

EMIKO MURAMOTO

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



Orientador

Prof. Dr. Wiliama Nicolau

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo para a obtenção do Título de  
"Mestre em Ciências"

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. William Nicolau

Orientador

Prof. Dr. Metry Bacila

Coordenador

Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Diretor do Instituto de Energia Atômica

Prof. Dr. Lício Marques de Assis

Livre-Docente da Faculdade de Medicina da USP

Chefe de Pesquisa da Divisão de Radiobiologia

do Instituto de Energia Atômica

Etsuko Ikeda

Farmacêutica Bioquímica

Suemi Sugavara

Farmacêutica Bioquímica

Serviço de Computação Analógica e Digital do Instituto de Energia Atômica

## ÍNDICE

	página
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO .....	1
Propósito do trabalho .....	11
CAPÍTULO II	
MATERIAL E MÉTODO	
Material .....	12
Preparo do Material .....	13
Material Biológico .....	14
Metodologia .....	15
CAPÍTULO III	
RESULTADOS	
1. Comparação das respostas à administração de TSH exógeno ob- tidas em camundongos machos e fêmeas .....	19
2. Efeitos nos animais pela administração de soro fisiológico como controle das experiências .....	22
3. Efeitos nos animais pela administração de TSH .....	22

	página
4. Relação dose-resposta dos animais à administração de soro `sabidamente possuidor de atividade de LATS .....	24
5. Reprodutibilidade nas amostras obtidas pela administração de um mesmo soro possuidor de atividade de LATS .....	26
6. Resultados obtidos na avaliação da atividade de LATS dos sôros de pacientes portadores de doença de Graves .....	31
 CAPÍTULO IV	
DISCUSSÃO .....	40
 CAPÍTULO V	
CONCLUSÕES .....	44
 CAPÍTULO VI	
SUMÁRIO .....	46
APÊNDICE .....	48
BIBLIOGRAFIA .....	91

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Adams e col. (1) verificaram que a administração de tireotrofina as cobaias que haviam recebido previamente  $^{131}\text{I}$  para a marcação "in vivo" dos compostos iodados tireoidianos, resultou em incremento de atividade radioisotópica sanguínea desses animais. Nessas experiências os animais recebiam tiroxina para inibir a secreção endógena de tireotrofina. Posteriormente, foi verificado que, ao administrar soro de paciente com hipertireoidismo (2), a tireóide dos animais era estimulada por um agente sérico que provocava resposta diferente quando

---

Trabalho realizado no Departamento de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica.

Abreviaturas: TSH - tireotrofina bovina, LATS - estimulador tireoidiano de ação prolongada, PBI - iodo ligado à proteína, FHG - fitohemaglutinina, IgG - imunoglobulina G,  $T_3$  - triiodotironina,  $L-T_4$  - L-tetraiodotironina ou tiroxina, mU milIunidade,  $R_1$  - % da contagem radioativa de 3 horas em relação àquela de zero hora, obtidas em 0,1 ml do sangue do camundongo,  $R_2$  - % da contagem radioativa de 18 horas em relação àquela de 3 horas obtidas em 0,1 ml do sangue do camundongo,  $R_3$  - contagem radioativa de 18 horas em relação àquela de zero hora obtida em 0,1 ml do sangue do camundongo.

comparada a estimulação pelo TSH.

O plasma ativo induzia um prolongamento marcante na resposta do animal teste que se estendia a 16 ou mais horas quando medida pela radioatividade sanguínea.

Os referidos autores (3), ao adicionarem TSH no soro de paciente que apresentava essa anormalidade na resposta, verificaram 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 tireotoxicose e foi relacionada à concomitante existência de exoftalmia .

Modificando a técnica de Adams e col. (2) McKenzie (35) usou para os estudos, camundongos previamente injetados com  $^{131}\text{I}$  e obteve respostas sanguíneas máximas duas horas após a administração de tireotrofina. Ao administrar aos camundongos pretratados de modo idêntico, sôros de pacientes tireotóxicos e medindo a radioatividade dos sangues 2, 12 e 24 horas após, obteve como resposta um retardamento semelhante ao descrito por Adams e col. (2). A esse fator existente nos sôros de tais pacientes McKenzie (35) deu o nome de "ativador tireoídiano".

Após a comprovação da existência desse estimulador anormal da tireóide, diversas pesquisas têm sido feitas seguindo ou modificando o ensaio biológico de McKenzie (36). Vários outros nomes foram dados a essa substância, tais como fator tireoídiano sérico, ativador da tireóide, estimulador anormal da tireóide.

Posteriormente, no 4<sup>o</sup> Congresso Internacional de Bócio realizado em 1960 em Londres este estimulador recebeu o nome de "Estimulador Tireoidiano 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  $PB^{131}I$ , da captação de  $^{131}I$  pela tireóide e da altura da célula acinar da tireóide do camundongo (37).

