



**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO RADIOBIOLÓGICO PARA ESTIMATIVA  
DO "ESTIMULADOR TIROIDIANO DE AÇÃO PROLONGADA"  
(LATS) NO SORO HUMANO**

*EMIKO MURAMOTO, WILIAN NICOLAU, ETSUKO IKEDA, LÍCIO  
MARQUES DE ASSIS e RÔMULO RIBEIRO PIERONI*

**PUBLICAÇÃO IEA N.º 283**  
Janeiro — 1973

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
Caixa Postal 11049 (Pinheiros)  
CIDADE UNIVERSITÁRIA "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"  
SÃO PAULO — BRASIL

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO RADIOBIOLÓGICO PARA ESTIMATIVA  
DO "ESTIMULADOR TIROIDIANO DE AÇÃO PROLONGADA"  
(LATS) NO SORO HUMANO\***

**Emiko Muramoto, Wilian Nicolau, Etsuko Ikeda  
Lício Marques de Assis, Rômulo Ribeiro Pieroni**

**Departamento de Radiobiologia  
Instituto de Energia Atômica  
São Paulo - Brasil**

**Publicação IEA Nº 283  
Janeiro - 1973**

---

\* Separata da "Revista da Associação Médica Brasileira", vol. 18, nº 10, outubro de 1972

**Instituto de Energia Atômica**

Superintendente: Rômulo Ribeiro Pieroni

**Conselho Superior**

Eng<sup>o</sup> Roberto N. Jafet – Presidente

Prof.Dr. Emilio Mattar – Vice-Presidente

Prof.Dr. José Augusto Martins

Dr. Affonso Celso Pastore

Prof.Dr. Milton Campos

Eng<sup>o</sup> Helcio Modesto da Costa

# Padronização do método radiobiológico para estimativa do "estimulador tireoideano de ação prolongada" (LATS) no soro humano<sup>1</sup>

Emiko Muramoto\*  
 Wilian Nicolau\*\*  
 Etsuko Ikeda\*  
 Lício Marques de Assis\*\*  
 Rômulo Ribeiro Pieroni\*\*\*  
 São Paulo, SP

## INTRODUÇÃO

Adams e col.<sup>(4)</sup> verificaram que a administração de tirotrófina a cobaias que haviam recebido previamente <sup>131</sup>I para a marcação *in vivo* dos compostos iodados tireoideanos resultou em incremento de atividade radioisotópica sanguínea desses animais. Nessas experiências os animais recebiam tiroxina para inibir a secreção endógena de tirotrófina. Posteriormente, foi verificado que, ao administrar soro de paciente com hipertiroidismo<sup>(5)</sup>, a tireóide dos animais era estimulada por um agente sérico que provocava resposta diferente quando comparada com a estimulação pelo TSH. O soro ativo induzia um retardo marcante na resposta máxima do animal-teste que aparecia às 16 ou mais horas quando medida pela radioatividade sanguínea.

Adams<sup>(1)</sup>, ao adicionar TSH<sup>2</sup> no soro de paciente que apresentava essa anormalidade da resposta, verificou que os dois componentes agiam independentemente. Isso sugeriu que o soro continha "uma forma anormal de TSH". Esse material era encontrado

somente em pacientes com tirotoxicose e foi, de início, relacionada à concomitante existência de exoftalmia.

Modificando a técnica de Adams e col.<sup>(5)</sup>, McKenzie<sup>(33)</sup> usou para os estudos camundongos previamente injetados com <sup>131</sup>I e obteve respostas sanguíneas máximas duas horas após a administração de tirotrófina. Ao administrar a camundongos, pré-tratados de modo idêntico, soros de pacientes tirotóxicos e medindo a radioatividade dos sangues 2, 12 e 24 horas após, obteve um retardamento da resposta máxima semelhante ao descrito por Adams e col.<sup>(5)</sup>. A esse fator existente nos soros de tais pacientes McKenzie<sup>(33)</sup> deu o nome de "ativador tireoideano do hipertiroidismo".

Após a comprovação da existência desse estimulador anormal da tireóide, diversas pesquisas têm sido feitas seguindo ou modificando o ensaio biológico de McKenzie<sup>(34)</sup>. Vários outros nomes foram dados a essa substância, tais como "fator tireoideano sérico", "ativador anormal da tireóide", "estimulador anormal da tireóide".

Posteriormente, no 4.º Congresso Internacional de Bócio realizado em

1960, em Londres, este estimulador recebeu o nome de "Estimulador Tireoideano de Ação Prolongada" (*Long-Acting Thyroid Stimulator* ou simplesmente LATS).

A estimulação da tireóide por este fator foi confirmada por experiências que demonstraram que a injeção de soro de paciente que continha LATS produzia um aumento de PB<sup>131</sup>I, da captação de <sup>131</sup>I pela tireóide e da altura da célula acinar da tireóide do camundongo<sup>(35)</sup>.

Foi estabelecido, subsequentemente, que o material liberado pela glândula do camundongo sob a ação da tirotrófina ou LATS era, de modo predominante, tiroxina. Outras pequenas frações contendo respectivamente iodeto, triiodotironina e tirosinas iodadas<sup>(40,43)</sup> puderam ser também identificadas.

Adams<sup>(2)</sup> estudou o tempo de permanência do LATS no sangue circulante do rato e verificou que possuía meia-vida biológica de 7,5 horas, o que contrastava com a meia-vida biológica do TSH, cuja atividade caía a menos de 5% 1 hora após sua administração.

Esses resultados foram confirmados por McKenzie<sup>(36)</sup> ao injetar por via intravenosa soro de paciente com hipertiroidismo em camundongos e colhendo amostras sanguíneas a diversos intervalos de tempo. Foi verificado que a resposta se prolongava além de 8 horas após administração do soro, corroborando a idéia de que o LATS seria uma entidade distinta do TSH.

A distribuição de LATS entre as proteínas foi estudada por concentração de soro em ultrafiltração e eletro-

1. Standardisation de la méthode radio-biologique pour estimer le taux du "stimulus thyroïdien d'action prolongée" (LATS) existant dans le sérum humain / Standardization of the radiobiological method employed to estimate the "long-acting thyroid stimulator" (LATS) in human serum.

Trab. reu. de Div. de Radiobiol. do Inst. de En. Atôm. de S. Paulo e Dep. de Clínica Méd. da Fac. de Med. da Univ. de S. Paulo. Apres. para publ. em 28/10/71; aprov. em 13/4/72.

\* Bloq. Farmacêut. (Mestres em Ciência).

\*\* Méd. Livre Doc.

\*\*\* Méd. e Físico; Diretor do Inst. de En. Atôm. e Chefe da Div. de Radiobiol.

2. Abreviaturas: TSH — tirotrófina bovina; LATS — estimulador tireoideano de ação prolongada; PBI — iodo ligado à proteína; FHG — fto-hemaglutinina; IgG — imunoglobulina G; T<sub>3</sub> — triiodotironina; L-T<sub>3</sub> — L-tetraiodotironina ou tiroxina; mU — milunidades.

R<sub>3</sub> — % da contagem radioativa de 3 horas em relação àquela de zero hora, obtidas em 0,1ml do sangue do camundongo; R<sub>6</sub> — % da contagem radioativa de 6 horas em relação àquela de zero hora em 0,1ml do sangue do camundongo; R<sub>18</sub> — % da contagem radioativa de 18 horas em relação àquela de 3 horas obtida em 0,1ml do sangue do camundongo; R<sub>24</sub> — contagem radioativa de 24 horas em relação àquela de 3 horas obtida em 0,1ml do sangue do camundongo.

toresse em bloco de amido<sup>(36)</sup>. A atividade de LATS mostrou estar distribuída quase que proporcionalmente nas frações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  globulinas, porém com mais atividade nesta última. Essa distribuição é diversa daquela apresentada pelo TSH proveniente de pacientes mixedematosos. Nestes, toda a atividade mostrou estar concentrada na  $\gamma$  globulina.

