

ERRATA

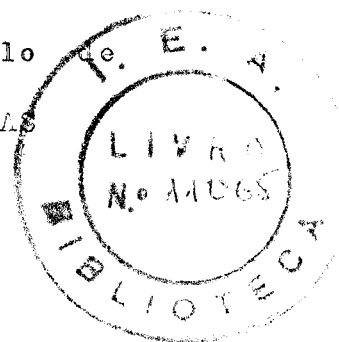
ANATOMIA E TOPOGRAFIA DA TIREOIDE DO SAPO
 (Bufo marinus ictericus) - ESTUDO AUTORRA
 DIOGRÁFICO E HISTOLÓGICO.

PAG.	LINHA	ONDE SE LÊ:	LEIA-SE:
2	2	método autorradiográfi- co...	processo autorradiográ- fico...
2	4	Antes de aplicá-lo...	Antes de descrevê-lo...
3	13	da existência do...	do conhecimento do...
4	15	método autorradiográfi- co...	processo autorradiográ- fico...
8	21	Física alcanço...	Física alcançou...
10	1	o inconveniente da...	o inconveniente da...
13	12	método autorradiográfi- co...	processo autorradiográ- fico...
20	4	4 tipos de energia de ra- dição...	4 tipos de radiação...
31	3	O isótopo traçador...	O isótopo indicador...
32	12	nos organismos vivos...	na maioria dos organis- mos vivos...
39	6	"KODAK BLUE X-RAY FILM"...	"KODAK BLUE BRAND X-RAY FILM"...
39	21	região do pescoço...	região cervical...
41	8	não somente aspectos mor- fológicos como fisiológi- cos da...	os aspectos morfológi- cos da...
41	10	Uma vês...	Uma vez...
51	8	da faringo,...	da faringe,...
51	21	como poder ser...	como podem ser...
52	3	GAUPP (1896)...	GAUPP (1904)...
54	14	técnica de empregação...	técnica de impregnação...
63	6	<u>Proc. Soc. Exptl. Biol.</u> <u>and Med. Proc.</u>	<u>Proc. Soc. Exptl. Biol.</u> <u>and Med.</u>
64	6	7 (1954) 14.	7 (1954) 44.
64	13	<u>Nature</u> , 1tt	<u>Nature</u> , 177

ORLANDO BEBELO DOS SANTOS

ANATOMIA E TOPOGRAFIA DA TIREOIDE DO
SAPO (Bufo marinus ictericus) - ESTU
DO AUTORRADIOGRÁFICO E HISTOLÓGICO.

Tese apresentada ao Insti
tuto de Biociências da U
niversidade de São Paulo-
Departamento de Fisiologia
Geral, sob a orientação do
Prof. Dr. RAULS SAWAYA, pa
ra obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIAS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA - INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA GERAL

1970

ORLANDO REBELO DOS SANTOS *

ANATOMIA E TOPOGRAFIA DA TIREOIDE DO
SAPO (Bufo marinus ictericus) - ESTU
DO AUTORRADIOGRÁFICO E HISTOLÓGICO.

ÍNDICE

	Pg
I - OBJETIVO	1
II - INTRODUÇÃO	3
III - MATERIAL E MÉTODO	30
IV - RESULTADOS.....	41
V - DISCUSSÃO	48
VI - RESUMO	57
VII - BIBLIOGRAFIA	60

* Bolsista do Instituto de Energia Atômica.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor RÔMULO RIBEIRO PIERONI, Chefe da Divisão de Radiobiologia e Diretor do Instituto de Energia Atômica, pelo inestimável auxílio e pela permissão em utilizar o equipamento e dependências da Divisão de Radiobiologia.

Ao Professor Doutor PAULO SAVAYA, Diretor do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, o meu agradecimento pela orientação recebida e sugestões apresentadas, bem como pela boa vontade demonstrada na correção do texto.

Às bibliotecárias MARIA FLORENCIA FONANI PEIXOTO e ODILIA PEPPER, pelo auxílio prestado no levantamento bibliográfico. Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e do Instituto de Energia Atômica pelo apoio, incentivo e colaboração.

Finalmente a todos aqueles que, direta ou in diretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

I - OBJETIVO

O presente trabalho tem por escôpo a utilização do processo autorradiográfico, com o intuito de evidenciar e localizar a região anatômica da glândula tireoide do sapo (Bufo marinus ictericus) pelo uso do isótopo ^{131}I e posterior preparação de lâminas histológicas.

Justifica êste trabalho o fato de, comumente, ser bastante difícil localizar anatômicamente as tireoides no sapo, o Anfíbio Anuro mais frequente e mais comumente utilizado entre nós, tanto nos laboratórios clínicos como nos experimentais.

Geralmente, quando se pretende estudar a fisiologia dêste órgão, nêstes animais, uma das dificuldades maiores vem a ser a localização da tireoide por entre os músco -

los e cartilagens da região cervical. .

O método autorradiográfico revelou-se de -
grande valia para essa localização.

Antes de aplicá-lo, julguei de interêsse -
apresentar um apanhado geral sôbre o histórico do mesmo.

II - INTRODUÇÃO

A - HISTÓRICO DA AUTORRADIOGRAFIA

ROGERS, ANDREW W.¹ cita ter sido a primeira autorradiografia obtida em 1867 por NIEPCE DE ST. VICTOR², o qual publicou um escurecimento produzido sobre emulsão de cloreto e iodeto de prata por nitrato e tartarato de urânio.

NIEPCE responsabilizou a ocorrência deste escurecimento ao sal de urânio, quando este ficava separado da emulsão por lâminas de vidro de diferentes cores. Ele interpretou seus resultados em termos de fluorescência. ROGERS, acha curioso, que o escurecimento de uma emulsão fotográfica por material radioativo tenha sido observado por este caminho tão longo, antes mesmo da existência do fenômeno radioativo.

BOYD, GEORGE A.³ e GUDE, WILLIAM D.⁴, relatam que a primeira publicação de um autorradiograma aplicado à biologia foi por E.S. LONDON em 1904, no IMPERIAL INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MEDICINE em St. PETERSBOURG.⁵⁻⁷ Neste trabalho de E.S. LONDON, duas rãs foram utilizadas na experiência, uma como controle e a outra foi exposta a emanações de rádio. Após a morte desta última, foi colocada sobre uma chapa fotográfica, dando um autorradiograma. Em outro experimento - realizado pelo mesmo pesquisador, uma porção da pele da rã foi removida e o animal inteiro foi colocado sobre uma chapa fotográfica. O autorradiograma mostrou menor escurecimento na área correspondente à pele removida, indicando uma deposição de "produtos filhos" da emanação, na pele ou sobre ela. Ao mesmo tempo, BOUCHARD, Ch., CURIE P. e colaboradores⁸ usaram o mesmo método autorradiográfico microscópico em um experimento similar, com o intuito de estudar a distribuição das emanações de rádio inaladas, em secções de tecido de cobaia. Nenhum detalhe de suas técnicas foi descrito, mas eles relataram a variação da concentração de atividade no rim, fígado, baço, - coração, cérebro, pulmão e glândulas adrenal.

Para BOYD e GUDE, os fatos que contribuíram para o inicial uso da autorradiografia, foram: Em primeiro lu

gar, a descoberta do Raio X, por WILHELM CONRAD, a 8 de Novembro de 1895, que ao observar um raio invisível, exceto ao passar através de um anteparo fluorescente, exhibia o poder de penetrar em materiais como roupas, madeiras e mesmo carne de não humana, entretanto os ossos, ficavam opacos e podiam ser vistos em suas posições anatômicas sob a pele. Em segundo lugar, os estudos de HENRI BECQUEREL⁹ em 1896, estudando a fluorescência de certos compostos, repetiu e estendeu as observações feitas por NIEPCE, de que raios similares poderiam ser produzidos naturalmente pelo urânio, pois êste ao ser exposto a luz solar impressionava as chapas fotogrâficas. BECQUEREL usou em seus experimentos cristais de sulfato de uranila. Em certa ocasião, BECQUEREL observou que o sol não brilhara por alguns dias e que os cristais de sulfato de uranila permaneceram fechados em uma gaveta juntamente com a chapa fotogrâfica. Esta chapa foi também encontrada escurecida. E em terceiro lugar, os experimentos de Madame MARIE CURIE e de outros investigadores, que em 1898, observaram ser muitos os elementos pesados exibidores dêste fenômeno e que os minerais de urânio não atuavam por fluorescência e sim pelo que ela denominou de "radioatividade".

Após êste início, quase acidental, as autor

radiografias de cristais de sal de urânio, permaneceram como observação curiosa por muitos anos.

REINGANUM¹⁰, em 1911, realizou o exame microscópico dos grãos de prata reduzida, produzidos pelas partículas alfa nas emulsões fotográficas.

KOTZAREFF¹¹, em 1922, relatou um autorradiograma mostrando a concentração de rádio na cortical de rim de uma cobaia. Os tecidos usados para o autorradiograma foram fixados em formalina.

Uma extensa série de trabalhos com radiações ionizantes foram iniciados a partir de 1922. Em 1924, LACASSAGNE e col.¹²⁻¹⁴ do RADIUM INSTITUTE DE PARIS, relataram seus estudos a respeito da distribuição do Polônio e outros elementos, em espécimes biológicos. Seu primeiro método foi o de embeber os tecidos e colocá-los em blocos de parafina, dos quais retirava secções, corando e comprimindo-as em chapas fotográficas. Os autorradiogramas foram comparados com as secções coradas, e o Polônio foi localizado nas microestruturas.

LACASSAGNE chamou os resultados de "autorradiografia" e "histoautorradiografia". Estes trabalhos de LACASSAGNE foram a primeira tentativa sistemática e bem sucedida para explorar o fenômeno observado por BECQUEREL, como meio de

observação, dos locais em que se situava a radiação em espécimes biológicos.

CHAMIE¹⁵ publicou em 1927, o primeiro de uma série de trabalhos, sobre o uso da emulsão fotográfica, relativos aos estudos de radiocoloides em soluções iônicas diluídas, abaixo do produto de solubilidade. Estes trabalhos, tem especial significado na pesquisa biológica, por ter ela encontrado soluções agregadas de radioatividade, as quais chamou de "radiocoloides". Visto que, em sistemas biológicos há coloides concentrados em certos tecidos e ao se fazer estudos da distribuição de soluções iônicas diluídas, poder-se-á incorrer em interpretações falsas. A autorradiografia pode mostrar os radiocoloides nos tecidos e através os trabalhos realizados por CHAMIE, nós poderemos interpretá-los sem incorrerem em erro.

Em 1930, LOMHOLT¹⁶, usou uma secção de tecido de 20 micras diretamente sobre uma chapa fotográfica, mais tarde removeu-a para corar. Observou que desta maneira, poder-se-ia usar para estudos histológicos a mesma secção que serviria para a confecção do autorradiograma. No mesmo ano, LEBLOND³ trabalhando no laboratório de LACASSAGNE, independente do trabalho de LOMHOLT, iniciou a montagem de secções, em placa de vidro, por aposição com a chapa fotográfica, para estudar a -

distribuição do Polônio.

O primeiro autorradiograma de radioatividade induzida, nos foi relatado em 1938, por GROVEN, GOVAERTS e colaboradores¹⁷, quando demonstraram que neutrons de Iridio irradiado escureciam uma chapa fotográfica. Eles também relataram um autorradiograma feito com Rádio-Fosforo.