Foi estabelecido subsequentemente que o material liberado pela glândula do camundongo sob a ação da tireotrofina ou LATS, era, de modo predominante, tiroxina. Outras pequenas frações contendo respectivamente iodeto, trilodotironina e tirosinas iodadas (44, 53) puderam ser também identificadas.

Adams e col. (4) estudaram o tempo de permanência do LATS no sangue circulante do rato e verificaram 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 a sua administração.

Esses resultados foram confirmados por McKenzie (39) ao injetar por via intravenosa soro de paciente com hipertireoidismo em camundongos e colhendo amostras sanguíneas a diversos intervalos de tempo. Foi verificada 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 eletroforese em bloco de amido (39). 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 hipertireoidianos 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 (38) que anti-soro anti-TSH não tinha ação sobre a atividade de LATS e que TSH padrão adicionado a soro e ensaiados em camundongos continuavam a produzir uma resposta precoce. Esse fato não afastou, porém, a possibilidade do LATS ser uma forma alterada de TSH.

Outra diferença de comportamento entre esses dois fatores é a resposta dos mesmos à temperatura (34). Assim, o LATS é muito afetado por altas temperaturas sendo que o seu aquecimento a 70°C por 10 minutos reduz a 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, a sua concentração, como já foi assinalado, predominava no componente da  $\gamma$  globulina (39). A associação de LATS com a  $\gamma$  globulina foi mais claramente evidenciada por método de gel



filtração em Sephadex (40) e precipitação em etanol a frio (6). 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 (40) que obteve 3 frações protéicas por gel-filtração em Sephadex G-200 (26, 47). 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 subfrações sendo porém a sua atividade mais evidente na proteína 7S.

Adams e col. (6) estabeleceram que o LATS podia ser recuperado do soro com a imunoglobulina G (IgG) e a sua atividade não podia dela ser dissociada.

A falha de várias tentativas para separar a atividade do LATS do IgG levou McKenzie (40) a sugerir que a atividade poderia ser inerente à propriedade específica da molécula de  $\gamma$  globulina.

Meek e col. (47) foram os primeiros a obterem preparações de  $\gamma$  globulina-LATS eletroforéticamente puras. Trataram séros de pacientes hipertireoidianos com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (16, 26, 47) e separaram as diversas frações em coluna de dietilaminoetil-celulose (16, 47). A fração ativa foi eletroforéticamente identificada como 7S  $\gamma$  globulina. Quando esta  $\gamma$  globulina tinha a 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 (20, 21, 42, 47).

A associação da atividade do LATS com a 7S  $\gamma$  globulina foi confirmada por Kriss e col. (26) usando a técnica de ultra centrifugação em gradiente de sacarose, imunoeletroforese, imunofluorescência, dupla difusão em agar pelo método de Ouchterloni e incubação com anti-soro anti-proteína 7S.

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

Mais recentemente foram descritos diversos processos para concentrar e purificar as amostras a serem ensaiadas. Assim Miyai e col. (48) 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. Durante esse processamento os autores obtiveram sete frações. A atividade específica de LATS era relativamente maior nas frações de eluições mais curtas na coluna de carboxi-metil-celulose (frações IV a VII) e se relacionava à atividade de  $\gamma$  globulina quando ensaiada por imunoeletroforese.

Dorrington e col. (19) concentraram 10 vezes a atividade sérica de LATS por meio de precipitação em  $(NH_4)_2SO_4$ , diálises sucessivas com tampão de fosfato e purificação em Sephadex DEAE-celulose.

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

Dorrington e col. (21) mostraram que as preparações de microssoma da tireóide eram eficientes na remoção de LATS existente em uma solução. O microssoma era homogenizado em tampão de sacarose-citrato-fosfato e a que sedimentava a 105.000 x g na ultra centrifugação, presumivelmente, retículo endoplasmático, tinha capacidade de ligar o LATS. Este fato não era verificado quando a preparação de microssoma era colocada em contacto com o TSH.

El Kabir (22) fez uma série de estudos e verificou que o LATS aparentava ser absorvido pelos homogenizados de tecidos do fígado, rim, músculo e mucosa gástrica, os quais levavam a uma perda parcial da atividade do estimulador. A adição de quantidade crescente do homogenizado de tireóide resultou na abolição da atividade do LATS. Não foram feitas tentativas para estabelecer se o efeito desses tecidos sobre o estimulador não era devido à degradação enzimática do IgG.

A absorção do LATS por outros tecidos (21) que não o tireoidiano, sob o ponto de vista de reação imunológica, poderia ser devida a um auto-antígeno hipotético compartilhado por vários tecidos.

