no cromatograma do hidrolisado de tireoide de rato, usando o solvente n.º V da Fig. 1 (Tabela I) e a auto-radiografia do mesmo cromatograma mostrando a concordância entre os resultados dos dois métodos (pico e mancha).

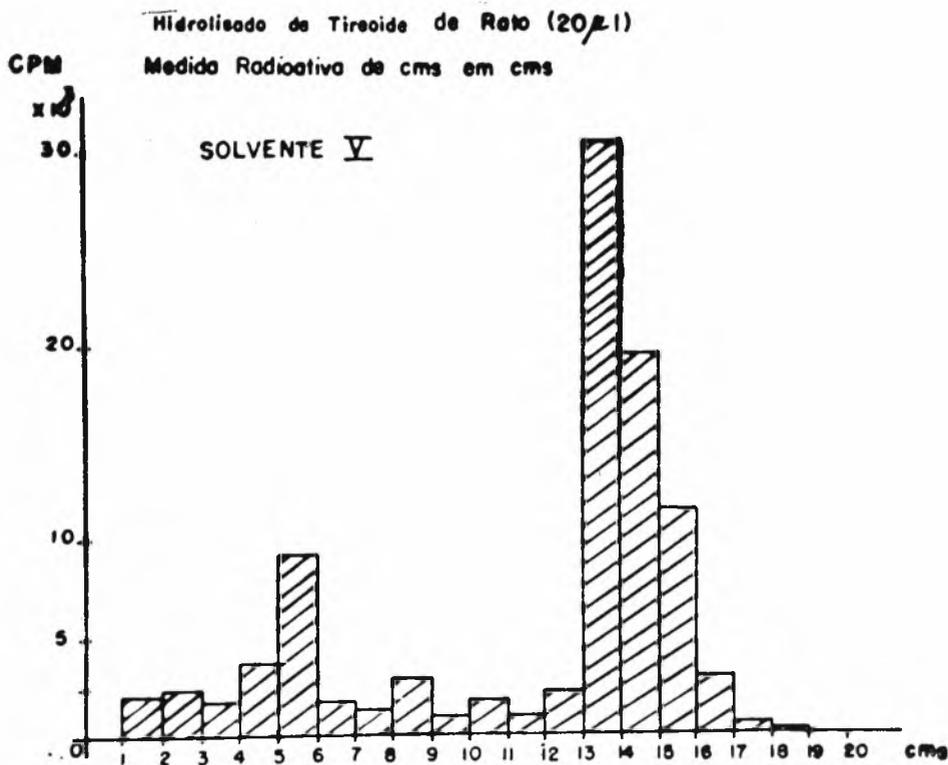


Fig. 18 — Gráfico das medidas radioativas feitas na mesma placa da Fig. 15, usando o solvente n.º V da Fig. 1 (Tabela I), raspando a placa de cm em cm e medindo a radioatividade de cada cm em detector de cintilação do tipo poço.

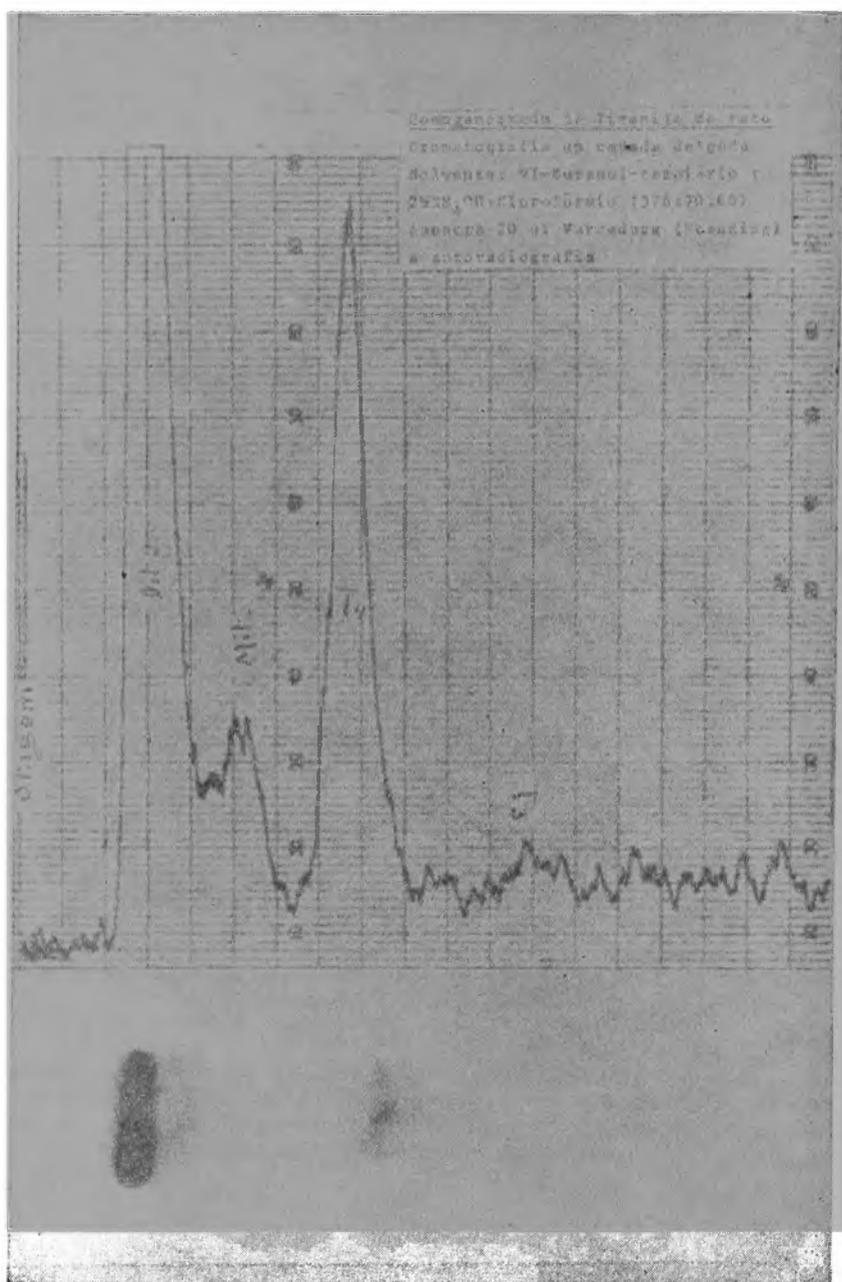


Fig. 19 — Gráfico da varredura feita no cromatograma do hidrolisado de tireóide de rato, usando o solvente n.º VI da Fig. 1 (Tabela I) e a auto-radiografia do mesmo cromatograma mostrando a concordância entre os resultados dos dois métodos (pico e mancha).

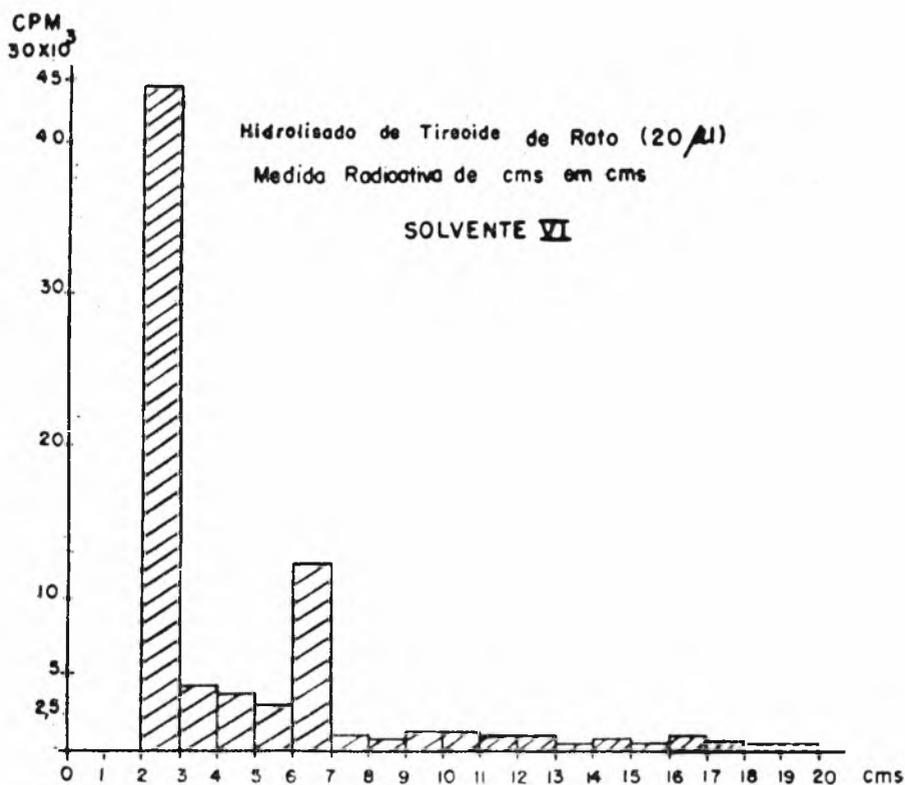


Fig. 20 — Gráfico das medidas radioativas feitas na mesma placa de cromatografia da Fig. 19 usando o solvente n.º VI da Fig. 1 (Tabela I), raspando a placa de cm em cm e medindo a radioatividade de cada cm em detetor de cintilação do tipo poço.

TABELA II
HIDROLISADO DE TIREÓIDE DE RATO (20 µI)

Medidas radioativas das placas de cromatografia em camada delgada em detetor de cintilação tipo poço das regiões correspondentes a cada composto.

