

UFRS
DEPTO. DE FISILOGIA
BIBLIOTECA

CAPTAÇÃO ESPECÍFICA *in vivo* DA [125I] INSULINA
PELA TIREÓIDE DE TARTARUGAS *Chrysemys dorbigni*

Lígia Maria Barbosa Coutinho

*Dissertação de mestrado
apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, área de concentração
Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

A meus pais

Ao Mario

*As minhas filhas
Mara Elena e Elisa*

I N D I C E

Agradecimentos

<i>Introdução</i>	1
<i>Objetivos</i>	16
<i>Materiais e métodos</i>	17
1. <i>Animais</i>	17
2. <i>Soluções utilizadas</i>	18
2.1. [¹²⁵ I] <i>insulina</i>	18
2.2. <i>Insulina</i>	20
2.3. <i>Outros hormônios peptídicos</i>	21
2.4. <i>Iodeto de potássio</i>	22
2.5. <i>UAT</i>	22
3. <i>Procedimentos gerais</i>	23
3.1. <i>Medida de captação da [¹²⁵I]insulina</i>	23
3.2. <i>Análise da natureza do material radio-</i> <i>tivo</i>	27
3.3. <i>Análise estatística</i>	31
<i>Resultados</i>	32
<i>Discussão</i>	56
<i>Resumo</i>	71
<i>Referências bibliográficas</i>	73

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

Meus agradecimentos são essencial - mente dirigidos a duas pessoas: Dr. Mario Ferreira Coutinho , meu marido e Dra. Maria Marque, minha orientadora e amiga.

Agradeço a ele por ter sempre me incentivado a continuar na luta e a não desis - tir, especialmente nas horas mais difíceis de um curso de Mestrado, quando entram em conflito a Família, o Trabalho e a Pesquisa.

Agradeço a ela por ter proporcionado minha inclusão neste curso de Mestrado, por ter sempre me apoiado durante o desenrolar do curso e, principalmente, por ter trabalhado lado a lado na parte experimental e na reda - ção desta tese, com dedicação e carinho.

Não poderia deixar de externar os meus agradecimentos à colaboração constante e desinteressada da Prof. Roselis Silveira Martins da Silva.

Também não esqueci do inestimável auxílio e incentivo de muitas horas de trabalho do Prof. Antonio Bellô, a ele meu reconhecimento e admiração.

INTRODUÇÃO

A insulina, hormônio polipeptídico produzido pelas células beta das ilhotas de Langerhans, exerce múltiplas e complexas ações no organismo, estimulando reações metabólicas para a síntese e armazenamento de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Estimula, também, o transporte de glicose, de alguns amino-ácidos, de potássio e de magnésio através da membrana plasmática das células-alvo; estimula a oxidação da glicose e a formação de ATP, DNA e RNA; e inibe a glicogenólise, a lipólise, a proteólise, a gliconeogênese, a ureogênese e a cetogênese. Estas ações têm sido particularmente estudadas no fígado, no tecido adiposo e no músculo esquelético, mas há evidências de que a insulina atua também sobre outros tecidos ou células (músculos cardíaco e liso, cartilagem e osso, pele, fibroblastos, leucócitos, timócitos, etc.). Seus efeitos dependem da quantidade de insulina secretada, de sua distribuição e degradação, do tipo de tecido, de sua ligação a receptores específicos, de eventos pós-receptor dentro da célula, dos nutrientes dentro e fora das células, da concentração iônica e da concentração de outros hormônios (*Porte Jr. e Halter, 1981*).

A insulina é sintetizada como precursor de cadeia única, a pró-insulina (*Steiner, 1967; Steiner*

e col., 1967). Dentro dos grânulos de armazenam^{en}to, a açã^o enzimática determina a liberaçã^o do hormôn^{io} ativo que é um peptíd^{io} composto de 51 amino-ácidos, distribuíd^{os} em duas cadeias, A e B, unidas por pontes dissulfeto. A cadeia A é formada por 21 amino-ácidos e a cadeia B por 30 (Steiner, 1977).

Esse hormôn^{io} foi identificado em ilhotas de Langerhans de todas as espécies de vertebrados estudadas, e, evidências imunológicas e biológicas indicam sua presença também no sistema digestivo de alguns invertebrados (Falkmer e col., 1973). Comparada com outras moléculas protéicas, a insulina foi altamente preservada na evoluçã^o, com substituiçã^o de um amino-ácido, com velocidade aproximada de 1×10^{-9} amino-ácidos/locus/ano. Assim, a insulina de um vertebrado primitivo difere da humana por aproximadamente 38 % de seus resíduos (Blundell e Wood, 1975).

A determinaçã^o da estrutura primária da insulina de mais de 25 espécies de vertebrados indica que a substituiçã^o de amino-ácidos pode ocorrer em muitas posiçõ^{es} dentro de uma das cadeias, sem que haja grandes alteraçõ^{es} na eficácia biológica do hormôn^{io}, medida por vários sistemas de bio-ensaio.

Por outro lado, muitas características estruturais foram conservadas por toda evolução dos vertebrados, incluindo a posição 3 da ligação dissulfeto, a região *N*-terminal e *C*-terminal da cadeia A, e os resíduos hidrofóbicos na região *C*-terminal da cadeia B, bem como outros (Carpenter, 1966). Desde que as mudanças na conformação molecular de qualquer dessas regiões tendam a reduzir marcadamente ou abolir a atividade hormonal, elas podem ser consideradas fundamentais para a manutenção das características estruturais secundárias e terciárias, importantes e necessárias para a atividade biológica (Carpenter, 1966).

Apesar de a insulina de diferentes espécies animais apresentar diferenças estruturais, ela conservou sua atividade biológica fundamental, ainda que possam existir diferenças em sua potência. Há farta literatura evidenciando efeitos da insulina bovina ou porcina em vertebrados não mamíferos (Revisões de Epple, 1968; Falkmer e Patent, 1972; Penhos e Ramey, 1973). Por outro lado, a insulina do vertebrado mais primitivo, a lampréia *Myxine glutinosa*, exerceu ação similar à da insulina porcina em células gordurosas de rato, em experimento *in vitro* (Emdin e col., 1977) e a insulina de distintas aves foi igualmente ativa em diafragma de ratos (Hazelwood e

col. 1968; Weitzel e col., 1969), enquanto que extratos pancreáticos de tartaruga produziram convulsões em camundongos (Marques e Kraemer, 1968). Mais recentemente foi comprovado experimentalmente que a insulina de galinha e tartaruga apresentam idêntica reação cruzada com anticorpos anti-insulina porcina (Langslow e col., 1973).

Durante os últimos anos surgiram evidências de que a primeira etapa do mecanismo de ação da insulina consiste em sua ligação a sítios específicos da membrana celular (Levine, 1965). Inicialmente havia apenas bases teóricas que postulavam que o local de ação da insulina era a membrana citoplasmática da célula-alvo. A demonstração deste fenômeno tornou-se possível quando se pôde marcar substâncias polipeptídicas com radioisótopos, especialmente [^{131}I] e [^{125}I] (Elgee e col., 1953; Elgee e col., 1954; Sonenberg e col., 1954; Richards e Sayer, 1951).

Apesar de o [^{125}I] não ser o constituinte normal da insulina, ele pode ligar-se aos grupos *tirosina* e/ou *histidina*. Se a iodação se faz com grande número de átomos de iodo, o hormônio torna-se inativo. Entretanto, se essa iodação é feita de modo que se encontre, no máximo, um átomo de iodo para cada molécula de insulina, não se observa nenhuma perda da atividade do hormônio (Elgee e col., 1954). Monoiodo-

insulina foi virtualmente indistinguível da insulina nativa em sua capacidade de estimular a oxidação da glicose em adipócitos e hepatócitos de ratos (*Freychet e col., 1971*), o que foi amplamente confirmado posteriormente.

Os primeiros estudos de ligação de hormônio aos tecidos-alvo empregavam medidas de desaparecimento do hormônio do meio de incubação (*Stadie e col., 1951; Crofford, 1968*). Posteriormente sua captação pelas células-alvo passou a ser avaliada por procedimentos que empregavam substâncias radioativas. Os trabalhos pioneiros de *Lin e Goodfriend (1970)* e de *Lefkowitz e col. (1970, 1970, 1971)* permitiram a medida indireta das propriedades e concentrações de receptores na suprarrenal a $[^{131}\text{I}]$ angiotensina e ao $[^{131}\text{I}]$ ACTH, respectivamente.

Baseados no princípio do radioimunoensaio, introduzido por *Berson e Yalow (1968)*, surgiram estudos da interação direta desses hormônios peptídicos a seus receptores específicos em células-alvo. A utilização de hormônio radioativo para a ligação *in vitro* (*Stadie e col., 1953*) foi contestada inicialmente por muitos autores, devido à incerteza da especificidade de ligação desses hormônios radioativos. Essa dúvida foi superada pelo trabalho constante de pesquisadores que conseguiram comprovar a semelhança

entre os resultados obtidos *in vitro*, com o hormônio marcado, e os ensaios biológicos realizados com essa mesma substância (Richard e Sayer, 1953; Kono e Barhan, 1971; Freychet e col., 1971). Esses métodos *in vitro* com hormônios peptídicos marcados, com alta radioatividade específica, permitiram demonstrar sítios específicos de ligação a essas substâncias, ou seja, os receptores (Roth, 1973).

Uma vez estabelecido, com razoável segurança, que a interação de ligação reflete uma interação inicial biologicamente significativa, é possível romper a célula para determinar quantitativamente a localização da estrutura de ligação da insulina, para comparar as propriedades obtidas por esses métodos com aquelas observadas na célula intacta e proceder a uma extração posterior do receptor e sua purificação (Cuatrecasas, 1971). Com essa finalidade, iniciaram-se as experiências com membranas isoladas de células para a observação da ligação hormonal. Após a ruptura da célula, as estruturas específicas de ligação da insulina podem ser recolhidas quantitativamente em uma determinada fração e as propriedades cinéticas de ligação desse hormônio a essa fração específica pode equivaler à ligação cinética observada nas células intactas (Cuatrecasas, 1971). A extração vigorosa da membrana com certos solventes orgâ-

nicos ou sua digestão pela fosfolipase não diminui ou altera as propriedades de ligação da insulina às moléculas que podem ser subsequentemente solubilizadas com detergentes (*Cuatrecasas, 1971*). O receptor da insulina é, pois, um exemplo de estrutura que, apesar de ser constituinte da membrana biológica, não depende grosseiramente da membrana lipídica, ao menos para uma de suas funções, isto é, para o reconhecimento da insulina.

A medida direta da ligação do hormônio a seu receptor específico foi realizada em um grande número de tecidos-alvo. A maioria de tais estudos foi inicialmente realizada em homogenizados celulares e/ou frações parcialmente purificadas de membranas. Entretanto, com o aumento do uso da cultura de tecidos e de células-alvo dispersas com enzimas, iniciou-se o estudo com células intactas para a observação da interação de hormônio-receptor, com muitas vantagens evidentes (*Catt e Dufau, 1977*). Quando apropriadamente preparadas, as células-alvo demonstram a mesma alta especificidade e afinidade para hormônios peptídicos (*Gavin e col., 1973; Kono e Barham, 1971*), que os preparados de células lisadas. A vantagem de utilização de células dispersas consiste na possibilidade de correlacionar o fenômeno da ligação hormonal com a resposta bio

lógica, que depende da atividade metabólica da célula intacta.

Para que o princípio do radioimunoensaio pudesse ser aplicado ao estudo dos hormônios e seus receptores, foi necessário, não só demonstrar a persistência da atividade biológica dessas substâncias, quando ligadas ao iodo radioativo, mas também que se pudesse excluir a *adsorção inespecífica* da substância radioativa, ou seja, aquela quantidade de substância marcada com isótopos radioativos que não se encontra diretamente ligada ao receptor hormonal. Para se excluir essa *adsorção inespecífica* utilizaram-se estudos de *competição quantitativa*. O hormônio nativo ou seus derivados competem com o hormônio marcado em sua ligação com seus receptores, de forma quantitativa, que pode ser prevista com base na sua potência relativa, enquanto que as proteínas não relacionadas não têm efeito (Lefkowitz e col., 1970).

Para que um hormônio vá ativar um tecido-alvo, ele deve, em primeiro lugar, ligar-se a alguns constituintes da célula (Roth, 1973). Para a elucidação adequada da base molecular da ação de hormônio polipeptídico, deve-se identificar, caracterizar, isolar e purificar as estruturas receptoras específicas da célula, com as quais os hormônios inicialmente inter

agem (Cuatrecasas, 1972). Os sítios de ligação situados na superfície da célula e que servem de local de ação da insulina foram denominados *receptores* (Cuatrecasas, 1971; Kahn, 1976). *Receptores* significam aquelas moléculas da célula que são capazes de reconhecer e interagir com um determinado hormônio com alto grau de seletividade e afinidade e, que, adicionalmente, possuem a capacidade de transmitir ou informar a ocorrência dessa interação para processos bioquímicos, determinando eventos metabólicos significativos (Cuatrecasas, 1972). Assim, o receptor apresenta duas funções: a primeira, de reconhecer especificamente um determinado hormônio, e a segunda, de informar, de alguma forma, o reconhecimento desse hormônio para outras moléculas (Cuatrecasas, 1972).

Além da afinidade da insulina ao receptor, a atividade biológica desse hormônio vai depender da concentração de receptores de uma determinada célula. O número de sítios de ligação insulina-receptor por célula é limitado, com menos de um milhão por célula para cada sistema estudado (Lefkowitz e col., 1971; Means e Vaitukaitis, 1972; Cuatrecasas, 1971; Gavin e col., 1973), sendo calculadas por aproximação, porque o estado de equilíbrio (*steady state*) pode não representar um verdadeiro equilíbrio, pois nem todos os sítios são expostos ao meio de modo uniforme.

Além disso, há alguma degradação do hormônio e do receptor no curso dos estudos (*Kahn e col.*, 1972). Cerca de 11.000 moléculas de insulina podem se ligar a uma célula (*Cuatrecasas*, 1971; 1972). Enquanto que o número de receptores à insulina por célula varia amplamente de tecido a tecido e de espécie a espécie, a concentração de receptores por unidade de superfície de célula parece ser similar (*Ginsberg e col.*, 1977).

No estudo da ligação específica hormônio-receptor, deve-se ter em conta que ela depende da concentração do hormônio e do receptor, da temperatura e do tempo (*Roth*, 1973). Deve ser considerado que, apesar de a atividade intrínseca de todas as insulinas de origem animal ser idêntica (*Muggeo e col.*, 1979), observam-se diferenças na sua potência, de acordo com as espécies estudadas. Isso pode ser atribuído a diferenças de afinidade da insulina com seus receptores (*Muggeo e col.*, 1979; *Zimmerman e col.*, 1974). Apesar de terem havido alterações na estrutura da insulina durante o período evolutivo, as características de seus receptores permaneceram marcadamente constantes (*De Meyts e col.*, 1975; *Muggeo e col.*, 1979). Estudos da atividade biológica, afinidade a receptores e sequência da insulina de diferentes animais sugerem fortemente que uma região invariável localizada na super-

fície do monômero da insulina pode ser o local da ligação ao receptor (*Blundell e col., 1972; Pullen e col., 1976*). Essa região inclui os resíduos da cadeia A e da cadeia B adjacente. O envolvimento desses resíduos foi também testado por estudos das propriedades biológicas e afinidade dos receptores à insulina especificamente modificada (*Freychet e col., 1974; Gliemann e Gammeltoft, 1974*). Apesar de os resíduos envolvidos na ligação do receptor não serem necessariamente os mesmos responsáveis pelo desencadeamento dos efeitos biológicos dos hormônios, parece que para a insulina, mesmo com ampla variação na afinidade de ligação, há um paralelismo entre essa afinidade de ligação e a potência biológica (*De Meyts e col., 1978*).

A ligação da insulina ao receptor foi estudada em grande detalhe nas células gordurosas intactas, sob condições que permitem simultaneamente sua medida e correlação com a resposta biológica (*Cuatrecasas, 1971*). Identificaram-se mais recentemente, receptores à insulina em células circulantes como monócitos (*De Meyts e col., 1976; Nielsen e Pedersen, 1978*), leucócitos (*Pedersen e Nielsen, 1976*) e eritrócitos (*Gambhir e col., 1978*) e em outros órgãos como o sistema nervoso central (*Havrankova e col., 1978; Pacold e Blackard, 1979*), timo (*Goldfine e col., 1972*) e glândula submandibular

(*Sacchi e col.*, 1982). Todos estes estudos foram realizados em mamíferos.

