

# METABOLISMO DO IÓDO E BLOQUEIO PELO 6-PROPIL-2-TIOURACIL EM TUNICADOS

*Ascidia nigra* (Savigny), 1816

*Ary Domingos do Amaral*

Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Centro de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo e Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo.

## ÍNDICE

1. Introdução .....	258
2. Material e métodos .....	261
3. Resultados .....	267
4. Tabelas .....	268
5. Análise Estatística dos resultados experimentais .	275
6. Discussão .....	281
7. Conclusões .....	288
8. Bibliografia .....	290

## IODINE METABOLISM AND BLOCKADE BY 6-PROPIL-2-TIOURACIL BY TUNICATES

*Ascidia nigra* (Savigny), 1816

**RESUMO** — A pesquisa em *Ascidia nigra* sôbre a síntese de proteínas e hormônios iodados em grupos de animais normais e animais prèviamente bloqueados pela incubação em 6-propil-2-tiouracil, deu como resultado os seguintes valores:

1. Taxa de captação de  $^{131}\text{I}$  pela massa visceral total do corpo.
  - 1.1 Redução de 51,8% desta taxa nos animais bloqueados em relação aos normais;
  - 1.2 Redução de 33,6% do  $\text{PBI}^{131}$  nos bloqueados em relação aos normais;

- 1.3 Redução de 78,7% do BEI<sup>131</sup> nos bloqueados em relação aos normais.
2. Taxa de captação do <sup>131</sup>I pela túnica total: Redução de 66,7% nos bloqueados.
3. Taxas de captação de <sup>131</sup>I pelas várias regiões dos animais, sifão oral, sifão anal, endóstilo, coração, cesta brânquial, rim de acumulação e intestino, gônadas: Há redução acentuada (ao redor de 75%) nos animais bloqueados, porém o teste de Tukey revela que os valores médios em tôdas as regiões foram reduzidos homogeneamente, com exceção das gônadas que apresentam variações e que se acredita sejam estacionais.
4. Taxas de captação de <sup>131</sup>I por grama de tecido nas diversas regiões citadas no item 3. Nota-se redução acentuada (também ao redor de 75% em tôdas as regiões) revelando-se, porém, pelo teste de Tukey, que êste bloqueio é mais acentuado na região do endóstilo.
5. Conclui-se, portanto, que o metabolismo do iôdo em **Ascidia nigra** segue a mesma seqüência hormonal básica encontrada em outros cordados.
6. O 6-propil-2-tiouracil age como droga bloqueadora, principalmente da síntese de T3 e T4, sendo êste bloqueio mais acentuado na região do endóstilo, o que leva a admitir êste órgão como precursor funcional da tireóide dos Vertebrados.

**ABSTRACT** — Synthesis of proteins and iodinated hormones in a Tunicate **Ascidia nigra** (Savigny) 1816, and the comparison of one group of normal and other blockaded with 6-propil-2-tiouracil were studied and supported following. Conclusions:

- I — Up-take of <sup>131</sup>I by the total visceral mass of the body of **Ascidia nigra**:
  - a — Reduction of 51,8% in blockade animals in relation to normals in the same condition.
  - b — Reduction of 33,6% in the P.B.I.<sup>131</sup> in blockade animals in relation to normals.
  - c — Reduction of 76,7% in the B.E.I.<sup>131</sup> in blockade animals in relation to normals.

II — Up-take of  $^{131}\text{I}$  by the total tunic of **Ascidia nigra**: Reduction of 66,7% in blockade animals in relation to normal.

III — Up-take of  $^{131}\text{I}$  by various regions of the body — oral siphon, anal siphon, endostyle, heart, branchial sacs, kidney of accumulation and intestine, gonads: Reduction of 75% in the blockade animals, but the Tukey test showed that the reduction was homogeneal in all regions excepts the gonads (seasonal variations).

IV — Up-take  $^{131}\text{I}$  per gram of tissue in various regions (same of item III) of the body of **Ascidia nigra**: A great reduction too, around 75%, but the Tukey test showed that the blockade is only more remarkable in the endostyle.

CONCLUSIONS — 1. The metabolism of iodine in the Tunicate **Ascidia nigra** is identical of that found in all vertebrates. 2. The 6-propil-2-tiouracil in this animals blocks the synthesis of Thyroxine (T4) and 3,5,3', tri-iodotironine (T3) and the blockade is more intense in the Endostyle an organ probable precursor of the Thyroid gland.

## 1.

### INTRODUÇÃO

Embora date de mais de um século o conhecimento sobre o teor de iodo no homem em relação com as funções da tireóide, somente nestas últimas décadas é que, principalmente pela aplicação dos isótopos radioativos, puderam esclarecer-se alguns mecanismos desta importante função, em especial nos Vertebrados.

Quanto aos Invertebrados, a capacidade de síntese de hormônios iodados foi intensamente investigada entre outros por ROCHE (1952, p. 45), GORBMAN (1955, p. 336), ROCHE e JOUAN (1956, p. 1701), LELOUP e FONTAINE (1960, p. 316) e, não obstante, ainda é um dos temas que apresenta numerosos pontos à espera de estudos acurados para o necessário esclarecimento. As substâncias iodadas nesses animais seriam apenas esclero-proteínas iodadas inertes ou proteínas com capacidade de acumular hormônios iodados hidrolizáveis de acordo com a necessidade do animal.

A presença de tecido tireóideo típico, isto é, um tecido epitelial de origem ectodérmica do tipo vesicular, formando folículos, como na glândula tireóide, aparece bem caracterizada na escala zoológica somente a partir dos Ciclostomos e Teleóteos (GORBMAN e BERN, 1962, p. 100), em pequenas vesículas esparsas na região da faringe. Já em 1965, GORBMAN (p. 343) admitia que os sacos em que se formam as iodo-proteínas perdem seu duto e tornam-se verdadeiros órgãos endócrinos quando seu conteúdo é lançado diretamente no sangue.

Estudando os Cordados, GORBMAN (1954, p. 3), indica o endóstilo, estrutura ciliada da região média do fa-

rínge do Amphioxus e dos Tunicados como anatomicamente homólogo à tireóide, mas esta homologia ainda é duvidosa. Sem dúvida é um dos órgãos de alta capacidade de concentração do iôdo.

De modo especial, relativamente aos Tunicados — os Cordados mais estudados quanto ao metabolismo do iôdo e à biossíntese hormonal — são dignas de referência as pesquisas de SALVATORE, VECCHIO e MACCHIA (1960, p. 1380) em *Clavelina lepadiformis*, as de ROCHE, RAMETTA e VARRONE (1962, p. 1964) em *Salpa maxima* Forskal e ainda os mais recentes destes mesmos autores (1964, p. 277) em *Ciona intestinalis* L. e, finalmente, as de BARRINGTON (1964, p. 23) que demonstraram a existência do mecanismo da hormoniogênese com o emprêgo do iôdo radioativo.

Quanto aos Cefalocordados, citam-se os trabalhos de COVELLI, SALVATORE, SENA e ROCHE (1960, p. 1165), em *Branchiostoma lanceolatum* (Amphioxus) em que foi demonstrada a presença de um centro de iodação protéica no endóstilo, posteriormente confirmada por BARRINGTON (1962, p. 202). O endóstilo é reconhecido como auxiliar para tomada de alimento (HUUS, 1937, p. 588) portanto pertencente ao trato digestivo.

Por sua vez, ROCHE, SALVATORE e RAMETTA (1962, p. 164) chegaram à conclusão de que o mecanismo da hormoniogênese parece idêntico em todos os Cordados (Urocordados, Cefalocordados e Vertebrados), observando-se o início da síntese hormonal tireoidea a partir dos Urocordados.

Há, porém, restrições quanto à função dos endóstilo, o qual não seria um órgão com função tireoidea típica, tendo sido demonstrado em seu epitélio apenas um centro de iodação protéica (GORBMAN 1941, p. 192; BARRINGTON 1962, p. 203) e outro na túnica (ROCHE, SALVATORE e RAMETTA 1962, p. 154).

Estes dados colhidos na bibliografia recente levam, portanto, a admitir ser ainda duvidosa a existência de um tecido de função tireoidea nos Protocordados, e, na opinião dos autores citados, a presença de uma estrutura tireoidea nesses animais está a exigir novos estudos. DODD e MATTY (1964, p. 305), no entretanto, asseveram categoricamente que o endóstilo é o progenitor da glândula tireóide.

As informações colhidas na bibliografia sobre as funções do endóstilo não são concordes. Por outro lado, e como se verá no decorrer do presente trabalho, não é esse órgão o único capaz de concentrar o iôdo. Nos Tunicados o endóstilo é um órgão característico e além desse órgão, outros existem nestes animais que seriam capazes de tal concentração. Pareceu, pois, de interesse investigar este importante tema, na expectativa de procurar confirmar ou não ser o endóstilo o precursor da tireóide. Assim, por sugestão do Prof. Paulo Sawaya e da Profa. Dra. Verônica Rapp de Eston, fui levado a tratar deste problema, principalmente com o intuito de tentar dirimir as dúvidas que ainda permanecem quanto à existência de uma verdadeira função tireoidea nestes animais (Tunicados).