Compostos	SOLVENTE I		SOLVENTE II		SOLVENTE III	
	C.P.M.	% desvio padrão (composto)	C.P.M.	% desvio padrão (composto)	C.P.M.	% desvio padrão (composto)
MIT	7.220	1,0	9.128	1,0	36.036	0,5
DIT	27.265	0,5	42.109	0,3		
T ₃	1.926	2,5	2.686	1,5	8.086	1,0
T ₄	2.971	1,5	3.344	1,5	2.205	0,7
I	1.826	2,5	1.124	2,5	140	2,5
B.G.	149	2,5	150	2,5		

ABREVIACÕES:

MIT = Monoiodotirosina

T₃ = Triiodotironina

C.P.M. = Contagem por minuto

DIT = Diiodotirosina

T₄ = Tiroxina

B.G. = Back Ground ou radiação natural

São medidas radioativas de cada composto removido da placa correspondente, servindo para determinar a radioatividade de cada um e a sua porcentagem no total e assim, comparando com a literatura especializada, podemos ter uma idéia do rendimento do método de hidrólise aqui empregado.

Fig. 21 — Representa a recuperação dos compostos iodados (MIT, DIT, T₃, T₄) das placas de cromatografia em camada delgada usando os solventes I, II, III da Fig. 1 (Tabela I).

TABELA III

HIDROLISADO DE TIREÓIDE DE RATO (20 µI)

Medidas radioativas das placas de cromatografia em camada delgada em detetor de cintilação tipo poço das regiões correspondentes a cada composto.

Compostos	SOLVENTE IV		SOLVENTE V		SOLVENTE VI	
	C.P.M.	% desvio (composto)	C.P.M.	% desvio (composto)	C.P.M.	% desvio (composto)
MIT	19.723	0,7	11.648	0,7	17.156	0,7
DIT	52.046	0,2	47.587	0,3	31.220	0,5
T ₃	2.451	1,5	2.230	1,5	1.623	0,7
T ₄	13.040	0,5	11.811	0,7	6.201	1,0
I	4.337	1,5	1.389	2,5	662	2,5
B.G.	149	2,5	150	2,5	140	2,5

ABREVIACOES:

MIT = Monoiodotirosina DIT = Diiodotirosina T₃ = Triiodotironina
 T₄ = Tiroxina C.P.M. = Contagem por minuto B.G. = Back Ground ou radiação natural

Fig. 22 — Representa a recuperação dos compostos lodados (MIT, DIT, T₃, T₄) das placas de cromatografia em camada delgada usando os solventes IV, V, VI da Fig. 1 (Tabela I).

São medidas radioativas de cada composto removido da placa correspondente, podendo agora, determinar a radioatividade de cada um e a sua porcentagem no total e com estes dados compararmos com a literatura especializada para termos assim, uma idéia sobre o rendimento do método de hidrólise aqui empregado.

III. CONCLUSÕES: Fundamentadas na análise por cromatografia em camada delgada do hidrolisado de tireóide de rato.

1. Todos os solventes usados na análise por cromatografia em camada delgada relacionados na Fig. 1 (Tabela I) foram bons para a separação dos compostos em estudo.
2. Houve uma perfeita concordância entre os picos obtidos pela varredura com as manchas obtidas pela autoradiografia de cada composto da mesma placa usando todos os solventes relacionados na Fig. 1 (Tabela I).
3. Houve também uma semelhança de imagem entre as medidas de cm em cm de cada placa e a varredura correspondente provando não haver, ou, se houver, há muito pouco iodo livre, dando uma cauda ao longo do cromatograma e aumentando assim, sua radiação de fundo.
4. Não se obtiveram menores valores para MIT e DIT usando os solventes alcalinos da Fig. 1 (Tabela I), solventes I, II, III e VI em comparação com os solventes ácidos da mesma Tabela n.º IV e V mostrados nas figuras 21 e 22, embora na literatura especializada se mencione que os valores de MIT e DIT em solventes alcalinos são mais reais, pois não há a contaminação de pequenos polipeptídeos não hidrolisados que migram em solventes ácidos (Pitt-Rivers e Schwartz, 1969).
5. O teor de tiroxina foi mais alto usando os solventes IV e V (14,23% e 15,08%) em celulose em pó e ainda são valores que estão em concordância com a literatura especializada (Sofianides *et al.*, 1966 e Faircloth *et al.*, 1965) e que prova se ter aqui obtido uma hidrólise enzimática efetiva com ótima recuperação do teor de tiroxina.
6. O solvente n.º VI embora tenha dado um teor razoável de tiroxina (10,90%) é o que apresenta o maior teor de

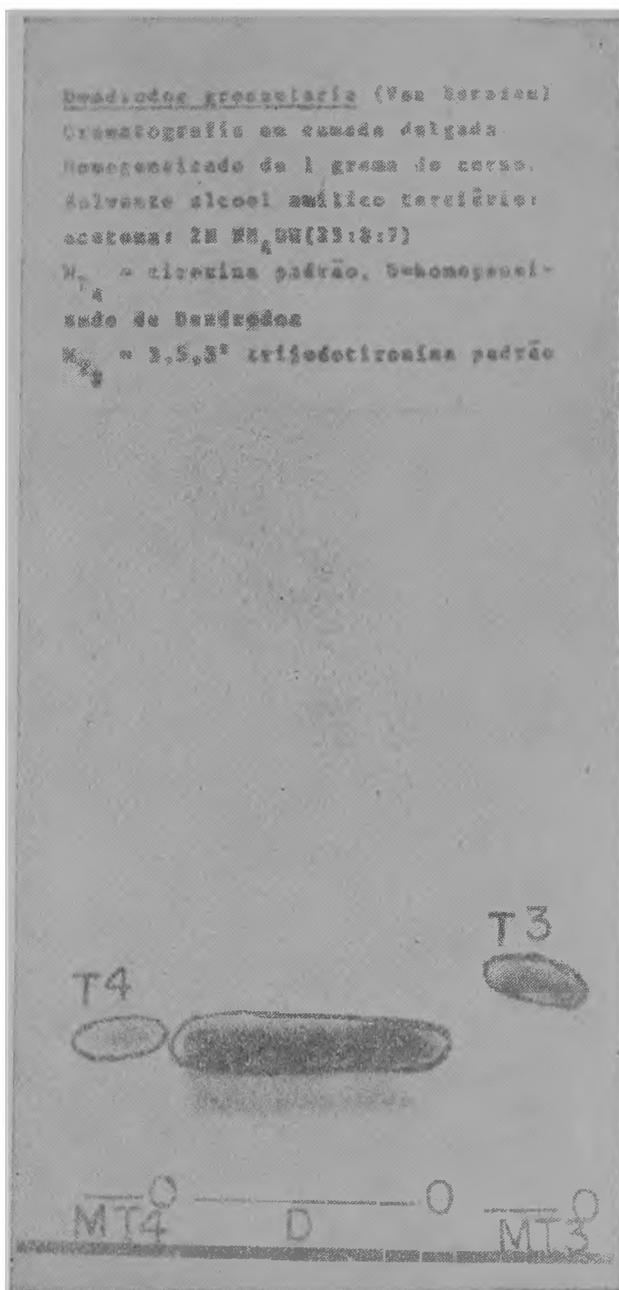


Fig. 23 — Cromatograma do hidrolisado do corpo de animais normais, usando-se o solvente n.º I da Fig. 1 (Tabela I) e revelado com ninhidrina a 0,25% segundo Sofianides et al. (1966).

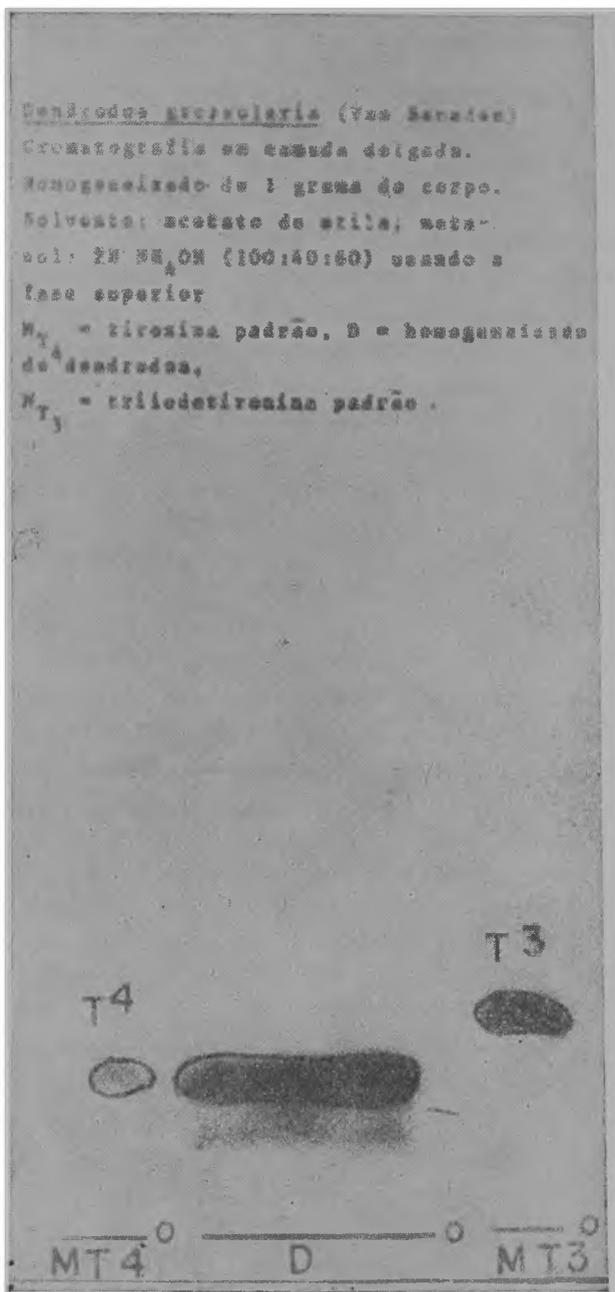


Fig. 24 — Cromatograma do hidrolisado do corpo dos animais normais, usando-se o solvente n.º II da Fig. 1 (Tabela I) e revelado com ninhidrina a 0,25% segundo Sofianides et al. (1966).

iodo livre (11,16%) sendo também o que possui mais lento desenvolvimento da câmara cromatográfica (= 3 horas) e portanto, quanto mais lento o desenvolvimento maior a deiodinização dos compostos, principalmente a tiroxina.