Com relação ao registro de receptores de insulina em tecidos de animais não mamíferos, a literatura é ainda muito escassa. Foi porém demonstrada a presença de receptores insulínicos em hepatócitos de aves (*Simon e col.*, 1977); em fígado, músculo esquelético e rim de anfíbios (*Posner e col.*, 1974) e em eritrócitos de aves (*Ginsberg e col.*, 1977), de anfíbios e de peixes (*Muggeo e col.*, 1979).

Estudo comparativo das características dos receptores em eritrócitos de diversos vertebrados (de peixes a mamíferos, com exclusão de répteis) parece indicar que o receptor foi altamente conservado em todas as espécies, principalmente com respeito aos efeitos da temperatura e do pH, à especificidade à insulina e seus análogos e à cooperatividade negativa (*Muggeo e col.*, 1979). Cooperatividade negativa significa que a ligação da insulina ao sítio receptor induz à perda de afinidade de outros sítios receptores para a insulina, devido, nesse caso, a uma velocidade de dissociação acelerada do complexo insulina - receptor (*De Meyts e col.*, 1978). *De Meyts e col.* (1978) demonstraram uma região específica e bem definida, dentro da área de ligação do hormônio que é responsável pela indução da cooperatividade negativa. Esta propriedade que é característica dos receptores

ã insulina foi amplamente conservada durante a evoluçãõ como uma atividade intrĩnseca da insulina, e, a parentemente, permanece invariãvel atravẽs de toda a histõria da evoluçãõ dos vertebrados, que se estende aproximadamente por meio bilhãõ de anos (*De Meyts e col., 1978*).

Alẽm das tẽcnicas de *binding in vitro* utiliza - das para identificar e caracterizar os receptores hormonais em diferentes tecidos, desenvolveu-se um mẽtodo *in vivo*, baseado no mesmo princĩpio da competiçãõ quantitativa entre o hormõnio marcado e o nãõ marcado. Este mẽtodo, introduzido por *Puca e Bresciani (1969)*, para estudo da interaçãõ do 6,7-³H-17 beta estradiol com a glãndula mamãria e outros õrgãos, no camundongo, mostrou-se vãlido para a identificaçãõ de sĩtios receptores a outros hormõnios (*Kammerman e Canfield, 1972; Boyland e Wittliff, 1973; Turyn e Dellacha, 1978; Marques e col., 1979; Bergeron e Posner, 1979; Warshawsky e col., 1981*). O mẽtodo *in vivo* embora nãõ permita a determinaçãõ da afinidade e da concentraçãõ dos receptores hormonais, satisfaz os critẽrios de dose-dependẽncia, saturabilidade e especificidade exigidos para sua identificaçãõ.

Atravẽs do mẽtodo *in vivo*, *Gagliardino e col. (1980)* demonstraram a presençã de receptores ã insulina no fĩgado de ratos, indicando a validade do mẽ-

todo, uma vez que concorda com os dados obtidos nos clássicos experimentos *in vitro*. Com método autoradiográfico *in vivo* identificaram-se sítios receptores em distintas áreas do sistema nervoso central (van Houten e Posner, 1979; van Houten e Posner, 1981), no pâncreas exócrino (Bergeron e col., 1980) e na glândula submandibular do rato (Sacchi e col. 1982). Marques e col. (1979, 1982), trabalhando com tartarugas *Chrysemys dorbigni*, identificaram através de experimentos *in vivo* a presença de sítios específicos de ligação à insulina na hipófise e nas suprarrenais. Estas observações foram confirmadas em frações microssomais de hipófise de rato (Turyn e Dellacha, 1980) e em hipófises intactas *in vitro* (Belló e col., 1982). Estes últimos autores evidenciaram ainda uma ação estimuladora da insulina sobre a captação de desoxiglicose na hipófise, confirmando pela ação biológica a provável presença de receptores insulínicos nessa glândula.

A observação de captação específica da [^{125}I] insulina pelas adrenais de tartarugas (Marques e col. 1979, 1982) foram confirmadas no rato, bem como foi demonstrada a ação da insulina sobre a captação de desoxiglicose por essa glândula *in vitro* (Machado e col., 1982). Através de autoradiografia quantitativa, Bergeron e col. (1980) igualmente registraram cap

tação específica da insulina pela adrenal de ratos.

Uma vez que glândulas endócrinas, como a hipófise e as suprarrenais podem ser consideradas órgão-alvo para a ação da insulina, julgou-se importante verificar se a glândula tireóide poderia apresentar também sítios de ligação específica a esse hormônio.

Elegeram-se como modelo experimental a tartaruga, cuja tireóide apresenta particularidades que favorecem o estudo da ligação do hormônio marcado com [^{125}I]. A captação de iodo pela tireóide desses animais é relativamente lenta (Chow e col., 1981) em comparação com a de outras espécies. Este fato poderia facilitar a distinção dos dois fenômenos: captação específica da [^{125}I] insulina e a captação do iodo radioativo resultante da possível degradação do hormônio marcado *in vivo*.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo identificar a presença de sítios de ligação específica à [^{125}I] insulina na tireóide de tartarugas *Chrysemys dorsalis*, através do método *in vivo* descrito por *Puca e Bresciani (1969)* e adaptado para a insulina por *Gagliardino e col. (1980)*, e comparar a captação específica do hormônio pela análise de filtração molecular em gel do material radioativo contido na glândula.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS:

Os experimentos foram realizados em tartarugas *Chrysemys dorbigni* (Reptilia, Chelonia), adultos, machos e fêmeas, com pesos oscilando de 800 a 1850 g.

Os animais foram colhidos em um dos afluentes do Guaíba, o rio Jacuí, que se situa nas proximidades de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. No Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, os animais foram mantidos em tanques especiais, com água corrente, à temperatura ambiente, com uma ilhota de terra central. A alimentação mista (carne moída e vegetais) *ad libitum* foi mantida durante o período de adaptação desses animais, no Biotério (de 7 a 10 dias).

Vinte e quatro horas antes da realização do experimento, as tartarugas eram trazidas ao laboratório e mantidas em recipientes com água e sem alimentação até que seu estudo fosse realizado. A temperatura corporal foi mantida relativamente constante, com variações mínimas, pois procurou-se conservar a temperatura ambiente ao redor de 24°C, por meio de condicionadores de ar, durante todo o tempo em que se desenvolveu o experimento.

2. SOLUÇÕES UTILIZADAS:

2.1. [^{125}I] insulina:

A insulina porcina foi marcada com iodo radioativo (^{125}I), de acordo com o procedimento de *Greenwood e col. (1963)*, ligeiramente modificado. O iodeto de sódio radioativo procedia da New England Nuclear. A marcação da insulina com iodo radioativo foi realizada no Departamento de Química Biológica da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de Buenos Aires, pelos professores Juan Modesto Dellacha e Daniel Turyn.

O hormônio iodado foi previamente testado e depois congelado a menos 20°C, acondicionado com proteção de chumbo e congelado a -20°C. Após, no máximo, quatro dias de sua marcação com iodo, a insulina era trazida a Porto Alegre.

Previamente à administração do hormônio marcado às tartarugas, realizou-se sua purificação através de cromatografia em gel de filtração com Sephadex G-50.

O Sephadex G-50 era preparado suspendendo-se 3 g desse gel em 150 ml de água destilada e aquecendo-se a mistura durante uma

hora em banho maria. Após esfriar e decantar, desprezava-se o sobrenadante. Adicionavam-se ao precipitado, outros 150 ml de solução tampão de Krebs-Ringer. Este procedimento era repetido três vezes. Finalmente o Sephadex, assim preparado, era colocado lentamente em uma coluna de vidro de 0,7 cm de diâmetro e 60 cm de altura, atingindo 40 cm de altura, quando, então, se completava com solução de Krebs-Ringer. Fazia-se a conexão da coluna com uma pera de decantação, contendo também a solução tampão. Deixava-se a coluna, assim preparada, com fluxo interrompido, durante toda a noite, a uma temperatura de 4°C. Na manhã seguinte, adicionava-se albumina (Sigma Chemical Company) ao tampão, de modo a ter uma concentração de 1 % e deixava-se passar pela coluna durante duas horas. A velocidade de fluxo era de 0,5 ml em cada 2,5 minutos.

Após duas horas, colocava-se uma amostra de [125 I] insulina (0,1 a 0,2 ml), diluída em parte igual de tampão Krebs-Ringer, contendo 0,5 % de albumina bovina. Este processo era feito lentamente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Colocava-se o

tampão com 1 % de albumina bovina e deixava-se passar, colhendo amostras do eluído, com intervalos regulares de 2,5 minutos.

Media-se a radioatividade das amostras eluídas da coluna, através de um Espectrômetro Baird Atomic, modelo 530. Eram obtidos três picos de radioatividade, que correspondem ao material agregado, à [^{125}I]insulina e ao [^{125}I] livre, na respectiva ordem de aparecimento. As amostras que corresponderam à [^{125}I] insulina eram reunidas em um só tubo e misturadas. Dessa mistura retirava-se uma amostra de 30 μl para medir a radioatividade. Diluía-se, então, a insulina marcada em cloreto de sódio a 0,9 %, de tal forma a se obter 1 a 2 x 10⁶ contas por minuto em cada 0,5 ml da solução. A dose injetada foi de 0,5 ml/Kg de peso corporal total da tartaruga.

2.2. Insulina:

Foi utilizada insulina bovina cristalina, com atividade de 26 UI/mg (Lilly). Essa insulina era previamente dissolvida em solução de ácido clorídrico 0,06 N e completado o volume desejado com cloreto de sódio

0,9 %. A concentração final da insulina não marcada, adicionada à solução contendo [^{125}I] insulina, variou de 2×10^{-2} a 2×10^3 $\mu\text{g/ml}$. O volume injetado foi sempre de 0,5 ml/Kg de peso corporal total.

2.3. Outros hormônios peptídicos:

Algumas tartarugas foram injetadas com [^{125}I] insulina associada a excesso de outros hormônios peptídicos, como, por exemplo, o hormônio do crescimento humano, o glucagon e a prolactina ovina.

O hormônio do crescimento foi preparado pelo método de *Ross e col. (1963)* e purificado em coluna de Sephadex G-100 no Departamento de Química Biológica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Buenos Aires. O cloridrato de Glucagon (Laboratorio Lilly) e a prolactina (Organização Mundial da Saúde) foram dissolvidos em meio alcalino, a pH 9,5 e diluídos em solução salina, com concentração final, após a adição de [^{125}I] insulina, de $2.000 \mu\text{g/ml}$. Cada animal recebeu 0,5 ml/Kg de peso total, dessa solução, por via intra-aórtica.

2.4. Iodeto de potássio 0,15 M:

Uma solução de iodeto de potássio, na dose de 2,5 ml, foi injetada na veia jugular em um grupo de animais, quatro horas antes da administração da insulina marcada com iodo radioativo. Injetava-se lentamente para evitar alterações cardíacas provocadas pelo potássio contido na solução. O iodeto de potássio tinha por finalidade saturar a tireóide de iodo, para evitar que a possível captação de [^{125}I], produto de degradação da [^{125}I] insulina, pudesse mascarar a captação do hormônio radioativo.

2.5. U A T :

UAT é uma solução constituída por uréia 4M, ácido acético 1M e Triton X-100 a 1%. Ela é preparada dissolvendo-se 240 g de uréia em 500 ml de água destilada e acrescentando 60 ml de ácido acético. Dissolve-se o Triton X-100 em 0,5 ml de água destilada, misturando cuidadosamente com bastão de vidro, até completar 10 ml. Esta solução de Triton X-100 é adicionada à mistura de uréia-ácido acético. Após isso, completa-se com água destilada o volume de 1000 ml.

3. PROCEDIMENTOS GERAIS:

3.1. Medida da captação da [125 I] insulina *in vivo*:

Descrição do método: As tartarugas eram pesadas e, após anestesiadas com pentobarbital sódico, na dose de 25 mg/ml/Kg de peso corporal total, abria-se um retângulo de aproximadamente 6,0 x 7,0 cm, na região ventral da carapaça, com o auxílio de uma serra elétrica. Após a abertura da carapaça, com exposição de todos os órgãos, praticava-se a abertura do saco pericárdico e fazia-se a injeção das soluções em estudo, através da aorta, com posterior fechamento do pertuito deixado pela agulha, com um nó cirúrgico, para evitar não só o sangramento, como também o refluxo das substâncias injetadas.

Para o estudo da ligação específica da insulina à tireóide *in vivo*, utilizou-se a técnica anteriormente descrita por Turyn e Dellaacha, em 1978.

Após determinados intervalos de tempo da injeção de [125 I] insulina, segundo os grupos experimentais, eram colhidas amostras de sangue, através de punção ventricular, e colo

cados em três tubos previamente pesados. A glândula tireóide, localizada na região anterior dos grandes vasos da base, era retirada e dissecada, colocada sobre papel filtro, seca, e após, introduzida no interior de um tubo também previamente pesado. Tomava-se o cuidado para que o tecido, bem como o sangue, ocupasse a porção mais inferior do tubo. Se tal não acontecesse, procedia-se à centrifugação por dois minutos a 3.000 rotações por minuto, em centrífuga *Internacional*, para que todo material ficasse depositado no fundo do tubo e conseqüentemente sua radioatividade ficasse contida na geometria do poço contador.

A radioatividade das amostras era medida em Espectrômetro Baird Atomic, modelo 530 e calculava-se o número de contas por minuto por grama de tecido ou de sangue, sendo os resultados expressos pela relação contas por minuto por grama de tecido por contas por minuto por grama de sangue.

Grupos experimentais:

Grupo I : Captação específica de [^{125}I]insulina em tartarugas *Chrysemys dorsalis*, machos e fêmeas, após uma hora da injeção do

hormônio marcado, a 25º C. Cinco animais machos e quatro animais fêmeas foram injetados com [¹²⁵I] insulina isoladamente, e quatro machos e cinco fêmeas receberam, além de insulina marcada, insulina em excesso (1 mg/Kg), para verificar-se a influência do sexo dos animais na captação do hormônio.

Grupo II : Captação de [¹²⁵I] insulina em presença de excesso de outros hormônios peptídicos . Foram estudadas 22 tartarugas machos, distribuídas em cinco subgrupos. O primeiro subgrupo serviu de controle e recebeu apenas insulina marcada; o segundo foi injetado com excesso de insulina não marcada; o terceiro recebeu, além de insulina marcada , excesso de hormônio de crescimento (hGH); o quarto recebeu excesso de prolactina ovina e, finalmente, o último subgrupo de quatro tartarugas recebeu excesso de glucagon. Todos esses subgrupos receberam concomitantemente [¹²⁵I] insulina. Os animais foram sacrificados após uma hora da injeção dos hormônios.

Grupo III: Captação da [¹²⁵I] insulina em tartarugas fêmeas, em função do tempo. O hormônio marcado em estudo foi injetado em 16 tartarugas fêmeas. Grupos de 4 animais foram sa-

sacrificados aos 30, 60, 120 e 180 minutos, após a injeção intra-aórtica de insulina marcada. Outros 14 animais receberam, além de [^{125}I] insulina, um excesso de insulina não marcada (1 mg/Kg de peso total), e, também foram sacrificadas nos mesmos intervalos de tempo.

Grupo IV : Captação de [^{125}I] insulina em função do tempo, em tartarugas fêmeas previamente injetadas com iodeto de potássio. O iodeto de potássio 0,15 M, na dose de 2,5 ml foi administrado 4 horas antes da injeção de [^{125}I] insulina, por via endovenosa, para a observação da influência do iodo na captação do hormônio marcado. Foram injetados 12 animais do sexo feminino os quais foram sacrificados aos 30, 60, 120 e 180 minutos. Outro grupo de 12 animais recebeu além de iodeto de potássio e da insulina marcada, excesso de insulina não marcada, na dose de 1 mg/Kg de peso corporal total.

Grupo V : Captação específica da [^{125}I] insulina pela tireóide, em presença de doses crescentes de insulina não marcada, com a finalidade de determinar a curva dose-efeito na inibição da captação do hormônio marcado pela in

ulina não marcada. Vinte e oito tartarugas machos foram injetadas com [^{125}I] insulina e doses crescentes de insulina não marcada, nas concentrações de 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 , 10^1 , 10^2 e 10^3 $\mu\text{g/Kg}$ de peso em um volume de 0,5 ml. Os animais foram sacrificados uma hora após a injeção das substâncias. Idêntico procedimento foi efetuado em tartarugas injetadas 4 horas antes com iodeto de potássio (2,5 ml /Kg de peso de solução 0,15 M).

3.2. Análise da natureza do material radioativo:

Procedimento in vivo:

Após anestésiar as tartarugas com pentobarbital sódico (25 mg/Kg de peso corporal), procedia-se à abertura da carapaça na porção ventral do animal, conforme já foi descrito no método de captação de [^{125}I] insulina *in vivo*, na página 23. Após determinado intervalo de tempo da administração de [^{125}I] insulina, retirava-se uma amostra de sangue, por punção ventricular e extirpava-se a glândula tireóide.