No decorrer destes estudos, de conformidade com a moderna bibliografia a respeito, verifiquei outros pontos importantes ainda não esclarecidos, principalmente no que se refere ao metabolismo do iôdo na túnica que reveste a massa visceral e em outros órgãos internos. Graças às facilidades que me foram concedidas pelo Instituto de Biologia Marinha e pelo Centro de Medicina Nuclear, ambos da Universidade de São Paulo, foi possível atacar estes problemas com a moderna técnica dos isótopos radioativos. Parece-me que pela primeira vez, se faz o estudo das funções endócrinas nos Tunicados com o bloqueio da função tireoidea pelo 6-propil-2-tiou-racil.

Assim, no presente trabalho tratarei dos seguintes tópicos:

1. avaliação do metabolismo do iôdo na massa visceral total do corpo, em tôda a túnica de *Ascidia nigra*, um dos Tunicados mais freqüentes do litoral do Estado de São Paulo;
2. verificação do metabolismo iódico e os respectivos valores médios em cada um dos diferentes órgãos da massa visceral do animal;
3. determinação das alterações do metabolismo iódico após tratamento do animal por 6-propil-2-tiouracil, um dos reconhecidos bloqueadores da função tireóidea.

## 2.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1. *Material*

As *Ascidia nigra* (Savigny), 1816 provieram do litoral paulista, região de São Sebastião, coletadas nos meses de janeiro a outubro.

Como se sabe, êstes Tunicados vivem no litoral inferior aderentes aos diversos substratos, principalmente rochas, suportes de cais e de flutuadores. Assim são encontrados no litoral de São Sebastião, nos arredores dos laboratórios mantidos pelo Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, localizados na praia do Segredo (23° 48' 7" S; 46° 23' 29" W).

Colhidos nas diversas praias, foram levados para o laboratório e aí mantidos com água salgada corrente. São animais que vivem bem nestas condições, aderindo por vêzes às paredes dos aquários.

Utilizaram-se sempre animais adultos, de grande porte. As experiências efetuavam-se à temperatura ambiente que se manteve ao redor de 20° C.

### 2.2.1. *Técnica Geral*

Logo após a coleta, os animais eram lavados com água do mar artificial, segundo PANTIN (1948, p. 63), isenta de iôdo, a fim de se removerem os detritos aderentes.

Tôdas as experiências foram feitas simultâneamente em dois grupos, sendo um testemunha e outro bloqueado por substâncias antitireóideas.

**Grupo normal:** as ascídias foram pesadas e colocadas cada uma em um béquer contendo 200 ml de água do mar artificial, isenta de iôdo.

**Grupo bloqueado:** meia hora antes do início da experiência pròpriamente dita, acrescentaram-se aos 200 ml da mesma água do mar artificial 100 mg de 6-propil-2-tiouracil (PT), do que resultou uma concentração de 0,5 mg/ml de substância anti-tireoidea, concentração esta suficiente para o bloqueio do acoplamento das tirosinas iodadas. (THOMAS 1956, p. 203; IINO, YAMADA e GREER 1961, p. 582). Em seguida, acrescentaram-se a cada béquer 35  $\mu$ Ci (microcuries) de  $^{131}\text{I}$  sob a forma de Na  $^{131}\text{I}$ .

Após 6 horas de incubação a  $21^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  na solução radioativa, os animais foram lavados em água do mar corrente durante 30 minutos, para se remover todo o Na  $^{131}\text{I}$  adsorvido e não incorporado às células.

Em seguida, os animais foram preparados de acôrdo com a finalidade da respectiva experiência, o que será descrito nos respectivos capítulos.

Tôdas as medidas radioativas foram feitas num conjunto Escalímetro-Ratemeter modelo SR. 02 n.º 1108 (Centro de Medicina Nuclear), com detector de cintilação do tipo poço, modelo Phillips: PW 4.111 N.R.C. 965c, cristal de iodeto de sódio: NaI (T1), com 37,5 mm de diâmetro, 45 mm de altura e poço com 11 mm de diâmetro e 34 mm de profundidade.

### 2.2.2. *Captação e distribuição de $^{131}\text{I}$ na túnica e na massa visceral total*

Os animais preparados como descrito em 2.2.1. foram dissecados e separados em duas partes: túnica e massa visceral total, sendo ambas pesadas.

Da túnica, retiraram-se pequenos pedaços de várias regiões, que, depois de pesados em conjunto, foram seccionados e colocados em tubo de ensaio apropriado para medida radioativa no detector de cintilação tipo poço. As medidas foram feitas no conjunto descrito em 2.2.1.

A massa visceral de cada animal foi primeiramente seccionada com tesoura sôbre a placa de Petri, e em seguida, recebeu 5 ml de ácido tricloroacético a 20% e homogeneizando-se o total em triturador de tecido (tipo «Teflon-Pestle tissue grinder» Arthur Thomas n.º 4288 B). Completou-se a volume constante com o mesmo ácido tricloroacético (20 ml).

Fez-se a medida da radioatividade em alíquota de 1 ml retirada do volume total do homogeneizado, no conjunto descrito em 2.2.1.

Os resultados obtidos serviram para cálculo de captação de  $^{131}\text{I}$  por grama de tecido, tanto da túnica, como da massa visceral total. Em seguida determinou-se o valor médio da captação dos grupos normais e dos bloqueados, o intervalo de confiança para os dois grupos e a percentagem de redução da média dos normais em relação à média dos bloqueados.

### 2.2.3. *Captação e distribuição do $^{131}\text{I}$ nas diversas regiões da massa visceral total*

Animais preparados conforme a descrição em 2.2.1. foram a seguir dissecados e separados em duas partes: túnica e massa visceral, sendo ambas pesadas.

Da túnica tirou-se uma amostra para a medida radioativa, conforme 2.2.2.

Separaram-se as seguintes regiões da massa visceral, após cuidadosa dissecação de cada animal: sifão oral, sifão anal, endóstilo, gônadas, coração, cesta brânquial e rim de acumulação juntamente com o intestino.

Cada região foi primeiramente seccionada com tesoura sobre placa de Petri, adicionando-se, em seguida, 5 ml de ácido tricloroacético a 20%, depois homogeneizada, e completando-se a volume constante conforme 2.2.2.

As medidas radioativas foram feitas em alíquotas de 1 ml em detector de cintilação tipo poço.

Das medidas anotadas, foi calculada a captação de  $^{131}\text{I}$  total e por grama de tecido, tanto da túnica como de cada parte da massa visceral considerada. Estes resultados serviram para o cálculo do valor médio da captação para o grupo dos animais testemunhas e dos bloqueados, do intervalo de confiança para os dois grupos, e da percentagem de redução da média dos animais normais, em relação à média dos bloqueados.

#### 2.2.4. *Determinação do $^{131}\text{I}$ ligado às proteínas (PBI- $^{131}$ ) na massa visceral total*

Para as determinações do PBI- $^{131}$  usou-se o método inicialmente descrito por CLARK et al (1949, p. 331). Dividiram-se os animais em dois grupos, sendo um normal e outro previamente bloqueado pelo PT.

Os animais de cada grupo foram preparados conforme já descrito em 2.2.1. e após a incubação, dissecados, separando-se a túnica e a massa visceral total.

A massa visceral total foi homogeneizada, completando-se o volume constante pela técnica descrita em 2.2.2.

A medida radioativa da alíquota de 1 ml foi feita no cintilador tipo poço, sendo este resultado (A) considerado como valor do extrato total.

Após a medida, a alíquota do homogeneizado foi centrifugada a 2.500 r.p.m. durante 15 minutos, para a precipitação

de tôdas as proteínas (Centrifuga MSE, MED, 1LM, n.º 67484, MSE, Ltd. London).

Desprezou-se o sobrenadante.

Acrescentou-se ao precipitado 1 ml de NaOH 1N e, após agitação, fez-se a medida radioativa no mesmo cintilador. Esta medida (B) representa o valor do  $^{131}\text{I}$  ligado às proteínas (PBI $^{131}$ ).

A percentagem do PBI $^{131}$  será:  $\frac{B}{A} \times 100\%$

Com os dados obtidos calculou-se, para a massa visceral total, o valor médio da percentagem do PBI $^{131}$ , para os dois grupos, normal e bloqueado, o intervalo de confiança para os dois grupos e a percentagem de redução da média dos normais em relação à média dos bloqueados.

#### 2.2.5. *Determinação dos compostos iodados (T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>)\* extraídos pelo butanol BEI $^{131}$ na massa visceral total*

O estudo dos compostos, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, extraídos pelo butanol, baseou-se nos trabalhos de INGBAR, FREINKEL, HOEPRICH e ATHENS (1954, p. 388), fazendo-se a comparação de grupos normais e bloqueados por drogas anti-tireóideas.

Os dois grupos foram preparados e incubados conforme descrito em 2.2.1.