DENDRODOA GROSSULARIA (Van Beneden)

Medidas radioativas em detetor de cintilação tipo poço das placas de cromatografia em camada delgada das regiões MIT + DIT do hidrolisado da túnica e do corpo de animais normais, tratados com tiroxina e tratados com tiouracil.

MIT + DIT

Animais	Corpo		Túnica	
	C.P.M.	D.P.	C.P.M.	D.P.
Normais	2048 ±	17	6685 ±	2
	2060 ±	26	6660 ±	15
	1961 ±	44	6701 ±	20
Tiroxina (tratados)	3130 ±	67	10325 ±	59
	3420 ±	137	10282 ±	29
	3125 ±	70	10116 ±	88
Tiouracil (tratados)	516 ±	7	278 ±	7
	508 ±	2	267 ±	0,3
	492 ±	9	259 ±	6
B.G.	179 ±	5	157 ±	8

ABREVIACÕES:

- MIT = Monoiodotirosina — DIT = diiodotirosina
 B.G. = Back ground ou radiação de fundo ou radiação natural
 D.P. = Desvio Padrão
 C.P.M. = Contagem por minuto

Fig. 25 — Indica os valores em contagem por minuto dos compostos monoiodotirosina + diiodotirosina raspados da placa de cromatografia em camada delgada usando o solvente n.º IV da Fig. 1 (Tabela I) do hidrolisado da túnica e corpo dos animais normais, tratados com tiroxina e tratados com tiouracil.

7. Todos os outros solventes da Fig. 1 (Tabela I) com exceção do n.º III que leva também cerca de 2 horas para o desenvolvimento apresentam uma oscilação entre 50 a 90 minutos para o completo desenvolvimento do cromatograma.
8. Os solventes ácidos n.º IV e V foram os melhores para o teor de tiroxina e seus precursores (Fig. 22).
2. Resultados do hidrolisado de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden)

DENDRODOA GROSSULARIA (Van Beneden)

Medidas radioativas em detetor de cintilação tipo poço das placas de cromatografia em camadas delgada da região correspondente a Triiodotironina (T_3) do hidrolisado do corpo de animais normais.

Triiodotironina (T_3)

	C.P.M.	Corpo	D.P.	
Solvente II	166	±		M = 164
	148	±	1,4	
	179	±	11,0	
			10,6	
Solvente IV	339	±		M = 263
	229	±	54,0	
	222	±	24,0	
			29,0	
Solvente V	272	±		
	295	±	7,7	
	172	±	1,4	
			4,0	

ABREVIACÕES:

B.G. = Back ground ou radiação natural.

D.P. = Desvio Padrão

C.P.M. = Contagem por minuto

Fig. 26 — Contém os valores em contagem por minuto da região correspondente a 3, 5, 3' triiodotironina raspada das placas de cromatografia em camada delgada usando os solventes n.º II, IV e V da Fig. 1 (Tabela I) do hidrolisado do corpo dos animais normais.

DENDRODOA GROSSULARIA (Van Beneden)

Medidas radioativas em detetor de cintilação tipo poço das placas de cromatografia em camada delgada, região correspondente a tiroxina (T_4), hidrolisado de túnica e do corpo dos animais normais, tratados com tiroxina e tratados com tiouracil.

TIROXINA

	Corpo		Túnica	
	C.P.M.	D.P.	C.P.M.	D.P.
Animais Normais	1331 \pm	28 M = 1291	2071 \pm	10,5
	1304 \pm	9	M = 2086	2114 \pm
	1237 \pm	38		2073 \pm
Tiroxina (tratados)	809 \pm	30	6781 \pm	6,0
	863 \pm	7 M = 852 M = 6772	6764 \pm	5,0
	885 \pm	23	6770 \pm	1,4
Tiouracil (tratados)	186 \pm	7	191 \pm	4,0
	175 \pm	15 M = 196 M = 185	195 \pm	7,0
	226 \pm	21	170 \pm	10,5
B.G.	179 =	5	157 \pm	8

ABREVIACÕES:

C.P.M. = Contagem por minuto

D.P. = Desvio Padrão

B.G. = Back ground ou radiação de fundo ou radiação natural

Fig. 27 — Mostra os valores em contagem por minuto da região correspondente a L-tiroxina raspadas das placas de cromatografia em camada delgada usando o solvente n.º IV da Fig. 1 (Tabela I) do hidrolisado da túnica e do corpo dos animais normais, animais tratados com tiroxina e tratados com tiouracil.

IV. CONCLUSÕES: Fundamentadas na análise por cromatografia em camada delgada do hidrolisado da túnica e do corpo de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

1. Pode-se afirmar que existe L-tiroxina no hidrolisado do corpo de *Dendrodoa* como mostram as Fig. 23 e 24.
2. Pode-se afirmar ser L-tiroxina, pois o composto apresentou concordância com a substância padrão (L-tiroxina) usando dois solventes diferentes (Fig. 23 e 24).

3. A presença da tiroxina foi primeiramente evidenciada em dois solventes diferentes com a simples vaporização de ninhidrina, sendo portanto uma identificação química estática da existência do composto (Fig. 23 e 24).
4. Não se conseguiu identificar quimicamente a presença de 3,5,3' triiodotironina no hidrolisado do corpo dos animais normais.
5. Não se conseguiu também, detectar a presença de 3,5,3' triiodotironina radioativa no hidrolisado do corpo de animais normais usando três solventes diferentes (Fig. 26) sendo as contagens por minuto das regiões T₃ pouco significativas estatisticamente em relação ao valor da radiação de fundo da própria placa (Fig. 26).
6. Assim, pode-se afirmar que dentro das limitações do método aqui utilizado, não se pôde detectar a presença de 3,5,3' triiodotironina em *Dendrodoa*.
7. Há produção de MIT e DIT tanto no corpo como na túnica dos animais em estudo (Fig. 25).
8. O teor de produção de MIT e DIT é maior na túnica que no corpo dos animais normais (Fig. 25).
9. O tratamento com tiroxina exógena incrementa a produção de MIT e DIT sendo porém este incremento percentualmente igual para a túnica ($\approx 59\%$) e para o corpo ($\approx 53\%$) dos animais tratados em relação aos normais (Fig. 25).
10. Portanto, o aumento da produção de MIT e DIT devido ao tratamento com tiroxina exógena (Fig. 25) é o mesmo (cerca de 50%) tanto no corpo como na túnica dos animais tratados em relação aos normais.
11. A administração de tiouracil bloqueia quase completamente a síntese de MIT e DIT tanto no corpo como na túnica dos animais tratados (Fig. 25).
12. Há produção de L-tiroxina marcada tanto no corpo como na túnica dos animais normais (Fig. 27).
13. A produção de tiroxina marcada é maior na túnica (2086 C. P. M.) que no corpo (1291 C. P. M.) dos animais normais.

14. A administração de tiroxina exógena causou efeito diferente no corpo como na túnica dos animais tratados (Fig. 27).
15. No corpo dos animais tratados com tiroxina exógena houve uma redução de 34,1% na produção de tiroxina marcada em relação ao corpo dos animais normais.
16. Na túnica dos animais tratados com tiroxina exógena houve ao contrário, um aumento marcante de 224% na produção de tiroxina marcada em relação a produção da túnica dos animais normais (Fig. 27).
17. Portanto, a administração de tiroxina exógena diminuiu a produção de tiroxina marcada no corpo dos animais e aumentou a produção na túnica dos mesmos animais.
18. A administração de tiouracil bloqueou completamente a produção de tiroxina marcada tanto no corpo como na túnica dos animais tratados.

4.

DISCUSSÃO

A glândula tireóide foi entre todas as estruturas endócrinas a que mais se prestou ao estudo e conseqüente esclarecimento dos passos que culminam na produção dos seus hormônios.

A introdução do iodo radioativo e de métodos bioquímicos de análise e extração, como os vários tipos de cromatografia e a extração butanólica hoje bem aperfeiçoada, possibilitou a identificação precisa dos hormônios tireóideos (3,5,3' triiodotironina e tiroxina) bem como os precursores hormonais MIT e DIT (monoiodotirosina e diiodotirosina).

Do ponto de vista morfológico, ou melhor, a unidade morfo-fisiológica tireóidea é o folículo. Assim, todos os vertebrados desde os peixes inferiores até o homem possuem como unidade tireóidea o folículo tireóideo.

E é este folículo que realiza toda a biossíntese dos hormônios tireóideos onde se passam os seguintes passos: (Fig. 28).

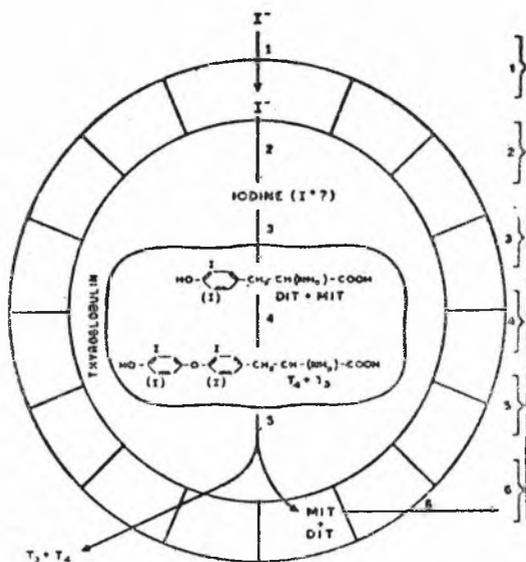


Fig. 28

1. Transporte de iodeto em uma proteína específica (tireoglobulina)
2. Oxidação dos iodetos a iodo
3. Organificação do iodo (MIT + DIT)
4. Acoplamento das iodotirosinas para recuperação do iodo
5. Hidrólise da tireoglobulina e liberação dos hormônios.
6. Deiodização das iodotirosinas

Portanto, a fisiologia da glândula tireóide nada mais é do que o estudo dos processos citados, sendo este processo revisto por vários autores e os passos todos já bem identificados com relação aos mamíferos — Pitt-Rivers (1950, 1963); Pitt-Rivers e Cavalieri (1962); Gross e Pitt-Rivers (1954).