Extração do material radioativo:

A *tireoide*: retirada a *tireoide*, esta era dissecada, pesada e lavada em solução salina. Conservava-se em gelo. Após cortar a *tireoide* com uma tesoura, em pequenos fragmentos, estes eram retirados da solução salina e colocados em 3 ml de UAT. Procedia-se, então, à homogenização do tecido *tireoideo* com o homogenizador de vidro, por dois minutos, com velocidade máxima. Após, deixava-se em repouso no gelo, por alguns minutos, até desaparecer a espuma. Centrifugava-se, então, o homogenizado em Centrífuga *Sorval*, por 15 minutos, a 10.000 gravidades. O sobrenadante era colocado em tubos plásticos, após prévia retirada da camada de gordura. Contava-se a radioatividade do sobrenadante em 3 a 4 alíquotas de 200 μ l. Ao precipitado acrescentavam-se 2 a 3 ml de hidróxido de sódio a 1 M e agitava-se até constituir uma mistura homogênea. Retirava-se uma alíquota de 200 μ l para medir a radioatividade e calculava-se a radioatividade total contida no precipitado. Em geral, menos de 10 % da radioatividade total do homogenizado da *tireoide* aparecia no precipitado.

O plasma : o sangue era colocado em tubos heparinizados para não coagular e, posteriormente centrifugado. O plasma assim obtido era colocado em gelo. Retirava-se após uma alíquota de 50 μ l para contagem radioativa e outra alíquota que contivesse 20.000 a 100.000 contas por minuto. A esta amostra acrescentava-se solução de UAT, de forma a completar um volume de 1,5 ml.

A [125 I] insulina: dilui-se em 2 ml de UAT a gota que restou na seringa utilizada para injetar a [125 I] insulina. Contou-se a radioatividade contida em 200 μ l. Utilizou-se uma amostra desse preparado, contendo cerca de 100.000 contas por minuto, para eluir em coluna de Sephadex G-50 e estabelecer o perfil cromatográfico da [125 I] insulina injetada.

Filtração molecular em gel:

Para estabelecer a natureza do material radioativo contido no plasma e na tireóide foi realizada a filtração molecular em gel. Cada amostra de tecido, plasma ou [125 I] insulina foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex G-50 equilibrada com UAT.

A coluna de Sephadex G-50 foi preparada da seguinte forma: pesaram-se 3g de Sephadex G-50 e dissolveu-se em água destilada, aquecendo em banho maria, durante uma hora. Após esfriar e decantar, colocou-se o líquido lentamente em uma coluna de 0,7 cm de diâmetro e 60 cm de altura. Deixou-se passar 150 a 200 ml de água destilada para compactar e lavou-se a coluna com 150 ml de UAT.

Semeou-se ao redor de 1,5 ml de material em estudo (sobrenadante, plasma ou [125 I] insulina). Foram recolhidas frações de aproximadamente 800 μ l, em um minuto, em cada tubo, num total de 100 tubos. Este processo foi realizado a uma temperatura constante de 20 $^{\circ}$ a 25 $^{\circ}$ C. As amostras assim obtidas foram contadas em Espectrômetro Baird Atomic, modelo 530.

Grupos experimentais:

Estes grupos experimentais estavam constituídos por animais fêmeas, com pesos variáveis entre 1.100 e 1.950 g.

Grupo I : cinco tartarugas fêmeas foram injetadas com [125 I] insulina isoladamente e foram sacrificadas respectivamente após 15, 30, 60, 120 e 180 minutos da injeção.

Grupo II : cinco tartarugas fêmeas foram injetadas com [^{125}I] insulina associada a excesso de insulina não marcada (1 mg/ml/Kg de peso total) e foram sacrificadas aos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após a injeção dos hormônios, respectivamente.

Grupo III : cinco tartarugas fêmeas foram injetadas com iodeto de potássio, na dose de 2,0 ml, por via intra-aórtica, 15 minutos antes da administração do hormônio marcado. Esses animais foram sacrificados após 15, 30, 60, 120 e 180 minutos da administração da insulina marcada.

Grupo IV : duas tartarugas fêmeas receberam 2,0 ml de iodeto de potássio 15 minutos antes da injeção de [^{125}I] insulina associada à insulina não marcada em excesso. Os animais foram sacrificados aos 120 minutos da administração do hormônio radioativo.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média. Utilizou-se para análise estatística o teste t de Student para amostras independentes. O nível de significância foi de 5 %.

RESULTADOS

Captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas

Chrysemys dorsalis machos e fêmeas:

A *tabela I* mostra os resultados da captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas machos e fêmeas, uma hora após a injeção de [^{125}I] in sulina ou de [^{125}I] insulina associada a um excesso de insulina não marcada. Pode-se observar que a relação entre a radioatividade do tecido tireóideo e a do sangue foi estatisticamente mais elevada nos animais que receberam apenas [^{125}I] insulina, do que naqueles injetados com insulina não marcada juntamente com [^{125}I] insulina. Não houve diferenças estatisticamente significativas na captação de radioatividade pela tireóide de tartarugas machos e fêmeas.

TABELA I

Captação da radioatividade pela tireóide de *Chrysemys dorsibigni*, uma hora após a injeção de [^{125}I] insulina apenas ou juntamente com insulina não marcada.

ANIMAIS	Relação Tireóide / Sangue (cpm/g T / cpm/g S)		p
	[^{125}I] insulina	[^{125}I] insulina + insulina(1mg/Kg)	
MACHOS	4,27 \pm 0,77* (5)	0,56 \pm 0,12 (4)	< 0,001
FÊMEAS	3,49 \pm 1,07 (5)	0,93 \pm 0,15 (4)	< 0,05

* Médias \pm EPM

Entre parênteses número de animais

Temperatura 25 ° C

Captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas *Chrysemys dorsalis* em presença de vários hormônios polipeptídicos.

Quando a [¹²⁵I] insulina foi administrada juntamente com excesso de insulina não marcada, observou-se uma diminuição da radioatividade captada pela tireóide, enquanto que o glucagon, o hormônio do crescimento e a prolactina não foram capazes de interferir nessa captação, conforme os resultados obtidos neste experimento e que estão sumarizados na *tabela II*.

TABELA II

Captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas *Chrysemys dorsibigni* uma hora após a administração de [125 I] insulina associada ou não à insulina ou outros hormônios polipeptídicos.

[125 I] Insulina + hormônios(1mg/Kg)	Relação Tireóide / Sangue (cpm/g T / cpm/g S)	Valor de <i>p</i> com relação à [125 I] insulina apenas
Nada	4,47 ± 0,83* (6)	
Insulina	0,47 ± 0,07 (4)	< 0,001
Hormônio do crescimento	6,20 ± 1,35 (4)	n.s.
Prolactina	3,91 ± 0,07 (4)	n.s.
Glucagon	3,91 ± 0,87 (4)	n.s.

* Média ± EPM

Entre parênteses número de animais

Temperatura 25 °C

Captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas
Chrysemys dorsalis em função do tempo.

A captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas, após diferentes intervalos de tempo da administração intra-aórtica de [^{125}I] insulina apenas ou associada à insulina não marcada (1 mg/Kg) pode ser vista na *Figura 1*. Da análise dessa figura, observa-se que há um aumento crescente da captação da radioatividade pela tireóide, que se mostra ainda muito elevada após três horas da administração do hormônio marcado. Após a injeção de [^{125}I] insulina associada a um excesso de insulina não marcada, observa-se significativa redução da captação da radioatividade pela tireóide, mas também essa menor captação aumenta em função do tempo.

A *Figura 2* mostra a captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas previamente injetadas com iodeto de potássio. Pode-se ver que os valores da relação T/S alcançam o máximo aos 30 minutos, decrescendo até os 180 minutos. Nesses animais previamente injetados com iodeto de potássio, observa-se também que a insulina não marcada administrada em excesso inibe a captação de [^{125}I] insulina pela tireóide.

Comparando os dados obtidos nesses dois grupos de animais, com ou sem a administração prévia de

iodeto de potássio, observa-se que no primeiro grupo a captação da radioatividade é máxima aos 30 minutos, enquanto que no segundo grupo essa captação continua aumentando até 180 minutos. Quando os animais receberam previamente iodeto de potássio e após [125 I] insulina associada à insulina não marcada, observa-se uma nítida redução na captação da radioatividade pela tireóide, e a relação T/S permanece constante no decorrer do tempo, ao contrário do que se verifica nos animais que não receberam iodeto de potássio.

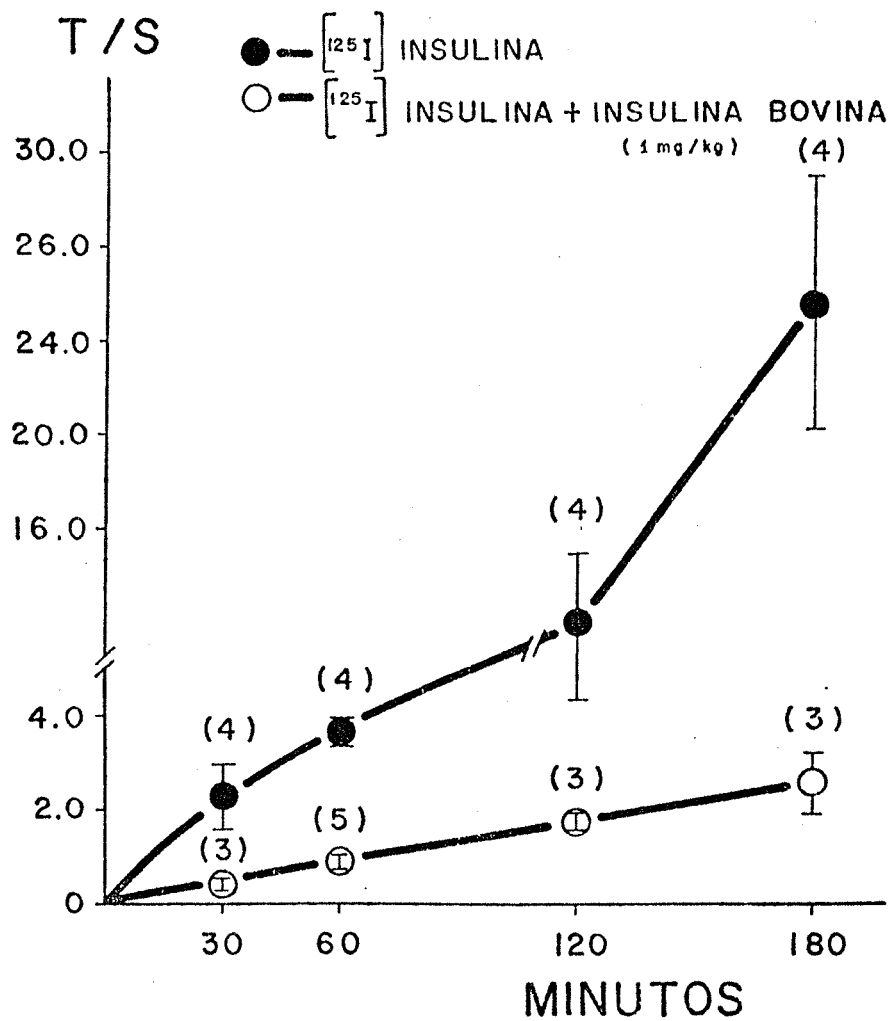


FIGURA 1 - CAPTAÇÃO DA RADIOATIVIDADE PELA TIREÓIDE DE TARTARUGAS *Chrysemys dorsbigni* FÊMEAS APÓS DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO DA INJEÇÃO I.A. DE [125I] INSULINA OU DE [125I] INSULINA MAIS INSULINA NÃO MARCADA. NÚMERO DE ANIMAIS ENTRE PARENTÊSES.

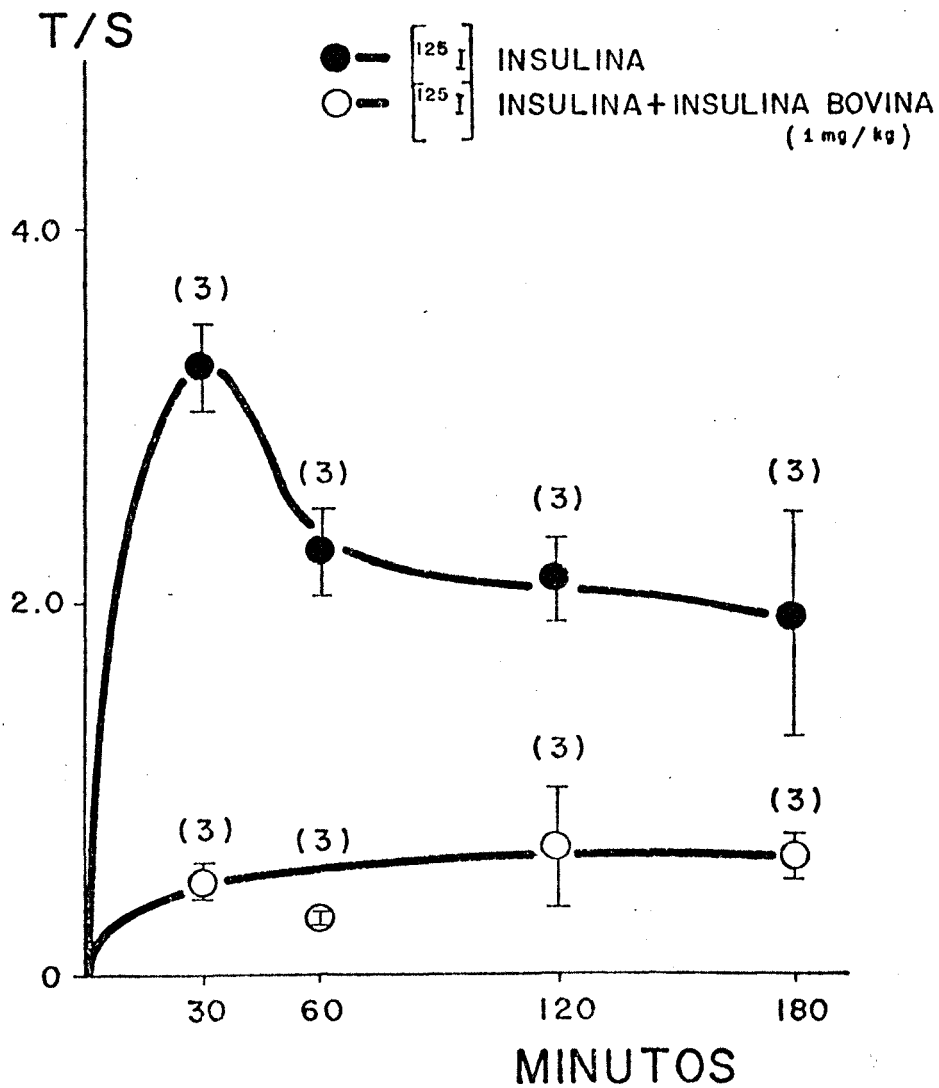


FIGURA 2 - CAPTAÇÃO DA RADIOATIVIDADE PELA TIREÓIDE DE TARTARUGAS *Chrysemys dorsibigni* FÊMEAS APÓS DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO DA INJEÇÃO I.A. DE [125 I] INSULINA. TODOS OS ANIMAIS FORAM INJETADOS COM 2,5 ML DE KI 0,15 M 4 HORAS ANTES DA [125 I] INSULINA. NÚMERO DE ANIMAIS ENTRE PARENTESES.

Captação da radioatividade pela tireóide de tartarugas *Chrysemys dorsalis* em presença de doses crescentes de insulina não marcada.

Doses de insulina não marcada de 10^{-2} ng até 10^3 μ g /Kg de peso corporal total da tartaruga quando injetadas associadas à [125 I] insulina, mostram que a competição é dose dependente. Uma curva dose-efeito pode ser obtida quando as contas por minuto por grama de tecido de tireóide são correlacionadas em função da dose administrada do hormônio não marcado, como pode ser visto na *Figura 3 a*.

Similar curva também é vista quando da administração de iodeto de potássio previamente à injeção de [125 I] insulina e de insulina não marcada aos animais em estudo, como se vê na *Figura 3 b*.

A dose de insulina não marcada necessária para inibir 50 % da captação da radioatividade pela tireóide (ED_{50}) foi de 10^{-1} a 10^0 μ g/Kg de peso corporal, tanto nos animais submetidos à administração prévia de iodeto de potássio como naqueles que não receberam essa substância.