A hipótese de que a resposta tardia apresentada pelo soro de hipertiroideianos pudesse ser devida a uma fração do TSH ligada a proteínas séricas e liberada tardiamente para a sua ação sobre a tireóide foi afastada, quando se demonstrou<sup>(41)</sup> que anti-soro anti-TSH não tinha ação sobre a atividade de LATS e que TSH padrão adicionado a soros e ensaiados em camundongos continuavam a produzir uma resposta precoce. Esse fato não afastou, porém, a possibilidade de o LATS ser uma forma alterada de TSH.

Outra diferença de comportamento entre esses dois fatores é a resposta dos mesmos à temperatura<sup>(32)</sup>. Assim, o LATS é muito afetado por altas temperaturas, sendo que seu aquecimento a 70°C por 10 minutos reduz sua atividade a 2% do valor inicial, enquanto que nas mesmas condições o TSH é afetado em apenas 45% da sua potência.

Apesar de ser aparente que o LATS se distribuía entre as várias espécies de proteínas séricas quando fracionado por eletroforese ou cromatografia, sua concentração, como já foi assinalado, predominava no componente da  $\gamma$  globulina<sup>(36)</sup>. A associação de LATS com a  $\gamma$  globulina foi mais claramente evidenciada por método de gel-filtração em Sephadex<sup>(38)</sup> e precipitação em etanol a frio<sup>(3)</sup>. Por esta técnica o LATS não somente era encontrado com a  $\gamma$  globulina como também recuperado quantitativamente separado do TSH.

Plasmas de pacientes com doença de Graves contendo LATS foram ensaiados por McKenzie<sup>(38)</sup>, que obteve 3 frações protéicas por gel-filtração em Sephadex G-200<sup>(26,46)</sup>. A atividade do LATS era completamente recuperada na segunda fração protéica. A hidrólise com a pancreatina e refiltração desta fração em gel de Sephadex G-25 mostrou que o LATS estava associado a várias subtrações, sendo porém sua atividade mais evidente na proteína 7S.

Adams e col.<sup>(3)</sup> estabeleceram que o LATS podia ser recuperado do soro com a imunoglobulina G (IgG) e sua atividade não podia dela ser dissociada.

A falha de várias tentativas para separar a atividade do LATS do IgG levou McKenzie<sup>(38)</sup> a sugerir que a atividade poderia ser inerente à propriedade específica da molécula de  $\gamma$  globulina.

Quando esta  $\gamma$  globulina tinha sua cadeia peptídica fracionada, a duração de resposta apresentada pela sua administração ao camundongo era de menor magnitude, indicando a necessidade de globulina intacta para a atividade de LATS<sup>(19,20,42,46)</sup>.

Nos métodos que foram descritos para a avaliação da atividade de LATS, o volume de soro a ser analisado é limitado a 0,5ml, devido a seus efeitos nocivos sobre a preparação biológica. Isto parece limitar o encontro de LATS positivo em pacientes portadores da doença de Graves.

Mais recentemente foram descritos diversos processos para concentrar e purificar as amostras a serem ensaiadas. Assim, Miyai e col.<sup>(48)</sup>, por meio da separação em DEAE-Sephadex, neutralizações com anti-soros e purificações em carboxi-metil-celulose do soro teste, conseguiram concentrar de 30 a 37 vezes a atividade de LATS.

Dorrington e cols.<sup>(19)</sup> concentraram 10 vezes a atividade sérica de LATS por meio de precipitação em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , diálises sucessivas com tampão de fosfato e purificação em Sephadex DEAE-celulose.

Diversas tentativas, sem resultados positivos, foram realizadas a fim de dissociar a atividade de LATS da atividade de IgG, usando técnica de cisão de diferentes tipos de ligações não covalentes. Isto levou à suposição de que o LATS tivesse uma função de anticorpo.

A absorção de LATS por microsoma de tireóide e a sua posterior eluição em tampão ácido<sup>(20,18)</sup>, resultou na obtenção daquele ativador em alto grau de afinidade e especificidade para os microsomas tiroideanos<sup>(8,21)</sup>. O mecanismo lógico no caso seria a de neutralização específica do LATS por alguns componentes da fração microsomal da tireóide.

Se o LATS é um anticorpo para um componente da tireóide, então a absorção pelo antígeno específico com consequente eluição deveria resultar em maior purificação do material. Esse método, entretanto, é de resultado relativo, já que só pequena parte do estimulador é recuperado do provável complexo antígeno-anticorpo.

Baseados nas evidências de que o estimulador é uma IgG, diversos autores investigaram a possibilidade de sua síntese *in vitro* pelos linfócitos<sup>(42,39)</sup>, já que os linfócitos circulantes têm participação ativa no fenômeno imunológico que ocorre nas reações ligadas à hipersensibilidade. Assim, Bach<sup>(7)</sup>, em 1963, estudou os linfócitos do sangue de paciente com doença de Graves, a fim de investigar a possibilidade de a fito-hemaglutinina (FHG) estimular a síntese de LATS<sup>(7,23,41)</sup>. McKenzie<sup>(39)</sup>,

trabalhando com cultura de linfócitos do sangue incubados conjuntamente com FHG, conseguiu demonstrar a atividade do LATS nas células provenientes de pacientes portadores de doença de Graves. As experiências eram negativas quando ao meio de cultura não se adicionava FHG ou quando se trabalhava com homogeneizado celular. O mesmo autor<sup>(40)</sup> demonstrou nestas culturas a incorporação, embora pequena, de aminoácidos marcados com <sup>14</sup>C em  $\gamma$  globulina tipo IgG.

Melhor caracterização da atividade de LATS do meio de cultura como IgG foi fornecida pelos trabalhos de Miyai e col.<sup>(47)</sup> utilizando o fracionamento protéico em gel-Sephadex e neutralização da atividade com anti-soro anti- $\gamma$  globulina. Apesar das respostas obtidas no camundongo pela administração do líquido de cultura serem de pequena magnitude, elas eram estatisticamente significantes.

Desde que é sabido que existe uma especialização entre as células para a produção de anticorpos<sup>(23,16,22,51)</sup>, seria de se supor que respostas de maior magnitude pudessem ser obtidas desde que fossem usados linfócitos provenientes de estruturas especializadas para esse fim, tais como os linfócitos<sup>(16)</sup> associados à tireóide. Maior resposta linfocitária *in vitro* poderia também ser obtida pela utilização de antígeno específico<sup>(16)</sup> para a produção de LATS. Tal antígeno, entretanto, não é conhecido.

Tentativas para a caracterização do antígeno têm sido feitas, embora em pequeno número. McKenzie<sup>(40,43)</sup> e Burke<sup>(16)</sup> obtiveram resposta estimuladora da tireóide de camundongos utilizando soros de coelhos previamente imunizados com homogeneizado total da tireóide e com a sua fração microsomal. A resposta era mais evidente quando se utilizava a primeira preparação. Nessas experiências utilizou-se como controle microsomas de fígado, para os quais o coelho não produzia resposta de LATS<sup>(40,21,52)</sup>. Os animais, no entanto, não apresentaram hipertiroidismo pelos parâmetros utilizados pelos autores, apesar de exibir incremento na sua iodemia protéica não relacionada, aparentemente, à administração do homogeneizado tiroideano.

Berumen e cols.<sup>(12)</sup> referiram, diferentemente do que até então vinha sendo admitido, que a maior parte de atividade de absorção do LATS estava na fração celular solúvel e não na microsomal.

Smith<sup>(55)</sup> confirmou este achado demonstrando que realmente a maior parte de atividade absorvedora de LATS dos homogeneizados tiroideanos está na fração solúvel. Essa fração contém múltiplos componentes, entre os quais

a troglobulina, a hemoglobina e proteínas séricas. Usando a precipitação salina e a gel-filtração, o autor mostrou que a atividade de absorção do LATS se associava a uma fração 4S. Esta fração parece conter os antígenos tiroidianos específicos que seriam importantes na absorção do LATS.

O conceito de que o LATS é um anticorpo contra alguns componentes tiroidianos não foi confirmado pelos trabalhos de Burk<sup>(15,16)</sup>, que demonstrou a ausência da positividade de diversas reações características de fenômenos imunológicos utilizando soros LATS-positivos. Nesse mesmo trabalho, o autor fornece certos indícios da existência de fatores séricos inibidores da atividade de LATS.