Mais recentemente, apareceram os trabalhos de revisão em que todos os passos citados foram sedimentados e atualizados. São os trabalhos de Roche e Michel (1963).

Concomitante ao estudo da fisiologia tireóideia nos mamíferos, os pesquisadores passaram a estudar a tireóide sob o ponto de vista comparativo, estudando a fisiologia dos folículos nas várias classes dos vertebrados.

Os vários problemas que interessaram os pesquisadores sobre a glândula tireóideia foram:

1. Seria a síntese de hormônios tireóideos restrita somente às espécies que possuem uma tireóide diferenciada, isto é, com folículos e portanto restrita aos vertebrados?
2. Do ponto de vista filogenético, quando aparece a primeira síntese de hormônios tireóideos?
3. Seria a bioquímica de hormônios tireóideos e a produção de T_3 e T_4 idêntica nos vertebrados e nos animais sem folículos tireóideos?
4. Haveria uma origem filogenética no processo de concentração e organificação do iodo que permitisse estabelecer um esquema filogenético na produção hormonal?

Assim, tentando resolver estes vários problemas, muitos estudos foram feitos em endocrinologia comparada e resultavam em vários trabalhos de revisão, dos quais selecionamos Berg, Gorbman e Kobayashi (1959); Barrington (1962 e 1964); Gorbman e Bern (1962).

A fisiologia da glândula apresenta aspectos comuns que vão desde os vertebrados até os peixes inferiores ou ciclóstomos.

Nos vertebrados a biossíntese ou mecanismo de produção dos hormônios foram relativamente bem explorados bem como os seus efeitos gerais.

Nas aves também, em geral nos animais de sangue quente — (mamíferos e aves) — a glândula apresenta um mecanismo semelhante havendo apenas variações nas espécies quanto à velocidade de captação do iodo e organificação, bem como a velocidade de liberação dos hormônios na circulação. Estas variações são apenas em função das necessidades das espécies consideradas.

Um aspecto importante nas aves é a influência da tiroxina na muda estacional onde o mecanismo neuro-endócrino representa um papel principal na mediação do estímulo do meio ambiente, embora haja também interação e até balanceamento de efeitos entre hormônios tireóideos e os estrógenos e andrógenos no processo de muda.

Nos vertebrados de sangue frio ou poiquilotermos, todos, até os peixes inferiores, apresentam o folículo tireóideo e, portanto, todo o mecanismo básico já citado, havendo um efeito tireóideo bem marcante nos anfíbios, que é a sua metamorfose.

A ação dos hormônios tireóideos na metamorfose dos anfíbios é um conhecimento já relativamente antigo, sendo descrito a primei-

ra vez por Gudernatsch (1912), que alimentou as larvas de anfíbios com vários tecidos de mamíferos e notou que o tecido tireóideo causava uma parada no crescimento e uma metamorfose precoce dos anfíbios.

Portanto, a administração de tireóide como alimento causou o mesmo efeito, tanto nos anuros como nos urodelos.

Recentemente, encontra-se o trabalho de Kerkof, Tong e Chai-koff (1963) em salamandras, relacionando o processo de muda com os níveis de tiroxina no sangue, usando três espécies de Salamandra e chegando à confirmação de que o processo de muda está na dependência dos níveis de tiroxina circulante.

Com relação aos peixes, relativamente poucos são os trabalhos conclusivos, havendo ainda, vários aspectos que necessitam melhores esclarecimentos. Nas investigações feitas com peixes teleósteos, Hickman Jr. (1959) concluiu que a função tireóidea nestes peixes visa possibilitar a melhor adaptação dos mesmos às variações ambientais, principalmente com relação à pressão osmótica e à temperatura e também possibilitar a melhor adaptação às rápidas mudanças internas que ocorrem nestes animais.

Depois, há também, os trabalhos de Fontaine (1954) e Leloup e Fontaine (1960), que procuravam relacionar a função tireóidea nos peixes teleósteos ao determinismo das migrações.

Nos elasmobrânquios, contam-se os estudos histológicos de Gorbman (1965), relacionando as variações morfológicas da glândula e o desenvolvimento destes animais, porém, não há uma perfeita relação entre eles, sendo ainda, o mesmo autor responsável pela revisão comparativa sobre a bioquímica do iodo como índice da evolução da função tireóidea.

Portanto, pode-se agora fazer uma síntese de todo o mecanismo.

Sob o ponto de vista morfo-fisiológico, a unidade básica tireóidea é o folículo e existe em todos os vertebrados, desde os mamíferos até os peixes.

Nos vertebrados inferiores, os efeitos dos hormônios tireóideos estão relacionados mais aos processos de crescimento e diferenciação do que a alterações na taxa metabólica, e, recentemente, mesmo nos vertebrados superiores, a tendência é considerar o efeito no crescimento e diferenciação (síntese proteica) como a ação fundamental dos hormônios tireóideos (Tata, 1967).

Estudos atuais provaram também que, mesmo nos vertebrados inferiores, a biossíntese hormonal ocorre em cadeias de polipeptídeos de uma iodoproteína característica relacionada com a tireoglobulina e seu aspecto na análise, por ultracentrifugação, é semelhante em todos os vertebrados (Salvatore *et al.*, 1965; Roche *et al.*, 1968).

Assim, a biossíntese hormonal tireóidea é semelhante em todos os vertebrados, bem como a presença de iodoproteína em todos os animais considerados desde os mamíferos até os peixes sendo que entre eles merecem destaque principal os agnatas ou ciclostromata.

HORMÔNIOS TIREÓIDEOS NOS AGNATA:

Agora, a classe mais inferior dos vertebrados, os chamados ciclostromatas, merece um estudo especial no que se refere à tireóide pois deles derivam vários dados importantes para a endocrinologia comparada quando se fez a analogia entre ciclostromos e os protocordados.

Sabe-se que a lampreia, um ciclostromo típico, antes de atingir a forma adulta, passa por uma forma larvária conhecida pelo nome de ammocoetes.

A ammocoetes como toda larva de vertebrados, possui uma notocorda e não tem ainda, portanto, um sistema vertebral diferenciado, isto é ossificado.

Segundo Salvatore (1969) o nome ammocoetes foi um erro de classificação pois confundiu-se a larva do *Petromyzon* com um membro adulto do sub-filo protocordata.

O mais importante para a finalidade do presente trabalho é o fato da ammocoetes não possuir durante seu estado larvário folículos tireóideos diferenciados.

Portanto, seria aí o ponto de início para a determinação se há ou não uma biossíntese hormonal, pois na larva da lampreia existe uma estrutura, saco glandular sub-faríngeo, cuja origem vem do assoalho da faringe entre a primeira e a quinta fenda branquial.

Esta estrutura recebe o nome de endóstilo ou saco-glandular sub-faríngeo para Gorbman em seu trabalho sobre fisiologia de peixes (1969) ao passo que Salvatore (1969) sugere que esta estrutura seja chamada de saco glandular sub-faríngeo e reservar o termo endóstilo para a "prega" hipobranquial dos protocordata.

A verdade é que na larva de lampreia esta estrutura, endóstilo ou saco glandular sub-faríngeo, persiste durante toda a fase larvária e quando se dá a metamorfose, parte do epitélio glandular sub-faríngeo sofre a involução enquanto que o resto da estrutura se diferencia em folículos tireóideos característicos (Leach, 1939-1944).

Em 1942, Gorbman, usando iodo radioativo relata o acúmulo de iodo no endóstilo ou saco glandular sub-faríngeo da lampreia e mais tarde seus resultados foram conferidos por Barrington e Franchi (1956) e também por Clements e Merlini (1960) e Clements e Merlini (1960).

Porém, acúmulo de iodo não significa presença de síntese hormonal. Com os trabalhos de Leloup e Berg (1954) apareceu a primeira prova da presença de MIT, DIT, T₃ e T₄ em hidrolisado do endóstilo de lampreia.

Portanto, o trabalho de Leloup demonstrou que é na glândula sub-faríngea o local da síntese de hormônios tireóideos na larva da lampreia, havendo somente iodotironinas livres em outros tecidos do animal.

Ficou provado que o endóstilo da lampreia sintetiza os hormônios tireóideos e ainda mais, com a identificação de protease na mesma estrutura por Clements e Gorbman (1955) confirma-se a presença da síntese e uma hidrólise enzimática na própria estrutura de acordo com as necessidades do animal.

Com todos estes dados chega-se agora aos cordados inferiores. Como a síntese de hormônios tireóideos dá-se em todos os vertebrados, lógico seria procurar uma função tireóidea nos cordados inferiores.

Assim, passa-se a estudar agora, o problema nos protocordados que compreendem dois sub-filos: os cefalocordados e os urocordados.

Ora, como a tireóide dos vertebrados desenvolve-se uma parte do assoalho faríngeo, desde há muito tempo procurou-se uma área anatômicamente homóloga nos protocordados (Dohrn, 1886).

De fato, na linha mediana ventral da faringe dos protocordados existe uma prega faríngea que recebe o nome de endóstilo. O problema agora reside na relação funcional entre este endóstilo e a mesma estrutura dos ciclóstomos.

Existem fatos a favor e contra o argumento do endóstilo dos protocordados ter função análoga a dos ciclóstomos. Tanto é que,

Hyman, já em 1942 chega a conclusão, baseando-se somente em dados morfológicos, que são duas estruturas completamente diferentes.

O próprio Gorbman (1955), resume o problema da seguinte maneira: foi uma forma infeliz ter sido o saco glandular sub-faríngeo da larva dos ciclóstomos, popularizado com o nome de endóstilo, causando confusão entre duas estruturas do mesmo nome.

Os primeiros dados negativos referentes ao endóstilo dos tunicados, foram dados por Cameron (1914-1915), que, fazendo análise química, encontrou grande quantidade de iodo na túnica, mas não no endóstilo.