BULLIARD, GRUNDLAND e colaboradores¹⁸, realizaram o primeiro autorradiograma biológico com radioatividade induzida, em 1938, quando demonstraram o ^{32}P em glândula adrenal. Em 1940, HAMILTON, SOLEY e EICHORN¹⁹ usaram o iodo radioativo para estudar a captação do iodo pela glândula tireoide, usando o processo autorradiográfico. O método usado neste experimento foi o de seções de tecido contendo o iodo radioativo, montadas sobre lâminas de vidro, mantendo-se estas lâminas por pressão sobre a emulsão da chapa fotográfica. Esses autores mostraram que o ^{131}I vai rapidamente para o tecido tireoideano, sendo incorporado ao coloide contido nos folículos. Casos de hipertireoidismo, câncer tireoideano e bócio não tóxico foram estudados por esses autores com a ajuda da autorradiografia.

O revolucionário avanço que a Física alcançou durante e após a Segunda Guerra Mundial; a Fissão Nuclear e

o advento da Bomba Atômica, tornaram o uso da autorradiografia vitalmente importante para o conhecimento da distribuição, em plantas e animais, dos produtos radioativos da Fissão Nuclear. Durante este período, novos isótopos radioativos tornaram-se úteis, abrindo novas possibilidades na investigação de sistemas biológicos.

Durante essa década, BELANGER, LEBLOND e seus colaboradores, em Montreal; EVANS, na Columbia University, em New York; ENDICOTT e YAGODA, em Bethesda, Maryland; e PELC, na Inglaterra, deram grandes contribuições para o aprimoramento das técnicas autorradiográficas.

Em 1943, LEBLOND e colaboradores²⁰, prepararam autorradiografias demonstrando a distribuição do iodo na glândula tireoide. Ao redor de 1946, BELANGER e LEBLOND²¹ desenvolveram uma técnica com emulsão líquida, que apresentou considerável resolução. A técnica consistia em fundir a emulsão fotográfica e depositá-la sobre as seções de tecido através de um fino pincel.

Em 1947, EVANS²², fez experiências com o processo de montagem de seções histológicas diretamente sobre o filme fotográfico, capacitando-o desta forma, ao uso de coloração de rotina, para corar autorradiogramas satisfatoriamente,

sem apresentar o inconveniente da pouca penetração do corante - através da emulsão. Técnica similar foi aplicada por ENDICOTT e YAGODA²³ em 1947, para tecidos marcados com Polônio, utilizando o método para emissores alfa.

PELC²⁴ no mesmo ano, imaginou uma técnica - inteiramente nova para remover a emulsão fotográfica do suporte de vidro e cobrir a secção histológica, previamente marcada, sobre uma lâmina de vidro, na forma convencional, com a emulsão. Através o uso de uma camada delgada (10 micras) de emulsão, a resolução dos grãos de prata ativados no autorradiograma, foi marcadamente aperfeiçoada. Este método é no momento reconhecido como a técnica padrão do "stripping film".

Do trabalho de alguns pesquisadores sobre a Física e Química das emulsões, técnicas de manipulação destes novos meios e interpretações e análises dos caminhos das partículas observadas, tornou disponível uma riqueza de novas informações. Algumas partículas fundamentais, foram inicialmente - descritas, baseando-se em seus caminhos nas emulsões nucleares.

Contribuições para o desenvolvimento das emulsões nucleares foram dadas por HERZ, STEVENS e BERBILIAN, da KODAK Ltd., WALLER, da ILFORD Ltd., SPENCE e WEBB, da EASTMAN KODAK Co.³ As técnicas de manipulação destes novos meios, bem

como as interpretações e análises dos caminhos das partículas foram dadas por C.F. POWELL^{25,26}

Em 1954, ARNOLD²⁷ estudando a retenção dos isótopos de longa vida no corpo, adotou a técnica da emulsão líquida de BELANGER e LEBLOND²¹, tendo-a usado com emulsões nucleares.

No ano seguinte (1955), JOFTES e WARREN²⁸, descreveram a técnica de lâminas mergulhadas em emulsão nuclear fundida, técnica que tem sido amplamente usada, e que é a base do método de emulsão líquida nos presentes dias.

Durante a mesma década, um grupo paralelo de técnicas foram aparecendo. Alguns autores^{29,30}, tentaram aperfeiçoar o contáto entre emulsão e espécime, por descolamento da emulsão de seus suportes de vidro e aplicação direta no espécime.

Tal como ocorreu com a emulsão líquida, uma nova técnica empregando uma emulsão nuclear, logo fez sua aparição. Baseada na sugestão de S.R. FELC, a KODAK Ltd., iniciou a manufatura de autorradiografias especiais através o método de descolamento de filme "stripping film".^{31,32}

Após a publicação dêstes dois artigos referentes a técnica do "stripping film", houve um grande avanço -

na resolução e na reprodutibilidade de algumas técnicas que haviam sido experimentadas em outros tempos. Tanto a técnica da emulsão líquida, como a do "stripping film", produz camadas de emulsão de poucas micras de espessura sobre a superfície do espécime. Neste tipo de preparação, partículas carregadas, próximas ao espécime, somente tocam um ou dois grãos de prata para mostrar sua passagem.

Das técnicas físicas aplicadas ao registro do traçado das partículas, poucas entretanto, mostram possibilidades autorradiográficas para aplicação direta em biologia. Esta aproximação é direta e simples nos casos de partículas - alfa, pois estas deixam um traço muito característico, sendo de fácil registro e reconhecimento. Já para partículas beta, o método de traçado não é tão acessível, mas agradecimentos são feitos aos trabalhos pioneiros dos Físicos HILDELEVI³³⁻³⁵ e LEVINTHAL, C.³⁶, por terem desenvolvido uma técnica de grande precisão quantitativa para autorradiografias de traço beta.

A última década tem presenciado uma rápida transformação na biologia celular, devido ao desenvolvimento do microscópio eletrônico. Era inevitável que tentativas fossem feitas, baseadas na união das técnicas autorradiográficas, para uso deste novo método de observação para material biológico.

A primeira e pouco provável autorradiografia, vista no M.E. foi publicada em 1956 por LIQUIER-MILWARD.³⁷ Desde aquela data, novas técnicas foram propostas e novas emulsões nucleares foram produzidas com o intuito de se encontrarem os requisitos aproximados destas, para uso em resoluções extremamente altas. É atualmente possível resolver o local de incorporação de material radioativo, dentro de 500 a 700 Å em circunstâncias favoráveis e desde então, aperfeiçoamentos estão sendo realizados.

B - DEFINIÇÕES

Os termos RADIOAUTOGRAFIA e AUTORRADIOGRAFIA referem-se ao método pelo qual, usando-se uma emulsão fotográfica, permite determinar a natureza, a localização, a energia e a quantidade de um material radioativo num espécime, tanto que, ela pode ser visualizada. O produto da técnica é referido como "AUTORRADIOGRAMA".

De acôrdo com a descrição de BOYD³, " A au -
torradiografia é um instrumento científico para detecção de par -
tículas ionizantes, e é análogo ao contador Geiger-Müller, com
a exceção de que, a passagem de uma partícula ionizante é medi -
da por grãos de prata, mais rápido que o estalido de uma lâmpa -
da fotográfica para instantâneos".

Nos primórdios do uso da autorradiografia, -
esta era usada sômente para eventos qualitativos. Mais tarde, -
com o desenvolvimento dos processos autorradiográficos e com o
advento da eletrônica, foi possível a detecção e medida de uma
radiação e a contagem da mesma - eventos quantitativos.

EMULSÃO FOTOGRAFICA, é uma película ou pla -
ca foto-sensível, formada por uma fina camada de gelatina con -
tendo um grande número de cristais de haleto de prata. A luz i -
nicia um processo na emulsão, a qual liberta eletrons que levam
a uma redução dos cristais de haletos de prata, em prata metáli -
ca; a qual por seu turno atua como um catalizador para a poste -
rior redução dos cristais de haleto de prata em suas imediatas
vizinhanças, durante o processo de desenvolvimento. A radiação
ionizante "interage" com a emulsão para fornecer eletrons (quer
primária ou secundariamente) diretamente, produzindo o mesmo e -
feito final.

EMULSÃO NUCLEAR, é uma emulsão fotográfica - preparada especialmente para a detecção das partículas nucleares.

PELICULA PROTETORA, é uma camada fina de plástico, mais de uma micra, que se interpõe entre o espécime e a emulsão para evitar reações físicas ou químicas.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO, é o tempo durante o qual se produz a imagem autorradiográfica.

REVELAÇÃO, é o processo fotográfico de redução que torna visível a imagem latente.

FIXAÇÃO, é a remoção dos cristais não reduzidos na emulsão.

DEFEITOS, são as imagens que aparecem na autorradiografia e que não procedem da radioatividade do espécime.

RESOLUÇÃO, é a distância mínima na qual as imagens de dois pontos podem separar-se. Desde que, a radiação emitida seja proveniente de uma fonte pontual, quanto maior for a distância entre a fonte de radiação e a emulsão, mais difusa será a imagem produzida no filme.

C - NOÇÕES FUNDAMENTAIS

O FILME usado em autorradiografia é feito baseado em 3 principais componentes:

O AGENTE SENSÍVEL, usualmente cristais de haletos de prata, espalhados através um meio gelatinoso para formar a emulsão (gelatina mais cristais de Brometo de Prata). Esta emulsão é suportada por uma fôlha de acetato de celulose ou vidro.

O TAMANHO e CONCENTRAÇÃO dos grãos de haletos de prata, que governam tanto a sensibilidade como a resolução da emulsão. O TAMANHO do grão está diretamente relacionado com a sensibilidade da emulsão e a CONCENTRAÇÃO do grão, está diretamente relacionado com o grau de resolução possível. Infelizmente, o aumento da sensibilidade da emulsão às radiações ionizantes, necessariamente, aumentam a sensibilidade para a radiação de fundo.

a) Espessura da emulsão:

1 - Delgadas: camada simples de cristais;

2 - Médias : 10 - 20 micras (comuns);

3 - Espessas: 600 micras (não usadas em autorradiografias).

b) Gelatina: Contém os cristais de AgBr. Ao absorver-
água incha-se, aumentando seu volume vá-
rias vezes. Ao secar, contrai, voltando-
a sua posição inicial.

c) Cristais: AgBr com pequena quantidade de AgI.

d) Tipos de emulsões:

1 - Ópticas: Usadas em fotografia comum. Pode-se -
usar para demonstrações e captação;

2 - Raios X: (emulsão dos dois lados, geralmente):

Usuais: Cristais de 2-8 micras com 15%
de haletos de prata;

Ultrassensíveis ("No-screen X-ray -
film"): Cristais de 0,5-3 micras.

3 - Nucleares:

- 40-45% de haleto de Prata;

- Cristais: 0,1-0,4 micras ($10^3/\text{cm}^3$);

- Da Kodak:

NTA - para alfa (espessura 10, 25, 100
micras);

NTB - pouco sensível à raios cósmi-
cos. Para partículas de alta
velocidade;

NTB₂- para qualquer partícula (espessura 10, 25 e 100 micras);

NTB₃- para qualquer partícula; muito sensível ao "Background".

Usa-se antes de 3 semanas. Espessura 25 a 100 micras.