Após a incubação, os animais foram dissecados, separando-se a túnica e a massa visceral total. Esta foi seccionada com tesoura numa placa de Petri. Adicionaram-se 5 ml de NaOH 2N e, seguindo-se, homogeneização segundo a técnica descrita em 2.2.1.

Completou-se com o mesmo NaOH 2N o volume do homogeneizado, de modo a mantê-lo constante (20 ml).

Uma alíquota de 1 ml foi medida em cintilador tipo poço representando o valor do extrato total (A).

\* T<sub>3</sub> : 3,5,3' triiôdotironina;

T<sub>4</sub> : 3.5.3',5' tetraiódotironina ou tiroxina

Em seguida, a alíquota do homogeneizado foi centrifugada a 2.500 r.p.m. durante 15 minutos para a precipitação de tôdas as proteínas. Desprezou-se o sobrenadante.

Ao precipitado adicionaram-se 5 ml de butanol acidificado com HCl 0,1N segundo ROCHE, SALVATORE e RAMETTA (1962, p. 154) para a extração dos hormônios tireóideos ( $T_3$  e  $T_4$ ). A solução foi agitada por meio de um bastão de vidro e centrifugada novamente a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos.

Após a centrifugação, retirou-se, com uma pipeta de Pasteur, o sobrenadante que é o extrato butanólico, e que foi transferido para outro tubo de medida.

Adicionou-se ao precipitado novamente butanol acidificado e extraiu-se mais duas vêzes, reunindo-se todos os extratos butanólicos num só tubo de medida.

Mediu-se agora a radioatividade total do extrato butanólico da massa visceral total de cada animal, representando esta medida (B) o  $BEI^{-131}$ .

$$\text{A percentagem do } BEI^{-131} \text{ foi: } \frac{B}{A} \times 100\%$$

Com os resultados registrados calcularam-se para a massa visceral total das ascídias: o valor médio do  $BEI^{-131}$  do grupo dos normais e dos bloqueados, o intervalo de confiança para os dois grupos e a percentagem de redução da média dos normais em relação à média dos bloqueados.

Agradeço ao Dr. Tede Eston de Eston, Diretor do Centro de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo, entidade de que recebemos todo o auxílio e meios materiais; à Profa. Dra. Verônica Rapp de Eston, Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisas Biológicas do Centro de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo, pela direção na pesquisa básica em geral e no campo dos radioisótopos em especial; ao Prof. Dr. Paulo Sawaya, Diretor do Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Fa-

culdade de Filosofia, Ciências e Letras e do Instituto de Biologia Marinha, ambos da Universidade de São Paulo, pela orientação no campo da Fisiologia Animal Comparada e da Biologia Marinha; aos Profs. Thomas Bitelli, Diva Diniz Correa, Erasmo Garcia Mendes e Domingos Valente pelas sugestões e apôio dados.

### 3.

## RESULTADOS

Os resultados acham-se indicados nas tabelas. Far-se-á agora, sumariamente a apresentação dos métodos estatísticos usados na análise dos resultados experimentais, a seguir a análise estatística própria dita, e, finalmente, apresentar-se-ão a discussão dos resultados e as conclusões.

### 3.1. Tabelas

Os resultados experimentais foram tabelados da seguinte maneira:

TABELA 1: Massa visceral de *Ascidia nigra*: determinação do  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido, da percentagem de iôdo ligado às proteínas (PBI-131) e da percentagem de iôdo extraído pelo butanol (BEI-131).

TABELA 2: Túnica de *Ascidia nigra*: determinação de  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido, em 25 animais normais e 25 bloqueados.

TABELA 3: Regiões da massa visceral de *Ascidia nigra*: determinação da concentração total de  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$  obtida de «pool» de 10 animais.

TABELA 4: Regiões da massa visceral de *Ascidia nigra*: determinação do  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido, em «pool» de 10 animais.

T A B E L A 1

**Massa visceral de Ascidia nigra:** Determinação do <sup>131</sup>I em  $\mu$ Ci por grama de tecido, da porcentagem de iódo ligado às proteínas (PBI-131) e da porcentagem de iódo extraído pelo butanol (BEI-131), em 25 animais normais e 25 bloqueados.

ANIMAIS DETERMINAÇÕES <sup>131</sup> I/grama de tecido	NORMAIS		BLOQUEADOS		Taxa de redução %
	Valores médios	Intervalo de confiança com 95%	Valores médios	Intervalo de confiança com 95%	
PBI-131 %	0,027	0,024 — 0,030	0,013	0,011 — 0,015	51,8
BEI-131 %	45,54	40,42 — 50,66	30,27	26,86 — 33,68	33,60
	55,83	52,94 — 58,74	11,92	9,85 — 13,99	78,70

T A B E L A 2

**Túnica de Ascidia nigra:** Determinação de <sup>131</sup>I em  $\mu$ Ci por grama de tecido, em 25 animais normais e 25 bloqueados.

ANIMAIS	BLOQUEADOS		Taxa de redução %
	Intervalo de confiança com 95%	Valores médios ( $\mu$ Ci)	
Valores médios ( $\mu$ Ci)	0,044 — 0,053	0,016	66,7
		Intervalo de confiança com 95%	
		0,014 — 0,018	

T A B E L A 3

Regiões da massa visceral de *Ascidia nigra*: Determinação do <sup>131</sup>I em  $\mu$ Ci por grama de tecido, em "pool" de 10 animais.

REGIÕES	ANIMAIS			NORMAIS			BLOQUEADOS			Taxa de redução %
	Peso (g)	Valores médios ( $\mu$ Ci)	Intervalo de confiança c/ 95%	Peso (g)	Valores médios ( $\mu$ Ci)	Intervalo de confiança c/ 95%	Valores médios ( $\mu$ Ci)	Intervalo de confiança c/ 95%		
Sifão oral	3,5	0,470	0,454 — 0,487	4,0	0,079	0,076 — 0,081	0,079	0,076 — 0,081	83,2	
Sifão anal	1,5	0,098	0,095 — 0,102	1,5	0,028	0,027 — 0,030	0,028	0,027 — 0,030	71,4	
Endóstilo	1,5	0,121	0,118 — 0,125	1,5	0,125	0,125 — 0,125	0,022	0,021 — 0,023	81,8	
Coração	2,5	0,269	0,262 — 0,276	2,5	0,066	0,065 — 0,068	0,066	0,065 — 0,068	75,4	
Cesta brânquial	4,5	0,587	0,581 — 0,593	4,5	0,166	0,160 — 0,179	0,166	0,160 — 0,179	71,8	
Rim de Acumulação e Intestino	49,5	4,195	4,190 — 4,199	39,0	0,860	0,812 — 0,908	0,860	0,812 — 0,908	79,5	
Gônadas	1,5	0,069	0,067 — 0,071	1,5	0,034	0,033 — 0,035	0,034	0,033 — 0,035	50,7	

T A B E L A 4

Regiões da massa visceral de *Ascidia nigra*: Determinação da concentração total de <sup>131</sup>I em  $\mu$ Ci, obtida de "pool" de 10 animais.

REGIÕES	ANIMAIS			NORMAIS			BLOQUEADOS			Taxa de redução %
	Valores médios ( $\mu$ Ci)	Intervalo de confiança com 95%	Valores médios ( $\mu$ Ci)	Valores médios ( $\mu$ Ci)	Intervalo de confiança com 95%	Valores médios ( $\mu$ Ci)	Intervalo de confiança com 95%			
Sifão oral	0,134	0,129 — 0,139	0,020	0,019	0,019 — 0,021	0,019	0,019 — 0,021	85,1		
Sifão anal	0,066	0,063 — 0,068	0,019	0,019	0,018 — 0,020	0,018	0,018 — 0,020	71,2		
Endóstilo	0,081	0,079 — 0,083	0,015	0,015	0,014 — 0,016	0,014	0,014 — 0,016	81,5		
Coração	0,108	0,105 — 0,110	0,027	0,027	0,026 — 0,028	0,026	0,026 — 0,028	75,0		
Cesta brânquial	0,147	0,145 — 0,148	0,037	0,037	0,036 — 0,038	0,036	0,036 — 0,038	74,8		
Rim de acumulação e intestino	0,085	0,084 — 0,086	0,022	0,022	0,021 — 0,023	0,021	0,021 — 0,023	74,2		
Gônadas	0,046	0,045 — 0,047	0,022	0,022	0,021 — 0,023	0,021	0,021 — 0,023	52,1		

### 3.2. *Métodos estatísticos usados na análise dos resultados experimentais*

A análise estatística dos resultados experimentais obtidos consta dos cálculos dos valores médios, dos desvios padrões, dos intervalos de confiança, dos testes de média, da taxa de redução, do método de Cochran e do teste de Tukey.

#### 3.2.1. *Cálculo dos valores médios*

Os valores médios que aparecem no texto e nas tabelas foram determinados segundo a expressão:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

sendo «n» o número de medidas e  $\sum_{i=1}^n x_i$  a soma das «n» medidas.