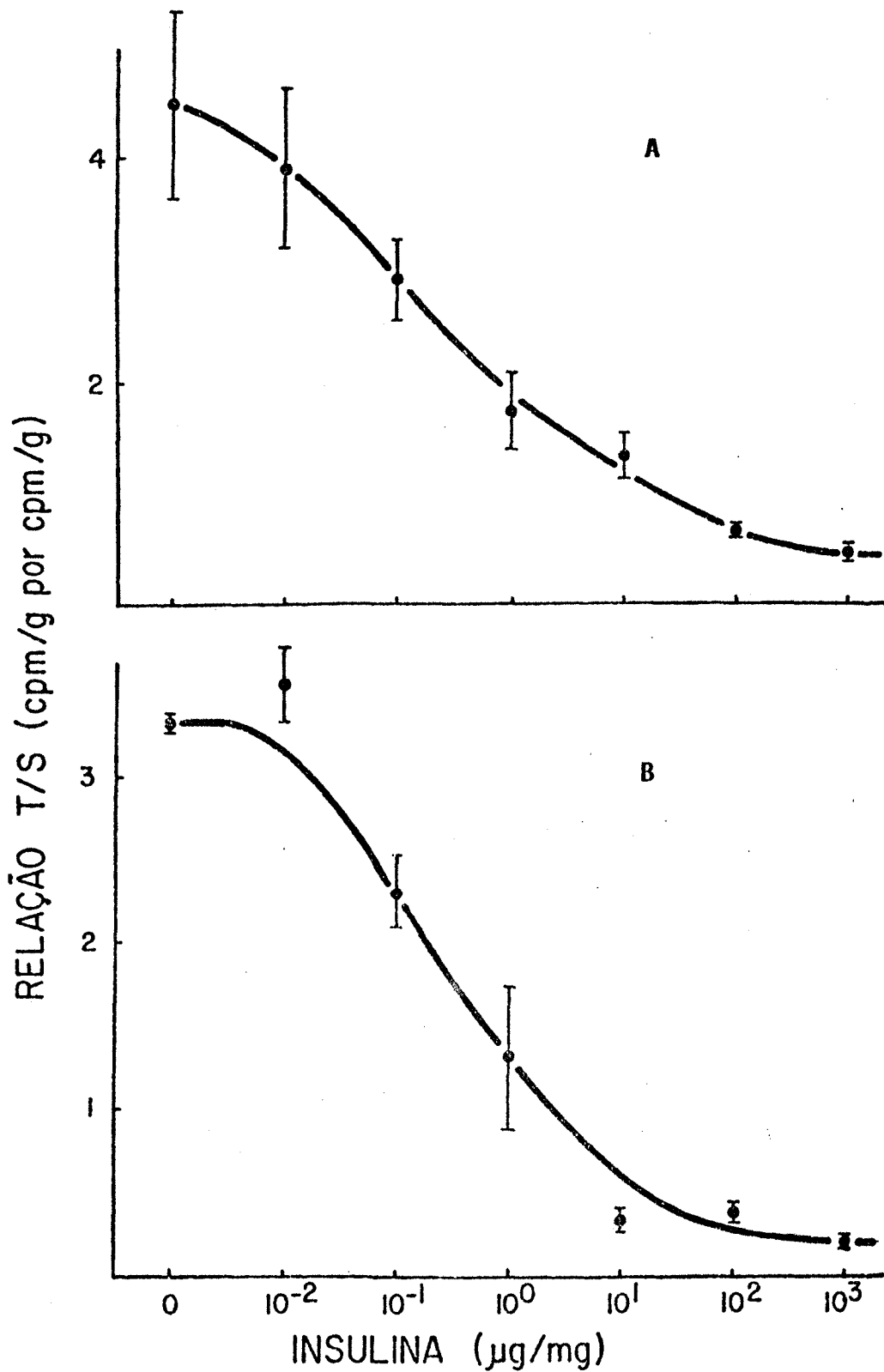


FIGURA 3 - CAPTAÇÃO DA RADIOATIVIDADE PELA TIREÓIDE DE TARTARUGAS *Chrysemys dorsibigni*, EM PRESENÇA DE DOSES CRESCENTES DE INSULINA NÃO MARCADA. Em A, SEM A ADMINISTRAÇÃO DE IODETO DE POTÁSSIO, e em B, ANIMAIS PREVIAMENTE INJETADOS COM SOLUÇÃO DE IODETO DE POTÁSSIO 0,15 M.

Análise da natureza do material radioativo contido na [^{125}I] insulina e no plasma.

A *Figura 4 A* mostra o perfil de eluição, em cromatografia de Sephadex G-50, da solução de [^{125}I] insulina administrada aos animais. Observa-se o aparecimento de três picos. O primeiro pico, da esquerda para a direita por ordem de aparecimento, corresponde ao volume de eluição do Azul Dextran, e é atribuído a agregados de moléculas presentes na preparação de [^{125}I] insulina. O segundo pico, o maior, representa [^{125}I] insulina, uma vez que a insulina não marcada purificada nas mesmas condições elui no mesmo volume. O terceiro pico corresponde a produtos de degradação final da [^{125}I] insulina que eluem com o iodeto de potássio radioativo. Como se pode ver na *Figura 4 A*, a solução de [^{125}I] insulina utilizada nos experimentos encontrava-se praticamente isenta de [^{125}INa].

Os perfis de eluição das amostras de plasma colhidas após 60 minutos da injeção intra-aórtica de [^{125}I] insulina ou de [^{125}I] insulina mais insulina não marcada (1 mg/Kg) encontram-se nas *Figuras 4 B e 4 C*, respectivamente. Em ambas amostras, a maior proporção de radioatividade eluiu no pico correspondente a [^{125}I] insulina. Observa-se, no entanto, na *Figura 4 B* um ligeiro acréscimo de radioatividade no pico correspondente ao [^{125}INa], o que pode indicar es

tar já ocorrendo um certo grau de degradação da [^{125}I] insulina injetada. Este fenômeno torna-se mais evidente aos 180 minutos, quando a maior proporção da radioatividade aparece no pico do [^{125}INa], reduzindo-se o pico correspondente à insulina (*Figura 5 A*).

O plasma colhido aos 180 minutos da injeção de [^{125}I] insulina juntamente com excesso de insulina não marcada mostra um perfil de eluição completamente distinto: a maior proporção da radioatividade aparece no pico da insulina e pequena fração no pico do [^{125}INa], indicando ter ocorrido menor degradação do hormônio marcado (*Figura 5 B*),

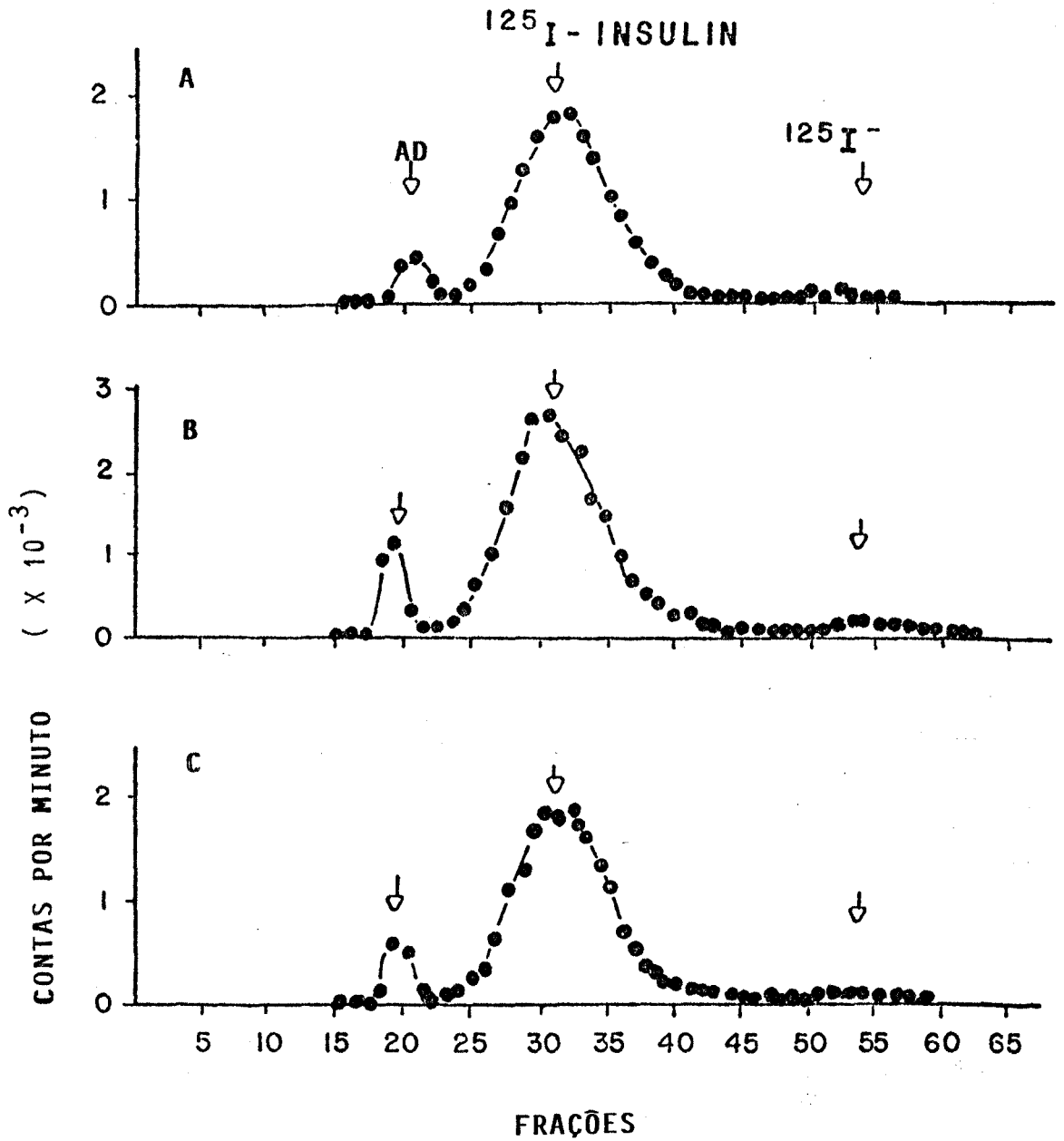


FIGURA 4 - PERFIS DE ELUIÇÃO, EM CROMATOGRAFIA DE SEPHADEX G-50, DA ^{125}I INSULINA (em A) E DO PLASMA AOS 60 MINUTOS DA INJEÇÃO I.A. DE ^{125}I INSULINA OU DE ^{125}I INSULINA MAIS INSULINA NÃO MARCADA (em B e C, respectivamente).

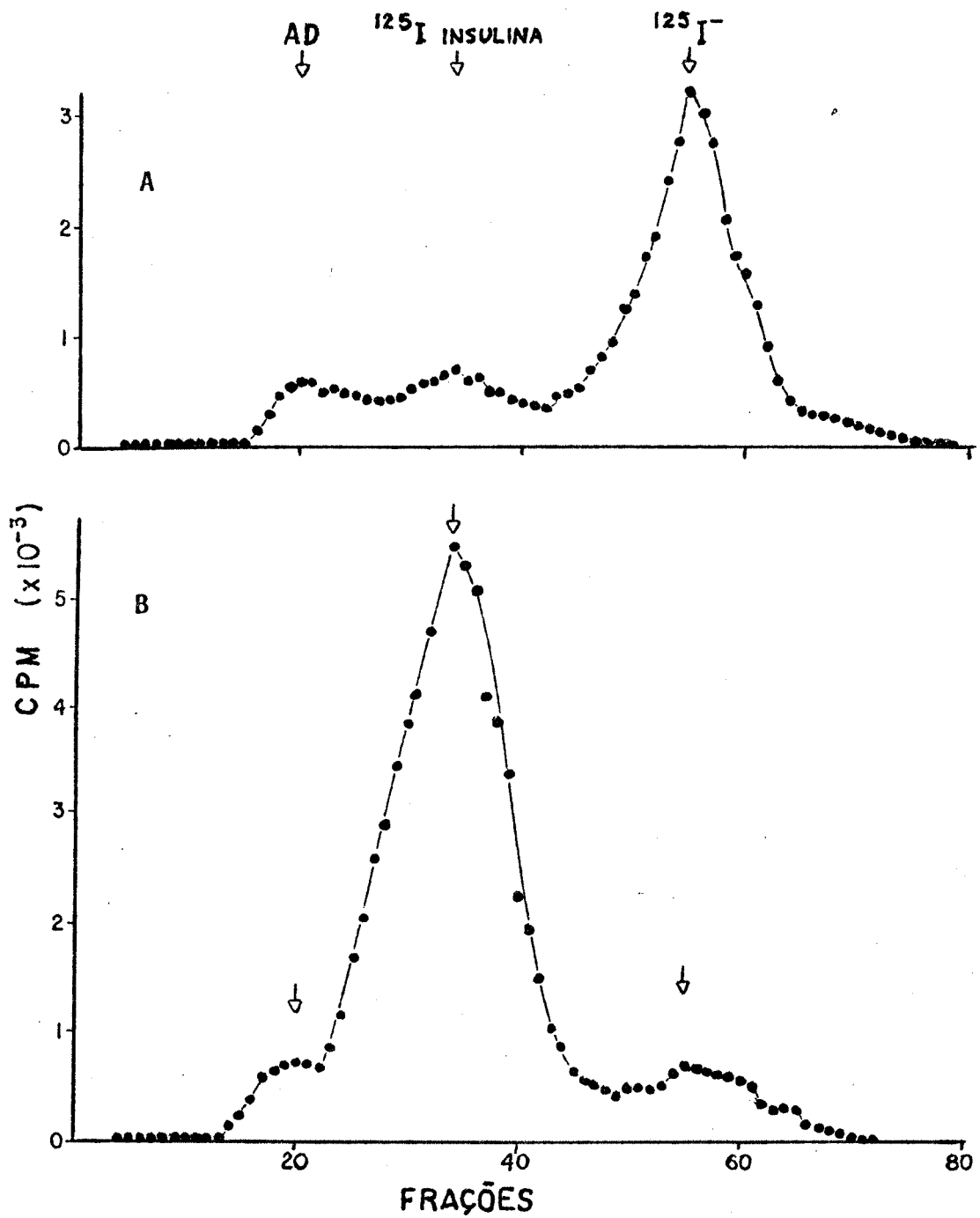


FIGURA 5 - PERFIS DE ELUIÇÃO, EM FILTRAÇÃO MOLECULAR EM GEL DE SEPHADEX G-50, DO PLASMA AOS 180 MINUTOS DA INJEÇÃO I.A. DE $[^{125}\text{I}]$ INSULINA (em A) OU DE $[^{125}\text{I}]$ INSULINA MAIS INSULINA NÃO MARCADA (em B).

Análise da natureza do material radioativo de extratos de tireóide oriundos de animais que receberam exclusivamente [^{125}I] insulina.

A eluição dos extratos de homogenizados de tireóide revelou três picos, como se vê na *Figura 6*. A proporção da radioatividade em cada um desses picos mostra acentuada modificação com o decorrer do tempo. Aos 15 minutos não aparece o primeiro pico, enquanto que o segundo é bem evidente e o terceiro é pequeno (*Figura 6 A*). Aos 30 minutos, vê-se o aparecimento do primeiro pico, continuando nítido o segundo e aumentando o terceiro (*Figura 6 B*). Aos 60 minutos, como se pode verificar na *Figura 6 C*, o segundo pico é nítido e há um aumento do primeiro e terceiro picos, sendo o segundo pico ainda de maior proporção que os demais. Na *Figura 6 D*, que representa material eluído após 120 minutos da administração de [^{125}I] insulina, observou-se o desaparecimento do segundo pico, tornando-se predominante o primeiro, tendo diminuído acentuadamente o terceiro pico. Aos 180 minutos, como se pode ver na *Figura 6 E*, há predominância do primeiro pico, diminuindo o terceiro e continuando ausente o segundo.

Análise do material de extratos de tireóide oriundos de animais que receberam [^{125}I] insulina juntamente com excesso de insulina não marcada.

A administração de [^{125}I] insulina associada à insulina não marcada diminui a captação de [^{125}I] insulina. Isto pode ser visto na *Figura 6*, em que se observa uma redução do segundo pico, em comparação ao encontrado em extratos de tireóides de animais injetados apenas com insulina radioativa. Esta redução na captação se observa dos 15 aos 60 minutos. Aos 120 minutos a proporção de radioatividade é similar nos três picos, e aos 180 minutos a quase totalidade do material radioativo eluiu no primeiro pico. Fenômeno similar foi observado nos extratos de tireóide retirados de tartarugas injetadas apenas com [^{125}I] insulina.