4 - Autorradiográficas: (Placas, "stripping film"): emulsão que se desprende, e emulsão líquida.

a) Placas: Os tipos comuns são: NTA, NTB, NTB₂ e NTB₃ (para alfa e beta);

b) "Stripping film" de base permeável, tipos:

1 - Da "Eastman Kodak" - (N.Y.): NTA, NTB, NTB₂ e NTB₃;

2 - Da "Kodak Ltd" (England): Os mesmos, mais AR.10 (grão fino) e AR.50 (veloz);

c) "Stripping film" de base impermeável

vel: Tipo NTB, para beta, vem com película protetora.

d) Placas autorradiográficas (porta-objetos 3x1"):

Tipo A: grão fino, não muito sensível;

Tipo "No-screen": mais sensível.

D - FATORES QUE AFETAM A RESOLUÇÃO

- a) Espessura da emulsão;
- b) Espessura do espécime;
- c) A distância entre ambos;
- d) O alcance da radiação.

E - PROPRIEDADES DA RADIAÇÃO

1 - Características radioisotópicas.

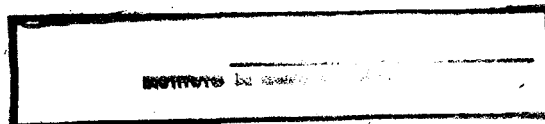
Na dependência do isótopo radioativo, êle pode sofrer desintegração pela emissão de 4 tipos de energia de radiação: raios alfa, beta, gama e raios X.

As partículas alfa produzem ionizações tão intensas ao longo de seus curtos caminhos através a emulsão, que são distinguidos facilmente (boa resolução), porém os isótopos com emissões alfa são de interesse biológico, mais por sua toxicidade do que por sua utilidade como rádio traçadores.

As partículas beta, com sua ionização específica mais baixa, penetram mais por caminhos muito irregulares através a emulsão e dão origem a imagens um pouco mais difusas. Visto que, a densidade do íon ao longo da trajetória da partícula é inversamente proporcional a energia cinética da partícula beta, segue que emissores beta de baixa energia dão origem à autorradiografias de alta resolução.

As partículas gama são raramente usadas em estudos autorradiográficos por causa de sua ionização específica ser extremamente baixa.

Os raios X de baixa energia, dão boa



resolução.

Em sistemas biológicos a energia beta é a mais importante, porque possui pouco poder de penetração e gasta sua energia muito próxima à fonte - alto poder de ionização.

O princípio básico da autorradiografia é a combinação dos fundamentos da Física Nuclear e fotográficos.

2 - Determinação do tempo de exposição³³.

É francamente reconhecido ser muito empírica a determinação do tempo de exposição em autorradiografia. Sugere-se entretanto que para cada experiência, seja preparada uma série de amostras em duplicata para expô-las em vários intervalos de tempo. Pela manutenção cuidadosa dos registros - das amostras características e o tempo de exposição, o pesquisador terá no futuro à custa destas experiências acumuladas, possibilidades para determinar com precisão, o tempo de exposição.

Tem sido estimado que com 10^6 - 10^8 partículas beta, muitas chocam-se em cada cm^2 do filme de RX produzindo um escurecimento ótimo.

Escurecimento detectável pode ocorrer -

rer como resultado de 10^5-10^6 beta interações por cm^2 . Desta forma, uma estimativa grosseira de tempo de exposição pode ser feita, medindo a atividade da amostra por cm^2 com um atenuador (detector G.M. com janela fechada). Presunindo-se que a média de contagens registradas em um detector é aproximadamente equivalente a média de interações de partículas com a emulsão, o espaço de tempo requerido para acumular o supramencionado número de interações de partículas beta, poderá ser imperfeitamente estimado.

Nos dias de hoje tem-se que: " para maior tempo de exposição, menor resolução (em geral)", devido provavelmente ao aumento do número de partículas beta de maior alcance.¹⁰

3 - Tempo de revelação.

O tamanho dos grãos aumenta, ao prolongar-se o tempo de revelação. De 3 a 12 minutos, tem-se uma resolução de 100 a 50%.

4 - Tamanho do grão da emulsão (tamanho dos cristais):

- a) filme tipo K: grão = 10 micras, a resolução é pobre;

- b) filme para raios X: grão 0,5 a 3 micras, a resolução é média;
- c) NTB ("Nuclear Track Beta"): grãos de 0,1 a 0,4 micras, boa resolução para autorradiografia celular.

5 - Efeito da imagen residual.

"Névoa": uniforme granulação na emulsão. Afeta a nitidez das imagens. Não foi bem estudada, é devida provavelmente ao calor, idade da emulsão, etc.

F - MÉTODOS ESPECÍFICOS PARA AUTORRADIOGRAFIA.

Empregamos dois métodos básicos em autorradiografia:

1 - Método do contáto temporário.

Envolve o contáto entre a emulsão e a amostra, sômente durante o tempo de exposição. Este método é mais aplicado a amostras espessas.

2 - Método do contáto permanente.

Envolve o contáto permanente entre a emulsão e a amostra e é usado exclusivamente com secções de tecido delgado.

MÉTODO DO CONTÁTO TEMPORÁRIO

É a técnica da simples aposição. A amostra é colocada em contáto com a emulsão mediante pressão. Depois da exposição, a amostra é renovada e o filme é revelado. Este método é o mais apropriado para o uso com cromatogramas de materiais marcados, fôlhas e todos os tecidos vegetais, secções de ossos compactos e secções de tecidos que tenham contornos bem definidos (para permitir subsequente superposição). Este método apresenta a vantagem de ser rápido e permitir coloração do tecido, não afetando o filme. Apresenta como desvantagens, uma resolução pobre, não sendo recomendado para estudos de localização celular e também a pressão requerida, poderá resultar em artefatos no filme.

MÉTODO DO CONTÁTO PERMANENTE

Para melhor resolução e para evitar problema

de realinhamento, a secção de tecido pode ser montada permanentemente em contáto com a emulsão. Após a exposição e revelação do filme, a secção pode ser corada e examinada simultâneamente com a autorradiografia, ou pode ser examinada dirètamente através do microscópio de contraste de fase. Três modificações deste método são usadas comumente:

a) Montagem por flotação.

As secções são montadas sôbre a emulsão, permanecendo aderidas a ela durante o processo fotográfico e de coloração. Esta é uma técnica relativamente simples, utilizável ao nível celular, boa resolução (5-7 micras), correta superposição de imagens: histológica e fotogrífica.

As desvantagens deste método são referentes as possibilidades de perdas por lavagen, coloração da gelatina e efeitos quínicos, aparecendo na revelação manchas não uniformes.

b) Uso de emulsão líquida.

A secção de tecido é coberta com uma camada de emulsão líquida e deixada a endurecer, formando assim uma preparação permanente.

As vantagens são similares às do método -

anterior. As desvantagens são decorrentes do aumento da imagem de fundo, é difícil conseguir espessura uniforme e na secagem da emulsão ocorre turvação desta na amostra.

c) Método do "stripping film" (emulsão que se desprende).

A emulsão se descola de sua base e é aplicada sobre a secção montada em um porta-objeto, por meio de flutuação.

Este método apresenta as vantagens de ser rápido, emulsão de espessura uniforme, bom contáto, preparação uniforme, resolução excelente, nível celular, coloração antes ou após o processo fotográfico e reprodutibilidade em determinações quantitativas.

As desvantagens deste método são relativamente pequenas, sendo a baixa sensibilidade do filme uma delas.

d) Método da "alta-resolução".

As mais recentes técnicas permitem a aplicação de uma camada única de cristais de haletos de prata em uma secção de tecido ultrafino embebido em metacrilato. Seguindo o desenvolvimento da emulsão, a secção do tecido é cora

do com acetato de uranila e examinada por meio de um microscópio eletrônico. Resolução da ordem de 0,1 micra são obtidas, as quais são obviamente mais convenientes para estudos de localização intracelular. Algumas variações deste método tem sido chamada de autorradiografia molecular.

G - CAUSAS DE ERRO (ARTIFÍCIOS TÉCNICOS).

- a) Perda de radioatividade por lavagem;
- b) Relocalização da radioatividade;
- c) Deslocamento de estruturas tissulares;
- d) Espessura irregular da amostra;
- e) "Envoamento" devido ao calor, luz vermelha, idade da emulsão, etc.
- f) Impressões digitais;
- g) Unidade na emulsão (montagem por flotação): a água aumenta a velocidade de desaparecimento da imagem latente;
- h) Marcas de pressão e riscos na emulsão;
- i) Contração da emulsão nos bordos, falsas - imagens, distorções;
- j) Efeitos químicos: substâncias químicas atacam a emulsão;

- k) Difusão de átomos e moléculas. Demonstrou-se a difusão de Th e Po a distâncias superiores a 100 micras;
- l) Fotoluminescência: A amostra pode conter substâncias com esta propriedade (polihidrocarburetos);
- m) Radiação "Cerenkov": É possível, ainda - que provavelmente insignificante (beta de grande velocidade atravessando a emulsão);
- n) Radiação estranha à amostra: Máquinas de Raios X, fontes gama, radioisótopos, vários autorradiogramas na mesma caixa;
- o) Deslocamento da imagem: Autorradiogramas de contáto permanente, o procedimento fotográfico tende a deslocar a imagem;
- p) Defeitos no processamento: Temperatura, agitação imperfeita, impurezas na água de lavagem, etc;
- q) Perda de prata na coloração: os grãos de prata são renovados pelos corantes de Heilely, Hematoxilina e outros;
- r) Manipulação defeituosa das emulsões produ

em tôda a sorte de imagens estranhas;

s) Precipitação radioativa: Imagens produzidas pelo pó radioativo das explosões nucleares;

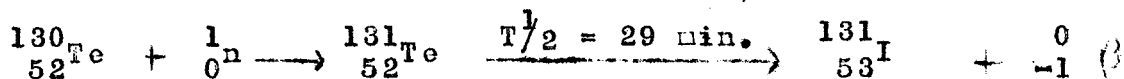
III - MATERIAL E MÉTODO

Autorradiografias de glândula tireoide podem ser obtidas pelos vários métodos referidos e descritos na introdução (F), dependendo do objetivo a que o pesquisador se propoem. O método autorradiográfico adotado nêste trabalho foi o do contáto temporário, utilizando-se a técnica da simples a-
posição. Este método é indicado para os casos em que se deseja comparar a amostra com o escurecimento produzido na autorradio-
grafia, propiciando desta maneira a visualização da região em que se encontra a radioatividade captada pela amostra.

Para a realização dêste experimento fo-
ram utilizados sapos da espécie Bufo marinus ictericus, adultos, não se tendo levado em conta, o pêsso e o sexo dos animais, vis-
to que, o objetivo do presente trabalho era o de aplicar o mé-
todo autorradiográfico como técnica auxiliar para evidenciar e

localizar a região anatômica em que se encontra a glândula tireoide do sapo.

O isótopo traçador utilizado para marcar a glândula tireoide foi o ^{131}I , que é obtido a partir do:



A utilização deste isótopo no experimento prende-se ao fato de ser o mais usado em autorradiogramas de tireoide e por apresentar as vantagens dos raios beta, os quais possuem uma máxima penetração no tecido ao redor de 2mm, que é o ideal para o objetivo da autorradiografia, dando também raios gama que facilitam o processo de contagem.

A meia vida de 8 dias do ^{131}I é igualmente vantajosa, visto que, ela permite o manuseio do tecido e preparação de autorradiograma, sem perda significativa de radioatividade. As partículas beta, com suficiente energia, produzem área de escurecimento de uma emulsão fotográfica a considerável distância do seu ponto de origem.