Em virtude das dificuldades de caracterização de LATS como anticorpo, o que permitiria localizar sua fonte de produção ao nível do sistema linfoplasmocitário, até o momento não se conseguiu descobrir o local de sua formação ou síntese no organismo. Muitos autores procuram excluir o eixo hipotálamo-hipófise-tiroídiano como sistema formador de LATS. Assim, vários pacientes portadores de doença de Graves hipofisectomizados terapeuticamente apresentavam LATS circulantes. Werner e cols.<sup>(36)</sup> e Becker e col.<sup>(9,10)</sup> verificaram que essa conduta terapêutica aplicada em alguns casos de doença de Graves não levava o paciente ao estado de hipotiroidismo, como seria de se esperar. A administração a camundongos de extratos hipofisários obtidos pela necropsia de pacientes com doença de Graves com LATS<sup>(27,37)</sup> circulante não dava respostas tardias satisfatórias, indicando a ausência desse fator no material testado.

Adams e cols.<sup>(6)</sup> compararam os resultados dos ensaios biológicos em camundongos hipofisectomizados e intactos aos quais tinham sido administrados soros LATS-positivos<sup>(49)</sup>. As experiências demonstraram que a ação do LATS era evidente nos camundongos hipofisectomizados, excluindo a possibilidade de que ele seja um fator derivado do hipotálamo, responsável pela liberação de TSH da pituitária. O presente trabalho teve como objetivo essencial a montagem da metodologia para a estimativa da atividade do LATS em portadores de doença de Graves, tendo em vista a necessidade da introdução de um método de pesquisa de certo interesse para o nosso meio. Entretanto, uma vez padronizado o método, como será visto, surgiram dúvidas na avaliação dos níveis de positividade das respostas que deveriam ser indicativas da existência de LATS nos soros ensaiados. Este trabalho se propõe:

1. Padronização da metodologia para a estimativa do LATS no soro de pacientes com doença de Graves.

2. Estudo dos níveis de resposta para os quais se pode considerar como estatisticamente provável a presença do LATS nos ensaios realizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Solução de <sup>125</sup>I** — A solução radioisotópica foi preparada de acordo com o número de animais a serem ensaiados. O radioiodo foi diluído em solução fisiológica na dose de 16 a 17  $\mu$ Ci em 0,25ml de solução para cada camundongo.

**Solução de L-3-3'-5-triiodotironina** — 0,2mg de T<sub>3</sub> foi dissolvida em NaOH — 1N e o volume completado a 200ml em solução fisiológica.

**Solução de hormônio tirotrófico** — 8ml da solução da TSH (10 UI dissolvidos em 10ml de água destilada) foram diluídos a 200ml em solução fisiológica. Um ml dessa solução foi novamente diluído a 10ml com solução análoga, obtendo-se assim, em 0,2ml, 0,8mU de TSH.

**Resina irocadora de ions** — Amberlite IRA — 410 — Resina aniônica forte na forma de cloreto, que foi obtida por percolação tratando, alternadamente, em NaOH — 1N e em HCl — 1N. Cada solução era passada pelo menos duas vezes. No intervalo de cada passagem lavava-se com água destilada até pH neutro e no final foi acondicionado em solução fisiológica.

Avaliou-se a atividade de LATS em 42 soros provenientes de 40 pacientes portadores de bócio difuso tóxico acompanhado de exoftalmia não maligna.

O sangue destes pacientes foi colhido por punção da veia antecubital. Após a retração do coágulo separou-se o soro, que foi mantido em congelador à temperatura de -20° até sua utilização.

O procedimento para a detecção da presença de LATS no soro de pacientes com doenças de Graves foi feito seguindo o método de ensaio biológico em camundongo, descrito por McKenzie<sup>(33)</sup> e modificado por Furth<sup>(24)</sup>.

Utilizaram-se camundongos fêmeas de raça Swiss, criados no biotério do Instituto de Energia Atômica, pesando entre 18 a 23g, os quais foram colocados em gaiolas e mantidos sob aquecimento com uma lâmpada de 100 watts. Em algumas experiências foram

utilizados camundongos machos, a fim de compará-los na eficiência de suas respostas. Os animais receberam, nos 10 dias que antecederam ao ensaio, dieta pobre em iodo (dieta de Remington e água desiodetizada por destilação e percolação em amberlite IRA-410). Passado esse período de 10 dias, foram administrados a cada animal por via subcutânea 16 a 17  $\mu$ Ci de <sup>125</sup>I diluído em 0,25ml de solução fisiológica. Com esse procedimento viu-se a marcação *in vivo* dos compostos iodados intratiroidianos. Concomitantemente, administrou-se 0,2  $\mu$ g de triiodotironina (T<sub>3</sub>) dissolvido em 0,2ml de solução fisiológica, a fim de suprimir a secreção endógena do TSH. Novas doses de T<sub>3</sub> foram administradas nas 24 e 44 horas após a primeira dose para assegurar a continuidade da supressão endógena.

Os animais foram numerados para a sua identificação posterior e distribuídos em lotes de 6 a 10 exemplares para cada material a ser analisado.

Após 48 horas da administração de <sup>125</sup>I retirou-se por punção do "sinus" retro-orbital do camundongo uma primeira amostra de 100  $\mu$ l de sangue com tubo capilar<sup>4</sup> heparinizado, cuja contagem radioisotópica serviu como referência para as modificações que poderiam advir da administração das substâncias a serem testadas. Essa contagem será referida aqui como "amostra de zero hora".

Feita a primeira sangria injetou-se, para cada camundongo de um mesmo lote, por via intraperitoneal, 0,5ml da substância a ser ensaiada.

Em cada experiência onde foram ensaiados os soros incluíram-se, paralelamente, dois grupos controles: em um deles os animais receberam 0,5ml de solução fisiológica e no outro 0,8mU de TSH padrão, cuja solução era preparada antes de cada ensaio.

Três e 18 horas após a administração, novas amostras de sangue foram retiradas, pelo mesmo processo acima descrito.

Cada amostra de 100  $\mu$ l de sangue era colocada em tubo de ensaio e o capilar era lavado por 4 vezes.

A radioatividade sanguínea foi contada em períodos de 10 minutos para cada amostra em espectrômetro-automático de cintilografia munido de cristal de NaI (TI) tipo poço.

As variações da radioatividade observadas nas amostras sanguíneas, uma vez deduzidas as respostas controles obtidas pela injeção de soro fisiológico, foram expressas em:

1. Aumento percentual da radioatividade nas amostras de 3 e 18 horas

3. Os soros destes pacientes nos foram cedidos para estudo pelo Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Serviço do Prof. A.B. de Ulhôa Cintra) e pelo Instituto de Endocrinologia e Doenças Metabólicas de São Paulo.

4. Tubo capilar — capacidade de 100  $\mu$ l — Drummond Scientific Co. Broomfield, Pa. U.S.A.

em relação ao valor inicial. Consideram-se, aprioristicamente, com base nos dados da literatura, como positivos os ensaios cujas contagens observadas às 18 horas em relação à contagem de zero hora foram iguais ou maiores que 150%.

2. Incremento estatisticamente significativo do número de contagens obtidas às 18 horas em relação àquelas de zero e de 3 horas (teste *t* de Student).

Como cada animal serviu como seu próprio controle aplicaram-se, para verificação do grau de significância, as fórmulas:

$$t = \frac{S(d - \bar{d})}{\sqrt{\frac{S(d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}}$$

Consideraram-se como positivos os ensaios cujos incrementos de radioatividade do sangue dos camundongos observados nas amostras obtidas às 18 horas após a administração da substância a ser testada foram significantes a nível de  $p < 0,05$ .

Estas duas formas de expressar a positividade do LATS no soro serão comparadas e discutidas.

## RESULTADOS

### 1. Comparação das respostas à administração de TSH exógeno obtidas em camundongos machos e fêmeas.

A fim de se verificar a possibilidade de serem utilizados de modo indiscriminado camundongos de ambos os sexos, foram feitas algumas experiências preliminares administrando 0,2 e 0,8mU de TSH e avaliando-se a resposta dos animais.

Verifica-se pela tabela I que os animais machos, em média, e praticamente nos casos individualizados, deixaram de responder a um estímulo de 0,2mU do hormônio trófico, de acordo com o critério metodológico adotado. Os animais fêmeas mostraram-se mais sensíveis ao TSH, respondendo em média a nível de 179,5%.