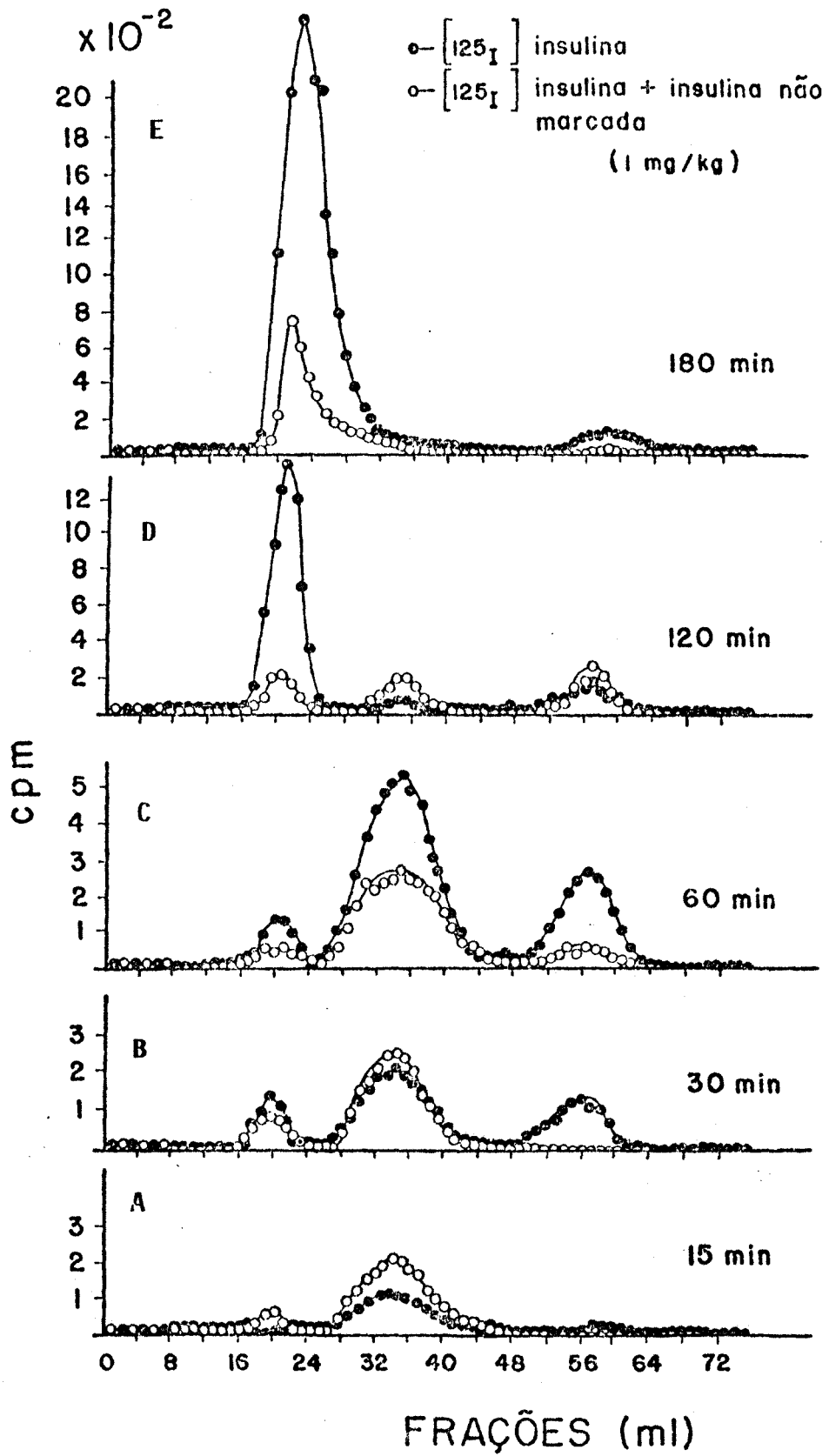


FIGURA 6 - PERFIS DE ELUIÇÃO, EM CROMATOGRAFIA DE SEPHADEX G-50, DE EXTRATOS DE TIREÓIDE DE ANIMAIS QUE RECEBERAM EXCLUSIVAMENTE $[^{125}\text{I}]$ INSULINA (\bullet -) E DAQUELES QUE RECEBERAM $[^{125}\text{I}]$ INSULINA + INSULINA NÃO MARCADA (\circ -).

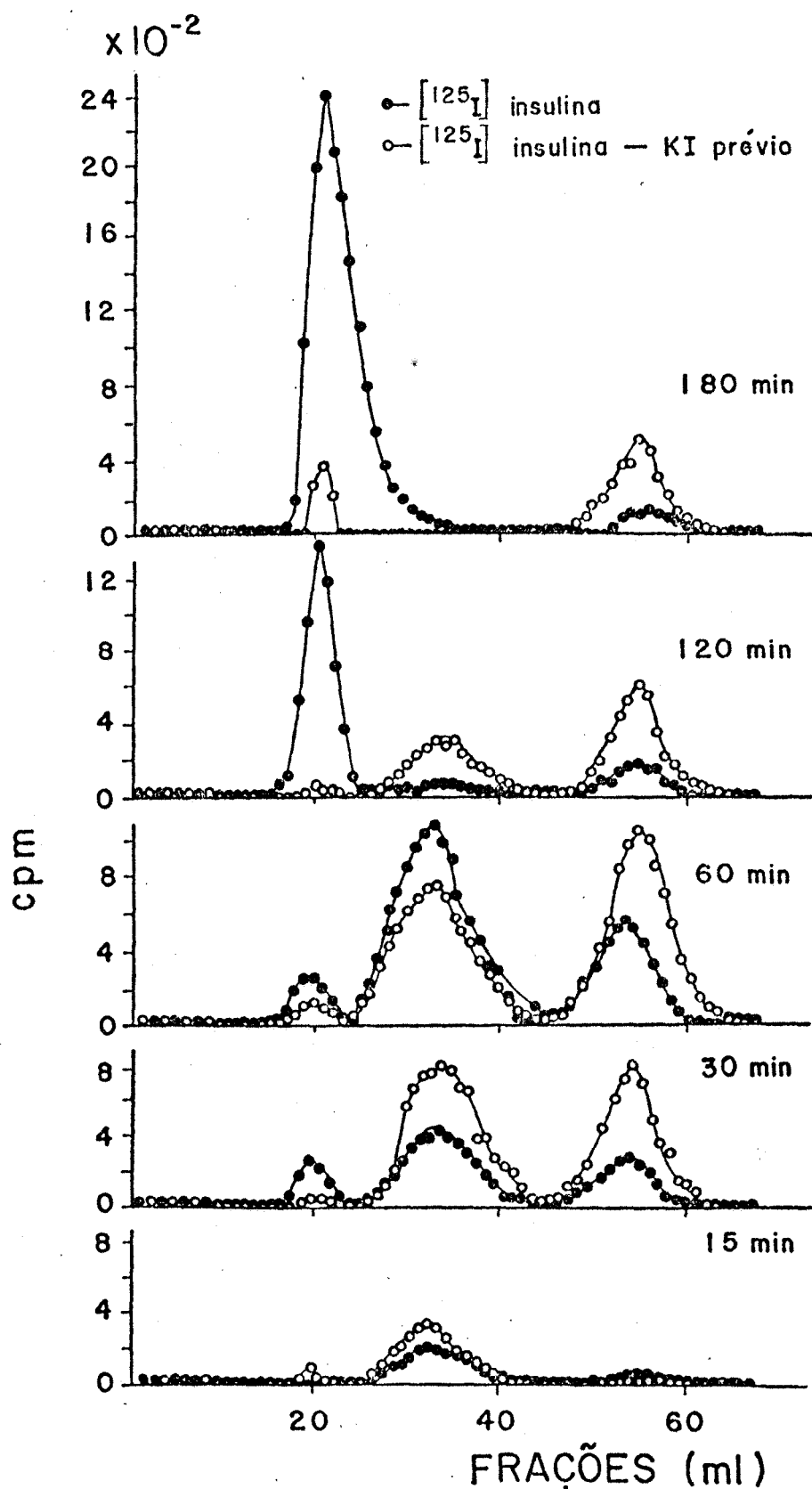


FIGURA 7 - PERFIS DE ELUIÇÃO, EM CROMATOGRAFIA DE SEPHADEX G-50, DE EXTRATOS DE TIREÓIDES DE ANIMAIS QUE RECEBERAM EXCLUSIVAMENTE $[^{125}\text{I}]$ INSULINA (●-) E DAQUELES QUE RECEBAM PREVIAMENTE IODETO DE POTÁSSIO (○-).

**Análise do material eluído de extratos de tireóide ori-
undos de animais que receberam [^{125}I] insulina após a
administração de iodeto de potássio.**

A *Figura 7* mostra que mesmo em presen-
ça de saturação da glândula tireóide pelo iodeto de
potássio, há uma captação de [^{125}I] insulina por esse
órgão, fato que é demonstrado nas curvas de eluição pe-
la presença de um segundo pico representativo, que já
aparece aos 15 minutos da administração da insulina ra-
dioativa.

Pode-se observar ainda na *Figura 7* que
o primeiro pico é pequeno e assim se mantém por todo
tempo do experimento (até 180 minutos), ao contrário
do que foi visto na eluição de extratos de tireóide re-
tirados de animais sem a prévia injeção de iodeto de
potássio, em que esse pico apresentou extraordinário
aumento. Por outro lado, o terceiro pico apresenta gra-
dativo aumento dos 15 aos 180 minutos.

A *Figura 8* permite uma comparação da percentagem da radioatividade em cada um dos picos de eluição dos extratos de tireóide em função do tempo da administração de [^{125}I] insulina ou de [^{125}I] insulina mais excesso de insulina não marcada e de [^{125}I] insulina com ou sem a prévia injeção de iodo de potássio. Ao analisarmos o histograma das percentagens relativas de cada pico, verifica-se que o segundo pico é praticamente idêntico em todos os experimentos em que os animais são sacrificados 15 minutos após a administração das substâncias em estudo, quais sejam: [^{125}I] insulina ou [^{125}I] insulina mais excesso de insulina não marcada, com ou sem injeção prévia de iodo de potássio. O terceiro pico já aparece aos 15 minutos da injeção de insulina radioativa isoladamente, mas que não aparece nos demais casos.

Na *Figura 8*, vê-se que a administração da insulina não marcada diminui a degradação da [^{125}I] insulina. Isto pode ser visto, comparando o terceiro pico dos casos com injeção de [^{125}I] insulina apenas, com e sem a administração prévia de iodo de potássio. Outro ponto a ser ressaltado é que a injeção de [^{125}I] insulina apenas ou de insulina marcada mais excesso de insulina não marcada faz com que o primeiro pico vá aumentando gradativamente até os 180 minutos, e que com a administração prévia

via de iodeto de potássio, este pico não aumenta.

A *Figura 9* mostra as curvas de eluição de extratos de tireóide obtidos ao sacrificar os animais aos 120 minutos da administração de $[^{125}\text{I}]$ insulina apenas ou $[^{125}\text{I}]$ insulina mais excesso de insulina não marcada, com e sem a injeção prévia de iodeto de potássio. Pode-se verificar que aos 120 minutos o segundo pico é comparativamente maior quando se administra previamente iodeto de potássio e que a insulina não marcada diminui a degradação da $[^{125}\text{I}]$ insulina, também quando da administração prévia de iodeto de potássio. O histograma das percentagens dos picos de radioatividade obtidos no experimento aos 120 minutos da injeção das substâncias, pode ser visto na *Figura 10*. Analisando essa figura observa-se que há uma nítida redução do terceiro pico quando da administração de excesso de insulina não marcada. Nessa mesma figura vê-se a predominância do primeiro pico quando a $[^{125}\text{I}]$ insulina é injetada sem a administração prévia de iodeto de potássio e que ele praticamente desaparece quando da injeção prévia dessa substância.

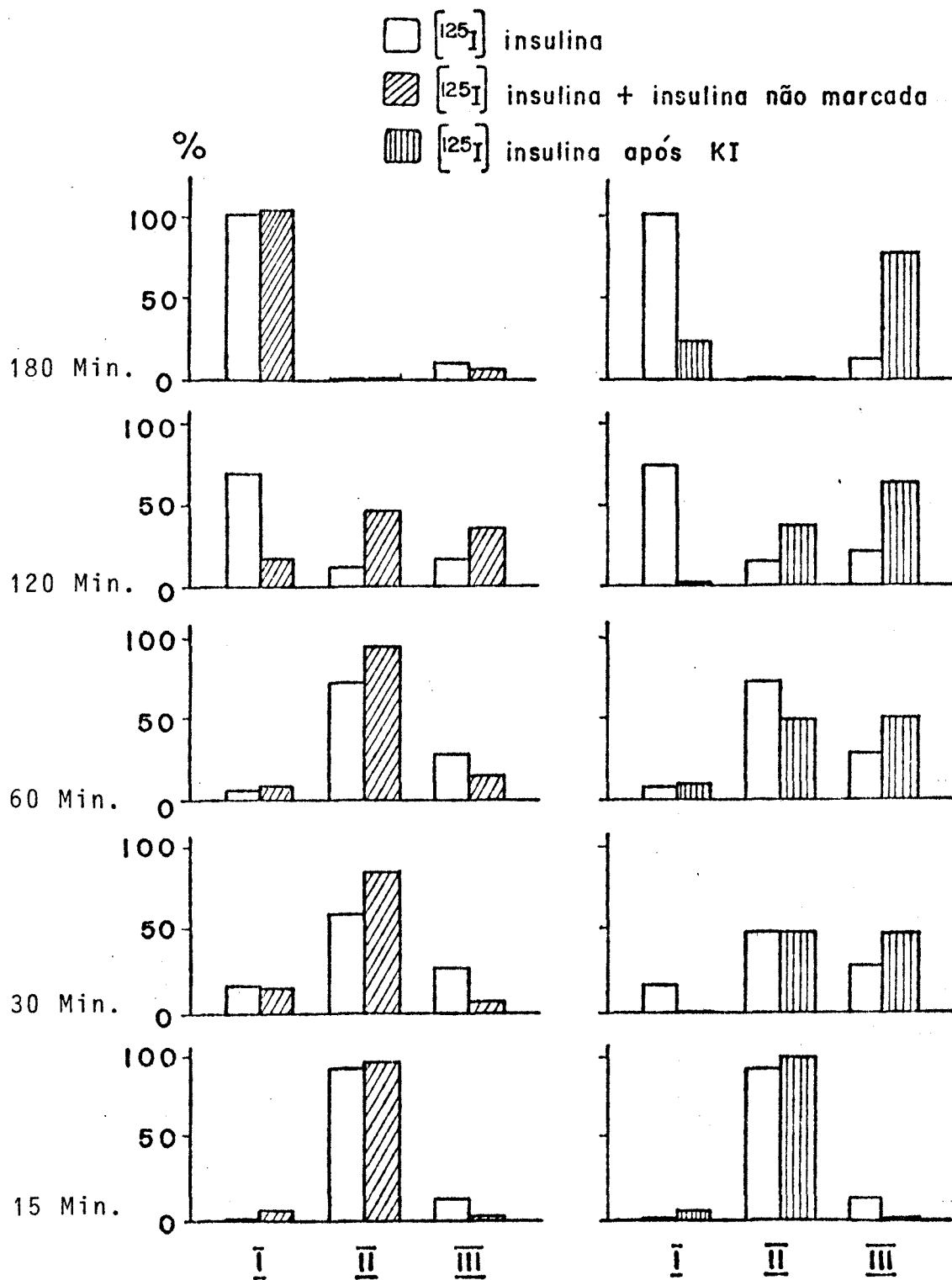


FIGURA 8 - Percentagens dos picos de radioatividade contidos na tireoide após diferentes intervalos de tempo da injeção i.a. da $[^{125}\text{I}]$ insulina.