A questão de homologia do endóstilo dos tunicados foi reaberta em 1956 e 1957 com os trabalhos de Barrington e Franchi e Barrington, descrevendo o acúmulo de iodo pelo endóstilo de *Ciona intestinalis* L.

Portanto, o problema da síntese tireóidea nos tunicados baseia-se nos trabalhos liderados por dois pesquisadores: Barrington, E. J. W. da Universidade de Nottingham — Inglaterra — e Roche, J. do College de France — Paris. Procuraremos descrever os trabalhos de ambos, as conclusões e nossas idéias a respeito.

Segundo a linha de trabalho de Roche, encontra-se o seguinte a respeito dos tunicados e, em particular, com *Ciona intestinalis* L.:

Os protocordados concentram iodo bastante ativamente como, por exemplo, em *Ciona*, a razão entre teor de iodo-131 no tecido e no meio é bem alta (15-20) Roche *et al.*, (1959).

A grande quantidade de iodo concentrado, cerca de 96%, acha-se, segundo este autor, na túnica, enquanto que o endóstilo possui somente 0,4% de iodo orgânico, sendo ainda a distribuição na túnica a seguinte: 50% na camada externa e 8,3% na camada interna (Roche *et al.*, 1961-1962).

Outro fato em favor da túnica ser o órgão responsável pela síntese de hormônio tireóideo, segundo Roche, prende-se ao fato de que os animais sem túnica possuem uma velocidade lenta de captação do iodo radioativo (Roche *et al.*, 1963-1964).

Alega também que, no endóstilo de *Ciona*, o único composto orgânico que conseguiu encontrar foi tiroxina livre (Roche *et al.*, 1962), enquanto que a camada interna da túnica contém iodotirosinas e iodotironinas.

De acordo com Roche (1962), os compostos iodados da túnica não estão livres e sim ligados, havendo aí três tipos de proteínas de acordo com a seguinte tabela reproduzida do mesmo autor:

iodoproteínas	% do iodo ¹³¹ orgânico total	Solúvel em soluções diluídas de sais	Solúvel em hidrólise enzimática	Compostos
Tg semelhante	5	+	+	T ₃ , T ₄ , MIT, DIT
“Particulate”	45	—	+	T ₃ , T ₄ , MIT, DIT
Escleroproteínas	50	—	—	MIT, DIT

Do mesmo grupo ligado a Roche, temos mais tarde o trabalho de Varrone *et al.* (1966) que estuda por ultra-centrifugação a camada interna da túnica de *Ciona* e descreve um pico semelhante a tireoglobulina; para este grupo, as conclusões são as seguintes:

1. Existe uma biossíntese hormonal em Tunicados.
2. Há uma grande concentração de iodo nestes animais.
3. Seria a túnica com seu epitélio interno (cutícula) a responsável pela produção de iodoproteínas hidrolisáveis enzimaticamente, liberando T₃ e T₄ e portanto a responsável pela biossíntese hormonal sendo que o endóstilo possui somente hormônio livre e portanto seria pouco provável ser aí o ponto de início da biossíntese.

Com relação ao trabalho do grupo de Roche, deve-se acrescentar o seguinte:

1. Seus trabalhos pioneiros são baseados em métodos de hidrólise enzimática que agora se sabe, produz grande deiodização de tiroxina (Rosemberg e La Roche, 1964), devido ao longo tempo usado e à enzima empregada. Assim, os mesmos autores não fizeram uma análise do tipo de proteína do endóstilo e sim somente da túnica (Varrone, 1966).

Portanto, são trabalhos que dão grande visão do fato, mas não excluem completamente a função do endóstilo ou outra região do corpo como órgão produtor de hormônios tireóideos, embora nos prove o papel importante da túnica neste processo.

O mesmo grupo de Roche indica que a biossíntese de hormônios tireóideos ocorre também em outros dois tunicados: *Clavelina lepadiformis* (M. Edw.) var. *rissoana*. (Salvatore, Vecchio e Macchia, 1960) e numa taliacea *Salpa maxima* Forskal (Roche, Rametta e Varrone, 1962).

Com relação aos cefalocordados, o mesmo grupo de Roche discute a formação de hormônios tireóideos pelo *Branchiostoma lanceolatum Pallas* (Amphioxus) (Covelli *et al.*, 1960) sendo a mesma identificação confirmada por Tong, Kerkof e Chaikoff (1962). Porém, nos cefalocordados a questão também não está resolvida, pois estes trabalhos provam somente a existência dos hormônios tireóideos e ainda mais, esta produção não está restrita ao endóstilo, tendo a própria notocorda e outros tecidos do corpo apresentado alto teor de hormônios tireóideos.

Portanto, o grupo de Roche conclui em favor da túnica dos Tunicados (camada interna) como a responsável pela biossíntese hormonal e nos cefalocordados dá a presença dos compostos mas, sua origem e o endóstilo como responsável principal, também não é conclusiva sendo portanto, nos cefalocordados para este grupo, um problema ainda aberto para pesquisa (Salvatore, 1969).

Agora, analisando os trabalhos do grupo de Barrington, chega-se às seguintes contribuições:

Tudo começou com o trabalho de Gorbman (1941) descrevendo a presença de um tecido capaz de concentrar iodo em *Ascidia*. Mais tarde, Barrington (1956) descreve a presença de iodo orgânico no endóstilo de *Ciona intestinalis L.* e depois o mesmo autor (1957) faz um estudo da distribuição e possível significado do iodo orgânico no mesmo animal (*Ciona intestinalis L.*)

Continuando seus trabalhos, o grupo de Barrington no trabalho de 1957 descreve os vários tipos de células do endóstilo e ainda diferencia quais são os mais capazes de organificar o iodo e quais as simplesmente secretoras de muco.

Assim, o problema do endóstilo dos tunicados como o precursor da glândula tireóidea é levantado por Barrington sendo defendido em seus três livros: *The Biology of Hemichordata and Protochordata* (1965), *An Introduction to General and Comparative Endocrinology* (1963) e *Perspectives in Endocrinology* (1968).

Continuando sua série de trabalhos, encontra-se (Barrington e Barron, 1960) a análise de iodo orgânico na túnica de *Ciona intestinalis* L. onde notam a presença de dois tipos de proteínas da cutícula, diferentes das restantes, de natureza glicoproteica associadas com carboidratos formando um complexo glicoproteico. Descreve ainda, a presença de duas categorias de substâncias na túnica: uma com grande número de ligações sulfrídricas e outra com um mecanismo de ligação quinônica.

Barrington (1958) ainda descreveu também a presença de iodo orgânico no endóstilo do *Branchiostoma*, estando assim, em concordância com os trabalhos de Roche (l.c.) no mesmo animal.

Em seqüência aos trabalhos, Barrington e Thorpe (1963) demonstraram a presença de iodo orgânico e fizeram a análise cromatográfica de extratos de *Saccoglossus* e da túnica de *Ciona intestinalis*, chegando à conclusão de haver no primeiro somente MIT e a presença de hormônios tireóideos na túnica de *Ciona*.

Os mesmos autores (Barrington e Thorpe, 1965) assinalam a ocorrência de iodo orgânico no endóstilo e faringe de *Ciona intestinalis* L. Neste trabalho, porém, analisaram somente o endóstilo, silenciando sobre a túnica do mesmo animal, o que, sem dúvida, o torna incompleto.

Continuando a série de trabalhos, Barrington e Thorpe (1965) admitem a possível identificação de MIT, DIT, e T₄ em *Ciona* e depois em 1968, analisam outro tunicado *Dendrodoa grossularia*, aventando a possibilidade da existência de hormônios neste outro Tunicado e fazendo o estudo bioquímico da túnica destes animais.

Portanto, em conclusão dos trabalhos de Barrington e col., o endóstilo seria o órgão em que se dá a concentração de iodo. Estes pontos de vista, são corroborados em alguns trabalhos clássicos de Zoologia (Whitear, 1957 e Bone, 1960).

Embora, os trabalhos de Barrington sejam de primeira qualidade sob o ponto de vista histológico e de revisão, ainda não foram

confirmados plenamente por outros pesquisadores, havendo muita controvérsia a respeito.

Assim, Godeaux (1963) diz que o endóstilo dos urocordados é capaz de realizar uma síntese rápida de hormônios tireóideos por processo análogo ao descrito nos Vertebrados, com o que plenamente concorda com Barrington.

Kennedy (1966) estuda também do ponto de vista histológico, a distribuição e a natureza dos compostos iodados nas Ascídias e chega á conclusão de ser o sangue o órgão que apresenta maior teor de iodo orgânico. O trabalho, porém, não é convincente e a base bioquímica fraca.

Olsson (1963) por sua vez, com trabalhos de alto teor crítico e grande precisão técnica, não conseguiu confirmar os trabalhos de Barrington no endóstilo de *Ascidia* e nas zonas descritas, como é o caso da zona 8 no endóstilo de *Ciona*. Olsson mostra serem estas células desprovidas de atividade secretória.

Continuando as pesquisas, Olsson (1965) descreve a citologia do endóstilo de *Oikopleura dioica* e, finalmente, (Olsson, 1969) faz uma revisão na endocrinologia dos protocordados e mixinoides, chegando às seguintes conclusões: o mecanismo de iodo ligado nos Tunicados ainda é muito obscuro e seriam necessárias maiores informações sobre a ligação do iodo e compostos formados nos diferentes tipos de endóstilos dos apendiculários.

Sendo um problema até agora ainda sem solução satisfatória, a questão de quando os hormônios tireóideos se tornam princípios ativos e em qual estágio de desenvolvimento destes animais.

O problema portanto, do endóstilo, ainda demanda mais informações, sendo que os trabalhos de Barrington representam apenas um ponto de vista a respeito, e por sinal muito controvertido e sem conclusão final.

Com relação à identificação dos hormônios, os trabalhos bioquímicos do grupo de Barrington aguardam confirmação, visto os cromatogramas não conduzirem à demonstração adequada. Parece não ser ainda possível aceitar as provas apresentadas, pois os artefatos de técnica, não estão excluídos e a presença real de substâncias hormonais não estar esclarecida.