Na tabela II, onde são mostrados os resultados obtidos em 3 experiências com animais machos e 9 experiências com fêmeas, injetados com 0,8mU de tirotrófina, verifica-se que os machos responderam em média a nível de 245,6% contra 338,0% das fêmeas. Essas experiências preliminares, embora os resultados não possam ser considerados como definitivos devido ao baixo número de ensaios realizados, levaram à utilização, em todas as experiências posteriores, somente de animais fêmeas.

Tabela I		
Resultados obtidos pela administração de 0,2mU de TSH bovino*		
Experiência n.º	Machos	Fêmeas
1	71,3	209,3
2	106,7	202,5
3	84,6	127,0
Média	87,4	179,5

\* Utilizaram-se lotes de 10 camundongos fêmeas e machos. Cada valor expresso na tabela representa o percentual do valor inicial da radioatividade sanguínea dos camundongos. A solução de TSH foi administrada intraperitonealmente e colheu-se sangue (100 µl) do soro retro-orbital dos animais antes da administração do hormônio trófico (zero hora) e três horas após. Contagem em 10 minutos para cada amostra.

### 2. Efeitos nos animais pela administração de soro fisiológico como controle das experiências.

A fim de se avaliar a contribuição dos fatores de manipulação (punção peritoneal e do sinus retro-orbital) dos animais nas modificações dos níveis de radioatividade sanguínea, em todas as experiências incluíram-se lotes de animais igualmente pré-tratados, que recebiam 0,5ml de solução fisiológica. A radioatividade medida às 3 e às 18 horas após mostrou constituir-se em média de 90,5 e 87,4% da atividade inicial, respectivamente. Houve, portanto, ligeiro decréscimo dos níveis de radioatividade circulante que não se mostrou significativo quando analisado estatisticamente. Esse resultado demonstra que a manipulação do animal não contribui para aumentar ou diminuir significativamente a resposta ao LATS ou TSH.

### 3. Efeitos nos animais pela administração de TSH

A tabela II mostra os resultados pela administração de 0,8mU de TSH exógeno expressos em percentagem do valor inicial da radioatividade sanguínea. Verifica-se que em todas as experiências realizadas com animais fêmeas houve resposta positiva à administração da referida dose quando a radioatividade era medida 3 horas após.

Na fig. 1 estão representados os resultados das diversas experiências

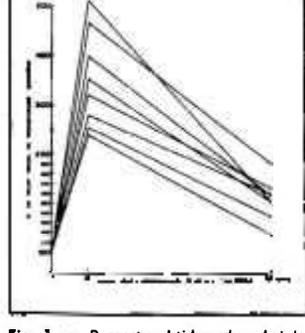


Fig. 1 — Resposta obtida pela administração de 0,8mU de TSH bovino a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos fêmeas devidamente preparados. Os resultados estão expressos em percentagem da contagem radioativa de 100µl, de sangue de camundongos coletados às 3 e 18 horas após a administração da tirotrófina em relação àquela contagem obtida à zero hora (antes da administração do TSH).

realizadas, incluindo-se as alterações da radioatividade medidas 18 horas após. Observa-se que a resposta positiva obtida às 3 horas declina constantemente em todas as experiências.

As respostas dos animais fêmeas à administração do TSH expressas em percentagem do valor inicial (zero hora) da radioatividade variou entre 228,3% a 510,5% com uma média de 338,0% (fig. 1), revelando, assim, grande variabilidade das respostas.

Quanto aos animais machos verifica-se que, em duas das três experiências, as respostas foram sensivelmente menores que a média obtida nas experiências realizadas em fêmeas (tabela II). Na experiência restante a resposta foi de boa magnitude.

### 4. Relação dose-resposta dos animais à administração de soro sabidamente possuidor de atividade de LATS.

A fim de se verificar se há proporcionalidade entre a quantidade de soro injetado e a resposta dos animais, foram administrados a 3 lotes de camundongos 0,1, 0,2, e 0,4ml de um mesmo soro possuidor de atividade de LATS por análises prévias.

Verifica-se que para a dose de 0,1, 0,2 e 0,4ml de mesmo soro administrado houve incremento relativamente bem proporcionado na resposta exibida pelos animais (fig. 2). Assim, foram obtidas respostas de 456,8%, 866,2% e 1797,3%, respectivamente. A análise estatística demonstrou serem

**Tabela II**  
Resultados obtidos pela administração do 0,8mU de TSH bovino\*

Experiência N.º	Médias		Desvios	
	R1	R3	R1	R3
1	424,9	183,8	510,5	153,3
2	132,9	42,9	250,1	127,5
3	179,1	46,0	280,1	159,3
4			228,3	116,3
5			351,3	151,1
6			466,3	189,9
7			320,2	165,1
8			247,1	134,0
9			388,5	158,2
<b>Média</b>	<b>245,5</b>	<b>70,7</b>	<b>338,0</b>	<b>190,7</b>

\* Utilizaram-se lotes de 6 a 10 camundongos machos e fêmeas. Cada valor expresso representa percentual do valor inicial da radioatividade sanguínea dos camundongos (R). A solução de TSH foi administrada intraperitonealmente e colheu-se sangue (100 µl) do seio venoso retro-orbital dos animais antes da administração do hormônio trófico (zero hora), 3 e 18 horas após. Contagem em 10 minutos para cada amostra.

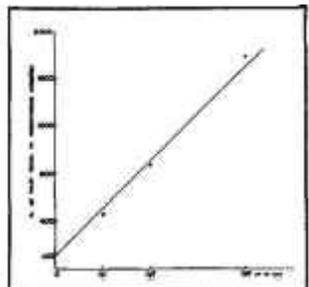


Fig. 2 — Respostas obtidas em relação à quantidade de soro administrada a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos devidamente preparados. Os resultados estão expressos em percentagem da contagem radioativa de 100µl de sangue de camundongos coletados às 3 e 18 horas após a administração do soro a ser analisado em relação àquela contagem obtida à zero hora (antes da administração do soro).

**Tabela III**  
Reprodutibilidade do método verificada pelo ensaio de um mesmo soro em 5 ocasiões sucessivas\*

Experiência N.º	3 hs/0h (R1)	18 hs/3h (R2)	18 hs/0h (R3)
1	128,6	355,0	456,8
2	96,3	475,7	458,2
3	99,0	454,0	449,8
4	129,5	471,3	612,1
5	166,1	375,1	600,1
<b>Média</b>	<b>123,6</b>	<b>426,4</b>	<b>517,0</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>± 27,2</b>	<b>± 76,6</b>	<b>± 101,0</b>
<b>Erro padrão</b>	<b>12,5</b>	<b>35,2</b>	<b>45,5</b>

\* Resultados de 5 ensaios obtidos pela administração de 0,1 ml de soro de paciente portador de doença de Graves e cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos devidamente preparados. Os resultados estão expressos em percento da contagem radioativa de 100 µl de sangue de camundongos coletados às 3 e 18 horas após a administração do soro a ser analisado, em relação àquela contagem obtida à zero hora (antes da administração do soro).

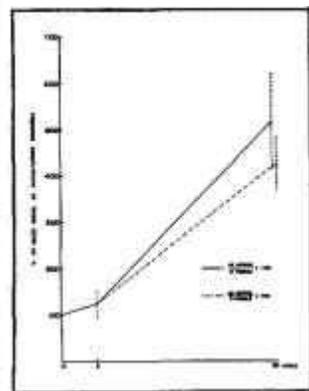


Fig. 3 — Média e respectivo desvio padrão das respostas de 5 experiências obtidas de um mesmo soro sabidamente portador de atividade de LATS. Administraram-se a cada animal 0,1ml de soro de lotes de 6 a 10 animais devidamente preparados. Os resultados estão expressos em percentagem da contagem radioativa de 100µl de sangue de camundongos coletados às 3 e 18 horas após a administração do soro a ser analisado, em relação àquela contagem obtida à zero hora (antes da administração do soro).

altamente significantes a níveis de  $p < 0,01$  as respostas obtidas nas 3 experiências, considerando de 18 horas em relação a zero hora ( $R_3$ ).