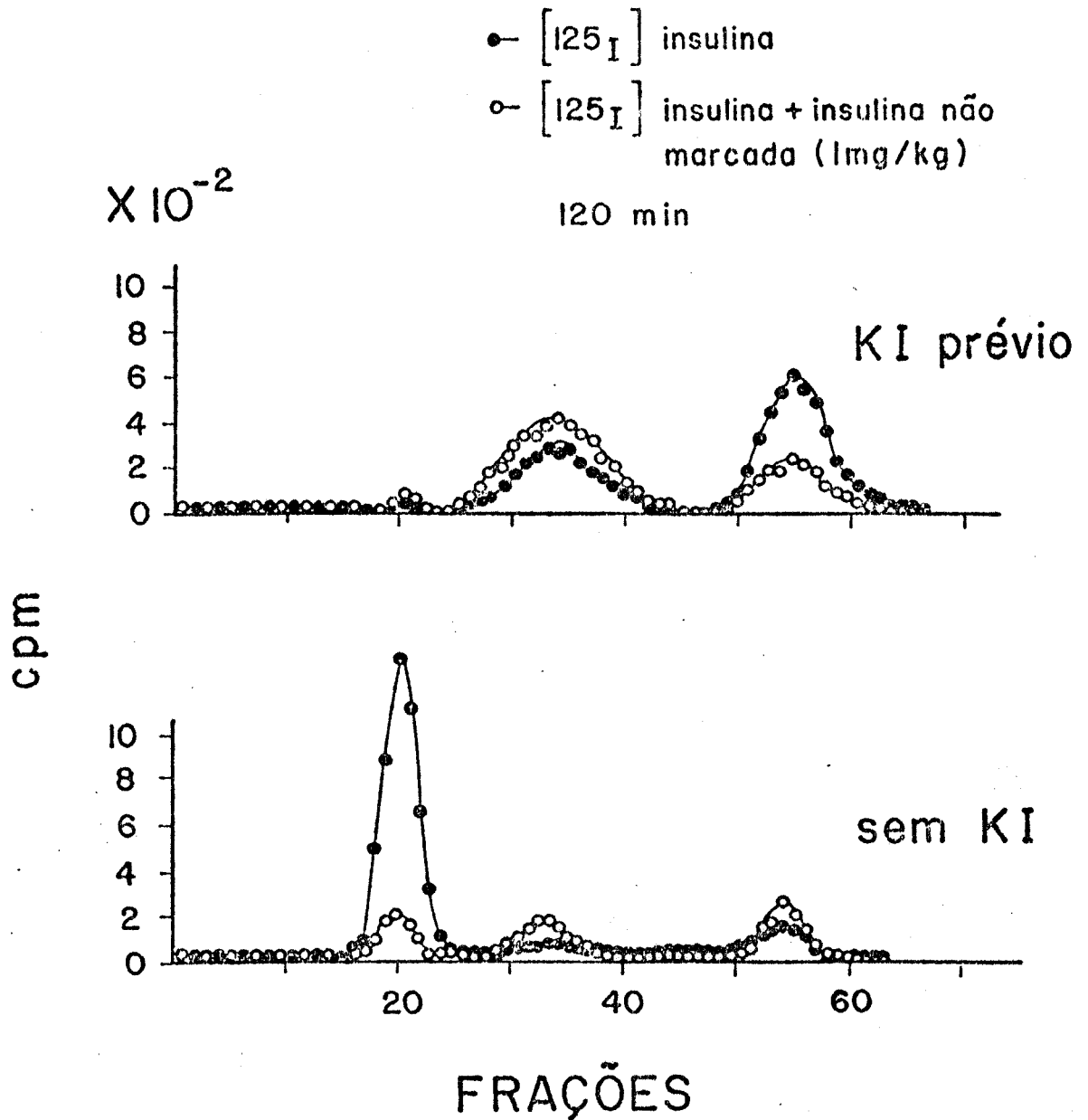


FIGURA 9 - PERFIS DE ELUIÇÃO, EM CROMATOGRAFIA DE SEPHADEX G-50, DE EXTRATOS DE TIREÓIDE DE ANIMAIS QUE RECEBERAM A $[^{125}\text{I}]$ INSULINA APENAS (●-) E $[^{125}\text{I}]$ INSULINA MAIS EXCESSO DE INSULINA NÃO MARCADA (○-), COM E SEM A INJEÇÃO PRÉVIA DE IODETO DE POTÁSSIO, COM O SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS AOS 120 MINUTOS DA INJEÇÃO.

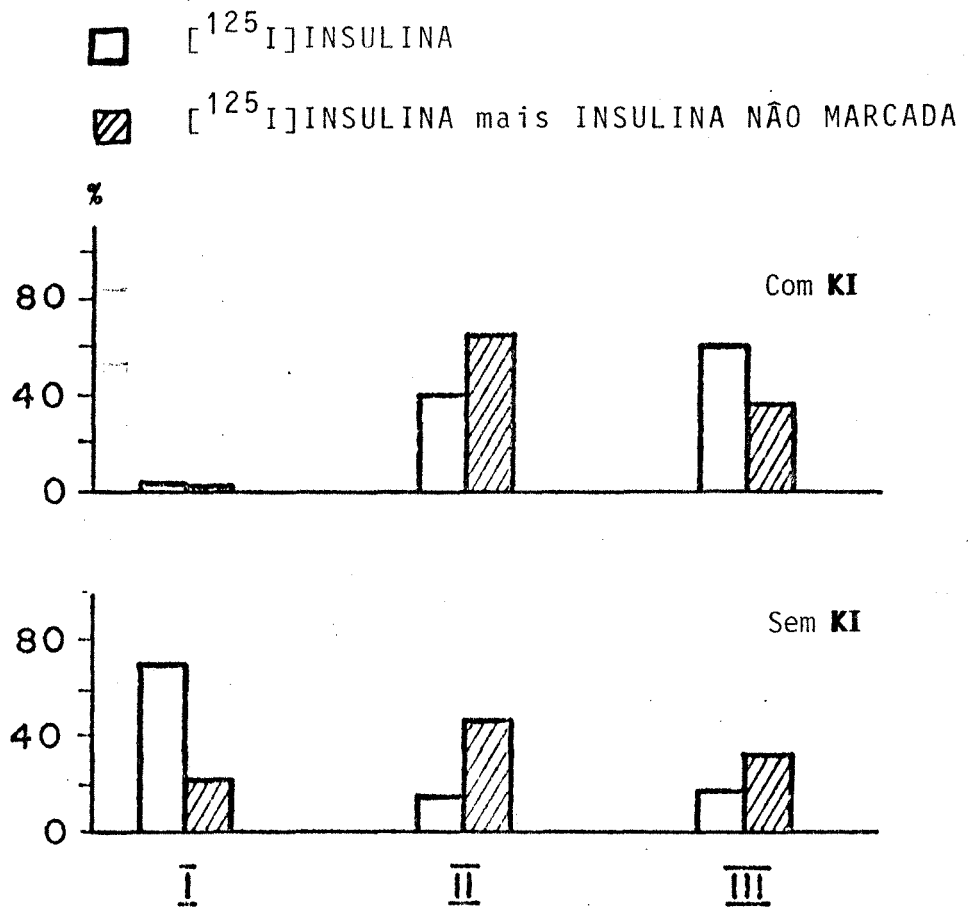


FIGURA 10- COMPARAÇÃO DA PERCENTAGEM DOS PICOS DE RADIO-
 ATIVIDADE CONTIDOS NA TIREÓIDE AOS 120 MINU -
 TOS DA INJEÇÃO i.a. DE INSULINA.

DISCUSSÃO

Em 1953, *Elgee e col.*, em seus estudos sobre a distribuição da insulina radioativa em ratos, constataram uma alta concentração de radioatividade a a p^os 15 minutos da administração de [¹³¹I] insulina em v^orios tecidos, incluindo a tire^oide. Entretanto, esses autores n^o deram a devida import^oncia a esta ultima observa^oo. Para explicar esses resultados, levantaram a hip^otese que a concentra^oo elevada de radioatividade nessa gl^ondula seria o resultado da alta capta^oo do [¹³¹I] livre.

Marques e col. (1980) demonstraram capta^oo espec^ofica de [¹²⁵I] insulina pela hip^ofise e pelas suprarrenais de tartarugas *Chrysemys dorsibigni* em experimentos *in vivo*, enquanto que *Turyn e Dellacha* em 1980, atrav^os de estudos *in vitro*, conseguiram comprovar a exist^oncia de s^otios de liga^oo espec^ofica para a insulina em preparados de membranas de hip^ofise de ratos. Partindo dos trabalhos acima que demonstraram que tanto a hip^ofise como as suprarrenais captam a [¹²⁵I] insulina, por que a tire^oide n^o a captaria? Levantou-se assim a hip^otese de que tamb^om a tire^oide poderia apresentar s^otios de liga^oo para a insulina, tendo em vista que esta ultima gl^ondula filogeneticamente

está unida ao tubo digestivo à semelhança do pâncreas e do fígado. Partindo dessas premissas e conhecimentos, resolveu-se estudar a tireóide, utilizando a técnica *in vivo*, descrita por Turyn e Dellacha (1978), para verificar a captação específica da [^{125}I] insulina pela tireóide de tartarugas *Chrysemys dorsalis*.

Nos últimos anos, novos métodos e adaptações de técnicas já conhecidas levaram ao estudo da ligação de hormônios peptídicos a seus receptores. Métodos e técnicas que procuram estudar diretamente a ligação hormônio-receptor são todos semelhantes no tocante ao uso de hormônios radioativos, pois estes apresentam as mesmas propriedades dos seus hormônios nativos não radioativos (Elgee e col., 1954; Freychet, 1976). Kammerman e Canfield, em 1972, descreveram um método *in vivo*, utilizando gonadotrofina coriônica humana marcada com iodo radioativo, e observaram sua ligação específica ao ovário de ratas. Este método foi utilizado por Turyn e Dellacha (1978) para demonstrar, em ratos, a captação específica pelo fígado do hormônio do crescimento. Esta técnica *in vivo*, além de apresentar resultados superponíveis aos encontrados com os métodos *in vitro*, tem a vantagem de ser menos laboriosa.

A captação de radioatividade pela tireóide de tartarugas *Chrysemys dorsalis* foi obtida pela administração intra-aórtica de [^{125}I] insulina. Observou-se que esta captação era máxima aos 180 minutos a-

põs a injeção intra-aõrtica do hormõnio marcado.

A anãlise cuidadosa da curva de captação revela que atẽ os 60 minutos apõs a administração do hormõnio ocorre um lento e progressivo aumento da captação de radioatividade e, que, apõs esse perõido de tempo, hã uma ascenção abrupta da mesma, que se continua atẽ o final do experimento. Comparando essa captação radioativa com aquela encontrada em animais previamente injetados com iodeto de potãssio, verificou-se que a captação mãxima de radioatividade pela glãndula se deu aos 30 minutos, apõs os quais houve um decrẽscimo gradativo atẽ a formaçãõ de um "plateau".

Observou-se, outrossim, que a captação de radioatividade pela tireõide atinge o seu mãximo, mais rapidamente que a captação pelo fõgado de tartaruga, pois, nesse õrgãõ, isto ocorre aos 60 minutos apõs a administração de [^{125}I] insulina (Machado, 1981). Por outro lado, em ratos, a captação de insulina pelo fõgado ã mãxima aos 10 minutos apõs a administração do hormõnio marcado (Gagliardini e col., 1980). A razãõ dessa diferença no tempo mãximo de captação da [^{125}I] insulina nas duas espẽcies pode ser atribuõda ã diferença de temperatura corporal existente entre esses animais. Turyn e col. (1980) demonstraram, em tartarugas, que a captação, pelo fõgado, do hormõnio do crescimento radioativo, ã dependente da temperatura, ocorrendo, respectivamente ãs 8,4 e 2 horas da injeção intra-aõrtica do hormõnio, em animais mantidos a temperaturas de 14, 25 e 30°C.

Como em todos esses estudos de ligação, a ligação não específica é estimada pela medida da radioatividade ligada em presença de grande excesso de hormônio não marcado (Freychet e col., 1971; Cuatrecasas, 1971), resolveu-se verificar qual era a captação específica no caso da tireóide. O excesso de hormônio não marcado realmente deslocou a insulina radioativa durante a primeira hora do experimento, mas após esse período de tempo, verificou-se que diminuía a inibição, voltando a aumentar a captação radioativa pela glândula. Levantou-se a hipótese que, com a degradação da [125 I] insulina pelos tecidos extra-tireóides, haveria liberação de [125 I] livre, que sob essa forma seria captado pela glândula, aumentando, assim a radioatividade. Sabendo-se que a captação de iodo pela tireóide é suprimida pela administração de iodeto de potássio (DeGroot, 1980), muito embora o mecanismo que determina esse bloqueio seja incerto, resolveu-se utilizar essa substância. Assim, excluiu-se a possibilidade de que a captação de material radioativo se devesse à captação do iodo e não da insulina. Realmente os animais estudados que receberam previamente iodeto de potássio apresentaram uma captação específica de [125 I] insulina que alcançou o máximo aos 30 minutos, decrescendo após, e que era bloqueada pela administração de insulina não marcada, mesmo após 180 minutos de sua injeção.

A especificidade de captação, característica fundamental dos receptores a hormônios peptídicos, é demonstrada pela inibição da captação radioativa com a administração de um excesso do hormônio correspondente não marcado (*Freychet, 1976*) e a não inibição por outros hormônios peptídicos, mesmo em altas concentrações (*Cuatrecasas, 1972*). Isto foi cabalmente demonstrado no presente experimento, quando se administrou excesso de glucagon, prolactina e hormônio do crescimento, que não alteraram a captação radioativa pela tireóide, como pode ser visto na *Tabla II*. Esta especificidade dos receptores à insulina também pode ser observada nos experimentos realizados *in vivo*, tanto no fígado de ratos (*Gagliardino e col., 1980*) como de tartarugas (*Machado, 1981*), e amplamente demonstrado nos experimentos *in vitro* (*Posner e col., 1974*).

A captação residual do hormônio marcado em presença de altas concentrações de hormônio não marcado é considerada como "não específica" (*Freychet e col., 1971; Cuatrecasas, 1971; Freychet, 1974; Freychet e col., 1974*). Este componente inespecífico é responsável pelo aumento linear da ligação total que ocorre com altas concentrações de hormônio (*Kahn, 1976*). Subtraindo-se a ligação não específica da total, obtêm-se a ligação específica.

Na *Figura 1* pode-se observar a captação total da radioatividade pela tireóide de tartarugas não injetadas com iodeto de potássio, onde se verifica um aumento sempre crescente nessa captação e que a captação inespecífica aumenta de forma paralela. A análise cuidadosa dessa primeira curva (*Figura 1*) mostra que até os primeiros 30 minutos da administração do hormônio marcado, a curva é superponível à curva que se vê na *Figura 2*, que corresponde aos animais injetados previamente com iodeto de potássio e que, a partir desse momento, ou seja após os primeiros 30 minutos, tem-se a impressão que outro fenômeno biológico está atuando, qual seja o da captação de [^{125}I] livre pela glândula, fazendo com que haja um aumento súbito na captação de radioatividade pela tireóide. Este segundo fenômeno biológico não ocorre quando a glândula é bloqueada previamente pelo iodeto de potássio, como se observa claramente pelo estudo da curva correspondente (*Figura 2*). Após os primeiros 30 minutos, a captação de radioatividade pela tireóide cai, devido talvez à saturação dos sítios receptores à [^{125}I] insulina nessa glândula. Nesta mesma figura, pode-se observar a captação não específica de radioatividade pela glândula que é mínima e constante e se deve à presença de radioatividade

no líquido extracelular do parênquima tireóideo e/ou à adsorção do hormônio simplesmente.

O estudo comparativo entre a captação de radioatividade pela tireóide de tartarugas machos e fêmeas não demonstrou diferenças estatisticamente significativas, tanto nos experimentos com insulina marcada apenas, como naqueles casos em que esta substância foi injetada concomitantemente com excesso de insulina não marcada, como se pode observar na *Tabela II*. Desta forma, empregaram-se durante o transcorrer do presente trabalho, tartarugas machos e fêmeas indiferentemente, entretanto utilizando-se animais do mesmo sexo, em cada tipo de experimento.

Um ponto importante a ser analisado é a curva de deslocamento da [^{125}I] insulina pela administração de doses crescentes de insulina não marcada, para verificar a dose deste hormônio, sob a forma nativa, capaz de prevenir em 50 % a captação de [^{125}I] insulina por essa glândula (ED_{50}). A *Figura 3* mostra a razão entre a radioatividade encontrada na tireóide e a do sangue, obtida quando [^{125}I] insulina é injetada concomitantemente com diferentes e crescentes doses de hormônio não marcado. Pode ser visto que esta razão cai em 50 % de seu valor quando doses de 10^{-1} a $10^0 \mu\text{g/Kg}$ de peso corporal de insulina bovina não marcada é injetada associada à [^{125}I] insulina.