Assim, do grupo de trabalho apresentado por Barrington, restará somente a visão controvertida da função do endóstilo e a identi-

ficação, embora imprecisa, dos hormônios em *Ciona* e a falta de identificação dos mesmos em *Dendrodoa*.

Esta visão imperfeita do endóstilo foi também defendida por mim (Amaral, 1969) ao verificar ser o mesmo mais sensível à ação de substâncias antitireóideas. Este trabalho, porém, é também passível de revisão, pois os antitireóideos não são específicos e falta ainda o estudo cromatográfico correspondente.

Portanto, analisando os próprios resultados aqui obtidos, poder-se-á afirmar o seguinte em relação ao Tunicado *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden):

São animais que concentram ativamente iodo, sendo o máximo de captação ao redor de 5 dias, o que confirma os resultados obtidos por outros pesquisadores (Roche *et al.*, 1959).

A identificação bioquímica da presença de tiroxina no corpo deste animal foi um dos objetivos deste trabalho, usando dois solventes diferentes e com padrões de substâncias ao lado, para não haver dúvidas na identificação (Figs. 23 e 24).

Além disso, pela primeira vez se identificou a tiroxina nestes animais (*Dendrodoa*) e ainda pela primeira vez se estudou a ação do hormônio exógeno na biossíntese hormonal destes Tunicados.

Em conseqüência, o hormônio exógeno causa um aumento na produção dos precursores hormonais (MIT e DIT) (Fig. 25) sendo porém este aumento da mesma ordem, tanto na túnica como no corpo dos animais tratados.

Com relação à produção de tiroxina marcada, os resultados aqui obtidos são inéditos. Demonstrou-se haver produção de T_4 (Fig. 27) tanto no corpo como na túnica, sendo seu teor de produção maior na túnica que no corpo.

A administração de hormônio exógeno causou efeitos diferentes: no corpo houve uma diminuição da produção de hormônio marcado provando haver no corpo um verdadeiro mecanismo de "feedback" no controle de sua síntese; na túnica, porém, a administração de hormônio exógeno causou um aumento marcante na produção de hormônio marcado.

Isto leva a crer que na túnica a ação seja apenas um efeito do hormônio tireóideo na síntese proteica (Tata, 1967) que sofreu um incremento devido à administração de hormônio exógeno, ao passo

que em alguma estrutura do corpo estaria o verdadeiro mecanismo da produção hormonal.

Finalmente a administração de substância anti-tireóidea bloqueia completamente a síntese dos hormônios e parcialmente a dos precursoros, o que concorda com os dados da literatura especializada (Pitt-Rivers, 1950; Iino *et al.*, 1961; Ingbar, 1955; Franklin *et al.*, 1944).

Logo, na base de um raciocínio analógico, poder-se-ia pretender que, no corpo, a T_4 exógena teria atuado como excesso de T_4 nos animais superiores que num "feed back" regula a sua própria produção pela glândula.

Mas esse raciocínio, obviamente não pode ser aplicado, no caso da túnica, admitida também como produtora e onde a T_4 exógena incrementou a produção local, a não ser que o mecanismo de produção de T_4 pela túnica seja diferente, num sentido de que mais T_4 (exógena) estimule mais produção local visando ao grande processo de crescimento que é a produção da túnica nesses animais.

5.

RESUMO E CONCLUSÕES FINAIS

I — *Captação e eliminação do Iodo-125:*

1. *Dendrodoa grossularia* capta ativamente o Iodo-125.
2. A captação alcança o seu pico máximo após 120 horas (5 dias).
3. Não há diferença significativa entre entrada de Iodo-125 e perda de Iodo-125 nos animais normais e nos tratados com tiroxina (Fig. 2 e 3).
4. O tiouracil bloqueia a captação do Iodo-125.

II — *Análise do hidrolisado de Dendrodoa usando a coluna de Sephadex-Gel-25-“Fine”:*

1. Existem substâncias precursoras hormonais tireóideas (MIT e DIT) (Fig. 6) e ainda a possível presença de L-tiroxina.
2. Há uma redução na síntese dos precursoros e do hormônio tireóideo nos animais tratados com hormônio exógeno (Fig. 7).

3. Nos animais tratados com tiouracil há um completo bloqueio da síntese hormonal tireóidea (Fig. 8).

III — *Análise por cromatografia em camada delgada do hidrolisado da túnica e do corpo de Dendrodoa grossularia* (Van Beneden).

1. Demonstrou-se a ocorrência de L-tiroxina no hidrolisado do corpo de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden) (Fig. 23 e 24).
2. Não foi possível detectar a presença de 3,5,3' triiodotironina no hidrolisado do corpo de animais normais (Fig. 23, 24, 26).
3. Há produção de moniodotirosina e diiodotirosina tanto no corpo como na túnica dos animais em estudo (Fig. 25).
4. O teor de produção de MIT e DIT é maior na túnica que no corpo dos animais normais (Fig. 25).
5. O tratamento com tiroxina exógena incrementa a produção de MIT e DIT, sendo, porém, este incremento percentualmente igual ($\approx 50\%$) para a túnica e para o corpo dos animais tratados em relação aos normais (Fig. 25).
6. Há produção de L-tiroxina marcada tanto no corpo como na túnica dos animais normais (Fig. 27).
7. A produção de L-tiroxina marcada é maior na túnica que no corpo dos animais normais (Fig. 27).
8. A administração de tiroxina exógena causou efeito diferente no corpo e na túnica dos animais tratados (Fig. 27).
9. No corpo dos animais tratados com tiroxina exógena houve uma redução de 34,1% na produção de tiroxina marcada em relação ao corpo dos animais normais.
10. Na túnica dos animais tratados com tiroxina exógena houve, pelo contrário, um aumento marcante, cerca de 224% na produção de tiroxina marcada em relação a produção da túnica dos animais normais (Fig. 27).
11. A administração de tiouracil bloqueou quase que completamente a síntese de MIT e DIT tanto no corpo como na túnica dos animais tratados (Fig. 25).

12. A administração de tiouracil bloqueou completamente a produção de tiroxina marcada tanto no corpo como na túnica dos animais tratados.

6.

BIBLIOGRAFIA

- AMARAL, A. D. — 1969 — Metabolismo do iôdo e bloqueio pelo 6 propil 2 tiouracil em Tunicados. *Ascidia nigra* (Savigny) 1816. Bol. Fac. Fil. Cien. Letr. Univ. S. Paulo, n.º 324 Zool. e Biol. Mar. N. S. n.º 26: 255-293.
- ANTHEUNISSE, L. J. and Lever, J. — 1956 — J-131 Accumulation in some invertebrates. Koninkl Nederl. Akademie Van Wetenschappen - Amsterdam, Reprinted from Proc. Ser. C, 59, (4): 562-565.
- BARRINGTON, E. J. W. — 1957 — The distribution and significance of organically bound iodine in the ascidian *Ciona intestinalis* L. J. Mar. biol. Ass. U. K., 36: 1-16.
- BARRINGTON, E. J. W. — 1958 — The localization of organically bound iodine in the endostyle of *Amphioxus*. J. Mar. biol. Ass. U. K., 37: 117-126.
- BARRINGTON, E. J. W. — 1962 — Hormones and Vertebrate Evolution. *Experimentia*, 18 (5): 201-210.
- BARRINGTON, E. J. W. — 1963 — An introduction to general and Comparative Endocrinology: Some evolutionary aspects of thyroïdal biosynthesis. pp. 179-183. Clarendon. Press Oxford.
- BARRINGTON, E. J. W. — 1964 — Hormones and Evolution. 154 pp. The English Universities Press Ltd.
- BARRINGTON, E. J. W. — 1965 — The biology of hemichordata and protochordata. 176 p. illus. San Francisco, W. H. Freeman.
- BARRINGTON, E. J. W. and Barron, N. — 1960 — On the organic binding of iodine in the tunic of *Ciona intestinalis*. J. Mar. biol. Ass. U. K., 39: 513-523.
- BARRINGTON, E. J. W. and Franchi, L. L. — 1956 — Organic Binding of Iodine in the Endostyle of *Ciona intestinalis*. *Nature*, 177: 432.
- BARRINGTON, E. J. W. and Franchi, L. L. — 1956 — Some cytological characteristics of thyroïdal function in the endostyle of the Ammocoete larva. *Quart. J. micr. Sci.* 97: 393-409.
- BARRINGTON, E. J. W. and Jorgensen, C. B. — 1968 — Perspectives in Endocrinology — Academic Press — London and New York.
- BARRINGTON, E. J. W. and Thorpe, A. — 1963 — Comparative observations on iodine binding by *Saccoglossus horsti* Brambell and Goodhart, and by the Tunic of *Ciona intestinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3: 166-175.
- BARRINGTON, E. J. W. and Thorpe, A. — 1965 — An autoradiographic study of the binding of iodine in the Endostyle and Pharynx of the Ascidian, *Ciona intestinalis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5: 373-385.
- BARRINGTON, E. J. W. and Thorpe, A. — 1965 — The identification of moniodotyrosine diiodotyrosine and thyroxine in extracts of the endostyle of the Ascidian *Ciona intestinalis* L. *Proc. Roy. Soc., B*, 163: 136-149.