Os raios saem verticalmente do lugar em que se encontra o isótopo na amostra e incidem sobre a emulsão, resultando na redução dos grãos de haletos de prata contidos na emulsão, no mesmo plano, efetuando então uma correlação exata



com o lugar da radioatividade do tecido. As partículas beta que irradiam em direção lateral de sua superfície podem agir sobre as células adjacentes que não estavam marcadas e produzir o escurecimento da emulsão, isto é um artefato referido como "scattering" (espalhamento).

FORMA E CONCENTRAÇÃO DO ISÓTOPO NO TECIDO

A glândula tireoide pode ser definida de uma maneira razoavelmente simples, como sendo um tecido capaz de acumular Iodo e combiná-lo com compostos orgânicos, formando a Tireoxina.

O hormônio tireoidiano e seus precursores são virtualmente os únicos compostos iodados nos organismos vivos, portanto, a distribuição de radioiodo pode ser interpretada como a distribuição destes compostos. Assim sendo, uma simples marcação, permite avaliar a função tireoidiana.³⁹

Nêstes últimos anos apareceram pesquisadores estudando a tireoide através o Iodo radioativo, visto que, o iodo é rapidamente ligado à proteína da tireoide, que usualmente existe na forma insolúvel, permitindo o processamento nor

nal do tecido, com insignificante perda de radioatividade, que é o mais importante na preparação de autorradiogramas.

Em cada animal foi injetado por via intraperitoneal, 60 uCi de ^{131}I , na forma de iodeto de sódio.

Decorridas 4 horas da injeção do ^{131}I , os animais foram sacrificados com éter sulfúrico e fixados em placas de cortiça, expondo sua porção ventral para cima. Após a abertura e dissecação desta porção, retirou-se a região compreendida entre a inserção cartilaginosa do osso hioide (superiormente) e o arco aórtico (inferiormente), conforme demonstra a figura nº 1.

As peças retiradas foram lavadas em água corrente, por 30 minutos, com a finalidade de remover o sangue contaminado pelo radioisótopo, o qual provocaria artifícios técnicos (manchas) na autorradiografia. Em seguida, as peças foram comprimidas entre 2 lâminas de vidro e levadas à estufa (50°) até completa secagem. Esta secagem foi realizada com o intuito de se evitar a diluição da emulsão fotográfica, pela água contida na peça, bem como, para evitar manchas sobre a autorradiografia.

Terminada a fase de secagem que durou entre 24 e 48 horas, as peças foram levadas a um aparelho do tipo

"TOBOR LARGE SAMPLE COUNTER" modelo 4350 e 4351 da Nuclear Chicago (detector de cintilação com cristal de iodeto de sódio), para a efetuação das contagens da atividade por minuto (cpm), informação que será utilizada posteriormente no cálculo do tempo de exposição. O aparelho quando utilizado para as contagens deste experimento apresentava as seguintes características: detector inferior: 0,7 cm e detector superior: 8,5 cm da fonte.

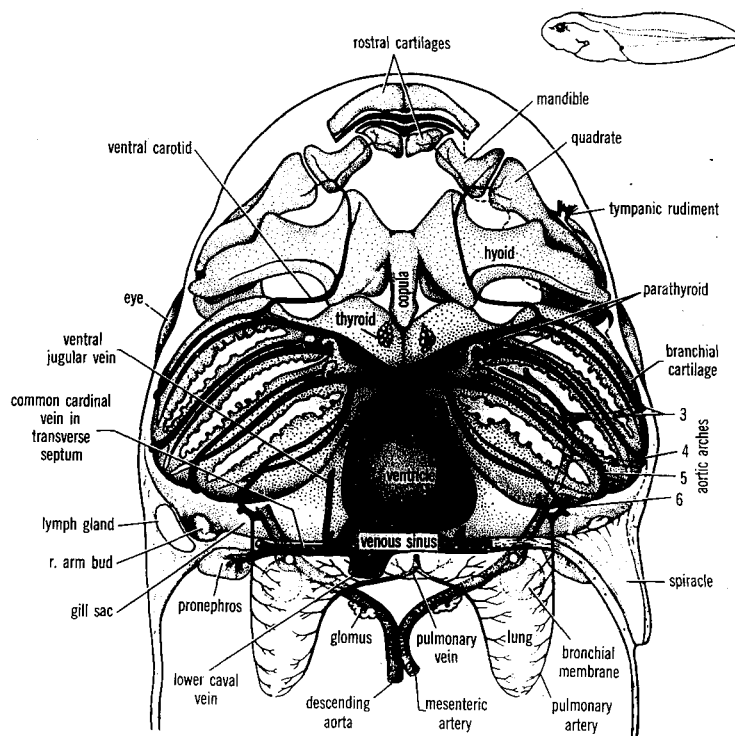


Fig.1: Vista da região ventral (esquemática) da Rana castesbeiana, mostrando a localização da gl. tireoide nesse animal. Modelo que serviu de orientação na dissecação do sapo Bufo marinus ictericus.

Para o cálculo do tempo de exposição utilizamos a curva característica do filme "KODAK BLUE BRAND X-RAY FILM" que foi calculada na Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica - São Paulo, que relaciona densidade radiográfica e logaritmo de exposição relativa.

Esta curva característica do filme apresenta 3 regiões distintas:

AB : região de sub-exposição;

BC : região retilínea ou de exposição normal;

CD : região de super-exposição.

Para se calcular o tempo de exposição, a região utilizada da curva é a BC, isto é, a região retilínea ou de exposição normal.

Na aplicação da curva característica do filme, a fórmula que nos dá o tempo de exposição é: $E = I \cdot T$, onde E é o logaritmo de exposição relativa; I é a atividade em μCi da peça que será exposta e T é o tempo de exposição que a peça deverá permanecer exposta. (Fig. 2)

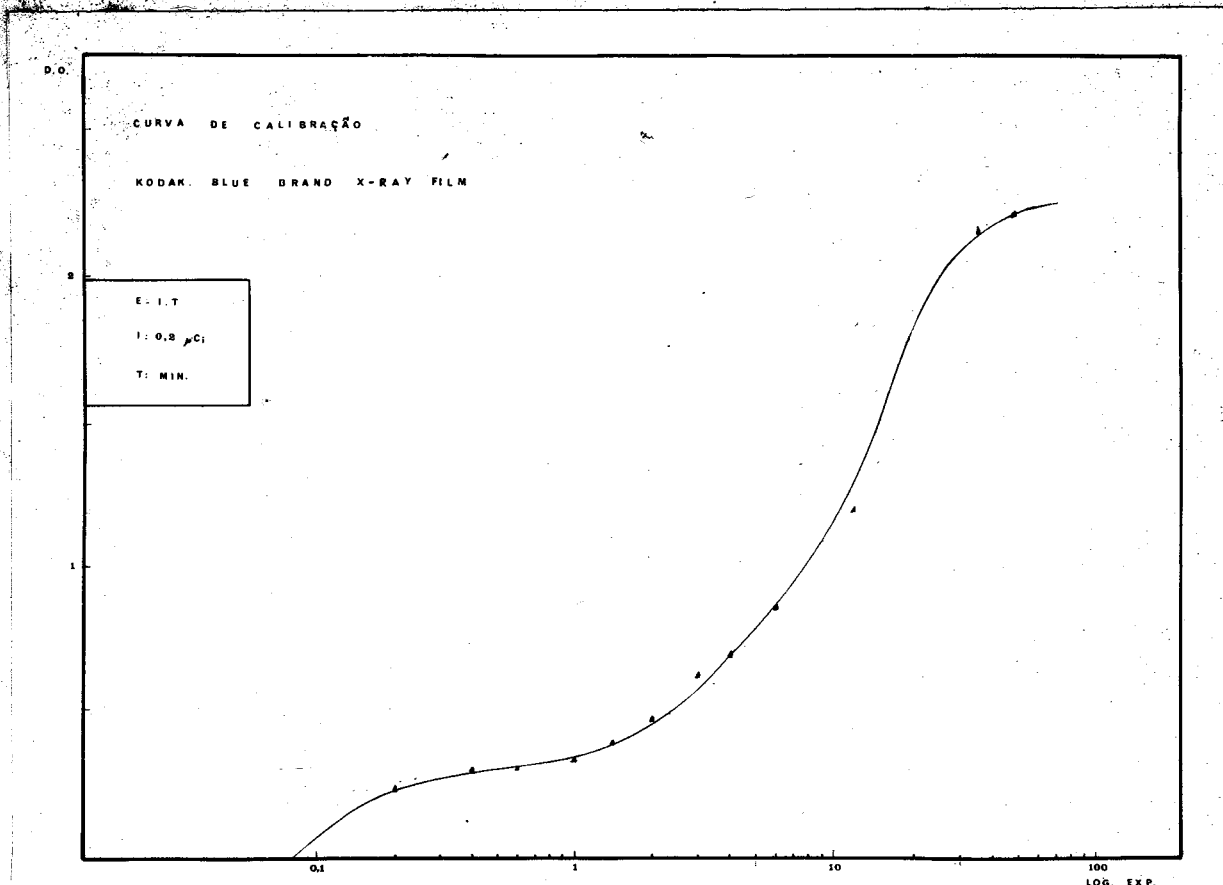


Fig.2: Curva característica do filme "KODAK BLUE BRAND X-RAY FILM" calculada na Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica - São Paulo.

O cálculo do tempo de exposição é executado da seguinte forma:

- a) Média das contagens efetuadas no "TORBOR";
- b) Subtração do "background" (contagem de radiação de fundo) à média das contagens;

- c) Para o cálculo da atividade em uCi da peça a ser exposta, foi por nós contado no "TOBOR", o número de desintegrações por minuto do padrão (0,35 uCi), mantendo-se a geometria dos detectores. Tendo-se obtido 150.000 cpm (contagens por minuto) para o padrão;
- d) Tendo-se o número de contagens por minuto do padrão, poder-se-á relacioná-lo com o número de contagens por minuto da peça, tendo-se como resultado a atividade contida na mesma;
- e) Aplica-se então, a fórmula $E = I.T$, que fornecerá o tempo de exposição;

CÁLCULO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO PARA AS PEÇAS DO EXPERIMENTO

Peça número 1:

Média das contagens: 90432 cpm.

Média do "Background" : 1390 cpm.

Média das contagens - Média do Bg : 39 042 cpm.

Padrão (0,35 uCi) : 150 000 cpm.

Então, temos:

0,35 uCi 150 000 cpm

x 39 042 cpm

$$x = 0,20 \text{ uCi}$$

Aplicando-se a fórmula da curva característica do filme, temos:

$$E = I.T$$

E = 10 (corresponde ao ponto médio da região BC, isto é, da região retilínea ou de exposição normal);

$$I = 0,20 \text{ uCi}$$

$$T = (\text{tempo de exposição})$$

Substituindo na fórmula, temos:

$$10 = 0,20 \cdot T$$

$$T = 50 \text{ minutos}$$

Portanto, o tempo de exposição que a peça número 1 deverá permanecer, será de 50 minutos.

Utilizando-se o mesmo raciocínio para os dados obtidos para as peças número 2, 3 e 4, obtivemos:

Para a peça número 2 : T = 1h e 11 minutos;

Para a peça número 3 : T = 4hs e 46 minutos;

4 : T = 7hs e 21 minutos.