**5. Reprodutibilidade nas amostras obtidas pela administração de um mesmo soro possuidor de atividade de LATS.**

Um mesmo soro foi ensaiado por 5 vezes em dias diferentes. Utilizaram-se nessas experiências 0,1ml de soro por animal. Os resultados obtidos nessas experiências são mostrados na tabela III. Nelas são incluídas, também, as respostas precoces. Verifica-se que apenas em uma ocasião a resposta obtida às 3 horas foi maior do que 150%,

obtendo-se às 18 horas resposta média de  $517,1\% \pm 101,0\%$  com um erro padrão de 45,45%.

Na fig. 3 estão representadas as médias e os respectivos desvios-padrões das 5 experiências realizadas, bem como os níveis de respostas e o respectivo desvio-padrão que se obtém quan-

do se consideram os incrementos de 18 horas em relação às respostas obtidas às 3 horas após a administração do soro ( $R_2$ ).

#### 6. Resultados obtidos na avaliação da atividade de LATS em soros de pacientes portadores de doença de Graves

Foram ensaiados 42 soros provenientes de 40 pacientes com doença de Graves. Os resultados obtidos são mostrados na tabela IV, em ordem decrescente da magnitude das respostas de 18 horas expressa em percentagem da atividade radioisotópica inicial do sangue do animal ( $R_3$ ).

Verifica-se que foram obtidas, entre os 42 ensaios realizados, 13 respostas iguais ou superiores a 150% da atividade inicial. Entre essas foram incluídas 2 experiências levadas a efeito em um mesmo paciente sob condições terapêuticas diferentes (paciente I.T.P.). Considerando-se essa forma de expressar a atividade de LATS, foram obtidos 30% de casos positivos nos pacientes portadores de doenças de Graves.

O nível de positividade variou amplamente desde 150% a 1.797,3%. Seguindo os trabalhos de McKenzie<sup>(44)</sup>, os ensaios positivos foram divididos em 2 subgrupos: um, cujo incremento foi maior que 300% da atividade inicial (ensaios n.ºs 1 a 5) e considerados como possuidores de grandes quantidades de LATS (fig. 4) e o outro, cujo incremento foi menor que 300% (pacientes n.ºs 6 a 13), portanto, com quantidade moderada de LATS (fig. 5).

Pela aplicação do teste  $t$  às 42 experiências realizadas, verificou-se que (tabela IV) os incrementos observados foram estatisticamente significantes em 18 ocasiões correspondentes a 16 pacientes (ensaios de n.ºs 1 a 5 e n.ºs 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 22, 23, 24, 26 e 28), o que dá uma positividade de LATS de 40%. Nos pacientes 6, 8 e 12 considerados "LATS positivos" pelo incremento percentual, o teste  $t$  não se revelou positivo devido ao grande desvio-padrão das respostas (casos 6 e 12) ou ao baixo número de camundongos que sobreviveram às experiências (caso 8).

Foi aplicado também o teste  $t$  para a verificação da significância das diferenças de médias obtidas entre as contagens radioisotópicas feitas no sangue do animal às 18 horas e aquelas obtidas às 3 horas após a administração do soro teste ( $R_2$ ). Assim obtiveram-se diferenças significantes entre estas duas médias em 14 ensaios realizados (experiências n.ºs 1 a 11 e n.ºs 14, 17 e 26).

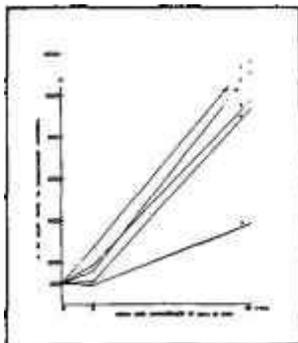


Fig. 4 — Cinco experiências com resposta fortemente positiva da atividade de LATS (> 300% da atividade inicial). Administrou-se 0,5ml de soro de paciente portador de doença de Graves a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos devidamente preparados. Os resultados estão expressos em percentagem da contagem radioativa de 100 $\mu$ l de sangue de camundongo coletado às 3 e 18 horas após a administração do soro a ser analisado em relação àquela contagem obtida à zero hora (antes da administração do soro).

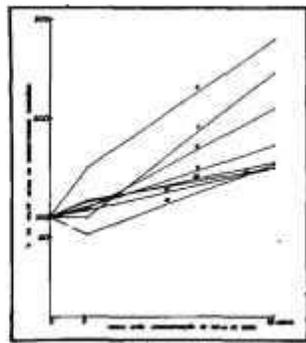


Fig. 5 — Oito experiências com respostas moderadamente positivas de atividade LATS (< 300% da atividade inicial). Administrou-se 0,5ml de soro de paciente portador da moléstia de Graves a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos devidamente preparados. Os resultados estão expressos em percentagem da contagem radioativa de 100 $\mu$ l de sangue de camundongo coletado às 3 e 18 horas após a administração do soro a ser analisado em relação àquela contagem obtida à zero hora (antes da administração do soro).

### DISCUSSÃO

O estudo de sensibilidade dos animais machos e fêmeas revelou, sem conclusão definitiva, devido ao pequeno número de ensaios realizados, que as fêmeas comportaram como mais sensíveis ao TSH. Daí a utilização de camundongos fêmeas para a montagem de ensaio biológico.

Nos dados fornecidos pela literatura observa-se também maior preferência pelo uso de fêmeas, não obstante alguns utilizassem com bons resultados animais machos<sup>(50,54)</sup>. Nesses trabalhos nenhuma referência é feita as possíveis diferenças de respostas entre os dois sexos.

A falta de padrão de LATS torna impossível a construção de uma curva de referência. Usa-se normalmente, a fim de assegurar bom procedimento durante as experiências, um lote controle injetado com TSH bovino ao qual os camundongos respondem satisfatoriamente<sup>(14,26,29,45,49)</sup>. A sensibilidade dos animais ao TSH bovino, relatada nos diversos trabalhos, varia grandemente. É frequente observarem-se falhas de respostas às doses pequenas<sup>(44,49)</sup>, tais como 0,05mU e 0,2mU. No presente trabalho verifica-se que os animais não responderam de modo nítido à administração de 0,2mU de TSH; a resposta a 0,8mU desse hormônio mostrou ser mais constante.

A suposição do TSH endógeno do animal teste iniciado logo após a ad-

ministração do iodo radioativo é, geralmente, feita injetando-se  $L-T_4$  por vários dias (4 a 5)<sup>(8,14,17,26,45,57)</sup> e adicionando-se à alimentação tireóide desidratada. Bowers e cols.<sup>(13)</sup> utilizaram em suas preparações biológicas a  $T_3$  como supressor do hormônio trófico, no que foram seguidos por Furth e cols.<sup>(24)</sup>. Estes últimos reduziram a duração do ensaio de maneira a não afetar a sensibilidade na significância das respostas dos animais, administrando apenas duas doses de  $T_3$  por via subcutânea. No presente trabalho utilizou-se essa modificação com resultados satisfatórios.

Os resultados obtidos para os controles que recebiam solução fisiológica mostraram decréscimo de atividade radioisotópica no sangue. Esse fato concorda com as experiências de vários autores<sup>(29,53)</sup>. Em alguns trabalhos, no entanto, é relatada pequena resposta positiva<sup>(16,30)</sup>, tanto pela administração de solução fisiológica como de soro albumina humana ou bovina.

A falta de padrão adequado de LATS faz com que se deva recorrer, para a montagem da metodologia, a soros de pacientes que mostrem títulos elevados do ativador, utilizando-se para testes de reprodutibilidade e de níveis de respostas em relação à dose administrada. Neste último teste, verificou-se linearidade satisfatória das respostas em relação às doses administradas, fato que concorda com os dados obtidos na literatura<sup>(26,30,31)</sup>.