- BARRINGTON, E. J. W. and Thorpe, A. - 1968 - Histochemical and biochemical aspects of iodine binding in the tunic of the Ascidian, *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden). Proc. Roy. Soc., B., 171: 91-109.
- BERG, O., Gorbman, A. and Kobayashi, H. — 1959 — The thyroid hormones in invertebrates and lower vertebrates in: Comparative Endocrinology, pp. 302-319. John Wiley, New York.
- BJÖRKSTEN, F., Grasbeck, R. and Lamberg, B. A. — 1961 — Methods for the Paper Chromatographic and Paper Electrophoretic Separation of Iodide, Iodotyrosines, Iodothyronines and their Derivates. Acta chem. scand., 15: 1165-1176.
- BLAU, N. F. — 1933 — The determination of thyroxine in the thyroid gland. J. Biol. Chem., 102: 269-278.
- BLAU, N. F. — 1935 — The determination of thyroxine in thyroid substance. J. Biol. Chem., 110: 351-363.
- BONE, Q. — 1960 — The origin of chordates. The Linn. Soc. Lond., Zool. 44 (297): 252-269.
- CAMERON, A. T. — 1914 — Contributions to the biochemistry of iodine. I. The distribution of iodine in plant and animal tissues. J. Biol. Chem., 18: 335-380.
- CAMERON, A. T. — 1915 — Contributions to the biochemistry of Iodine II. The distribution of iodine in plant and animal tissues. J. Biol. Chem., 23 (1): 1-39.
- CLEMENTS MERLINI, M. — 1960 — The secretory cycle of iodoproteins in Ammocoetes. II. A radioautographic study of the transforming larval thyroid gland. J. Morphol., 106: 357-364.
- CLEMENTS MERLINI, M. — 1960 — The secretory cycle of iodoproteins in Ammocoetes. I. A radioautographic time study of subpharyngeal gland. J. Morphol., 106: 337-356.
- CLEMENTS MERLINI, M. and Gorbman, A. — 1955 — Protease in Ammocoetes endostyle. Biol. Bull., 108: 258-263.
- COVELI, I., Blasi, F. & Tommaselli, A. — 1960 — Sur la dégradation de la 3:5:3' triiodo-L-thyronine par l'hépatopancreas de la Moule (*Mytilus galloprovincialis* L.) et du Poulpe (*Octopus vulgaris* L.) C. R. Soc. Biol., Paris, 154: 1225-1228.
- COVELLI, I., Salvatore, G., Sena, L. et Roche, J. — 1960 — Sur la formation d'hormones thyroïdiennes et de leurs précurseurs par *Branchiostoma lanceolatum* Pallas (*Amphioxus*). C. R. Soc. Biol., Paris, 154 (6): 1165-1169.
- CRAIG, L. C. and Gregory, J. D. and Hausmann, W. — 1950 — Versatile laboratory concentration device. Anal. Chem., 22: 1462.
- DEVLIN, W. F. and Stephenson, N. R. — 1962 — The chemical determination of liothyronine and thyroxine in enzymic hydrolysates of pork thyroid. J. Pharm. Lond., 14: 597-604.
- DODD, J. M. and Matty, A. J. — 1964 — Comparative aspects of thyroid function in: Pitt-Rivers, R. & Trotter, W. R. — The thyroid gland, 1: 303-356. Butterworths, London.
- DOHRN, A. — 1886 — Thyroidea bei *Petromyzon*, *Amphioxus* und den Tunicaten. Mitt. Zool. Sta. Neapel, 6: 49-92.
- FAIRCLOTH, M. A., Williams, A. D. and Florsheim, W. H. — 1965 — A thinlayer Chromatographic method for the analysis of thyroidal Iodoamino Acids. Analyt. Biochem., 12: 437-443.
- FAVINO, A., Emrich, D. and Mühlen, A-V. Z. — 1967 — Separation and quantitative determination of ^{131}I -Triiodothyronine and ^{131}I -

- thyroxine in human plasma by thin-layer chromatography. *Acta Endocr.*, 54: 362-374.
- FONTAINE, M. — 1954 — Du déterminisme physiologique des Migrations. *Biol. Rev.*, 29: 390-418.
- FRANKLIN, A. L., Lerner, S. R. and Chaikoff, I. L. — 1944 — The effect of thiouracil on the formation of thyroxine and diiodotyrosine by the thyroid gland of the rat with radioactive iodine as indicator. *Endocrinology*, 34: 265.
- FREY, H. — 1964 — Application of thin-layer chromatography to the quantitative determination of thyroid gland products. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 16: 470-472.
- GMELIN, R. and Virtanen, A. I. — 1959 — A sensitive colour reaction for the Paper Chromatographic Detection of Iodide, Iodinated Tyrosines and Thyronines. *Acta. chem. Scand.*, 13: 1469-1470.
- GODEAUX, J. — 1963 — Tuniciers: Embryologie, Histologie et Morphologie (1958-1961), *Forstschr. Zool.*, 16: 333-394.
- GORBMAN, A. — 1941 — Identity of an iodine-storing tissue in an ascidian. *Science*, 94 (2434): 192.
- GORBMAN, A. — 1965 — Some aspects of the comparative biochemistry of iodine utilization and the evolution of thyroidal function. *Physiol. Rev.*, 35 (2): 336-346.
- GORBMAN A. — 1969 — Thyroid function and its control in fishes, in: Hoar W. S. and Randall, D. J. — *Fish physiology*, 2: 241-274.
- GORBMAN, A. and Bern, H. A. — 1969 — A textbook of comparative endocrinology, John Wiley & Sons, New York. 468 p.
- GORBMAN, A., Clements, M. and O'Brien, R. — 1954 — Utilization of radiiodine by invertebrates, with special study of several annelida and mollusca. *J. Exp. Zool.*, 127: 75-92.
- GORBMAN, A. and Creaser, C. W. — 1942 — Accumulation of radioactive iodine by the endostyle of larval lampreys and the problem of homology of the thyroid. *J. Exp. Zool.*, 89: 391-405.
- GROSS, J. and Pitt-Rivers, R. — 1954 — Triiodothyronine in Relation to Thyroid Physiology. *Recent Progr. — Hormone Res.*, 10: 109-128.
- GUDERNATSCH, J. F. — 1912 — Feeding experiments on tadpoles. *Arch. Entw. Mech. Org.*, 35: 457.
- HEIDER, J. G. and Bronk, J. R. — 1965 — A rapid separation of thyroxine and some of its analogues by thin-layer chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 95: 353-355.
- HICKMAN, Jr. C. P. — 1959 — The osmoregulatory role of the thyroid gland in the starry founder, *Platichthys stellatus*. *Canad. J. Zool.*, 37: 997-1060.
- HOLLINGSWORTH, D. R., Dillard, M. and Bondy, P. K. — 1963 — Separation of iodoaminoacids and related compounds by thin-layer chromatography. *J. Lab. clin. Med.*, 62: 346-350.
- HUNTER, A. — 1910 — The determination of small quantities of iodine, with special reference to the iodine content of the thyroid gland. *J. Biol. Chem.*, 7: 321-349.
- HYMAN, L. H. — 1942 — Comparative anatomy of vertebrates. 2nd. ed. Univ. of Chicago Press. Chicago Illinois. 544p.
- IINO, S., Yamada, T. and Greer, M. A. — 1961 — Effect of graded doses of propylthiouracil on biosynthesis of thyroid hormones. *Endocrinology*, 68: 582-588.
- INGBAR, S. H. — 1955 — The influence of single doses of propylthiouracil on the Kinetics of iodine accumulation by the thyroid

- glands of normals and hyperthyroid subjects. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 15: 331-342.
- INOUE, K. — 1966 — Studies on Deiodination Occuring During Pancreatin Digestion of Thyroid Homogenates and its Prevention by Methimazole. *Endocrinology*, 79: 601-607.
- INOUE, K. and Taugog, A. — 1967 — Digestion of ¹³¹I-labeled thyroid tissue with maximum recovery of ¹³¹I-Iodothyronines. *Endocrinology*, 81: 319-332.
- JORGENSEN, C. B. and Larsen, L. O. — 1961 — Molting and its hormonal control in toads. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1: 145-153.
- KENDALL, E. C. — 1914 — The determination of iodine in connection with studies in thyroid activity. *J. Biol. Chem.*, 19: 251-256.
- KENNEDY, G. R. — 1966 — The distribution and nature of iodine compounds in Ascidians. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 7: 500-511.
- KERKOF, P. R., Tong, W., Chaikoff, I. L. — 1963 — I-131 utilization by Salamanders: *Tarich*, *Amphiuma* and *Necturus*. *Endocrinol.*, 73: 185-192.
- KOBAYASHI, H. — 1958 — On the induction of molt in birds by 17 oxy-progesterone-17 capronate. *Endocrinology*, 63: 420-430.
- LAURENT, T. C. and Killander, J. — 1964 — A theory of Gel filtration and its experimental verification, *J. Chromatog.*, 14: 317-330.
- LEACH, J. W. — 1939 — The endostyle and the thyroid gland of the brook lamprey *Ichthyomyson fossor*. *J. Morph.*, 65: 549-605.
- LEACH, J. W. — 1944 — The archetypal position of amphioxus and ammocoetes and the role of endocrines in chordate evolution. *Amer. Nat.*, 78: 341-357.
- LELAND, J. P. and Foster, G. L. — 1932 — A method for the determination of thyroxine in the thyroid. *J. Biol. Chem.*, 95: 165-179.
- LELOUP, J. and Berg. O. — 1954 — Sur la présence d'acides aminés iodés (monoiodotyrosine, diiodotyrosine et thyroxine) dans l'endostyle de l'Ammocoete. *C. R. Acad. Sci. D.*, 238: 1069-1071.
- LELOUP, J. and Fontaine, M. — 1960 — Iodine metabolism in lower vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 86: 316-353.
- LEMMON, R. M., Tarpey, W. and Scott, K. G. — 1964 — Separation of ¹³¹I labelled monoiodotyrosine and diiodotyrosine by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.*, 14: 516-517.
- MAN, E., Kydd, D. M. and Peters, J. P. — 1951 — Butanol Extractable iodine of serum. *J. clin. Invest.*, 30: 531-538.
- MANDL, R. H. and Block, R. J. — 1959 — Methods for the Qualitative, semiquantitative and Quantitative Determination of Iodoamino Acids and of Inorganic Iodide in Iodoprotein digests and in Human Serum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 81: 25-35.
- MURRAY, E. V. — 1955 — An all-glass rotary film evaporator. *Analyt. Chem.*, 27: 1207.
- OLSSON, R. — 1963 — Endostyles and endostylar secretions: A comparative histochemical study. *Acta Zool. Stockh.*, 44: 299-338.
- OLSSON, R. — 1965 — The citology of the endostyle of *oikopleura dioica*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 118 (24): 1038-1051.
- OLSSON, R. — 1969 — General Review of the endocrinology of the protochordata and myxinoidea. *Gen. comp. Endocrinol.*, 2: 485-499.
- OSBORN, R. H. & Simpson, T. H. — 1968 — Gel filtration of iodoaminoacids. *J. Chromatog.*, 34: 110-111.
- OSBORN, R. H. and Simpson, T. H. — 1968 — Quantitative scanning of ¹²⁵I on thin-layer chromatograms. *J. Chromatog.*, 35- 436-440.