O valor da ED₅₀ sendo da ordem de 10⁻¹ a 10⁰ µg de insulina por Kg de peso corporal, indica que provavelmente a [¹²⁵I] insulina está realmente ligada a receptores e não simplesmente adsorvida aos tecidos e líquidos extracelulares. Esta curva dose-efeito assim obtida tem sido usada nos mais diversos experimentos, tanto *in vitro* (House e Weidemann, 1970; Herrington e col., 1976; Simon e col., 1977; Emdin e col., 1977; Freychet e col., 1972; Turyn e Dellacha, 1980) como *in vivo* (Puca e Bresciani, 1969; Kammerman e Canfield, 1972; Turyn e Dellacha, 1978; Marques e col., 1978; van Houten e Posner, 1979; Gagliardino e col., 1980), para comprovar a ligação específica de hormônios peptídicos a seus sítios receptores. Idêntico valor da ED₅₀ foi obtido no experimento com animais previamente injetados com iodeto de potássio e sacrificados no mesmo intervalo de tempo (60 minutos). Isto se deve ao fato de que após uma hora da injeção da insulina radioativa, a degradação do hormônio ainda é insignificante, não havendo [¹²⁵I] livre circulando, como se comprova no perfil de eluição do plasma (Figura 4). Desta forma, a radioatividade contida na glândula, em ambas as curvas dose-efeito (sem e com iodeto de potássio prévio) deve-se à captação exclusiva da [¹²⁵I] insulina e à inibição competitiva dessa captação por doses crescentes de insulina não marcada.

Procurou-se ainda comprovar que o material radioativo existente nos tecidos tireóideos representava realmente a [¹²⁵I] insulina e não produtos de degradação desse hormônio marcado. Para tal, procedeu-

-se ao método da extração e purificação do material radioativo encontrado na tireóide de tartarugas, após a administração de [^{125}I] insulina apenas ou de [^{125}I] insulina mais insulina não marcada com ou sem a injeção prévia de iodeto de potássio. Utilizou-se o método da filtração molecular em gel (coluna de Sephadex G-50) para a determinação do tipo de substância radioativa encontrada na tireóide, por ser uma das técnicas mais úteis para estimar a natureza do material radioativo existente em um tecido (*Kimmele e col., 1968*).

Os picos encontrados pela filtração molecular em gel dos extratos de tireóide foram comparados com o perfil do hormônio marcado usado no transcorrer do experimento, e que pode ser visto na *Figura 4 A*. Observou-se que 90 % da radioatividade encontrada nos extratos de tireóide, aos 15 minutos da administração do hormônio marcado, eluíram da mesma forma que as preparações de [^{125}I] insulina, à semelhança do que foi encontrado em células adiposas isoladas por *Gliemann e Sonne (1978)*.

Os picos obtidos pela passagem do material radioativo pelo Sephadex G-50 representam, em ordem de aparecimento, agregados de alto peso molecular, insulina e produtos de **d**egradação. Admite-se que o primeiro pico represente a insulina ligada de

forma irreversível a receptores, complexos não dissociados ou fragmentos de membrana com associação não específica à insulina marcada. Alternativamente, este pico pode representar simplesmente [^{125}I] incorporado em qualquer outra proteína (Kahn e Baird, 1978). O segundo pico representa a insulina não degradada, e é o maior dos picos, conforme foi estudado por imunoprecipitação por Hammond e Jarrett (1975). Os produtos de degradação final que eluem com o iodeto de sódio radioativo constituem o terceiro pico, conforme estudos realizados por Kahn e Baird (1978) e Caro e Amatruda (1980).

Analisando os picos obtidos pela filtração molecular em gel de tecido tireóideo e comparando-os, pode-se verificar que quando da administração isolada de [^{125}I] insulina, esta substância é rapidamente captada pela tireóide, fato que se comprovou pela presença de um elevado segundo pico, visto já aos 15 minutos da injeção do hormônio radioativo. Já aos 30 minutos inicia-se a degradação da insulina pela glândula, fato que se comprovou pelo aparecimento do terceiro pico, que aumenta paralelamente com o passar do tempo, enquanto que o segundo pico vai diminuindo proporcionalmente. O primeiro pico continua aumentando com o transcorrer do tempo, como já foi visto na *Figura 2* e nos perfis de eluição vistos na *Figura 6*. Quando se administra [^{125}I] insulina mais excesso de insulina não marcada, há uma menor capta

ção de radioatividade pela tireóide, revelada por um segundo pico menor do que o observado com $[^{125}\text{I}]$ insulina. Ao mesmo tempo que o primeiro pico apresenta menor dimensão, não há aumento do terceiro pico, que representa a degradação do hormônio marcado. Estes resultados demonstram que também neste experimento a insulina não marcada protege a degradação desse hormônio, bem como diminui a captação radioativa pela glândula, por competição quantitativa. *Terris e Steiner (1975)* demonstraram também que o hormônio marcado diminui a velocidade de degradação da $[^{125}\text{I}]$ insulina em hepatócitos isolados de ratos.

Quando se administrou iodeto de potássio previamente à injeção de $[^{125}\text{I}]$ insulina, a captação radioativa pela tireóide continuou elevada, fato que se tornou evidente pela presença de um segundo pico elevado, desde os primeiros 15 minutos e que continuou elevado nos demais intervalos de tempo, até os 120 minutos. A insulina foi sendo captada e degradada como se pode observar pelo aparecimento de um terceiro pico, a medida que vai diminuindo o segundo pico. Houve também inibição da degradação da $[^{125}\text{I}]$ insulina, quando da administração de $[^{125}\text{I}]$ insulina mais excesso de insulina não marcada, nos animais que receberam iodeto de potássio previamente -

te, inibição esta que se observa aos 120 minutos.

Fato que deve ser assinalado é a presença de um primeiro pico que vai crescendo à medida que passa o tempo, chegando a níveis extraordinários aos 120 e 180 minutos, quando a insulina marcada com iodo radioativo é administrada isoladamente. Naqueles animais que receberam iodeto de potássio previamente à injeção de hormônio marcado, por outro lado, o primeiro pico não aparece ou é diminuído. A alternativa levantada por *Kahn e Baird (1978)* de que o primeiro pico representa uma proteína qualquer ligada ao [^{125}I] é muito interessante de ser discutida no presente trabalho, tendo em vista o perfil obtido pela eluição dos extratos de tireóide oriundos de animais tratados exclusivamente com a [^{125}I] insulina, onde aparece um primeiro pico muito elevado. Isto poderia ser explicado pela afinidade da glândula tireóide pelo iodo radioativo que seria liberado quando da degradação da [^{125}I] insulina em tecidos extratireóideos ou mesmo oriundos da degradação desse hormônio no interior da glândula e que seria utilizado por ela na elaboração de proteínas ligadas ao [^{125}I], e por que não da tireoglobulina? Este iodo radioativo captado pela glândula determinaria o aparecimento de um primeiro pico muito grande, quando da eluição de extratos de tireóide de animais que receberam exclusivamente

[¹²⁵I] insulina, especialmente após 120 minutos. No grupo de animais que recebeu iodeto de potássio previamente à injeção de insulina radioativa, por sua vez, não se observou o aparecimento do primeiro pico ou ele estava representado por uma curva diminuída. Este fato pode ser interpretado como sendo devido à saturação da tireóide por essa substância que diminuiria a captação pela glândula de [¹²⁵I] livre proveniente de outros tecidos e encontrados em circulação.

Realmente, a análise da filtração molecular em gel do plasma desses animais demonstra que, nos primeiros 30 minutos, o segundo pico é exuberante, devido à presença de grande quantidade de [¹²⁵I] - insulina no plasma, e que à medida que passa o tempo, vai aumentando o terceiro pico, produto da degradação da insulina que contém [¹²⁵I] e que alcança o seu máximo aos 120 minutos. Concomitantemente inicia-se, nos extratos tireóideos, o aumento do primeiro pico, provavelmente pela captação do iodo radioativo e elaboração por essa glândula de proteínas ligadas ao [¹²⁵I]. Analisando o perfil cromatográfico do plasma obtido de animais que receberam [¹²⁵I] insulina mais excesso de insulina não marcada, observa-se que há uma menor degradação da insulina radioativa, demonstrada pela presença de um segundo pico ainda elevado aos 180 mi

nutos e um segundo pico ausente ou diminuto.

Sempre que se observa a interação da insulina com seu receptor, espera-se uma resposta biológica, cuja magnitude depende da concentração do hormônio, da concentração de seu receptor e da afinidade do receptor (*Jarett, 1979*). *Brisson-Lougarre e col. (1978)* demonstraram esta resposta biológica ao constatarem o aumento da incorporação de leucina radioativa às proteínas totais, em fatias de tireóide de cão, após uma hora de incubação com insulina. Esses autores concluem que a insulina aumenta a captação de aminoácidos (ácido amino-butírico), em cortes de tecido tireóideo bovino. A insulina inicialmente se liga à membrana citoplasmática, e, após, penetra na célula da tireóide, chegando ao núcleo, ligando-se a receptores específicos, como foi demonstrado por *Brisson-Lougarre e Blum (1979)*. Esses autores comprovaram a presença de sítios de ligação específica à insulina, trabalhando com núcleos isolados de células tireóideas. Ao penetrar a célula e alcançar o núcleo, a insulina exerce a sua ação biológica, estimulando a produção de proteínas, dentre elas, talvez, esteja a tireoglobulina, fato que deverá ser pesquisado em trabalhos posteriores.

Por outro lado, *Bagchi e col. (1981)* demonstraram uma redução da sensibilidade ao hormônio tireotrófico (TSH), em glândula tireóide de camundon-

gos diabéticos. Essa menor resposta ao TSH, nesses animais, resulta em diminuição na síntese e liberação hormonal por parte da glândula.

Conclui-se do presente trabalho que a glândula tireóide de tartarugas *Chrysemys dorbingi* capta especificamente a [125 I] insulina e que esse fenômeno é independente da captação de iodo radioativo, produto de degradação do hormônio, como foi demonstrado pela análise cromatográfica da natureza do material captado. Esses dados indicam, assim, a presença de sítios receptores à insulina na tireóide das tartarugas. Estudos posteriores, em frações microsomiais de membranas de células tireóideas de verão procurar determinar as características e propriedades desses sítios receptores.

R E S U M O

Partindo de pesquisas que demonstraram a presença de sítios receptores à insulina na hipófise e nas suprarrenais, o presente trabalho teve por objetivo investigar a captação específica desse hormônio pela glândula tireóide. Utilizaram-se tartarugas *Chrysemys dorsalis* adultas de ambos os sexos. Como procedimento experimental empregou-se o método *in vivo* descrito por Gagliardino e col. (1980) que consistia na administração intra-aórtica (i.a.) da [125 I] insulina (2×10^6 cpm/Kg) e medida da radioatividade contida na glândula e no sangue, após diferentes intervalos de tempo. Os resultados foram expressos pela relação contas por minuto (cpm) por grama de tireóide por contas por minuto (cpm) por grama de sangue (T/S). A captação específica foi determinada pela administração da [125 I] insulina juntamente com excesso de insulina não marcada (1mg/Kg de peso corporal). Procedia-se também à análise da natureza do material radioativo captado pela glândula através do método de filtração molecular em gel de Sephadex G-50. Obtiveram-se os seguintes resultados:

1. A captação radioativa pela tireóide aumentou em função do tempo de injeção i.a. de [125 I] insulina. Esse aumento foi progressivo até os 60 minutos e extraordinariamente acentuado aos 120 e 180 minutos. Quando os animais recebiam previamente injeção de iodeto de potássio (solução 0,15 M), a captação máxima da radioatividade ocorreu aos 30 minutos;
2. A administração da [125 I] insulina juntamente com excesso de insulina não marcada reduziu significativamente a captação da radioatividade pela tireóide, nos animais tratados ou não com iodeto de potássio. Na primeira situação, a relação T/S manteve-se constante durante 180 minutos. Na segunda, essa relação apresentou marcado aumento em função do tempo;

3. A relação T/S foi similar em tartarugas machos e fêmeas.
4. A administração de hormônio de crescimento, glucagon ou prolactina juntamente com a [^{125}I] insulina não reduziu a captação da radioatividade. Somente a insulina não marcada foi capaz de competir com a [^{125}I] insulina, reduzindo essa captação;
5. A redução da captação da radioatividade foi dose-dependente da insulina não marcada. O ED_{50} foi de 10^{-1} a 10^0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal, em ambos grupos de animais, tratados ou não com iodeto de potássio;
6. Aos 15 minutos da administração de [^{125}I] insulina, 90 % da radioatividade contida no homogenizado da glândula eluiu no pico correspondente à insulina, quando cromatografado em gel de Sephadex G-50. Idêntico comportamento foi observado em homogenizado de tireóide de animais previamente tratados com iodeto de potássio;
7. Com o decorrer do tempo da injeção da [^{125}I] insulina (60, 120 e 180 minutos), a percentagem da radioatividade, que eluiu no pico correspondente à insulina, diminuía enquanto aumentava a radioatividade no pico correspondente ao iodeto de sódio radioativo. Em tempos mais tardios (120 e 180 minutos) observou-se o aparecimento de material radioativo de maior peso molecular do que a própria insulina;
8. A administração de insulina não marcada juntamente com [^{125}I] insulina retardou a degradação do hormônio marcado captado pela glândula;
9. O tratamento prévio com iodeto de potássio impediu o aparecimento do material radioativo com alto peso molecular, observado em glândulas de tartarugas injetadas apenas com [^{125}I] insulina.

Face à demonstração de captação específica de [^{125}I] insulina, confirmada pela análise cromatográfica do material radioativo encontrado nos extratos da tireóide, pode-se admitir que essa glândula, em tartarugas *Chrysemys dorsalis* possui sítios receptores à insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAGCHI, N., BROWN, T.R., SHIVERS, B., LUCAS, S. e MACK, R.E.-
Decreased thyroïdal response to Thyrotropin in Diabetic mice.
Endocrinology, 109:1428-1432, 1981.
2. BELLO, A.A., da SILVEIRA, C.M., WASSERMANN, G.F., TURYN, D. e
DELLACHA, J.M. - Insulin specific uptake, degradation and
action on deoxyglucose transport in rat pituitary gland. IRCS
Med.Sci., 10:121-122, 1982.
3. BERGERON, J.J.M. e POSNER, B.I. - In vivo studies on the
initial localization and fate of polypeptide hormone receptors
by technique of quantitative radioautography. J.Histochem.Cyto-
chem., 27:1512, 1979.
4. BERGERON, J.J.M., RACHUBINSKY, R., SEARLE, N., SIKSTROM, R. ,
BORTS, D., BASTIAN, P. e POSNER, B.I. - Radioautography visual-
isation of in vivo insulin binding to the exocrine pancreas .
Endocrinology, 107:1069-1079, 1980.
5. BERGERON, J.J.M., RACHUBINSKY, R., SEARLE, BORTS, D., SIKSTROM,
R. e POSNER, B.I. - Polypeptide hormone receptors in vivo :
demonstration of insulin binding to adrenal gland and gastro -
intestinal epithelium by quantitative radioautography. J.Histo-
chem.Cytochem., 28:824-835, 1980.
6. BERSON, S.A. e YALOW, R.S. - Radioimmunoassay of ACTH in plasma.
J.Clin.Invest., 47:2725-51, 1968.
7. BLUNDELL, T.L., DODSON, G., HODGKIN, D. e MERCOLA, D. - Insulin:
the structure in the crystal and its reflection in Chemistry and
Biology. Adv.Protein.Chem., 26:279-402, 1972 (Citado por Catt e
Dufau, ref. nº 15).

8. BLUNDELL, T.L. e WOOD, S.P. - Is the evolution of insulin Darwinian or due to selectively neutral mutation? Nature, 257:197-203, 1975.
9. BOYLAN, E.S. e WITTLIFF, J.L. - Specific estrogen binding in vivo in the R 3230 AC mammary adenocarcinoma of the rat. Cancer Res., 33:2903-09, 1973.
10. BRISSON-LOUGARRE, A., BLUM, C.J. e NAYER, Ph., De - Action of insulin on thyroid protein synthesis in dogs. Horm. Metab. Res., 10:396-400, 1978.
11. BRISSON-LOUGARRE, A. e BLUM, C.J. - Sites de liaison nucléaires à l'insuline dans les noyaux isolés de thyroïde bovine. C.R. Acad. Sci., Paris, 289:129-132, 1979.
12. CARO, J.F. e AMATRUDA, J.M. - Functional relationship between insulin binding, action and degradation. J. Biol. Chem., 255:10052-55, 1980.
13. CARPENTER, F.H. - Relationship of structure to biological activity of insulin as revealed by degradative studies. Am. J. Med., 40:750-58, 1966.
14. CATT, K.J. e DUFAU, M.L. - Peptide hormone receptors. Ann. Rev. Physiol., 39:529-57, 1977.
15. CHOW, S.Y., YEN-CHOW, Y.C. e WOODBURY, D.M. - Compartmentation in the turtle thyroid: water and iodine distribution. Endocrinology, 108:2200-09, 1981.
16. CUATRECASAS, P. - Properties of the insulin receptor of isolated fat cell membranes. J. Biol. Chem., 246:7265-74, 1971.