#### 3.2.2. *Cálculo dos desvios padrões*

Calculou-se o desvio segundo a distribuição «t» (student), pela fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \delta_i^2}{n-1}}$$

em que  $\sum_{i=1}^n \delta_i^2$  = soma dos quadrados dos desvíos (aparentes) e «n» o número de medidas.

#### 3.2.3. *Intervalos de confiança (i.c.)*

Calcularam-se os intervalos de confiança pela expressão:

$$\bar{X} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot t_{n-1}$$

· Sendo  $\bar{X}$  o valor médio;  $\sigma$  o desvio padrão; «n» o número de medidas;  $t_{n-1}$  encontrado em tabela.

### 3.2.4. *Testes de média*

Para verificar a igualdade ou não dos valores médios obtidos para os animais normais e bloqueados, em cada caso utilizou-se o teste de média, com êrro de primeira espécie ao nível de 5%.

Ao todo foram feitos nove testes de média, compreendendo duas hipóteses, a primeira denominada hipótese de nulidade ( $H_0$ ), que admite a igualdade dos valores médios, a segunda uma hipótese alternativa ( $H_1$ ), para a qual o valor médio do animal normal era superior ao valor médio do animal bloqueado (teste mono-caudal).

Para limitar a região da hipótese de nulidade, que apresenta como um extremo o valor médio obtido para os animais normais, empregou-se a expressão:

$$X = \bar{X} - \frac{\sigma}{\sqrt{n}} t_{n-1}$$

em que X é o outro extremo que limita a região de  $H_0$ ;  $\bar{X}$  o valor médio dos animais normais;  $\delta$  o desvio padrão (normais) e «n» o número de observações, sendo  $t_{n-1}$  encontrado em tabela.

A hipótese de nulidade ao nível de significância será aceita se o valor médio correspondente dos animais bloqueados estiver contida entre X e  $\bar{X}$ . Caso contrário rejeita-se tal hipótese. Todos os testes de média, permitiram a rejeição de  $H_0$  ao nível de 5%.

### 3.2.5. *Taxa de redução*

Para o cálculo da chamada taxa de redução dividiram-se os valores médios das amostras das Ascídias bloqueadas e das normais.

O quociente indica quanto percentualmente é, em relação à normal, o valor médio da amostra bloqueada.

O complemento dêsse valor fornece a *taxa de redução* ou seja, a redução do valor médio resultante para as amostras normais, no valor médio das amostras bloqueadas.

### 3.2.6. *Método de Cochran*

Considerando os valores médios encontrados para os animais normais e para os bloqueados, aceitou-se terem as regiões estudadas, do corpo do animal, a mesma captação média, nas condições de trabalho descritas em material e métodos, com aplicação do teste comparativo dos valores médios obtidos ao nível de 5%, conhecido por teste de Tukey.

Para verificar a aplicabilidade de tal teste, foi necessário testar a homogeneidade das variâncias pelo método Cochran. Tomou-se como hipótese  $H_0$  a igualdade das variâncias dos seis grupos correspondentes às regiões viscerais da *Ascidia nigra*, contra a hipótese alternativa  $H_1$ , da experiência de pelo menos uma diferente, entre tôdas elas, ao nível de 5%.

Os resultados mostraram que, ao nível de 5%, a propriedade da homocedasticidade é satisfeita.

### 3.2.7. *Teste Tukey*

Conforme explicação em 3.2.6. foi utilizado o teste de Tukey na comparação dos valores médios.

Como hipótese  $H_0$ , ao nível de 5%, testou-se a igualdade dos valores médios contra a alternativa ( $H_1$ ) de suas diferenças.

Para os animais normais, o teste indicou que, ao nível de 5% os valores médios são considerados iguais.

Para os bloqueados, o teste de Tukey, demonstrou existir apenas uma diferença, ao nível de 5%, entre os valores médios da cesta branquial e do endóstilo, isto é, *apenas o valor médio*

*do endóstilo pode ser considerado como o menor valor médio de todos os valores médios obtidos.*

### **3.3. *Análise estatística dos resultados experimentais***

Os estudos estatísticos dos resultados que se indicam nas tabelas (Tab. 1,2,3) compreendem:

1. Análise estatística das determinações feitas na massa visceral total das *Ascidia nigra* (Tab. 1).
2. Das determinações feitas na túnica (Tab. 2).
3. Das determinações feitas nas várias regiões da massa visceral dos animais, referindo-se à determinação da concentração total de  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$ , obtido de um «pool» de dez animais (Tab. 3).
4. Das determinações feitas nas várias regiões da massa visceral dos animais. Determinação de  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido em um «pool» de dez animais (Tab. 4).
5. Conclue-se esta parte com a apresentação do método de Cochran e do Teste de Tukey.

#### **3.3.1. *Análise estatística das determinações feitas na massa visceral das Ascidia nigra* (Tabela 1).**

##### **3.3.1.1. $^{131}\text{I}$ em $\mu\text{Ci}$ por grama de tecido**

Nos 25 casos testemunhas, o valor médio para a massa visceral total das Ascídias foi de 0,027  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,008  $\mu\text{Ci/g}$ . Os intervalos de confiança (i.c.) correspondendo sempre a 95% foi de 0,024 - 0,030.

Já nos 25 casos bloqueados pelo propil tiouracil, o valor médio foi de 0,013  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,006  $\mu\text{Ci/g}$  e o i.c. de 0,011 - 0,015.

A taxa de redução dos normais em relação aos bloqueados, foi de 51,8%, o que quer dizer que o bloqueador provocou a redução de 51.8% dos valores médios dos normais para os valores médios das Ascídias bloqueadas.

### 3.3.1.2. *Percentagem de iôdo ligado às proteínas (PBI-131)*

Nos 25 casos contrôle (normais) para o homogeneizado da massa visceral total, o valor percentual médio do PBI-131 foi de 45,54%, com desvio padrão de 17,8%. O i.c. foi 40,42 - 50,66.

Nos 25 casos bloqueados, conseguiu-se, para o homogeneizado da massa visceral do corpo, um valor percentual médio de PBI-131 de 30,27%, com desvio padrão de 11,71% e um i.c. de 95% de 26,86 - 33,68.

O cálculo da taxa de redução dos animais normais para os bloqueados deu como resultado 33,60%.

### 3.3.1.3. *Percentagem de iôdo extraído pelo butanol (BEI-131)*

Nos 25 casos testemunhas, para o homogeneizado da massa visceral total do corpo, o valor percentual médio de BEI-131 foi de 55,83% com desvio padrão de 7,51% e o i.c. de 95% de 52,94 - 58,74.

Com esse i.c. portanto, a quantidade de  $^{131}\text{I}$  orgânico extraído pelo butanol ( $T_3$  e  $T_4$ ), expressa em percentagem de BEI-131, na massa visceral total das *Ascidia nigra* incubadas com  $^{131}\text{I}$ , está compreendida entre 52,94 e 58,74%.

Já nos 25 casos bloqueados, o valor percentual médio do BEI-131 foi de 11,92% com desvio padrão de 5,37% e o i.c. de 95% de 9,85 - 13,99.

A taxa de redução dos animais normais para os bloqueados foi de 78,70%.

Considerando-se êstes resultados, vê-se que a substância bloqueadora interferiu mais na massa visceral total do corpo deste Tunicado em relação ao BEI-131 que ao PBI-131.

**3.3.2. *Análise estatística das determinações feitas na túnica das Ascidia nigra* (Tabela 2)**

**3.3.2.1.  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido**

Nos 25 casos usados como testemunhas obteve-se, para a túnica, 0,048  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, como valor médio, com desvio padrão de 0,013  $\mu\text{Ci/g}$  e um i. c. de 0,044 - 0,053, o que quer dizer que, dentro deste limite a quantidade de  $^{131}\text{I}$  expressa em *micro-curies por grama de tecido*, na túnica das Ascídias incubadas com  $^{131}\text{I}$ , está contida entre 0,044 e 0,053  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido.

Nos 25 casos usados como bloqueados, êsse valor médio foi de 0,016  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,005  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido e um i. c. de 0,014 - 0,018. Vê-se pois, ter havido sensível redução da absorção de  $^{131}\text{I}$  pela túnica das Ascídias estudadas, o que realmente se nota quando se calcula a taxa de redução dos normais para os bloqueados, resultando 66,7% o que é bastante alta.

Êste resultado indica ser a túnica das Ascídias a séde de intensa absorção do  $^{131}\text{I}$ .

**3.3.3. *Análise estatística das determinações feitas nas várias regiões da Ascidia nigra. Determinação da concentração total do  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$ , obtida de «pool» de 10 animais* (Tabela 3).**

**3.3.3.1. *Análise estatística do «pool» dos sífões orais***

Nos 10 casos testemunhas o valor médio para o «pool» dos sífões orais foi de 0,470  $\mu\text{Ci}$ , com desvio padrão de 0,02  $\mu\text{Ci}$ , o i. c. de 0,454 - 0,487.