Tabela IV

Resultados obtidos no ensaio de 42 soros de pacientes portadores de doença de Graves\*

Número	Paciente	horas da retirada do sangue do animal após a administração do soro					
		zero hora	3 horas		18 horas		
		contagem em 10'	contagem em 10'	R <sub>1</sub>	contagem em 10'	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	ITP	4122	11454	278,0 0,05 > p > 0,02	74189	644,6 p < 0,01	1797,3 p < 0,05
2	CAS	8059	12872	159,0 0,05 > p > 0,02	125063	971,0 p < 0,01	1552,0 p < 0,01
3	ITP	2767	5317	196,0 0,2 > p > 0,1	29674	492,8 0,05 > p > 0,02	966,0 0,05 > p > 0,02
4	SA	2303	3342	103,0 0,1 > p > 0,05	26403	871,0 0,05 > p > 0,02	945,0 0,05 > p > 0,02
5	JF	3334	3183	95,4 0,6 > p > 0,5	13361	412,9 p < 0,01	391,8 p < 0,01
6	DC	6541	9399	151,2 0,2 > p > 0,1	18336	185,0 0,05 > p > 0,02	280,0 0,1 > p > 0,05
7	DSL	4760	4753	103,0 0,9 > p > 0,8	11721	245,5 p < 0,05	246,2 0,07 > p > 0,01
8	JG	2697	2933	103,7 0,8 > p > 0,7	5670	193,3 0,05 > p > 0,02	210,3 0,2 > p > 0,1
9	JT	9379	10337	133,7 0,5 > p > 0,4	17123	158,0 p < 0,01	173,3 p < 0,01
10	ZSS	3214	2718	85,4 p > 0,9	5230	179,2 0,02 > p > 0,01	162,7 0,05 > p > 0,02
11	KH	4787	5531	116,5 0,05 > p > 0,02	7435	133,0 0,02 > p > 0,01	155,3 p < 0,01
12	IES	3670	3919	105,8 0,3 > p > 0,2	5493	140,1 0,2 > p > 0,1	150,3 0,1 > p > 0,05
13	AAS	2913	3127	116,9 0,1 > p > 0,05	4362	123,0 0,1 > p > 0,05	150,0 0,05 > p > 0,02
14	AN	2377	2072	87,1 0,8 > p > 0,7	3405	164,3 p < 0,05	143,2 p < 0,01
15	IAA	6523	7465	114,4 0,4 > p > 0,3	9246	123,6 0,1 > p > 0,05	141,6 p < 0,01
16	EAT	5597	4860	86,8 0,9 > p > 0,8	7704	159,5 0,05 > p > 0,02	137,6 0,9 > p > 0,8
17	MOL	4993	4856	97,1 0,9 > p > 0,8	6843	140,9 p < 0,01	136,9 0,02 > p > 0,01
18	ZMF	3353	3659	95,0 0,6 > p > 0,5	5098	142,1 0,1 > p > 0,05	135,3 0,3 > p > 0,2
19	MSS	6647	5960	94,5 p > 0,2	8907	149,4 0,1 > p > 0,05	134,1 0,4 > p > 0,3
20	MM	8401	9034	107,5 0,4 > p > 0,3	11042	122,5 0,5 > p > 0,4	131,4 0,4 > p > 0,3
21	MJC	2064	2054	99,4 0,9 > p > 0,8	2582	125,7 0,4 > p > 0,3	125,1 0,2 > p > 0,1

(Continua)

Tabela IV (conclusão)

Número	Paciente	horas da retirada do sangue do animal após a administração do soro					
		zero hora	3 horas		18 horas		
		contagem em 10'	contagem em 10'	R <sub>1</sub>	contagem em 10'	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
22	JB	6917	8280	$\frac{119,7}{0,2 > p > 0,1}$	8584	$\frac{103,6}{0,6 > p > 0,7}$	$\frac{124,1}{0,02 > p > 0,01}$
23	MJM	9086	10677	$\frac{114,0}{0,6 > p > 0,5}$	11134	$\frac{100,6}{0,9 > p > 0,8}$	$\frac{122,5}{0,05 > p > 0,02}$
24	MBS	2841	3455	$\frac{121,6}{0,2 > p > 0,1}$	3479	$\frac{100,6}{0,4 > p > 0,3}$	$\frac{122,4}{0,02 > p > 0,01}$
25	GI	7652	8567	$\frac{111,9}{0,1 > p > 0,05}$	9115	$\frac{106,3}{0,5 > p > 0,4}$	$\frac{119,1}{0,5 > p > 0,4}$
26	SFD	6667	5819	$\frac{87,2}{0,8 > p > 0,7}$	7980	$\frac{136,2}{p < 0,01}$	$\frac{118,9}{0,02 > p > 0,01}$
27	CS	8099	7633	$\frac{94,2}{0,4 > p > 0,3}$	9476	$\frac{124,4}{0,02 > p > 0,01}$	$\frac{117,2}{0,2 > p > 0,1}$
28	BC	3224	3072	$\frac{95,3}{0,9 > p > 0,8}$	3763	$\frac{122,5}{0,5 > p > 0,4}$	$\frac{116,7}{0,2 > p > 0,1}$
29	MASS	8360	10922	$\frac{130,6}{0,1 > p > 0,05}$	9690	$\frac{89,7}{0,9 > p > 0,8}$	$\frac{116,0}{0,02 > p > 0,01}$
30	MIN	3536	3241	$\frac{91,6}{0,9 > p > 0,8}$	4055	$\frac{125,1}{0,2 > p > 0,1}$	$\frac{114,7}{0,4 > p > 0,3}$
31	MASS	9267	8934	$\frac{96,4}{0,4 > p > 0,3}$	10619	$\frac{118,8}{0,2 > p > 0,1}$	$\frac{114,5}{0,4 > p > 0,2}$
32	MMC	3464	3235	$\frac{93,3}{0,5 > p > 0,4}$	3950	$\frac{118,7}{0,4 > p > 0,3}$	$\frac{112,6}{0,1 > p > 0,05}$
33	IAS	4716	4111	$\frac{87,2}{0,9 > p > 0,8}$	5125	$\frac{121,9}{0,2 > p > 0,1}$	$\frac{108,6}{0,6 > p > 0,5}$
34	MND	2141	1498	$\frac{73,4}{0,7 > p > 0,6}$	2278	$\frac{151,9}{0,05 > p > 0,02}$	$\frac{106,4}{0,4 > p > 0,3}$
35	MRS	5441	4187	$\frac{78,3}{0,9 > p > 0,8}$	5625	$\frac{134,1}{0,02 > p > 0,01}$	$\frac{104,1}{0,4 > p > 0,3}$
36	MN	7143	7037	$\frac{98,1}{0,8 > p > 0,7}$	7297	$\frac{104,1}{0,6 > p > 0,5}$	$\frac{102,1}{0,9 > p > 0,8}$
37	MCT	3463	2988	$\frac{86,5}{0,7 > p > 0,6}$	3284	$\frac{109,9}{0,4 > p > 0,3}$	$\frac{99,7}{0,5 > p > 0,4}$
38	ZRI	5157	4732	$\frac{91,7}{0,9 > p > 0,8}$	4983	$\frac{105,0}{0,3 > p > 0,2}$	$\frac{96,6}{0,8 > p > 0,7}$
39	ZP	5777	5236	$\frac{87,7}{0,7 > p > 0,6}$	5525	$\frac{103,7}{0,6 > p > 0,5}$	$\frac{95,2}{0,8 > p > 0,7}$
40	MOA	4922	4972	$\frac{103,5}{0,7 > p > 0,6}$	4577	$\frac{93,7}{0,7 > p > 0,6}$	$\frac{94,9}{0,8 > p > 0,7}$
41	MPC	5523	5019	$\frac{82,4}{0,5 > p > 0,4}$	4567	$\frac{91,7}{0,7 > p > 0,6}$	$\frac{81,2}{0,8 > p > 0,7}$
42	EPS	4160	3346	$\frac{83,4}{0,9 > p > 0,8}$	3346	$\frac{102,0}{0,8 > p > 0,7}$	$\frac{80,5}{0,8 > p > 0,7}$

\* R<sub>1</sub> — relação da radioatividade entre 3 horas/0 hora; R<sub>2</sub> — relação da radioatividade entre 18 horas/3 horas; R<sub>3</sub> — relação da radioatividade entre 18 horas/0 hora. Cada R é acompanhado do resultado obtido pelo aplicação do teste t entre as contagens relacionadas, a fim de se determinar a grau de significância dos incrementos da radioatividade do sangue do camundongo.

O teste de reprodutibilidade, apesar de certa variabilidade, mostrou-se satisfatório dentro das limitações inerentes a tal metodologia.