17. CUATRECASAS, P. - Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 68: 1264-68, 1971.
18. CUATRECASAS, P., DESBUQUOIS, B. e KRUG, F. - Insulin-receptor interaction in liver cell membrane. Biochem,Biophys.Res.Commun, 44:333-39, 1971.
19. CUATRECASAS, P. - The insulin receptor. Diabetes, 21:396-402,1972.
20. CUATRECASAS, P. - Affinity, chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 69:1277-81, 1972.
21. CUATRECASAS, P. - Isolation of the insulin receptor of the liver and fat cell membrane. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 69:318-22,1972.
22. CROFFORD, O.B. - The uptake and inactivation of native insulin by isolated fat cells. J.Biol.Chem., 243:362-69, 1968 (Citado por CATT e DUFAU, ref. nº 15).
23. DeGROOT, L.J. - Thyroid Physiology:Endocrine and neural relationships. In: DeGROOT, L.J.(Ed.), Endocrinology, vol. I , cap. 29. Grune & Stratton, New York, 1979, pp. 373-86.
24. ELGEE, N.J., WILLIAMS, R.H., LEE, N.D., WONG, T. e HOGNESS, J.R. - Studies of radioactive insulin. Diabetes, 2:370-71, 1953.
25. ELGEE, N.J., WILLIAMS, R.H. e LEE, N.D. - Distribution and degradation studies with insulin ¹³¹I. J.Clin. Invest., 33:1252-60, 1954.
26. EMDIN, S.O., GAMMELTOFT, S. e GLIEMANN, J. - Degradation, receptor binding affinity, and potency of insulin from the Atlantic Hagfish(Myxine glutinosa) determined in isolated rat fat cells. J.Biol.Chem., 252:602-608, 1977.

27. EPPLE, A. - Comparative studies on the pancreatic islets .
Endocrinologia Japonica, 15:107-122, 1968.
28. FALKMER, S. e PATENT, G.J. - Comparative and embryological aspects of the pancreatic islets. In: GREEP, R.O. e ASTWOOD, E.B. eds. Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology. Volume I. Endocrine Pancreas. Washington, American Physiological Society, 1972, cap.1, pp. 1-23.
29. FALKMER, S., EMDIN, S., HAVU, N., LUNDGREN, G., MARQUES, M., OSTBERG, Y., STEINER, D.F. e THOMAS, N.W. - Insulina in invertebrates and cyclostomes. Am.Zool., 13:625-638, 1973.
30. FREYCHET, P., ROTH, J. e NEVILLE, D.M., Jr. - Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. Biochem.Biophys.Res.Commun., 43: 400-408, 1971.
31. FREYCHET, P., ROTH, J. e NEVILLE, D.M., Jr. - Insulin receptor in liver: specific binding of ¹²⁵I-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 68:1833-37, 1971.
32. FREYCHET, P., KAHN, R., ROTH, J. e NEVILLE, D.M., Jr.- Insulin interactions with liver plasma membranes. J.Biol.Chem., 247:3953-61, 1972.
33. FREYCHET, P. - The interaction of proinsulin with insulin receptors on the plasma membranes of the liver. J.Clin.Invest., 54:1020-31, 1974 (Citado por SIMON, ref. nº 90).
34. FREYCHET, P., BRANDENBURG, D. e WOLLMER, A. - Receptor-binding assay of chemically modified insulin: comparison with in vitro and in vivo bioassay. Diabetologia, 10:1-5, 1974.(Citado por FREYCHET, ref. nº 36).

35. FREYCHET, P. - Interactions of polypeptide hormones with cell membrane specific receptors: studies with insulin and glucagon. Diabetologia, 12:83-100, 1976.
36. GAMBHIR, K.K., ARCHER, J.; BRADLEY, C.J. - Characteristics of human erythrocytes insulin receptors. Diabetes, 27:701-8, 1978.
37. GAGLIARDINO, J.J., PESSALQ, M.T., TURYN, D. e DELLACHA, J.M. - Insulin binding to liver cells: a simple and useful in vivo model. Hormone Metab.Res., 12:300-303, 1980.
38. GAVIN, J.R., III, GORDEN, P., ROTH, J., ARCHER, J.A. e BUELL, D.N. - Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor. J.Biol.Chem., 248:2202-2207, 1973. (Citado por FREYCHET, ref. nº 36).
39. GINSBERG, B.H., KAHN, C.R. e ROTH, J. - The insulin receptor of the turkey erythrocytes: similarity to Mammalian insulin receptors. Endocrinology, 100:82-90, 1977.
40. GLIEMANN, J. e GAMMELTOFT, S. - The biological activity and the binding affinity of modified insulins determined on isolated rat fat cells. Diabetologia, 10:105-113, 1974. (Citado por FREYCHET, ref. nº 36).
41. GLIEMANN, J. e SONNE, O. - Binding and receptor-mediated degradation of insulin in adipocytes. J.Biol.Chem., 253: 7857-63, 1978.
42. GOLDFINE, I.D., GARDNER, J.D. e NEVILLE, D.M., Jr. - Insulin action in isolated rat thymocytes. J.Biol.Chem., 21:6919-26, 1972.

43. GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M. e GLOVER, J.S. - The preparation of ^{131}I -labelled human Growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 89:114-123, 1963.
44. HAMMOND, J.M. e JARETT, L. - Insulin degradation by isolated fat cells and their subcellular fractions. Diabetes, 24:1011 - 1019, 1975.
45. HAVRANKOVA, J.; SCHMECHEL, D.; ROTH, J. e BROWNSTEIN, M. - Identification of insulin in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5737-41, 1978.
46. HAZELWOOD, R.L., KIMMEL, J.R. e POLLOCK, H.G. - Biological characterization on chicken insulin activity in rats and domestic fowl. Endocrinology, 83:1331-1336, 1968.
47. HERRINGTON, A.C., VEITH, N. e BURGER, H.G. - Characterization of the binding of human Growth hormone to microsomal membranes from rat liver. Biochem. J., 158:6169, 1976.
48. HOUSE, P.D.R. e WEIDEMANN, M.J. - Characterization of an ^{125}I -insulin binding plasma membrane fraction from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 41:541-48, 1970.
49. van HOUTEN, M. e POSNER, B.I. - Insulin binds to brain vessels in vivo. Nature, 282:623-5, 1979.
50. van HOUTEN, M.; e POSNER, B.I. - Specific binding internalization on blood-borne [^{125}I] insulin by neurons of the rat area postrema. Endocrinology, 109:853, 1981.
51. JARETT, L. - Pathophysiology of the insulin receptor. Human Path., 10:301-311, 1979.
52. KAHN, C.R., FREYCHET, P., NEVILLE, D.M., Jr. e ROTH, J. - Quantitative aspects of insulin interaction with liver membranes. Diabetes, 21:334-5, 1972.

53. KAHN, C.R.- Membrane receptors for hormones and neuro - transmitters. J.Cell.Biol., 70:261-286, 1976.
54. KAHN, C.R. e BAIRD, K. - The fate of insulin bound to adipocytes. J.Biol.Chem., 253:4900-06, 1978.
55. KAMMERMAN, S. e CANFIELD, R.E. - The inhibition of binding of iodinated human Chorionic Gonadotropin to mouse ovary in vivo. Endocrinology, 90:384-89, 1972.
56. KIMMEL, J.R., POLLOCK, H.G., HAZELWOOD, R.L.- Isolation and characterization of chicken insulin. Endocrinology , 83:1323-30, 1968.
57. KONO, T. e BARHAM, F.W. - The relationship between the insulin binding capacity of fat cells and cellular response to insulin. Studies with intact and trypsin-treated fat cells. J.Biol.Chem., 246:6210-16, 1971.
58. LANGSLOW, D.R., KIMMEL, J.R. e POLLOCK, H.G. - Studies of the distribution of a new avian pancreatic polypeptide and insulin among birds, reptiles, amphibians and mammals. Endocrinology , 93:558-565, 1973.
59. LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J. e PASTAN, I. - Radioreceptor assay of adrenocorticotrophic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma. Sci., 17:633-635, 1970.
60. LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J., PRICER, W. e PASTAN, I. - ACTH receptor in the adrenal: specific binding of ACTH¹²⁵I and its relation to Adenylctclase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 65:745-52, 1970.

61. LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J. e PASTAN, I. - ACTH-receptor interaction in the adrenal: a model for the initial step in the action of hormones that stimulates adenocyclase. Ann.NY Acad. Sci., 185:195-209, 1971.
62. LEVINE, R. - Cell membrane as a primary site of insulin action. Fed.Proc., 24:1071-73, 1965.
63. LIN, S.Y. e GOODFRIEND, T.L. - Angiotensin receptors. Am. J. Physiol., 218:1319-28, 1970.
64. MACHADO, V.L.A. - Captação específica e degradação in vivo da ^{125}I iodo-insulina em tartarugas Chrysemys dorsibigni. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas:Fisiologia, UFRGS, 1981.
65. MACHADO, V.L.A.; da SILVA, R.S.M.; MARQUES, M.; WASSERMANN, G.F. - Insulin specific uptake and action on deoxyglucose transport in rat adrenal glands. IRCS Med.Sci., 10:459-60, 1982.
66. MARQUES, M. e KRAEMER, A. - Extractable insulin and glucagon from turtle(Chrysemys dorsibigni)pancreas. Comp. Biochem.Physiol., 27:439-446, 1968.
67. MARQUES, M., da SILVA, R.S.M., TURYN, D. e DELLACHA, J.M. - Distribution and specific binding in vivo of iodinated Growth hormone in the turtle Chrysemys dorsibigni. Gen.Comp.Endocrinol., 37:487-92, 1979.
68. MARQUES, M., BELLÓ, A.A., TURYN, D. e DELLACHA, J.M. - Distribution of ^{125}I labelled insulin and specific binding by various tissues in the turtle Chrysemys dorsibigni. Proc. Intern.Union. of Physiol.Sci. XIV: 567, XXVIII International Congress, BUDAPEST 1980.

69. MARQUES, M., BELLŌ, A.A., MACHADO, V.L.A., TURYN, D. e DELLA-CHA, J.M. - In vivo specific uptake of labelled insulin by liver, adipose tissue, pituitary and adrenals in the turtle *Chrysemys dorbigni*. Gen.Comp.Endocrinol., 1982, in press.
70. MEANS, A.R. e VAITUKAITIS, J. - Peptide hormone "receptors" specific binding of H-FSH to testis. Endocrinology, 90: 39-46, 1972.
71. DE MEYTS, P., KAHN, C.R., GINSBERG, B. e ROTH, J. - The insulin receptor: greater evolutionary stability than insulin. Diabetes, 24:393, 1975.
72. DE MEYTS, P., BIANCO, A.R. e ROTH, J. - Site-site interactions among insulin receptors. J.Biol.Chem., 251:1877 - 88, 1976.
73. DE MEYTS, P., van OBBERGHEN, E., ROTH, J., WOLLMER, A. , BRANDENBURG, D. - Receptor binding of insulin_ mapping of the site inducing negative cooperativity. Nature, 273: 504-509, 1978.
74. MUGGEO, M., GINSBERG, B.H., ROTH, J., NEVILLE, D.M, Jr., De MEYTS, P. e KEHN, C.R. - The insulin receptor in vertebrates is functionally more conserved during evolution than insulin itself. Endocrinology, 104:1393-1402, 1979.
75. NIELSEN, H.B. e PEDERSEN , O. - Insulin receptors on monocytes of young healthy persons correlated with glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetologia, 14:159, 1978.
76. PACOLD, S. e BLACKARD, W.G.- Central nervous system insulin receptors in normal and diabetic rats. Endocrinology, 105: 1452-57, 1979.

77. PEDERSEN, O. e NIELSEN, H.B. - A study of insulin receptors in human mononuclear leucocytes. Acta Endocrinologica(KBH), 83:556-64, 1976.
78. PENHOS, J.C. e RAMEY, R. - Studies on the endocrine pancreas of amphibians and reptiles. Amer. Zool., 13: 667-698, 1973.
79. PORTE, D., Jr. e HALTER, J.B. - The Endocrine Pancreas and Diabetes Mellitus. In: WILLIAMS, R. (Ed.) , Textbook of Endocrinology, W.B.Saunders Co., Philadelphia, 1981, Cap.XV, pp.742.
80. POSNER, B.I., KELLY, P.A., SHIU, R.P.C. e FRIESEN, H.G. - Studies of insulin, Growth hormone and prolactin binding : tissue distribution, species variation and characterization . Endocrinology, 95:521-31, 1974.
81. PUCA, G.A. e BRESCIANI, F. - Interactions of 6-7-³H- 17B-estradiol with mammary gland and others organs of the C₃H mouse in vivo. Endocrinology, 85:1-10, 1969.
82. PULLEN, R.A., LINDSAY, D.G., WOOD, S.P., TICKLE, I.J. , BLUNDELL, T.L., WOLLMER, A., KRAIL, G., BRANDENBURG, D. , ZAHN, H., GLIEMANN , J. e GAMMELTOFT, S. - Receptor binding region of insulin. Nature, 259:369-373, 1976.
83. RICHARDS, J.B. e SAYERS, G. - Fate and excretion of adrenocorticotrophic hormone. Proc.Soc.Exp.Biol.&Med., 77:87-93, 1951.
84. ROOS, P., FEVOLD, H.R. e GEMZELL, L.A. - Preparation of human Growth hormone by gel filtration. Biochem.Biophys. Acta, 74:525-531, 1963.
85. ROTH, J. - Peptide hormone binding to receptors_ a review of direct studies in vitro. Metabolism, 22:1059-73, 1973.

86. SACCHI, G.E., TURYN, D. e DELLACHA, J.M.- Specific binding sites for ^{125}I -labelled insulin in the rat submandibular gland: in vivo and in vitro studies. in press.
87. SIMON, J., FREYCHET, P. e ROSSELIN, G. - A study of insulin binding sites in the chicken tissues. Diabetologia, 13:219-228, 1977.
88. SONENBERG, M., MONEY, W.L., DORANS, J.F., LUCAS, V. e BOURQUE, L. - The distribution of radioactivity in the tissues of the rat after the administration of radioactive Growth hormone preparations. Endocrinology, 55:709-720, 1954.
89. STADIE, W.C., HAUGAARD, N., VAUGHAN, M. e MARSH, J.B. - Factors influencing the combination of insulin with muscle from normal rats. J.Biol.Chem., 189:53-58, 1951 (Citado por CATT e DUFAU, ref. nº 15).
90. STADIE, W.C., HAUGAARD, N. e VAUGHAN, M. - The quantitative relation between insulin and its biological activity. J.Biol.Chem., 200:745-51, 1953.
91. STEINER, D.F. - Evidence for a precursor in the biosynthesis of insulin. Trans.NY Acad.Sci., Ser.II, 30:60-68, 1967.
92. STEINER, D.F., CUNNENGHAN, D.D., SPIGELMAN, L. e ATEN, B. - Insulin biosynthesis:evidence for a precursor. Sci., 157:697-700, 1967.
93. STEINER, D.F. - Insulin today. Diabetes, 26:322-340, 1977.
94. TERRIS, S. e STEINER, D.F. - Binding and degradation of ^{125}I -insulin by rat hepatocytes. J.Biol.Chem., 250:8389 - 98, 1975.
95. TURYN,D., e DELLACHA, J.M. - Specific binding of iodinated Growth hormone to rat liver in vivo. Endocrinology, 103 : 1190-95, 1978.

96. TURYN, D. e DELLACHA, J.M. - Insulin binding sites in rat hypophysis. IRCS Med.Sci.Biochem., 8:580-81, 1980.
97. TURYN, D., MARQUES, M. e DELLACHA, J.M. - In vivo effect of temperature on the specific liver uptake and renal degradation of labelled human Growth hormone in the turtle Chrysemys dorbgni . Gen.Com.Endocrinol., 44:171-6, 1981.
98. WARSHAWSKY, H., GOLTZMAN, D., ROULEAU, M.F. e BERGERON, J.J.M. - Direct in vivo demonstration by radioautography of specific binding sites for calcitonin in skeletal and renal tissues of the rat. J.Cell Biol, in press.
99. WEITZEL, G., OERTEL, W., RAGER, K. e KEMMLER, W. - Insulin vom Truthuhn (Meleagris gallopavo). Z.Physiol.Chem., 350: 57-62, 1969.
100. WOLFSEN, A.R.; McINTYRE, H.B. e ODELL, W.D. - Adrenocorticotropin measurement by competitive binding receptor assay. J.Clin.Endocrinol.Metabol., 34:684-9, 1972.
101. ZIMMERMAN, A.E., MOULE, M.L. e YIP, C.C. - Guinea pig insulin J.Biol.Chem., 249:4026-29, 1974.