De posse destes informes, as peças foram levadas a uma câmara escura, sendo postas no interior do porta-filmes "X-RAY CASSETTE", em contáto com o filme de RX médico, - com emulsão dupla, "KODAK BLUE X-RAY FILM", ambos da Kodak Ltd.

Terminado o tempo de exposição, o filme - foi revelado, fixado e lavado pelo processo usual em fotografia.

O tempo por nós utilizado para a revelação foi de 3 minutos e para a fixação de 10 minutos. Quanto ao tempo de lavagem, êste deve ser o maior possível, em água corrente.

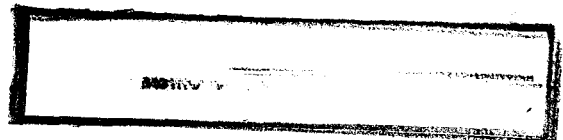
Nêste experimento o tempo de lavagem por nós adotado foi de 30 minutos. Após a lavagem as autorradiografias permaneceram na câmara escura para a secagem.

A localização da tireoide foi feita pela superposição da peça sôbre a autorradiografia.

Baseando-nos na localização da tireoide - demonstrada pela autorradiografia, tomamos alguns sapos adultos da mesma espécie, não irradiados, sacrificamos com éter sulfúrico, abrimos e dissecamos a região do pescoço, na qual havíamos localizado as glândulas tireoides, da mesma maneira que fizera-

nos com os irradiados.

As peças retiradas foram fixadas em formol e processadas através a técnica histológica usual, sendo coradas pelo método da Hematoxilina e Eosina. Após a secagem das lâminas histológicas, estas foram levadas ao microscópio e fotografadas (figs. 7-13).



IV - RESULTADOS

Os resultados obtidos indicam a aplicabilidade da técnica da autorradiografia na detecção das glândulas tireoides do Sapo (Bufo marinus ictericus) com vantagem sobre a indicada por K. G. WINGSTRAND (1964) com o emprêgo de Nitrato de Prata.

Graças à autorradiografia foi possível verificar, não somente aspectos morfológicos como fisiológicos da tireoide de Sapo. As figuras 3-6 indicam os autorradiogramas obtidos.

Uma vês localizadas as glândulas, foi possível fazer o estudo histológico. A estrutura do órgão é vista nas figuras 7-13.

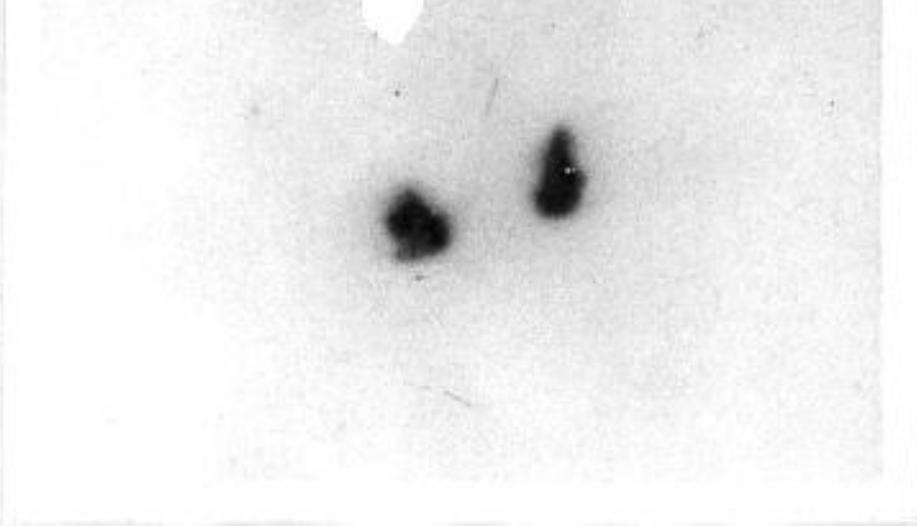


Fig.3: Autorradiograma da peça nº 1, mostrando a captação de ^{131}I pela glândula tireoide. Tempo de exposição 50 minutos. Ampliação 4 vezes.

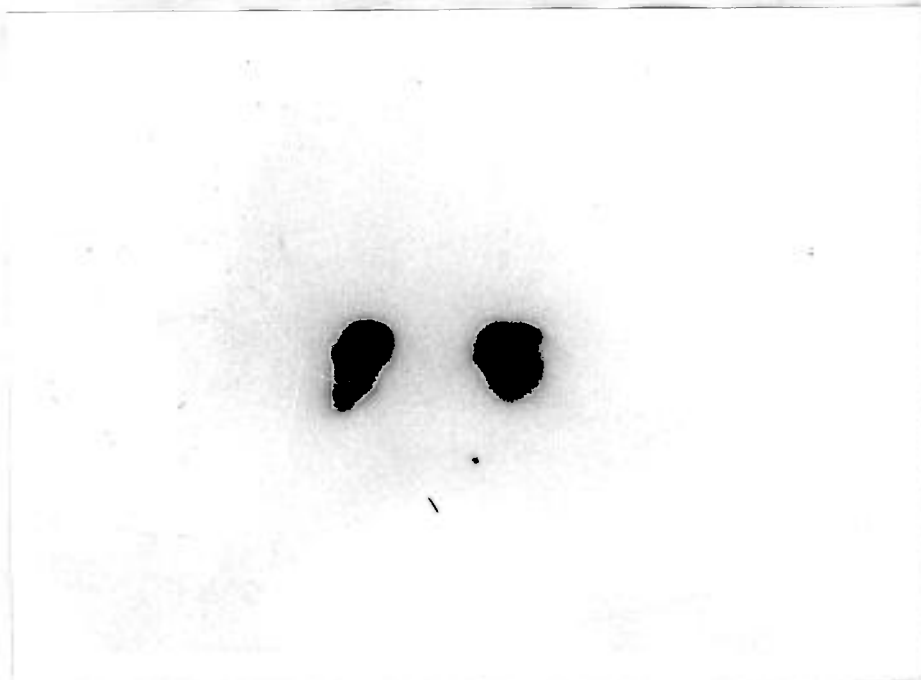


Fig.4: Autorradiograma da peça nº 2, mostrando a captação de ^{131}I pela glândula tireoide. Tempo de exposição 1h e 11 minutos. Ampliação 4 vezes.

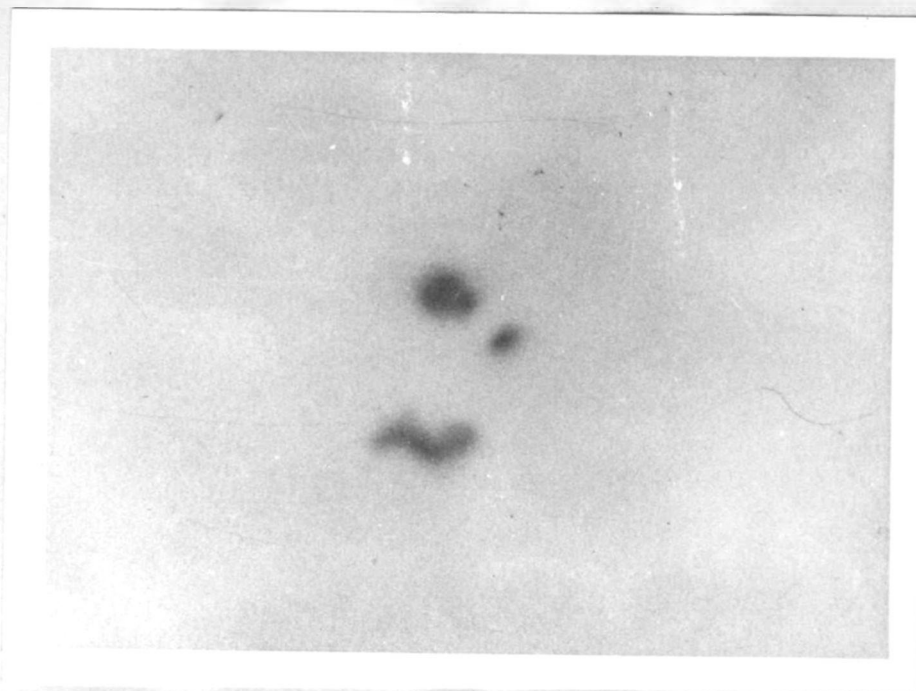


Fig.5: Autorradiograma da peça nº 3, mostrando a captação do ^{131}I pela glândula tireoide. Tempo de exposição 4hs e 40 minutos. Ampliação 4 vezes.

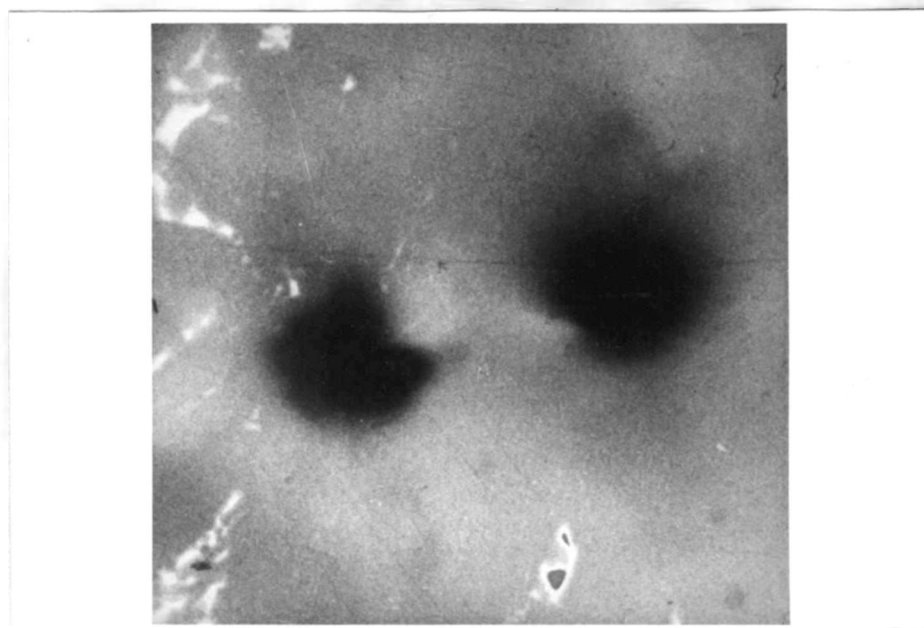


Fig.6: Autorradiograma da peça nº 4, mostrando a captação do ^{131}I pela glândula tireoide. Tempo de exposição 7hs e 21 minutos. Ampliação 8 vezes.