Nos 10 casos bloqueados o valor médio para o «pool» dos sífões orais foi de 0,079  $\mu\text{Ci}$ , com desvio padrão de 0,002  $\mu\text{Ci}$ , com um i. c. de 95% obtido de 0,076 - 0,081. A taxa de redu-

ção do valor médio do «pool» dos sífões orais dos normais em relação ao dos bloqueados foi de 83,2%.

### 3.3.3.2. *Análise estatística d «pool» dos sífões anais*

Nos 10 casos testemunhas o valor médio para o «pool» dos sífões anais foi de 0,098  $\mu\text{Ci}$  com desvío padrão de 0,003  $\mu\text{Ci}$ , o i. c. de 95% foi de 0,095-0,102.

Nos 10 casos bloqueados o valor médio para o «pool» dos sífões anais, foi de 0,028  $\mu\text{Ci}$ , com desvío padrão de 0,002  $\mu\text{Ci}$ ; o i. c. foi 0,027 - 0,030 e a taxa de redução do valor médio do «pool» destes sífões dos animais normais relativamente aos bloqueados, foi de 71,4%.

### 3.3.3.3. *Análise estatística do «pool» dos endóstilos*

Nos 10 casos testemunhas o valor médio para o «pool» dos endóstilos que se supõe ser o precursor embriológico da glândula tiróide foi de 0,121  $\mu\text{Ci}$ , com desvío padrão de 0,003  $\mu\text{Ci}$ , o i. c. de 95% foi de 0,118 - 0,125.

Nos 10 casos bloqueados, o valor médio para o «pool» dos endóstilos foi de 0,022  $\mu\text{Ci}$ , com desvío padrão de 0,001  $\mu\text{Ci}$ , com um i. c. de 95% de 0,021 - 0,023 e uma taxa de redução do valor médio dos animais normais para a dos bloqueados de 81,8%.

### 3.3.3.4. *Análise estatística do «pool» dos corações*

Nos 10 casos testemunhas o valor médio para o «pool» dos corações foi de 0,269  $\mu\text{Ci}$  com desvío padrão de 0,007  $\mu\text{Ci}$ , com um i. c. igual a 0,262 - 0,276. Já nos 10 casos bloqueados, o valor médio para o «pool» dos corações foi de 0,066  $\mu\text{Ci}$  com desvío padrão de 0,002  $\mu\text{Ci}$  e o i. c. de 95% foi de 0,065 - 0,068. A taxa de redução do valor do «pool» dos corações dos animais normais calculada em relação aos bloqueados foi de 75,4%.

### 3.3.3.5. *Análise estatística do «pool» da cesta branquial*

Nos 10 casos testemunhas, o valor médio para o «pool» da cesta brânquial foi de 0,587  $\mu\text{Ci}$ , com desvío padrão de 0,006  $\mu\text{Ci}$ , o i. c. foi de 0,581 - 0,593.

Nos 10 casos bloqueados para o «pool» deste órgão o valor médio foi de 0,166  $\mu\text{Ci}$ , com desvío padrão de 0,006  $\mu\text{Ci}$ , e o i. c. foi de 0,160 - 0,173. A taxa de redução do valor médio do «pool» deste órgão nos animais normais para o dos bloqueados foi de 71,8%, valor não muito maior que o obtido com os corações.

### 3.3.3.6. *Análise estatística do «pool» do rim de acumulação e dos intestinos*

Nos 10 casos contrôle o valor médio para o «pool» do rim de acumulação e dos intestinos foi de 0,860  $\mu\text{Ci}$  com desvío padrão de 0,050  $\mu\text{Ci}$ ; o i. c. foi de 0,812 - 0,908. Taxa de redução do valor médio deste «pool» nos animais normais em relação aos bloqueados é igual a 79,5%.

### 3.3.3.7. *Análise estatística do «pool» das gonadas*

Nos 10 casos contrôle o valor médio para o «pool» das gonadas foi de 0,069  $\mu\text{Ci}$  com desvío padrão de 0,002  $\mu\text{Ci}$ ; o i. c. foi de 0,067 - 0,071.

Nos 10 casos bloqueados o valor médio para o «pool» das gônadas foi de 0,034  $\mu\text{Ci}$  com desvío padrão de 0,001  $\mu\text{Ci}$ ; encontrou-se um i. c. de 95% de 0,033 - 0,035 e a taxa de redução de 50,7%.

Comparando-se as taxas de reduções nas diversas regiões, verifica-se que a maior redução ocorreu no endóstilo, sendo portanto este o órgão mais sensível ao bloqueio pela substância antitireoidea.

**3.3.4. *Análise estatística das determinações feitas nas várias regiões da *Ascidia nigra*. Determinação de  $^{131}\text{I}$  em  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido em «pool» de 10 animais (Tabela 4)***

**3.3.4.1. *«Pool» dos sífões orais***

Nos 10 animais testemunhas o valor médio para o «pool» dos sífões orais foi de 0,134  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido, com desvio de 0,005  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com um i. c. de 0,129 - 0,139.

Nos 10 casos bloqueados o valor médio para o «pool» dos sífões orais foi de 0,020  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i. c. foi 0,019 - 0,021; a taxa de redução de 85,1%.

**3.3.4.2. *«Pool» dos sífões anais***

Nos 10 animais testemunhas o valor médio para o «pool» dos sífões anais foi de 0,066  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i. c. de 0,063 - 0,068  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido.

Nos 10 casos bloqueados o valor médio para o «pool» dos sífões anais foi de 0,019  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i. c. de 95% de 0,018 - 0,020  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido e a taxa de redução de 71,2%.

**3.3.4.3. *«Pool» dos endóstilos***

Nos 10 animais testemunhas o valor médio para o «pool» dos endóstilos foi de 0,081  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,002  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i. c. foi de 0,079 - 0,083  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido.

Nos 10 animais tratados por agente bloqueador, o valor médio para o «pool» dos endóstilos foi de 0,015  $\mu\text{Ci}$  por grama de tecido, com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i. c. foi de 0,014 - 0,016  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido e a taxa de redução de 81,5%.

#### 3.3.4.4. *«Pool» dos corações*

Nos 10 animais testemunhas o valor médio para o «pool» dos corações foi de 0,108  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,003  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i.c. de 95% foi de 0,105 - 0,110  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido.

Nos animais bloqueados o valor médio para o «pool» dos corações foi de 0,027  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,007  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i.c. obtido foi de 0,026 - 0,028  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; a taxa de redução é de 75,0%.

#### 3.3.4.5. *«Pool» das cestas branquiais*

Nos 10 animais testemunhas o valor médio para o «pool» das cestas branquiais foi de 0,147  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i.c. foi de 0,145 - 0,148  $\mu\text{Ci/g}$ .

Nos 10 animais bloqueados o valor médio para o «pool» das cestas branquiais foi de 0,037  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, o i.c. obtido foi de 0,036 - 0,038  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido e a taxa de redução é de 74,8%.

#### 3.3.4.6. *«Pool» dos rins de acumulação e dos intestinos*

Nos 10 testemunhas o valor médio para o «pool» dos rins de acumulação e intestinos foi de 0,085  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i.c. foi de 0,084 - 0,086  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido.

Nos 10 bloqueados o valor médio para o «pool» dos rins de acumulação e intestinos foi de 0,022  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i.c. obtido foi de 0,021 - 0,023  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido e a taxa de redução de 74,2%.

#### 3.3.4.7. *«Pool» das gônadas*

Nos 10 testemunhas o valor médio para o «pool» das gônadas foi de 0,046  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido, com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i.c. foi de 0,045 - 0,047  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido.

Nos 10 bloqueados o valor médio para o «pool» das gônadas foi 0,022  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido com desvio padrão de 0,001  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido; o i. c. obtido foi de 0,021 - 0,023  $\mu\text{Ci/g}$  de tecido e a taxa de redução de 52,1%.

Comparando-se as taxas de redução pode-se dizer que a maior redução ocorreu no sifão oral e endóstilo e a menor no «pool» das gônadas.

### 3.3.5. *Método de Cochran e Teste de Tukey*

Julguei de interêsse, com os dados obtidos, aplicar também o método de Cochran e Teste de Tukey.

Como se sabe, pelo método de Cochran (Gomes 1963, p. 193) verifica-se se há ou não uma homogeneidade das variâncias (propriedade homocedasticidade) dentro do nível de 5% considerado. Testaram-se duas hipóteses:  $H_0$ , na qual tôdas as variâncias seriam iguais, contra  $H_1$ , em que existiria pelo menos uma variância diferente.

Ao nível 5% poder-se-á aceitar  $H_0$ , isto é, as variâncias gozam da propriedade da homocedasticidade.

Provada a homogeneidade das variâncias pelo método de Cochran, poder-se-á aplicar o teste de Tukey (Gomes 1963, p. 38) para comparar todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamento.

A Tabela 4, revelou que, nos animais normais, ao nível de 5% os valores médios obtidos podem ser considerados estatisticamente iguais. No entretanto, para os bloqueados, o teste de Tukey demonstrou existir apenas uma diferença entre as diversas regiões, ao nível de 5%, relativa ao valor médio do endóstilo o bloqueio provocado pela droga antireoidea foi mais acentuado.