A adsorção de LATS por microssoma de tireóide e a sua posterior eluição com o tampão ácido (22), resultou na obtenção da quãle ativador em alto grau de afinidade e especificidade para os mi

crossomas tireoidianos. O mecanismo lógico no caso seria a de neutra lização específica do LATS por alguns componentes da fração mícrosso mlal da tireóide.

Se o LATS é um anticorpo para um componente da ti reóide, então a adsorção pelo antígeno específico com conseqüente elui ção deveria resultar em maior purificação do material. Esse método, entretanto, é de resultado relativo, já que só pequena parte do estimu lador 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 (41, 42) já que os linfócitos circulantes têm participação ativa no fenômeno imunológico que ocorre nas reações liga das à hipersensibilidade. Assim Bach (7) em 1963 estudou os linfóci tos do sangue de paciente com doença de Graves afim de investigar a possibilidade da fitohemaglutinina (FHG) estimular a síntese de LATS (24, 7). MacKenzie (41) trabalhando com cultura de linfócitos do san gua 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 homogenizado celular. O mesmo autor (44) demonstrou nestas culturas a incorporação, embora pe quena, de amino ácidos marcados com  $^{14}\text{C}$  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. (49) 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 (16, 23, 52), seria de se supor que respostas de maior magnitude poderiam ser obtidas desde que fossem usados linfócitos provenientes de estruturas especializadas para esse fim, tais como os linfócitos (16) associados à tireóide. Maior resposta linfocitária "in vitro" poderia também ser obtida pela utilização de antígeno específico (16) para a produção de IATS. Tal antígeno, entretanto, não é conhecido.

Tentativas para a caracterização do antígeno têm sido feitas, embora em pequeno número. McKenzie (44) obteve resposta estimuladora da tireóide de camundongos utilizando sôros de coelhos previamente imunizados com homogenizado total da tireóide e com a sua fração microssomal (16). A resposta era mais evidente quando se utilizava a primeira preparação. Nessas experiências utilizou-se como controle, microssomas de fígado para os quais o coelho não produzia resposta de IATS (54). Os animais, no entanto, não apresentaram hipertireoidismo pelos parâmetros utilizados pelo autor, apesar de exibir incremento na sua iodemia protéica não relacionada, aparentemente, à administração do homogenizado tireoidiano.

A possibilidade do IATS ser um anticorpo antitireoidiano, hipótese que poderia surgir derivada da experiência acima citada, é rejeitada já que em indivíduos com elevados títulos de anticorpo

antitireoide como é, por exemplo, o caso de portadores da doença de Hashimoto (44) não tem sido demonstrada atividade de LATS. Por outro lado indivíduos com altos níveis de LATS podem não apresentar anticorpos antitireoglobulina quando analisados pelas técnicas usuais.

O conceito de que o LATS é um anticorpo contra alguns componentes tireoidianos não foi confirmado pelos trabalhos de Burke (15) que demonstrou a ausência da positividade de diversas reações características de fenômenos imunológicos utilizando sêros 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-hipofiseo-tireoidiano como sistema formador de LATS. Assim, vários pacientes portadores de doença de Graves hipofisectomizados terapêuticamente, apresentavam LATS circulantes, Werner e col. (57) e Becker e col. (10, 11) verificaram que essa conduta terapêutica aplicada em alguns casos de doença de Graves não levavam o paciente ao estado de hipotireoidismo como seria de se esperar. A administração a camundongos de extratos hipofisários obtidos pela necropsia de pacientes com doença de Graves com LATS (29, 39) circulante não davam respostas tardias satisfatórias, indicando a ausência desse fator no material testado.

Adams e col. (5) compararam os resultados dos en

saíes biológicos em camundongos hipofisectomizados é intactos aos quais tinham sido administrados séros LATS-positivo (50). 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.

### Propósito do Trabalho

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 nos próximos tópicos, surgiram dúvidas na avaliação dos níveis de positividade das respostas que deveriam ser indicativas da existência de LATS nos séros ensaiados. Assim em resumo 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.

## CAPÍTULO II

## MATERIAL E MÉTODO

## Material

- $^{125}$ Ira forma de NaI - Farwerke Hoechst Ag - Radiochem  
isches Labor Alemanha - atividade de 3 a 5mCi/ml.
- L-3-3'-5-triiodotironina - Laboratório Calbiochem  
Los Angeles - Califórnia.
- Hormônio tireotrófico de origem bovina - Ambinon-  
Laboratório Organon - São Paulo.
- 
- Heparina - Laboratório Roche - São Paulo.
- Amberlite - IRA 410 - Laboratório Geel - São Paulo.
- Cloreto de Sódio - pró análise.



## Material Biológico

Avaliou-se a atividade do LAPS em 42 sôros proveni  
entes de 40 pacientes (\*) portadores de bôcio difuso tóxico acompanha  
do de exoftalmia não maligna.