- OSBORN, R. H. and Simpson, T. H. — 1969 — The characterisation of iodoaminoacids and their derivatives by thin layer chromatography. *J. Chromatog.*, **40**: 219-224.
- OSBORN, R. H. and Simpson, T. H. — 1969 — The sites of iodine accumulation and the iodoamino acids in the plasma of plaice (*Pleuronectes platessa* L.), *J. Endocrin.*, **43**: 643-650.
- PATTERSON, S. J. and Clements, R. L. — 1964 — The application of Paper and thin-layer Chromatography to the Identification in a Feeding stuff Additive. *Analyst*, **89**: 328-331.
- PITT-RIVERS, R. — 1950 — Mode of Action of Antithyroid Compounds. *Physiol. Rev.*, **30**: 194-205.
- PITT-RIVERS, R. — 1950 — The chemical Assay of Thyroxine and other substances with thyroidal activity, in: Emmens, C. W. — *Hormone Assay*, 513-542. Academic Press, New York.
- PITT-RIVERS, R. — 1963 — Biochemistry and Physiology of Thyroid Hormones. *N. Y. St. J. Med.*, **63** (1): 43-49.
- PITT-RIVERS, R. and Cavaliere, R. R. — 1962 — The free iodotyrosines of thyroid. *Biochem. J.*, **83** (3): 25-26.
- PITT-RIVERS, R. and Cavaliere, R. R. — 1963 — The Free iodotyrosines of the rat thyroid gland. *Biochem. J.*, **86**: 86-92.
- PITT-RIVERS, R. & Trotter, W. R. — 1964 — The thyroid Gland., I-II. Butterworths. London.
- POSTMES, Th. — 1963 — A sensitive simple quantitative reaction for iodinated amino acids of human serum on paper chromatograms. *Acta Endocr.*, Copenhagen, **42**: 153-162.
- POSTMES, Th. — 1964 — Differentiation between iodine an non-iodine spots on paper chromatograms during the microquantitative determination of the iodinated amino acids of human serum. *Clin. Chim. Acta*, **10**: 581-583.
- ROCHE, J. — 1952 — Biochimie comparée des scléroprotéines iodées des Anthozoaires et des Spongiaires, *Experientia*, **8** (2): 45-54.
- ROCHE, J. et André, S. — 1962 — étude radioautographique de la fixation de l'iode (I^{131}) par des Algues Marines. *C. R. Soc. Biol.*, **156** (2): 1968-1971.
- ROCHE, J., André, S. et Covelli, I. — 1960 — Sur la fixation de l'iode par la Moule (*Mytilus galloprovincialis* L.) et la nature des combinaisons iodées élaborées. *C. R. Soc. Biol.*, **154**: 2201-2206.
- ROCHE, J., André, S. et Covelli, I. — 1962 — Sur la fixation et l'assimilation de l'iode (I^{131}) par un Bryozoaire, *Bugula neritina* L. *C. R. Soc. Biol.*, **156** (2): 1817-1822.
- ROCHE, J. et Jouan, P. — 1956 — Sur la présence de 3:5:3' — triiodothyronine dans une gorgonine. *C. R. Soc. Biol.*, **150** (10): 1701-1703.
- ROCHE, J. and Michel, R. — 1955 — Nature, Biosynthesis & Metabolism of Thyroid Hormones. *Physiol. Rev.*, **35**: 583-610.
- ROCHE, J. and Michel, R. — 1963 — Peptide and protein hormones, in: Florkin, M & Stotz, E. — *Comprehensive biochemistry*, **8**: 75-92.
- ROCHE, J., Rametta, G. et Varrone, S. — 1962 — Sur la présence d'hormones thyroïdiennes chez un Tunicier pélagique, *Salpax maxima* Forskal. *C. R. Soc. Biol.*, **156** (2): 1964-1968.
- ROCHE, J., Rametta, G. and Varrone, S. — 1963 — Sur la fixation et le métabolisme de l'iode au cours de la régénération de la tunique chez une Ascidie, *Ciona intestinalis* L., *C. R. Soc. Biol.*, **157**: 16-20.

- ROCHE, J., Rametta, G. et Varrone, S. — 1964 — Métabolisme de l'iode et formation d'iodothyronines (T_3 et T_4) au cours de la régénération de la tunique chez une Ascidie, *Ciona intestinalis* L., Gen. Comp. Endocrinol., 4: 277-284.
- ROCHE, J., Salvatore, G., Rametta, G. — 1962 — Sur la présence et la biosynthèse d'hormones thyroïdiennes chez un tunicier, *Ciona intestinalis* L. Biochim. Biophys. Acta, 63: 154-165.
- ROCHHE, J. Salvatore, G. Rametta, G. and Varrone, S. — 1959 — Sur la présence d'hormones thyroïdiennes (3:5:3' triiodothyronine et thyroxine) chez un tunicier, *Ciona intestinalis* L. C. R. Soc. Biol. 153: 1751-1757.
- ROCHE, J., Salvatore, G., Rametta, G. et Varrone, S. — 1961 — Iodoprotéines et biosynthèse d'hormones thyroïdiennes chez un tunicier, *Ciona intestinalis* L., C. R. Soc. Biol., 155 (7): 494-1501.
- ROCHE, J., Salvatore, G., Sena, L., Aloj, S., and Covelli, I. — 1968 — Thyroid iodoproteins in vertebrates ultracentrifugal pattern iodination rate. Comp. Biochem. Physiol., 27: 67-82.
- ROCHE, J., Yagi, Y., Michel, R., Lissitzky, S. et Eysseric-Lafon, M. — 1951 — Sur la caractérisation de la monobromotyrosine et la thyroxine dans les gorgonines. Bull. Soc. Chim. Biol., 33 (5-6): 526-531.
- ROSEMBERG, L. L. e La Roche, G. — 1964 — Determination of iodoamino acid composition of Rat Thyroidal Iodoprotein: Some Sources of Serious Error. Endocrinology, 75: 776-786.
- RESEMBERG, L. L., La Roche, G. and Ehlert, J. M. — 1966 — Evidence for heterogeneous turnover of iodine in Rat thyroid glands. Endocrinology, 79: 927-934.
- SALVATORE, G. — 1969 — Thyroid hormone Biosynthesis in Agnatha and Protochordata, Gen. Comp. Endocrinol., Supl. (2): 535-552.
- SALVATORE, G., Sena, L., Covelli, I. and Salvatore, M. — 1965 — Les iodoprotéines thyroïdiennes 12S, 19S and 27S chez divers Mammifères et leur signification physiologique. C. R. Acad. Sci., D., 260: 6227-6229.
- SALVATORE, G., Vecchio, G. et Macchia, V. — 1960 — Sur la présence d'hormones thyroïdiennes chez un Tunicier, *Clavelina lepadiformis* (M. Edw.) var. rissoana. C. R. Soc. Biol., 154 (7): 1380.
- SHAPIRO, O. and Gordon, A. — 1966 — An Improved Method for Separation of Radioactive Thyroid hormone Metabolites by Thin-layer Chromatography. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121: 577-579.
- SISSON, J. C. — 1965 — Principles of, and Pitfalls in, Thyroid Function Tests, J. Nucl. Med., 6 (12): 853-901.
- SOFTANIDES, T., Meloni, C. R., Alger, E. and Canary, J. J. — 1966 — Separation and Quantitative Recovery of Iodinated Amino Acids and Iodide by Thin-layer Chromatography. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123: 646-650.
- TATA, J. R. — 1967 — The formation and distribution of ribosomes during hormone-induced growth and development. Biochem. J., 104: 1-16.
- TONG, W. and Chaikoff, I. L. — 1958 — Hydrolysis of ^{131}I Thyroproteins by pancreatic enzymes. J. Biol. Chem., 232: 939-950.
- TONG, W., Kerkof, P. and Chaikoff, I. L. — 1962 — Identification of labelled thyroxine and triiodothyronine in *Amphioxus* treated with ^{131}I . Biochem. Biophys. Acta, 56: 326-331.
- TONG, W., Raghupathy, E. and Chaikoff, I. L. — 1963 — Recovery of Thyroxine from Thyroid Protein Hydrolyses with Pancreatic and Bacterial Proteases. Endocrinology, 72: 931-935.

- VARRONE, S., Macchia, V., Roche, J. — 1966 — Recherches sur les iodoprotéines d'un Tunicier: *Ciona intestinalis* L., C. R. Soc. Biol., 3: 544-546.
- WEST, C. D., Wayne, A. W. and Chavré, V. J. — 1965 — Thin layer Chromatography for thyroid hormones. *Analyt. Biochem.*, 12: 41-48.
- WHITEAR, M. 1957 — Some remarks on the Ascidian affinities of vertebrates. *Ann. Mag. nat. Hist.*, 10: 338-348.
- ZAPPI, E. — 1967 — Group separation of an aqueous solution of some iodinated amino-acids and derivatives by means of solvent extraction. *J. Chromatog.*, 30: 611-613.
- ZAPPI, E. — 1967 — Application of the FFCA-reaction for the detection of thyroid hormones and iodinated derivatives to thin-layer chromatography. *J. Chromatog.*, 31: 241-242.
- ZAPPI, E. and Bublitz, G. — 1968 — Combined chemical and isotopic detection of iodoamino acids in thin-layer chromatography. *J. Chromatog.*, 35: 441-445.