O nível de resposta positiva que se deve considerar como indicativo de atividade de LATS é variável desde 118% a 200%, de acordo com os diversos trabalhos<sup>(14,18,21,23,27,28,52)</sup>.

Vários testes estatísticos têm sido aplicados na procura de níveis de significância que possam exprimir em melhores condições a positividade do ensaio.

No presente trabalho notou-se uma discrepância na percentagem de soros LATS positivos quando se compara o número de pacientes considerados possuidores de LATS pela significância do teste *t* e com aqueles considerados positivos apenas pelos níveis de incremento da radioatividade do sangue do animal teste ( $R_3$ ). Assim, muitos soros de pacientes com doença de Graves que deveriam ser considerados como "LATS negativos" baseados empiricamente na obtenção de  $R_3$  menor que 150% (como fazem a maioria dos autores) mostraram que a resposta apresentada pelos animais, embora pequena, era significativa. Este fato elevou de 30 a 40% o número de pacientes que poderiam ser considerados como possuidores de atividade de LATS. A aplicação de teste *t* de Student<sup>(11)</sup>, no entanto, leva às vezes a não-obtenção da significância em ensaios com  $R_3$  evidentemente aumentados como sucedeu em 3 ocasiões (ensaios n.ºs 6, 8 e 12). Este fato foi imputado ao grande desvio-padrão das respostas apresentadas ou ao baixo número de camundongos recuperados para a sangria que seria efetuada às 18 horas após a administração do soro a ser ensaiado.

## SUMÁRIO

Realizou-se uma série de experiências com o objetivo de verificar a possibilidade da montagem da metodologia para a constatação da atividade do "estimulador tireoideano de ação prolongada" (LATS) nos soros de pacientes portadores de doença de bócio di-

fuso tóxico acompanhadas de exoftalmo não progressivo (doença de Graves).

Verificou-se uma boa reprodutibilidade nos ensaios realizados, bem como na linearidade da relação dose-res-

posta.

Utilizaram-se duas maneiras de expressar a positividade dos ensaios:

1. Cálculo em percentagem do valor da radioatividade inicial obtida na contagem do sangue do animal 18 horas após a administração do soro de paciente. Consideram-se como positivos os ensaios cuja percentagem do valor inicial da radioatividade do sangue dos camundongos obtida às 18 horas fosse igual ou maior que 150%.

2. Aplicação de teste *t* de Student às médias das contagens para verificação do grau de significância da resposta dos animais independentemente dos níveis de incremento da radioatividade entre 0 e 18 horas.

Pela primeira maneira de expressar as respostas, obtiveram-se 30% e, pela segunda, 40% de positividade para a presença de LATS, em 42 soros ensaiados, provenientes de 40 pacientes com doenças de Graves.

## RÉSUMÉ

Standardisation de la méthode radiobiologique pour estimer le taux du "stimulus thyroïdien d'action prolongée" (LATS) existant dans le sérum humain

Une série d'expérimentations fut menée à bout pour vérifier la possibilité de se créer une méthodologie qui puisse constater l'activité du "stimulus thyroïdien d'action prolongée" (LATS) existant dans les sérums de patients portant le goître diffus toxique, acru d'exophtalmie non progressive (mal de Graves).

Une bonne reproductibilité fut dégagée pendant les essais, ainsi que dans la relation linéaire dose-réponse.

La positivité des essais fut révélée à travers deux moyens:

1) Calcul en pourcentage de la valeur de radio-activité initiale obtenue à partir du comptage du sang de l'ani-

mal, 18 heures après l'administration du sérum du patient. On considère positifs les essais dont le pourcentage de la valeur initiale de la radio-activité du sang des souris obtenue après 18 heures, soit égal ou supérieur à 150%.

2) L'application du test "t" de Student pour moyennes des comptages afin de vérifier le degré de signification de la réponse (réaction) chez les bêtes, indépendant des niveaux de développement de la radio-activité entre 0 et 18 heures.

Le premier moyen accusa 30% et le second, 40% de positivities de la présence de LATS sur 42 sérums soumis à l'essai, provenant de 40 patients du mal de Graves.

## SUMMARY

Standardization of the radiobiological method employed to estimate the "long-acting thyroid stimulator" (LATS) in human serum

Some experiments on serum from thyrotoxic patients with non-malignant exophtalmos were carried out to ascertain the procedure for estimating the LATS. The method has proved to be satisfactory, revealing a good reproductibility and dose-response linear relationship. Two ways were used to express the positivity of the assays:

1) The calculation of the percentage of initial radioactivity obtained in the animal blood, 18 hours after administration of the patient's serum; the assays whose percentage values were equal to or more than 150 were considered as positive;

2) The employment of Student's "t" test to the mean counting. In this case, the significance of the response was verified independently of the relative level of increments of radioactivity between 0 and 18 hours. In the former way of expressing the response, 30% of positivity for the presence of LATS was observed; in the latter, 40% of positivity was obtained. A total of 42 sera were assayed, from 40 thyrotoxic patients.

## REFERÊNCIAS

1. Adams, D.D.: The presence of an abnormal thyroid-stimulating hormone in the serum of some thyrotoxic patients, *J. Clin. Endocr.* 13: 669, 1958.
2. Adams, D.D.: A comparison of the rates at which thyrotrophin and the human abnormal thyroid stimulator disappear from the circulating blood of the rat, *Endocrinology* 66: 658, 1960.
3. Adams, D.D. & Kennedy, T.H.:

Association of long-acting thyroid stimulator with the gamma globulin fraction of serum, *Proc. Univ. Otago M. School* 40: 6, 1952.

4. Adams, D.D. & Purves, H.D.: A new method of assay for thyrotrophin hormone, *Endocrinology* 57: 17, 1955.
5. Adams, D.D. & Purves, H.D.: Abnormal responses in the assay of thyrotrophin, *Proc. Univers. Otago M. School* 34: 11, 1956.

6. Adams, D.D., Purves, H.D. & Sirett N.E.: The response of hypophysectomized mice to injections of human serum containing long-acting thyroid stimulator, *Endocrinology* 68: 154, 1961.
7. Bach, R. & Hirschhorn, K.: Gamma globulin production on human lymphocytes in vitro, *Exptl. Cell Res.* 32: 592, 1963.

(Continua)