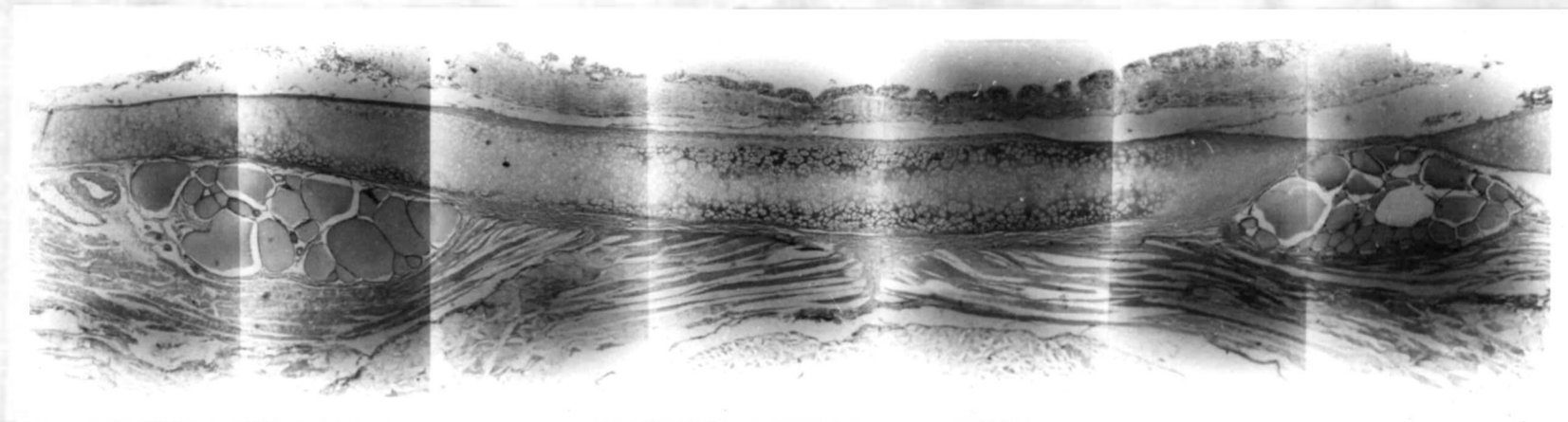


Fig. 7: Montagem seriada de foto-micrografias, para mostrar a forma anatômica e a localização das glândulas tireóides do Sapo Bufo marinus ictericus . Aumento 64 vezes.

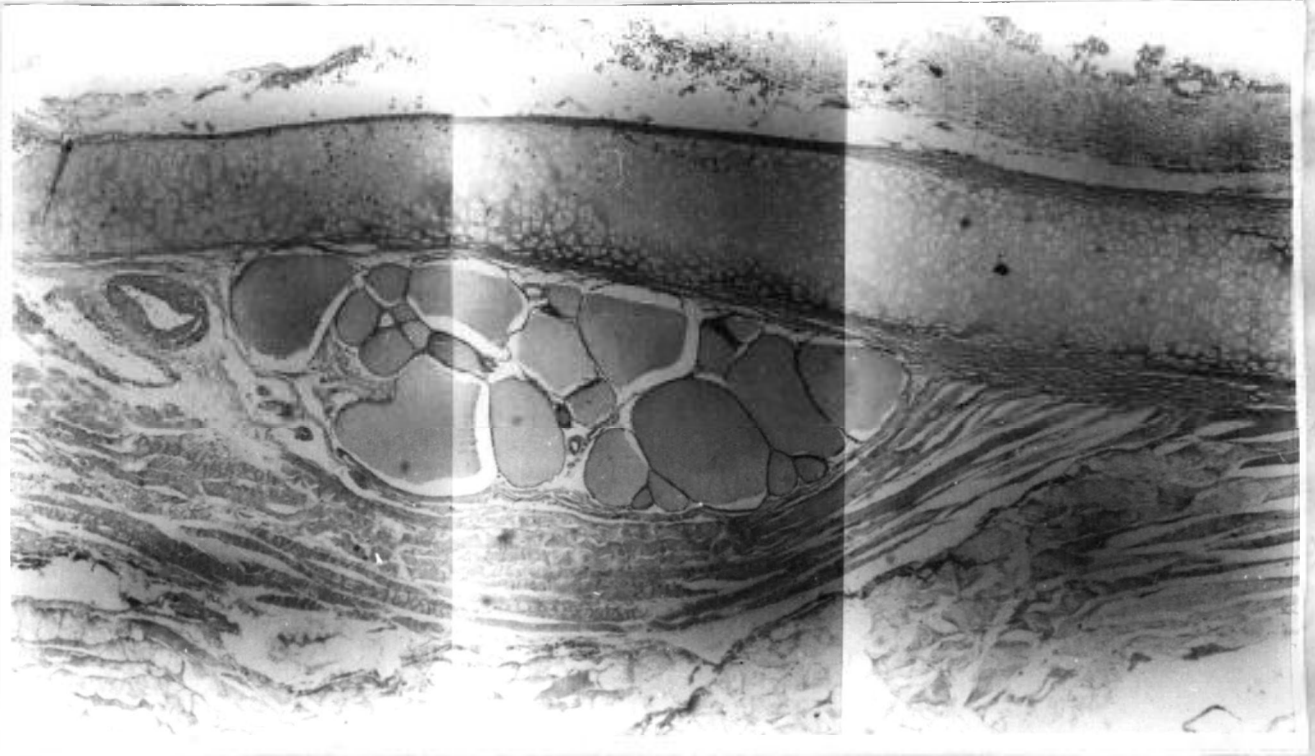


Fig.8: Montagen seriada de foto-micrografias, para mostrar com maiores detalhes a posição anatômica da glândula tireoide do Sapo Bufo marinus ictericus em relação a cartilagem do osso hióide. Aumentada 128 vezes.

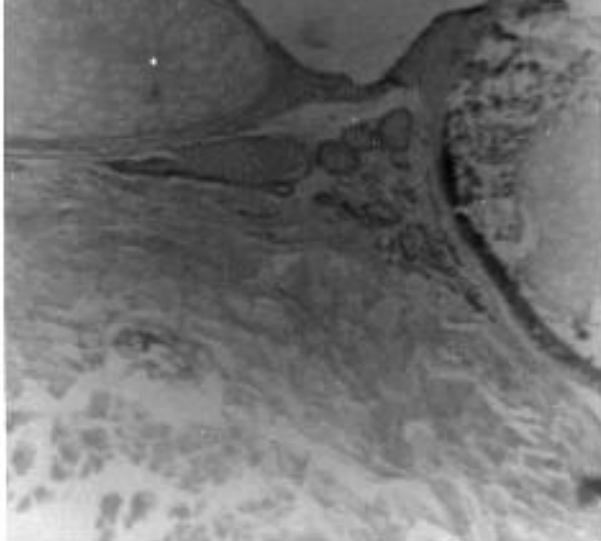


Fig.9: Foto-micrografia para mostrar uma outra disposição dos ácinos que formam a glândula tireoide do Sapo Bufo marinus ictericus. A posição anatômica da glândula é a mesma. Aumentada 123 vezes.

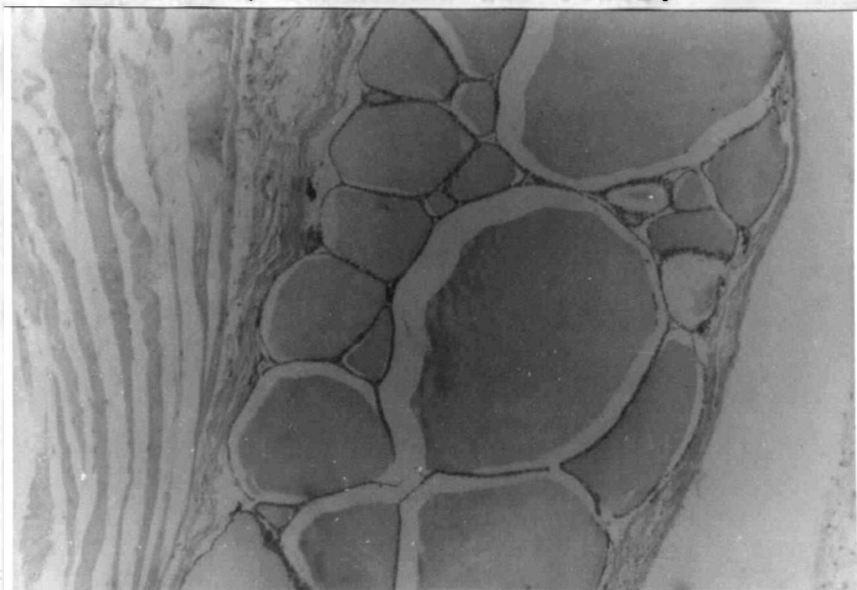
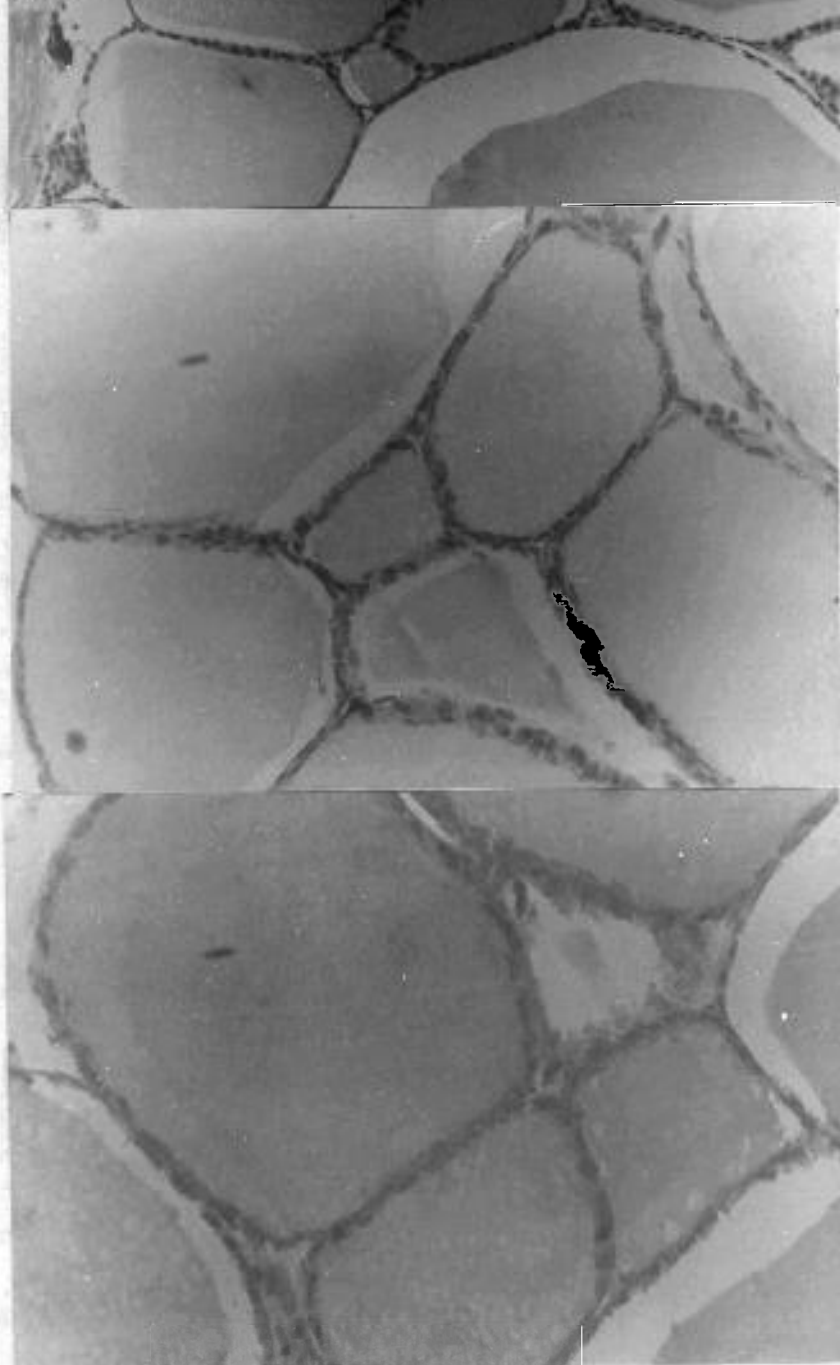


Fig.10: Foto-micrografia aumentada 320 vezes.