Êste resultado sugere que a região do endóstilo é a que fisiologicamente mais se assemelha funcionalmente, aos folículos tiroídeos encontrados nos vertebrados.

4.

DISCUSSÃO

A capacidade de concentração do iôdo pelo organismo, mesmo o dos Invertebrados, já é conhecida há mais de um século. Pitt-Rivers (1950, p. 514) ao tratar do ensaio químico da tiroxina e de outras substâncias com atividade tireóidea dá um bom esboço histórico do qual extraímos os trechos mais significativos. Assim, em 1819 (p. 254) Fyfe demonstrou, pela primeira vez, a existência de iôdo no pó de *Gorgonia*, Celenterado marinho, na época velho medicamento empregado para o tratamento do bócio.

Coube a Coindet (1820) mostrar, pela primeira vez, que o bócio carencial poderia ser tratado pela administração oral de iôdo.

Deve-se a Baumann (1896, p. 319) a descoberta da ocorrência de iôdo na glândula tireóide, e a demonstração de ser possível remover-se o mesmo desta glândula por solventes apropriados. Aventou ainda a hipótese, em primeira mão, de o iôdo estar ligado a uma proteína.

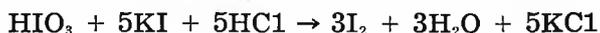
Baumann e Roos (1896, p. 481) notaram que o iôdo era removido da glândula juntamente com uma proteína solúvel em soluções salinas e precipitável por ácidos diluídos a quente.

Já Murray (1891, p. 796) provou que o mixedema era passível de tratamento com extratos tiróideos.

Hunter (1910, p. 321), reviu os métodos químicos da dosagem do iôdo, assinalando as falhas e propondo um método de dosagem química do iôdo que é usado, com algumas alterações, até hoje. Fundamentalmente trata-se do seguinte:

O iôdo ligado às proteínas («Protein bound iodine»), da substância em estudo, é liberado por incineração alcalina (mistura de carbonato e nitrato de potássio), resultando uma mistura de iodeto e iodato. O iodeto é oxidado por solução ácida diluída de cloro, dando também iodato. Na presença de iode-

to e ácido, em excesso, o iodato dará iôdo livre, segundo a seguinte equação:



O iôdo livre é determinado por titulação com tiosulfato de sódio, usando-se amido como indicador.

O método de Hunter foi, mais tarde, melhorado por Kendall (1914, p. 251), que também isolou um composto cristalino insolúvel em ácido e contendo 65% de iôdo total da glândula tireóide hidrolizada com NaOH 5%.

Como êste composto possuía atividades fisiológicas semelhantes ao pó de tireoide, Kendall denominou *tiroxina*.

Os pesquisadores passaram agora à identificação da estrutura química da tiroxina. Harington (1926, p. 293) analisou a estrutura química da tiroxina e, retirando os átomos de iôdo, denominou o composto resultante de *tironina*.

Depois, junto com Randall, Harington isolou outro composto da glândula tireóide a 3,5 diiôdotirosina (DIT). Naquela época (1929, p. 373) êstes dois compostos DIT e tiroxina, foram considerados os responsáveis pelo armazenamento de todo iôdo orgânico glandular.

Os estudos fisiológicos sôbre os dois compostos (Gaddum (1927/28, p. 246; 1929/30, p. 383), provaram que o DIT não atuava sôbre o cretinismo e o mixedema, não agia sôbre o metabolismo do nitrogênio, não alterava a pressão arterial do cão, não acelerava o consumo de oxigênio dos ratos e, ainda, não acelerava a metamorfose dos girinos, sendo todos êstes efeitos observáveis somente com o emprêgo da tiroxina.

Mais tarde, Gross e Pitt-Rivers (1954, p. 128) identificaram e estudaram outro hormônio da glândula tireoide, a 3,5,3' triiôdotironina ( $T_3$ ) e Pitt-Rivers e Cavalieri (1926, p. 25) ainda identificaram as tirosinas (monoiôdotirosina e diiôdotirosina) livres encontradas na tireóide do rato, ficando assim identificados todos os compostos iodados tireóideos.

Recentemente, Pitt-Rivers (1963, p. 43) demonstrou de modo bastante completo a fisiologia da tireóide e a função do

iôdo, bem como a sequência de formação dos hormônios na glândula. Esta é, a formação das tirosinas iodadas (MIT e DIT), sem ação hormonal, que, por interação entre si, darão os dois compostos considerados hormônios tireóideos: 3,5,3' triiôdotironina ( $T_3$ ) e 3,5,3',5' tetraiôdotironina ou tiroxina ( $T_4$ ).

Com o advento dos radioisótopos, apareceram métodos novos para o estudo da função tireóidea: a captação do  $I^{131}$  pela glândula, o  $^{131}I$  ligado às proteínas (PBI-131) (Mack, 1966, p. 150) e ao  $^{131}I$  extraído pelo butanol (BEI-131) (Ingbar, Freinkel, Hoeplich e Athens, 1954, p. 388). Aplicando o processo de diluição isotópica, pode-se hoje ter uma visão dinâmica do metabolismo do iôdo e da síntese hormonal.

Atualmente, os pesquisadores passaram a estudar o metabolismo do iôdo e a fisiologia tireóidea em tôda a escala animal. Assim, Gorbman (1965, p. 336), faz uma boa revisão da bioquímica comparativa do iôdo relacionado com a evolução da função tireóidea em todos os vertebrados.

A função tireóidea está bem evidenciada nos mamíferos e animais homeotermos e já se encontra relativamente bem bem estudada, o que não acontece nos animais de sangue frio. Investigando peixes teleósteos, Hickman (1959, p. 997) conclui que a função da tireóide é possibilitar a melhor adaptação dos peixes às variações do ambiente, principalmente quanto à pressão osmótica e à temperatura, e também possibilitar a melhor adaptação às rápidas mudanças internas que ocorrem nestes animais, como sejam a maturação sexual e as fases da metamorfose. Por sua vez, Fontaine (1954, p. 390) relaciona a função tireóidea nos peixes teleósteos ao determinismo das migrações.

Nos elasmobrânquios só se encontram estudos histológicos (Gorbman 1965, p. 336) interessados em co-relacionar variações morfológicas de glândula com condições de desenvolvimento destes animais.

Nos ciclóstomos, então, o problema se complica ainda mais, chegando Gorbman e Greaser (1942, p. 391) ao seguin-

te: o endóstilo da lampreia acumula  $^{131}\text{I}$  durante o período de reprodução e, talvez, a tireóide tenha grande função nestes animais, demandando ainda melhores estudos para uma conclusão.

Descendo a escala zoológica, nos cordados inferiores é que se encontra o ponto de partida da síntese hormonal, que será discutido mais adiante.

Em relação aos invertebrados, poder-se-á afirmar, segundo Gorbman, Clements e O'Brien (1954, p. 85) que os órgãos capazes de acumular iôdo ligado às proteínas dividem-se em dois grupos: um maior, incluindo tôdas as proteínas estruturais corpóreas de natureza fibrosa, que constituem os apêndices córneos dos animais, como é o caso do esqueleto das esponjas e corais, do exoesqueleto dos antrópodos, da carapaça e perióstraco dos moluscos, do bisso do *Mytilus*, dentes, setas e cutículas dos anélideos, e outro em que se encontram os epitélios que não possuem escleroproteínas, como os tentáculos do *Amphitrite*, e as glândulas intertegumentárias do *Dolichoglossus*.

As investigações efetuadas entre nós nos Hemicordados, especialmente em *Balanoglossus gigas* (De Jorge, Sawaya, Petersen e Ditadi, 1965, p. 1182/3; Sawaya, 1965, p. 48) demonstraram ocorrer uma concentração de iôdo na região hepática em mais de 800% que em qualquer outra região do corpo do mesmo animal.

No entretanto, como afirma Roche (1952, p. 45), estas proteínas, ou melhor escleroproteínas, seriam apenas proteínas inertes, sem atividades hormonais, representando um reservatório sômente de tirosinas halogenadas.

Nos Cordados inferiores o problema da síntese hormonal apenas foi abordado. No *Branchiostoma lanceolatum* (Palas) o conhecido Amphioxus, Covelli, Salvatore, Sena e Roche (1960, p. 1167), identificaram os hormônios tireoideos  $T_3$  e  $T_4$ , bem como seus precursores MIT e DIT e os derivados acetilados dos hormônios, demonstrando haver uma produção hormonal neste animal. Tong, Kerkof e Chaikoff (1962, p.

331) por sua vez, fizeram também no *Amphioxus*, a identificação de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> marcados em animais incubados com <sup>131</sup>I, chegando à conclusão de ser o endóstilo o órgão que maior concentra iôdo.

Nos Urocordados, Roche, Rametta e Varrone (1962, p. 1964) usando a *Salpa maxima* Forskal, chegaram à conclusão de haver uma produção de T<sub>4</sub> marcada a partir do <sup>131</sup>I, bem como dos precursores, sendo, portanto, os Tunicados portadores de um esbôço de função tireóidea.