## REFERÊNCIAS

8. Beall, G.N. & Solomon, D.H.: On the immunological nature of the long-acting thyroid stimulator, *J. Clin. Endocr.* 26: 1382, 1966.
9. Becker, D.V.: The effects of hypophysectomy on certain parameters of thyroid function in two patients with Graves' disease, *J. Clin. Endocr.* 19: 840, 1959.
10. Becker, D.V. & Furth, E.D.: *Total surgical hypophysectomy in nine patients with Graves' disease: evidence for the extra-pituitary maintenance of this disorder*, In: Current Topics in Thyroid Research, p. 596, Edited by Cassano, C. and Andreoli, M. New York Academic Press, Inc., 1965.
11. Berstein, L., Weatherall, M.: *Statistical for Medical and other biological students*, p. 86, 1952.
12. Berumen, F.O., Lobenz, I.L. & Utiger, R.D.: Neutralization of the long-acting thyroid stimulator (LATS) by thyroid subcellular fractions, *J. Lab. Clin. Med.* 70: 640, 1967.
13. Bowers, C., Lee, Y.K. & Schally, A.: Effect of actinomycin D on hormones that control the release of thyrotropin from the anterior pituitary glands of mice, *Endocrinology* 82: 303, 1968.
14. Burkhardt, G.: On the interaction of long-acting thyroid stimulator with thyroid stimulator following hypophysectomy for chromophobe adenoma, *J. Clin. Endocr.* 27: 1161, 1967.
15. Burke, G.: Hypertthyroidism and demonstration of circulating long-acting thyroid stimulator following hypophysectomy for chromophobe adenoma, *J. Clin. Endocr.* 27: 1161, 1967.
16. Burke, G.: Failure of immunologic reaction of long-acting thyroid stimulator (LATS) to thyroid components and demonstration of a plasma inhibitor of LATS, *J. Lab. Clin. Med.* 69: 713, 1967.
17. Carneiro, L., Dorrington, K.J. & Munro, D.S.: Recovery of the long-acting thyroid stimulator from serum of patients with thyrotoxicosis by concentration of immunoglobulin G, *Clin. Sci.* 31: 215, 1966.
18. Dobyns, B.M., Ruddi, A. & Liebe, D.: *The assay ophthalmos producing substance (EPS) and the long-acting thyroid stimulator (LATS) in whole and fractionated serum of patients with progressive exophthalmos*, In: Current Topics in Thyroid Research, p. 485, Edited by Cassano, C. and Andreoli, M. New York Academic Press, Inc., 1965.
19. Dorrington, K.J., Carneiro, L. & Munro, D.S.: *Chemical Studies on the long-acting thyroid stimulator*, In: Current Topics in Thyroid Research, p. 455 Edited by Cassano, C. and Andreoli, M. New York Academic Press, Inc., 1965.
20. Dorrington, K.J., Carneiro, L. & Munro, D.S.: Absorption of the long-acting thyroid stimulator by human thyroid microsomes, *J. Endocr.* 34: 133, 1966.
21. El Kabir, D.J., Benhamou-Glynn, N., Doniach, D. & Rolt I.M.: Absorption of thyroid-stimulating globulin from thyrotoxic sera by organ homogenates, *Nature* 210: 319, 1966.
22. Földes, J., Krasznai, I., Alfaláhi, S. & Piroscá, E.: Response of plasma LATS (long-acting thyroid stimulator) levels to L-triiodo tyronine, D-thyroxine and dexmethazone in Graves' disease, In: Current Topics in Thyroid Research, p. 617, Edited by Cassano, C. and Andreoli, M. New York Academic Press Inc., 1965.
23. Forbes, I.J. & Henderson, D.N.: Globulin synthesis by human peripheral lymphocytes. In vitro measurements using lymphocytes from normals and patients with disease, *Ann. Internal Med.* 65: 69, 1966.
24. Furth, E., Rathben, N. & Posillico, J.: A modified bioassay for the long-acting thyroid stimulator (LATS), *Endocrinology* 85: 592, 1969.
25. Kinderen, P.J. DER.: *EPS, Lats and exophthalmos, thyrotoxicosis*. Proc. of an Intern. Symposium Edinburg, 1967, E. & S. Livingstone Ltd. London, p. 221, 1967.
26. Kriss, J.P., Pleshakov, V. & Chien, J.R.: Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation do hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema, *J. Clin. Endocr.* 24: 1005, 1964.
27. Kumahara, Y., Iwatsubo, H., Miyai, K., Masui, H. & Fukuchi, M.: *Abnormal thyroid-stimulating substance in the pituitaries of patients with Graves' disease*, In: Current Topics in Thyroid Research, p. 603, Edited by Cassano, C. and Andreoli, M., New York Academic Press Inc., 1965.
28. Lamberg, B.A.: Thyroid function test, *Acta Endocr. (Kbh)*, Suppl. 124: 153, 1967.
29. Lamberg, B.A., Gordin, A., Viherkoski, M. & Kvist, G.: Long-acting thyroid stimulator (LATS) in toxic nodular goitre, toxic adenoma and Graves' disease, *Acta Endocr.* 62: 199, 1969.
30. Major, P.W. & Munro, D.S.: observations on the stimulation of thyroid function in mice by the injection of serum from normal subjects and from patients with thyroid disorders, *Clin. Sci.* 23: 463, 1962.
31. Mason, E.K., Hetzel, B.S., Good, B. F. & Stenhouse, N.S.: An improved bioassay for the determination of long-acting thyroid stimulator (LATS), *J. Clin. Endocr.* 27: 1529, 1967.
32. McGiven, A.R., Adams, D.D. & Purves, H.D.: A comparison of the heat stability of long-acting thyroid stimulator and human thyroid-stimulating hormone, *J. Endocr.* 32: 29, 1965.
33. McKenzie, J.M.: Delayed thyroid response to serum from thyrotoxic patients, *Endocrinology* 62: 865, 1958.
34. McKenzie, J.M.: The bioassay of thyrotropin in serum, *Endocrinology* 63: 372, 1958.
35. McKenzie, J.M.: Further evidence for a thyroid activator in hyperthyroidism, *J. Clin. Endocr.* 20: 380, 1960.
36. McKenzie, J.M.: Studies on the thyroid activator of hyperthyroidism, *J. Clin. Endocr.* 21: 635, 1961.
37. McKenzie, J.M.: The pituitary and Graves' disease, *Proc. Roy. Soc. Med.* 55: 539, 1962.
38. McKenzie, J.M.: Fractionation of plasma containing the long-acting thyroid stimulator, *J. Biol. Chem.* 237: 3571, 1962.
39. McKenzie, J.M.: Review. Pathogenesis of Graves' disease: role of the long-acting thyroid stimulator, *J. Clin. Endocr.* 25: 424, 1965.
40. McKenzie, J.M.: The long acting-thyroid stimulator: its role in Graves' disease, *Recent Progr. Hormone Res.* 23: 1, 1967.
41. McKenzie, J.M. & Fishman, J.: Effects of antiserum in bioassay of thyrotropin and thyroid activator of hyperthyroidism, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105: 126, 1960.
42. McKenzie, J.M. & Gordon, J.: *The origin of the long-acting thyroid stimulator*, In: Current Topics in Thyroid Research, p. 445, Edited by Cassano, C. and Andreoli, M. New York Academic Press, Inc., 1965.
43. McKenzie, J.M. & Haibach, H.: Increased total thyroxine with normal free thyroxine in anti-thyroid antiserum, *Endocrinology* 80: 1097, 1967.
44. McKenzie, J.M. & McCullagh, E.P.: Observations against a causal relationship between the long-acting thyroid stimulator and ophthalmopathy in Graves' disease, *J. Clin. Endocrinology* 28: 1177, 1968.
45. McKenzie, J.M. & Willanson, A.: Experience with the bio-assay of the long-acting thyroid stimulator, *J. Clin. Endocr.* 26: 518, 1966.
46. Meek, J.C., Jones, A. E. Lewis, U. J. & Vanderlaan, W.P.: Characterization of the long-acting thyroid stimulator of Graves' disease, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52: 342, 1964.
47. Miyai, K., Fukushi, M., Kumahara, Y. & Abe, H.: Long-acting thyroid stimulator (LATS) production by lymphocyte culture in patients with Graves' disease, *J. Clin. End. and Metab.* 27: 855, 1967.
48. Miyai, K. & Werner, S.C.: Concentration of long-acting thyroid stimulator (LATS) by subfractionation of  $\gamma$  G globulin from Graves' disease serum, *J. Clin. Endocr.* 26: 304, 1966.
49. Munro, D.S.: Observations on the discharge of radioiodine from the thyroid glands of mice injected with human sera, *J. Endocr.* 19: 64, 1959.
50. Noguchi, A., Kuribara, H. & Sato, S.: Clinical studies on the long-acting thyroid stimulator, *J. Clin. Endocr.* 24: 160, 1964.
51. Oudin, J.: Genetic regulation of immunoglobulin synthesis, *J. Cell Physiol.* 67, Suppl. 1: 77, 1966.
52. Pinchera, A., Liberti, P. & Badalamenti, G.: Long-acting thyroid stimulator and thyroid antibodies, *Lancet* 1: 347, 1966.
53. Pinchera, A., Pinchera, M.G. & Stanbury, J.B.: Thyrotropin and long-acting thyroid stimulator assays of thyroid disease, *J. Clin. Endocr.* 25: 189, 1965.
54. Shishiba, Y., Solomon, D. & David, H.: A modification of the McKenzie bioassay for LATS, *J. Clin. Endocr.* 29: 405, 1969.
55. Smith, B.R.: Interaction of the long-acting thyroid stimulator (LATS) with thyroid tissue in vitro, *J. Endocrinol.* 46: 45, 1970.
56. Werner, S.C., Becker, D.V. & Row, V.V.: Distribution of serum radioiodinated compounds in euthyroid and hyperthyroid patients following hypophysectomy, *J. Clin. Endocr.* 19: 957, 1959.
57. Werner, S.C., Tierney, J. & Tallberg, T.: Thyrotropin and "long-acting thyroid stimulator" effects from certain polypeptides, *J. Clin. Endocr.* 24: 339, 1964.