Figs. 11, 12 e 13: Foto-micrografias com aumentos de 400, 480 e 600 vêzes respectivamente, para mostrar a estrutura celular que delimita os ácinos glandulares, esta estrutura - conforme se observa é formada de camada única de células cilíndricas baixas, apresentando núcleos basófilos achatados. No interior dos ácinos observa-se o coloide.

V - DISCUSSÃO

Na bibliografia referente à anatomia comparativa da glândula tireoide de vertebrados, encontram-se as citações de GORBMAN e BERN⁴⁰, que serviram de base para comparação dos resultados aqui verificados com os de outros autores.

Para GORBMAN e BERN⁴⁰, a anatomia básica da glândula tireoide em todos os vertebrados é o folículo - uma concavidade formada por uma simples camada de células epiteliais englobando um espaço repleto de fluido. É um órgão altamente vascularizado e de forma variada segundo cada grupo de vertebrados, em que se torna característica (fig.14).

Assim, nos ciclóstomos e teleósteos, a glândula tireoideiana já se apresenta organizada. Os folículos são simplesmente espalhados ou reunidos em pequenos grupos, es-

parsos no tecido conjuntivo, sôbre a faringe.

Os folículos isolados, em geral seguem o curso da aorta ventral e as raízes dos ramos aórticos, dentro de sulcos. No entretanto, existem alguns teleósteos excepcionais ("Bermuda parrot fish", Espadarte e atum), nos quais foi encontrada glândula tireoide compacta, podendo ser bilobada, com os lóbulos aproximados um do outro na linha mediana.

Embora a área tireoidiana dos teleósteos seja bem vascularizada, há descrições na literatura de uma interessante relação linfática para os Lophius (Peixe). Nesta espécie, os folículos tireoidianos são referidos por estarem agrupados em tórno de um seio linfático, e que drena o conteúdo ininterruptamente para o coração. Talvez, a mais incomum característica anatômica da tireoide de teleósteo seja a tendência a sofrer uma dispersão para fora da área faríngea. O mais comum é o lado não faríngeo, no qual o folículo tireoidiano pode ser encontrado sôbre a cabeça do rim. Esta descoberta foi feita por Baker-Cohen ao investigar a causa de cistos nos rins de Platycephalus com aumento do bócio tireoídico. Estes cistos têm a capacidade de estocar radioiodo. Desde há muito, estudos revelaram que a tireoide heterotópica, provavelmente migrava da posição faríngea. Mais tarde, pequeno número de folículos foi encontra-

do no cérebro, olho, esôfago e baço.

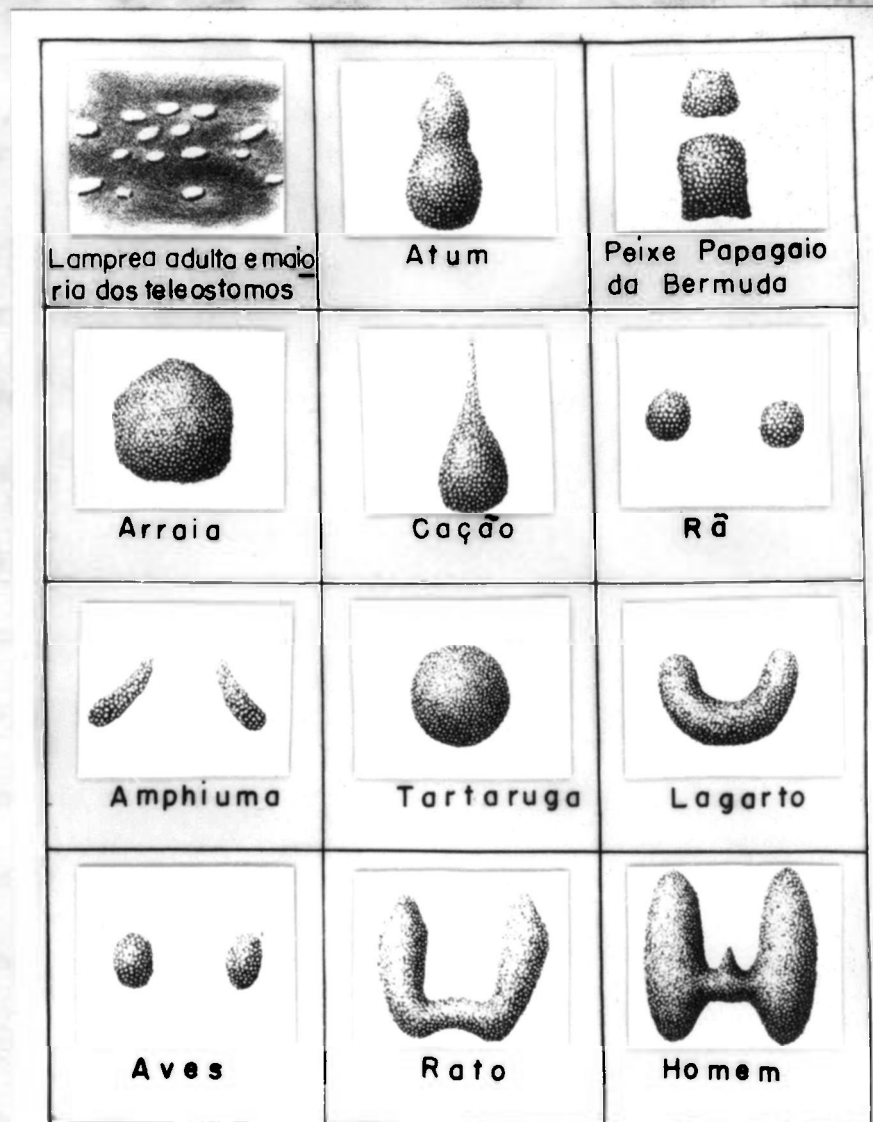


Fig.14: Esquema reproduzindo a forma anatômica da glândula tireoide de várias espécies animais vertebrados. Adaptado do "Textbook of comparative endocrinology" de Gorbman e Bern (1964).

Após a descoberta de Baker, em outras espécies de peixes teleósteos encontrou-se o órgão. Menciona-se ser esta tendência para a dispersão dos folículos tireóidicos devida à natureza encapsulada da glândula, nos teleósteos.

Nos peixes cartilaginosos a glândula é única e em forma de disco, nas arraias; em forma de frasco, nos tubarões. A parte mais estreita das tireoides dos tubarões fica próxima ao assoalho da faringe, e nos tubarões primitivos (Chlamydoselachus), um duto largo se estende da parte final do estreito da glândula tireoide através da cartilagem basal para a faringe. Há uma tendência entre os elasmobrânquios para a fusão de veias e canais linfáticos na superfície tireodiana. Em alguns elasmobrânquios há um seio venoso contínuo no qual a glândula se torna suspensa. A tireoide dos anfíbios é distintamente dupla e os dois lobos usualmente são arredondados, podendo estar relativamente separados, particularmente nos urodelos. Tipicamente estão associados à cartilagem do osso hioide podendo permanecer firmemente aderentes.

Em Amphiuma, por exemplo, a porção ventral da cartilagem branquial é côncava e contém as duas glândulas tireoides. Tais glândulas como poder ser imaginadas, são dificilmente encontradas por processo de dissecação. Após os mais

variados estudos referentes à tireoide dos anfíbios, concluiu-se que ela pode apresentar-se sob diversas formas.

GAUPP (1896) descreve duas glândulas tireoides na Rã, uma localizada à direita e outra à esquerda da traquéia, sem união entre elas e que ambas provêm de uma única formação, sendo que no período embrionário perdem a conexão e se isolam. Essa glândula tireoide apresenta-se como um corpúsculo ovalado alongado, observável com lupa, apresentando-se como uma reunião de pequenas vesículas em forma de cacho de uvas. Sua localização é muito profunda, situando-se ventralmente à raiz do "Processus postero-medialis" quanto à posição da cartilagem da língua. Ajusta-se à posição ventral lateral, por extensão de um prolongamento estreito, dirigindo-se para a frente e sobre a superfície ventral da língua. Em relação ao "M. Hypoglossus" comporta-se assim ou comprime-se à volta dos músculos laterais, podendo ser recoberta mais ou menos na totalidade por eles na parte ventral. Seu comportamento também em relação ao "M. sterno hyoideus" não é sempre constante. A maior parte da tireoide está localizada ao redor dos músculos laterais, podendo também achar-se entre suas fibras, intercalando-se nelas, pois ligam ambas as partes do músculo com seu final posterior. Na parte medial da tireoide, observa-se a inserção da porção ven

tral anterior do músculo.

É bem difícil a distinção da glândula tireoide no local em que se encontra, pois de tamanho bem pequeno e recoberta por um envoltório prêso à língua, não é facilmente assinalada.

Sempre se admitiu a ausência de tecido tireoidiano nos Typhlomolges, mas o reestudo de várias espécies, após 30 anos da descrição original, demonstrou que êsses animais têm uma glândula folicular pequena e típica.

A glândula tireoide, bem como outros órgãos endócrinos dos répteis, têm sido relativamente pouco estudados. Por isso, sua variação anatômica não é bem conhecida. No entanto duas das formas mais comuns são as vistas nos lagartos e tartarugas. Nas cobras e tartarugas a glândula tireoide é uma simples estrutura discoide, localizada em frente ao coração e com ramos para os sistemas aórticos.

Nos lagartos apresenta-se em forma de fita, envolvendo a traquéia ou é bilateralmente lobada e cada lobo situa-se de cada lado da traquéia, ambos conectados por um istmo de tecido tireoidiano, sobre a traquéia. Em alguns lagartos (Uromastix e Monitor) os dois lobos são separados.

Nas Aves, a glândula tireoide consiste

de dois lobos isolados, arredondados e apoiados em cada lado da traquéia, ao nível das clavículas.

A tireoide dos Mamíferos lembra as de alguns lagartos, sendo formada por dois lobos conectados por um ístmo, transversal à face ventral da traquéia.

Baseando-nos nas citações feitas por GORBIAN e BERN (l.c.) referentes à localização anatômica da glândula tireoide de réptil e em nossas pesquisas da literatura, observamos não haver informes quanto à localização da glândula tireoide do Sapo. Notamos também que quanto às técnicas empregadas para a localização deste órgão endócrino, somente encontramos uma citação feita por êsses mesmos autores, que mencionam a técnica utilizada por WINGSTRAND⁴², na qual o autor descreve a técnica de impregnação de prata em reação com o iodo tireoidiano, em Rã. Com o emprego desta técnica êle demonstrou a localização exata das glândulas tireoides desse animal (fig.15).

Em nosso experimento o método aplicado foi o da autorradiografia, utilizando o método do contáto temporário, empregando o ¹³¹I como traçador. Pela aplicação deste método conseguimos com facilidade, evidenciar e localizar com relativa precisão, a glândula tireoide do Sapo.

Notamos que a glândula tireoide deste

animal é distintamente dupla e que os lobos são arredondados, e apresentando-se relativamente bem separados, estando associados à cartilagem do osso hioide, podendo encontrar-se firmemente aderentes a êle e tendo como referência o V do arco aórtico.