Ainda com relação aos Tunicados, Roche, Salvatore e Rametta (1962, p. 154) estudando a *Ciona intestinalis*, L. concluem que a síntese de hormônios tireóideos é idêntica em todos cordados (urocordados, cefalocordados e vertebrados). O aparecimento da síntese dá-se a partir dos urocordados, sendo a produção de iôdotironinas uma característica dos cordados, processando-se, nos animais inferiores, num tecido de capacidade secretória (endóstilo) que seria filogeneticamente, o precursor do foliculo tireóideo dos vertebrados.

Assim, analisando os resultados aquí relatados e obtidos no Tunicado *Ascidia nigra*, nota-se na Tabela 1, que as quantidades de <sup>131</sup>I captadas por grama de tecido, na massa visceral total dos animais bloqueados sofreram uma redução de 51,8% em relação aos animais normais, e daí, concluir-se que o 6-propil-2-tiouracil (Thomas, 1956, p. 207; Iino, Yamada, Greer, 1961, p. 582) bloqueia também a incorporação das iôdotirosinas nessa massa visceral total.

Analisando ainda a Tabela 1, vêem-se que os valores de iôdo ligado às proteínas (PBI<sup>131</sup>) apresentam também uma redução de 33,6% dos bloqueados em relação aos normais. Esta redução não é tão evidente porque a droga bloqueadora inibe especificamente a produção de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> e não de seus precursores MIT e DIT (Wolff e Wolff, 1964, p. 266). Este achado corresponderia à grande produção de esclero-proteínas iodadas inertes, encontrada nos invertebrados em geral (Roche, Yagi, Michel, Lissitzky e Eysseric-Lafon 1951, p. 526).

A Tabela I evidencia melhor ainda os valores comparativos do iôdo extraído pelo butanol, em que se nota uma redução de 78,70% nos bloqueados em relação aos normais, o que parece provar que o bloqueio da produção de  $T_3$  e  $T_4$  é acentuado, pois segundo Ingbar, Freinkel, Hoeprich e Athens (1954, p. 393), o butanol somente extrai os hormônios ( $T_3$  e  $T_4$ ).

Com relação à túnica, os resultados expressos na Tabela 2, indicam o seguinte: o valor do  $^{131}\text{I}$  captado por grama de tecido apresenta uma redução de 66,7% nos bloqueados em relação aos normais provando, também haver neste órgão uma ação marcante da droga antitiroidea.

Analisando-se agora as várias regiões do corpo do animal, conforme a Tabela 3, nota-se o seguinte: há uma redução marcante dos valores médios da captação total do  $^{131}\text{I}$  nas várias regiões dos animais bloqueados em relação aos dos normais. A redução, porém é homogênea, oscilando entre 70 a 80% em tôdas as regiões, com exceção dos valores das gônadas em que é de 50,7%.

Esta redução bem maior das gônadas é explicável porque as experiências foram feitas no decorrer do ano, havendo, na computação, épocas em que os animais estavam em maturação sexual e portanto muito mais ativos metabòlicamente em relação às épocas de repouso sexual. Circunstâncias diversas impediram-me de relacionar o material quanto à maturação sexual, o que constituirá outro tema a ser investigado.

Analisando, em seguida, os valores de  $^{131}\text{I}$  captado por grama de tecido (Tabela 4) nas várias regiões dos animais, verifica-se uma redução sensível nos valores médios dos animais bloqueados em relação aos normais.

Considerados êstes valores médios e exceptuados os valores das gônadas, como acima foi explicado, fez-se primeiramente a comparação das variâncias (teste de Tukey) chegando-se à conclusão de que, para os normais, todos os valores médios, ao nível de 5% podem ser considerados iguais.

Com relação aos valores médios dos animais bloqueados o teste de Tukey provou serem todos os valores iguais ao nível de 5%, com exceção do *endóstilo*, sendo êste o *único valor médio que pode ser considerado estatisticamente inferior aos*

Pelo exposto, ficou demonstrado que a *Ascidia nigra* tem capacidade de sintetizar compostos iodados, não sòmente do tipo MIT e DIT, mas também T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, confirmando, assim os achados de Roche, Salvatore e Rametta (1962, p. 154) obtidos em outro tunicado.

Além disso, demonstrou-se igualmente, que a região preferencial desta síntese parece ser o endóstilo, o que concordaria com os achados de Gorbman e Creaser (1942, p. 391) em lampreia e os de Barrington (1962, p. 202) em Protocordados.

Em relação ao emprego de bloqueadores da síntese de hormônios iodados, não se encontraram na literatura outros dados referentes aos cordados inferiores. Stanley (1948, p. 21) comparou a ação de diversas drogas antitiróideas do grupo dos tiourilenos no homem e no rato, concluindo que, neste, o propiltiouracil era mais ativo. Iino, Yamada e Greer (1961, p. 582) estudando a ação de diversas doses de propiltiouracil sôbre a biossíntese de hormônios tireóideos, concluem que esta droga bloqueia preferentemente o acoplamento das tirosinas para a formação de tironinas iodadas, isto é, inibe a síntese de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>.

Por estas razões resolveu-se usar o propiltiouracil nos estudos do bloqueio hormonal, verificando-se, realmente, bloqueio mais acentuado nos compostos extraídos pelo butanol (BEI), prtanto, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, sendo êste bloqueio mais evidente na região do endóstilo.

Os resultados aqui apresentados indicam à saciedade, ser o endóstilo um dos órgãos que nos Cordados inferiores mais concentram iôdo, e no qual é mais intenso o bloqueio pelas drogas anti-tireóideas. Provavelmente, esse órgão poderá ser o precursor da tireóide dos Vertebrados. Tal afirmativa depende, porém, de outros estudos e de provas mais seguras para demonstrar-se uma verdadeira função tireóidea no endóstilo.

Como se sabe, um dos efeitos mais marcantes de  $T_4$  (tiroxina) é o estímulo da metamorfose dos girinos. Dificuldades inúmeras impediram de aplicar êste importante teste da função tireóidea, por demandar um maior refinamento da técnica da extração do hormônio, pois, as tentativas até agora efetuadas mostraram que os girinos não suportam a alimentação com endóstilo de *A. nigra* e nem a presença do extrato butanólico. Novos estudos serão necessários para aplicar-se êste teste.

5.

CONCLUSÕES

A presente pesquisa em *Ascidia nigra* sôbre a síntese de proteínas e hormônios iodados em grupos de animais normais e grupos de animais prèviamente bloqueados pela incubação em 6-propil-2-tiouracil, deu como resultado os seguintes valores:

1. ***Taxa de captação de  $^{131}I$  pela massa visceral total do corpo.***
  - 1.1. Redução de 51,8% desta taxa nos animais bloqueados em relação aos normais;
  - 1.2. Redução de 33,6% do PBI-131 nos bloqueados em relação aos normais;
  - 1.3. Redução de 78,7% do BEI-131 nos bloqueados em relação aos normais.
2. ***Taxa de captação do  $^{131}I$  pela túnica total***  
Redução de 66,7% nos bloqueados.
3. ***Taxas de captação de  $^{131}I$  pelas várias regiões dos animais: sifão oral, sifão anal, endóstilo, coração, cesta brânquial, rim de acumulação e intestino, gônadas.***

Há redução acentuada (ao redor de 75%) nos animais bloqueados, porém o teste de Tukey revela que os valores médios em tôdas as regiões foram reduzidos ho-

mogeniamente, com exceção das gônadas que apresentam variações e que se acredita sejam estacionais.

4. *Taxas de captação de  $^{131}\text{I}$  por grama de tecido nas diversas regiões citadas no item 3.*

Nota-se redução acentuada (também ao redor de 75% em tôdas as regiões) revelando-se, porém, pelo teste de Tukey que êste bloqueio é mais acentuada na região do endóstilo.

5. Conclui-se, portanto, que o metabolismo do iôdo em *Ascidia nigra* segue a mesma sequência hormonal básica encontrada em outros cordados.

6. O 6-propil-2-tiouracil age como droga bloqueadora, principalmente da síntese de  $\text{T}_3$  e  $\text{T}_4$ , sendo êste bloqueio mais acentuado na região do endóstilo, o que leva a admitir êste órgão como precursor funcional da tireóide dos Vertebrados.

## BIBLIOGRAFIA

- BARRINGTON, E. J. W. — 1962 — Hormones and Vertebrate evolution. *Experientia* **18**: 201-210.
- BARRINGTON, E. J. W. — 1964 — Hormones and evolution. 154 pp. The English Univ. Press Ltd. London.
- BAUMANN, E. — 1896 — Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chemie* **21**: 319, em Pitt-Rivers, R. — The Chemical Assay of Thyroxine and other substances with Thyroidal Activity, em Emmens, C. W. — Hormone Assay, pp. 513-542, Acad. Press. Inc. 1950, New York.
- BAUMANN, E. & ROOS, E. — Ibidem **21**: 481, em Pitt-Rivers, R. — The Chemical Assay of Thyroxine and other substances with Thyroidal Activity, em Emmens, C. W. — Hormone Assay, pp. 513-542, Acad. Press. Inc. 1950, New York.
- CLARK, D. E., MOE, R. H. & ADAMS, E. E. — 1949 — The rate of conversion of administered radioactive iodine into protein bound iodine of the plasma as an aid the evaluation of thyroid function. *Surgery* **26**: 331-340.
- COCHRAN, W. G. — 1954 — Some methods for Strengthening the common  $X^2$  tests. *Biometrics* **10**: 417-451.
- COINDET, J. R. — 1820 — Decouv. d. rem. contre le goître. *Bibl. Universelle de Genève*, em Pitt-Rivers, R — The Chemical Assay of Thyroxine and other substances with thyroidal activity, em Emmens, C. W. — Hormone Assay, pp. 513-542, Acad. Press. Inc. 1950 — New York.
- COVELLI, I. et al. — 1960 — Sur la formation d'hormones thyroïdiennes et de leurs precurseurs par *Branchiostoma lanceolatum* Pallas (*Ampioxus*). *C. R. Soc. Biol.* **154**: 1165-1169.
- DE JORGE, F. B., SAWAYA, P., PETERSEN, J. A. & DITADI, A. S. F. — 1965 — Iodine Acumulation by *Balanoglossus gigas*. *Science* **150** (3700): 1182-1183.
- DODD, J. M. & MATTY, A. J. — 1964 — Comparative aspects of Thyroid function. Em Pitt-Rivers, R & Trotter, W. R. — *The Thyroid gland* **1**: 303-356, Butterworths. London.
- FONTAINE, M. — 1954 — Du déterminisme physiologique des Migrations. *Biol. Rev.* **29**: 390-418. Cambridge Univ. Press.
- FORSKAL, P. — 1775 — *Descriptiones Animalium*. Edit C. Niebuhr. *Huniae* pp. 112-117, em Berrill, N. J. — 1950 — *The Tunicata with an account of the British species*. Printed for the Ray Society London.

- FYFE, A. — 1819 — Edinburgh Phil. J. 1: 254 ap. Pitt-Rivers, R. The Chemical Assay of Thyroxine and other substances with Thyroidal Activity, em Emmens, C. W. — 1950 — Hormone Assay, pp. 513-542, Acad. Press. Inc. New York.
- GADDUM, J. H. — 1927/28 — Quantitative observations on thyroxine and allied substances: I — The use of tadpoles. J. Physiol., **64**: 246-254.
- GADDUM, J. H. — 1929/30 — Quantitative, observations on thyroxine and allied substances: II — Effects on the oxygen consumption of rats. J. Physiol., **68**: 383-405.
- GOMES, F. P. — 1963 — Curso de estatística experimental. 2.a ed. Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz", 384 pp. Piracicaba.
- GORBMAN, A. — 1941 — Identity of an iodine-storing tissue in an ascidian. Science, **94**: 192.
- GORBMAN, A. — 1954 — Phylogenetic and developmental aspects of the Thyroid, em Bookhaven Symposia in Biology n. 7, The Thyroid, pp. 3-8. Bookhaven Nat. Lab.
- GORBMAN, A. — 1965 — Some aspects of the comparative biochemistry of iodine utilization and the evolution of thyroidal function. Phys. Rev. **35**: 336-346.
- GORBMAN, A. & BERN, H. A. — 1962 — A textbook of comparative endocrinology. New York, John Willey, 468 pp.
- GORBMAN, A., CLEMENTS, M. & O'BRIEN, N. — 1954 — Utilization of radioiodine by invertebrates, with special study of several annelida and molusca. J. Exp. Zool., **127**: 75-92.
- GORBMAN, A. & 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. & PITT-RIVERS, R. — 1954 — Triiodothyronine in relation to thyroid physiology. Recent prog. Hormone Res., **10**: 109-128.
- HARINGTON, C. R. — 1926a — Chemistry of thyroxine: I — Isolation of thyroxine from the thyroid gland. Biochem. J., **20**: 293-299.
- HARINGTON, C. R. — 1926b — Chemistry of thyroxine: II — Constitution and synthesis of desiodo-thyroxine. Biochem. J., **20**: 300-313.
- HARINGTON, C. R. & RANDALL, S. S. — 1929 — Observations on the iodine-containing compounds of the thyroid gland. Isolation of d1-3-5 diiodotyrosine. Biochem. J., **23**: 373-383.
- HICKMAN, C. P. — 1959 — The osmoregulatory role of the thyroid gland in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. Canad. J. Zool., **37**: 997.
- 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.

- HUUS, J. — 1937 — Ascidiaceae em Kükenthal, W. & Brumbach, T. — Tunicata. Hand, d. Zool. 5(2.a1/2): 545-692, Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- IINO, S., YAMADA, T. & GREER, M. A. — 1961 — Effect of graded doses of propylthiouracil on biosynthesis of thyroid hormones. Endocrinol., 68: 582-588.
- INGBAR, S. H., FREINKEL, N., HOEPRICH, P. D. & ATHENS, J. W. — 1954 — The concentration and significance of the butanol extractable  $I^{131}$  of serum in patients with diverse states of thyroidal function. J. clin. Invest., 33: 388-399.
- KENDALL, E. C. — 1914 — The determination of iodine in connection with studies in thyroid activity. J. Biol. Chem. 19: 251-256.
- LELOUP, J. & FONTAINE, M. — 1960 — Iodine metabolism in lower vertebrates. Ann. N. Y. Acad. Sci. 86: 316.
- MACK, R. E. — 1966 — The determination of proteins bound iodine  $^{131}I$  in Thyroid gland homogenates. J. Nucl. Med., 7: 150-152.
- MURRAY, G. R. — 1891 — Brit. Med. J. ii: 796 em Pitt-Rivers, R. — The Chemical Assay of Thyroxine and other substances with thyroidal activity, em Emmens, C. W. — 1950 — Hormone assay, pp. 513-542. Acad. Press. Inc. New York.
- PANTIN, C. F. A. — 1948 — Notes on microscopical technique for zoologists, p. 63.
- PITT-RIVERS, R. — 1963 — Biochemistry and physiology of thyroid hormones, N. Y. St. J. Med., 63: 43-49.
- PITT-RIVERS, R. — 1963 — The Chemical Assay of Thyroxine and other substances with thyroidal activity. In: Emmens, C. W., ed. — Hormone Assay. New York, Acad. Press, 1950, pp. 513-542.
- PITT-RIVERS, R. & CAVALIERI, R. R. — 1962 — The free iodotyrosines of the thyroid. Biochem. J. 83: 25-26.
- ROCHE, J. — 1952 — Biochemie comparée des scléroprotéines iodées des Anthozoaires et des Spongiaires. Experientia 8: 45-54.
- ROCHE, J. & JOUAN, P. — 1956 — Sur la présence de 3:5:3' triiodothyronine dans une gorgonine. C. R. Soc. Biol., 150: 1701-1703.
- ROCHE, J., RAMETTA, G. & VARRONE, S. — 1962 — Sur la présence d'hormones thyroïdiennes chez un Tunicier pélagique, *Salpa maxima* Forskal. C. R. Soc. Biol. 156: 1964-1968.
- ROCHE, J., RAMETTA, G. & VARRONE, S. — 1964 — Metabolisme de l'iode et formation diodothyronines ( $T^3$  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. Biochem. biophys. Acta, 63: 154-165.
- ROCHE, J., YAGI, Y., MICHEL, R., LISSITZKY, S. & EYSSERIC-LAFON, M. — 1951 — Sur la caractérisation de la monobromotyro-

- sine et de la thyroxine dans les gorgonines. Bull. Soc. Chim. Biol., **33**: 526-531.
- SALVATORE, G., VECCHIO, G. & MACCHIA, V. — 1960 — Sur la présence d'hormones thyroïdiennes chez un Tunicier, *Clavelina lepadiformis* (M. Edw.) var. *rissoana*. C. R. Soc. Biol., Paris, **154**: 1380-1384.
- SAWAYA, P. 1965 — Revisión de los órganos endócrinos de los hemi-cordados y cordados inferiores. VI Congr. Panamer. Endocrin. Mexico, D. F. Excerpta Medica, n. 99: 48-49. Amsterdam.
- STANLEY, M. M. — 1948 — The mechanism of action of antithyroid drugs. In: Symposium on radioiodine: July 28-30, pp. 19-24.
- THOMAS, I. M. — 1956 — The accumulation of radioactive iodine by *Amphioxus*. J. Mar. Biol. Ass. U. K., **35**: 203-210.
- TONG, W., KERKOFF, I. L. — 1962 — Identification of labeled thyroxine and triiodothyronine in amphioxus treated with  $I^{131}$ . Bioch. biophys. Acta, **56**: 326-331.
- WOLFF, E. C. & WOLFF, J. — 1964 — The mechanism of action of the thyroid hormones. In: Pitt-Rivers, R. — The thyroid gland. London Butterworths, **1**: 237-282.