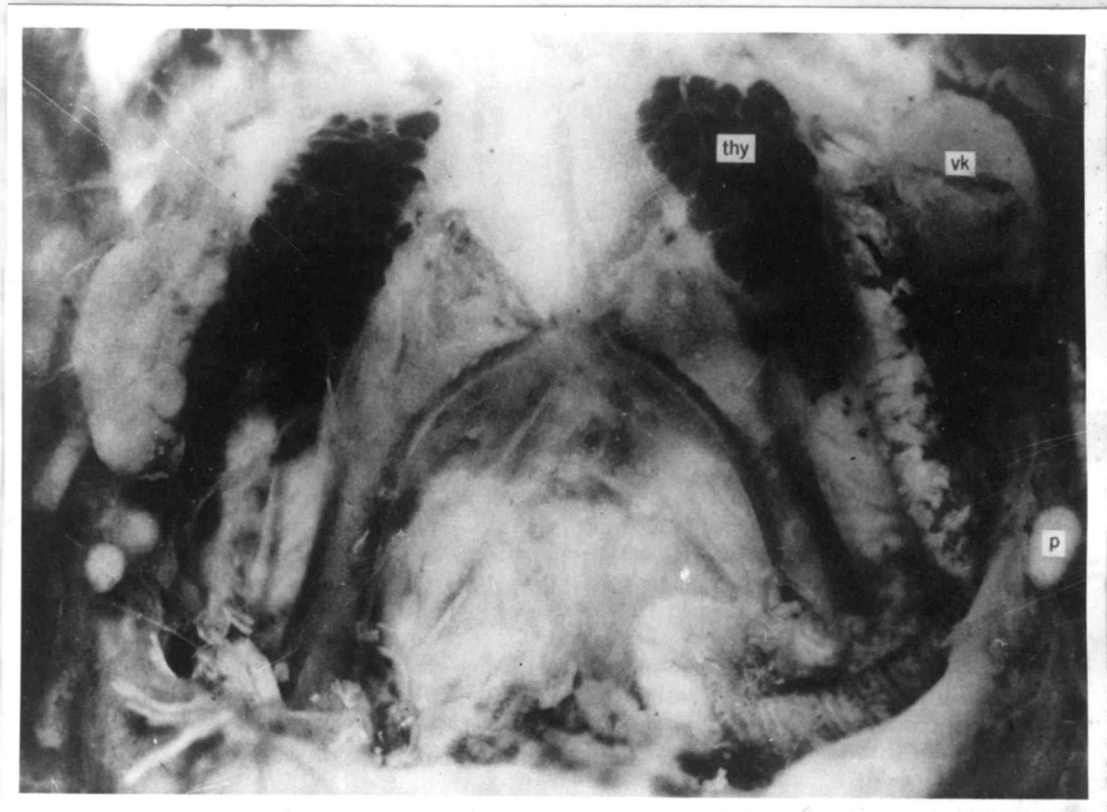


Fig.15: Aspecto ventral da dissecação da mandíbula inferior de uma Rã, corada com nitrato de prata, pela técnica aplicada por K.G. WINGSTRAND. As duas glândulas tireoides aparecem como dois cachos de uvas.

Ao compararmos nossas observações com as citações feitas por GORBMAN e BERN (l.c.) em relação à posição das tireoides de anfíbios, observamos haver estreita relação.

O quadro histológico, mostrou serem as glândulas tireoides do Sapo, formadas por ácinos contendo colóide em seu interior e delimitados por uma camada única de células cilíndricas baixas, apresentando núcleos basófilos achatados.

V - RESUMO

No presente trabalho, o processo autorradiográfico utilizando o método de contáto temporário, foi aplicado como auxiliar de pesquisa na evidencição e localizaçõ da glândula tireoide do Sapo Bufo marinus ictericus, através o uso do isótopo ^{131}I , como traçador.

Após a obtenção dos autorradiogramas, êstes foram superpostos às peças retiradas dos animais, evidenciando e localizando, desta maneira, a região em que se encontra o órgão endócrino procurado.

Com os dados obtidos foram preparadas lâminas histológicas, que mostraram as estruturas da glândula tireoide do animal pesquisado.

As informações obtidas através o experimento foram comparadas com as fornecidas para Anfíbios e Répteis.

VI - CONCLUSÕES

1 - O processo autorradiográfico aplicado na localização da tireoide do Anfíbio Anuro, Bufo marinus ictericus, demonstrou ser de grande valia, pois até então, o único processo descrito na literatura era o de impregnação por prata.

2 - O processo autorradiográfico apresenta as vantagens de ser mais rápido e não apresentar os inconvenientes apresentados pelo método da impregnação por prata, isto é, nos casos em que houver necessidade de estudo histológico.

3 - A glândula tireoide do Sapo Bufo marinus ictericus foi localizada por este método e com os cortes histológicos comprovou-se ser uma glândula distintamente dupla, com lobos arredondados, estando estes lobos firmemente aderidos

à cartilagem do osso hioide. Poder-se-á ter como referência o sulco em forma de V entre o arco aórtico.

4 - A localização da glândula tireoide do Sapo, coincide com a localização citada por GORBMAN e BERN, para os Anfíbios (Rã).

VII - BIBLIOGRAFIA

- 1 - ROGERS, A.W., Techniques of Autoradiography, Elsevier Publishing Co., New York, 1-4 (1967) 335 p.
- 2 - NIEPCE DE ST. VICTOR, Compt. Rend., 65 (1867) 505.
- 3 - BOYD, G.A., Autoradiography in Biology and Medicine, Academic Press Inc., New York, 1955, 339 p.
- 4 - GUDE, W.D., Autoradiographic Techniques, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1968, 113 p.
- 5 - LONDON, E.S., Études sur la Valeur Physiologique et Pathologique de l'émanation du Radium, Arch. Elec. Med., 12 (1904) 363-372.
- 6 - LONDON, E.S., O Fiziologopatologicheskoi Znachenii Emanatsii Radiya. (Physiologo-Pathological Importance of Radium Emanation). Obshchestvie Okhraneniia Narodnogo Zdrav'ia, 15/III, 1904.

- 7 - LONDON, E.S., O Fiziologopatolicheskoi Znachenii Emanatsii Radiya. (Physiologo-Pathological Importance of Radium Emanation). Russkii Vrach (St. Peterburg) 3 (1904) 369-372.
- 8 - BOUCHARD, Ch., CURIE P. and BALTHAZARD V., Action Physiologique de L'émanation du Radium. Compt. Rend. 133 (1904) 1384-1387.
- 9 - BECQUEREL H., Compt. Rend., 122 (1896) 420, 501, 693, 1086.
- 10 - Apostila "Radioisótopos en Diagnóstico Médico"., (Ap.), LOMBARDI H.M., AKERS L.K., Instituto de Estudios Nucleares de Oak Ridge, Tennessee, 1968, 233 p.
- 11 - KOTZAREFF, A., Photographies des Organes par L'émanation du Radium ou Radiumgraphie (Curiegraphie). J. Radiol. et Électrol. 6 (1922) 131-133.
- 12 - LACASSAGNE, A and LATTES J., Répartition du Polonium - (Injecté sous la Peau) dans l'organisme de Rats porteurs de Greffes Cancéreuses. Compt. Rend. Soc. Biol. 90 (1924) 352-353.
- 13 - LACASSAGNE, A and LATTES, J.S., Bull. Histol. Appl. et Tech. Microscop., 1 (1924) 279.

- 14 - LACASSAGNE, A., LATTES, J.S. and LAVEDAN J., J. Radiol. Electrol., 9 (1925) 1.
- 15 - CHAMIE, C., Sur les Groupements d'atomes d'éléments radioactifs dans le mercure. Compt. Rend. 124 (1927) 1243-1245.
- 16 - LOMHOLT, S., Investigation into the distribution of lead in the organism on basis of a photographic (Radiochemical) method. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 40 (1930) 235-245.
- 17 - GROVEN, Ch., GOVAERTS, J. and GUEBEN, G., Photographic Action of Artificial Radio-Elements. Nature 141 (1938) 916-917.
- 18 - BULLIARD, H., GRUNDELAND, I. and MOUSSA, A., Detection du Phosphor des Phosphatides Surrenaliens par le Radio phosphore. Compt. Rend. 207 (1938) 745-747.
- 19 - HAMILTON, J.G., SOLEY, M.H. and EICHORN, K.B., Deposition of Radioactive Iodine in Human Thyroid Tissue, - Univ. Calif. (Berkeley) Publs. Pharmacol. 1, N° 23 (1940) 339 .
- 20 - LEBLOND, C.P., J. Anat. 77 (1943) 149.
- 21 - BELANGER, L.F. and LEBLOND, C.P., Endocrinology, 39 (1946) 8.

- 22 - EVANS, T.C., Radioautographs in which the Tissue is Mounted Directly on the Photographic Plate. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 64 (1947) 313-315.
- 23 - ENDICOTT, K.M. and YAGODA, H., Microscopic Historadiographic Technic for Locating and Quantitating Radioactive Elements in tissue. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. Proc. 64 (1947) 170-172.
- 24 - PELC, S.B., Autoradiographic Technique. Nature 160 (1947) 749-750.
- 25 - POWELL, C.F. and OCCHIALINI, A.P.S., Nuclear Physics in Photographs, Clarendon, Oxford, (1947).
- 26 - POWELL, C.F., FOWLER, P.H. and PERKINS, D.H., The Study of Elementary Particles by the Photographic Method, Pergamon, London, (1959).
- 27 - ARNOLD, J.S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 85 (1954) 113.
- 28 - JOFTES, D.L. and WARREN, S., J. Biol. Phot. Assoc. 23 - (1955) 145.
- 29 - MC DONALD, A.M., COBB, J. and SOLOMON, A.K., Science 107 (1948) 550.
- 30 - BOYD, G.A. and WILLIAMS, A. I., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 69 (1948) 225.

- 31 - DONIACH, I. and PELC, S.R., Brit. J. Radiol. 23 (1950) 184.
- 32 - BERRIMAN, R.W., HERZ, R.H. and STEVENS, G.W.W., A New Photographic Material - A High-Resolution Emulsion for Autoradiography, Brit. J. Radiol. 23 (1950) 472-477.
- 33 - LEVI, H., Exptl. Cell Res., 7 (1954) 14.
- 34 - LEVI, H., Exptl. Cell Res., Suppl., 4 (1957) 207.
- 35 - LEVI, H., ROGERS, A.W., BENTZON, M.W. and NIELSON, A., Kgl. Danske Videnskab. Selskab, Mat. Fys. Medd., 33 No 11 (1963).
- 36 - LEVINTHAL, C. and THOMAS, C.A., Biochim. Biophys. Acta., 23 (1957) 453.
- 37 - LIQUIER-MILWARD, J., Nature, 1tt (1956) 619.
- 38 - WANG, C.H. and WILLIS, L.D., Radiotracer Methodology in Biological Science, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1965, 144-151.
- 39 - HAZARD, J.B. and SMITH, D.E., The Thyroid, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1964, 207-225.
- 40 - GORBMAN, A. and BERN, H.A., A textbook of Comparative - endocrinology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1964, 99-192.

- 41 - GAUPP, E., Anatomie des Frosches, 2nd, Vol. 3, Friedrich Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1904, 205-206.
- 42 - WINGSTRAND, K.G., (1964), Ap. GOBBMAN, A. and BERN, H. (1964)., Comparative Endocrinology, XIV - 468 pg. John Wiley & Sons, Inc., New York.