O sangue dêstes pacientes foram colhidos por punção da veia antero-cubital. Após a retração do coágulo separou-se o sôro que foi mantido em congelador à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

---

(\*) Os sôros dêstes 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.

## Metodologia

O procedimento para a detecção da presença de IATS no soro de pacientes com doenças de Graves foi feito seguindo o método de ensaio biológico em camundongo descrito por McKenzie (35) e modificado por Furth (25).

Utilizaram-se camundongos fêmeas de raça Swiss, criados no biotério do Instituto de Energia Atômica, pesando entre 18 a 23 g, os quais foram colocados em gaiolas e mantidos sob aquecimento com uma lâmpada de 100 watts. Em algumas experiências foram utilizados camundongos machos afim 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 desiodizada 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  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$  diluído em 0,25 ml de solução fisiológica. Com esse procedimento visou-se a marcação "in vivo" dos compostos iodados intratireoídianos. Concomitantemente, administrou-se 0,2  $\mu\text{g}$  de triiodotironina ( $\text{T}_3$ ) dissolvido em 0,2 ml de solução fisiológica afim de suprimir a secreção endógena do TSH. Novas doses de  $\text{T}_3$  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  $^{125}\text{I}$  retirou-se

por punção do "sinus" retro-orbital do camundongo uma primeira amostra de 100  $\mu$ l de sangue com tubo capilar 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 intra peritoneal 0,5 ml de substância a ser analisada.

Em cada experiência em que foram ensaiados os sôros, incluíram-se, paralelamente, 2 grupos contrôles : em um deles os animais receberam 0,5 ml de solução fisiológica e no outro 0,8 mU de TSH padrão, cuja solução fisiológica 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 (TL) tipo poço.

Os animais permaneceram em dieta até o final da experiência, sendo em seguida sacrificados.

As variações da radioatividade observadas nas amostras

tras sanguíneas foram, uma vez deduzidas as respostas contrôles obtidas pela injeção de soro fisiológico, expressadas em :

1. Aumento porcentual da radioatividade nas amostras de 3 e 18 horas em relação ao valor inicial. Consideraram, aprioristicamente, com base nos dados da literatura, como positivos, os ensaios cujas contagens observadas às 18 horas em relação à contagem de zero horas foram iguais ou maiores que 150 %.

2. Incremento estatisticamente significantes do número de contagens obtidos às 18 horas em relação às aquelas de zero e 3 horas (teste t de Student).

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

$$e_{\bar{d}} = \sqrt{\frac{S(d-\bar{d})}{n(n-1)}}$$

e

$$t = \frac{\bar{d}}{d}$$

Consideraram-se como positivos os ensaios cujos incrementos de radioatividade do sangue dos camundongos observados nas amostras

tras 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 LAIS no soro serão comparadas e discutidas.

### CAPÍTULO III

#### 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 0,8 mU de TSH e avaliando-se a resposta dos animais.

Verifica-se pela Tabela 1 que os animais machos, em média, e praticamente nos casos individualizados, deixaram de responder ao estímulo do hormônio trófico, de acordo com o critério metodológico adotado (vide página 17 item 1). Contrastando com esse efeito, as fêmeas mostraram-se mais sensíveis ao TSH, respondendo em média a nível de 179,5%.

As conclusões podem advir do exame da Tabela 2 onde

são mostrados os resultados obtidos em 3 experiências com animais machos e em 9 experiências com fêmeas, injetados com 0,8 mU de tireotrofina. 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 0,2 ml de TSH Bovino.\*

EXPERIÊNCIA nº	MACHOS	FÊMEAS
1	71,3	209,2
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 veio retro-orbital dos animais antes da administração do hormônio trófico (zero hora) e três horas após. Contagem em 10 minutos para cada amostra.

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

EXPERIÊNCIA nº	MACHOS		FÊMEAS	
	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>
1	424,9	183,8	510,5	153,3
2	132,9	42,9	250,1	127,5
3	179,1	66,0	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	136,0
9			388,5	158,2
Média	245,6	97,5	338,0	150,7

\* Utilizaram-se lotes de 6 a 10 camundongos machos e fêmeas. Cada valor expresso representa porcentual do valor inicial da radioatividade sanguínea dos camundongos (R<sub>1</sub>). A solução de TSH foi administrada intraperitonealmente e colheu-se sangue (100 µl) do veio 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.



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 pretratados, que recebiam 0,5 ml de solução fisiológica. A radioatividade medida às 3 e as 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 a resposta ao IATS ou TSH.

3. Efeitos nos animais pela administração de TSH

A Tabela 2 mostra os resultados pela administração de 0,8 mU de TSH exógeno expressos em porcento 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 Figura 1 estão representados os resultados das diversas experiências realizadas, incluindo-se as alterações da radiao-

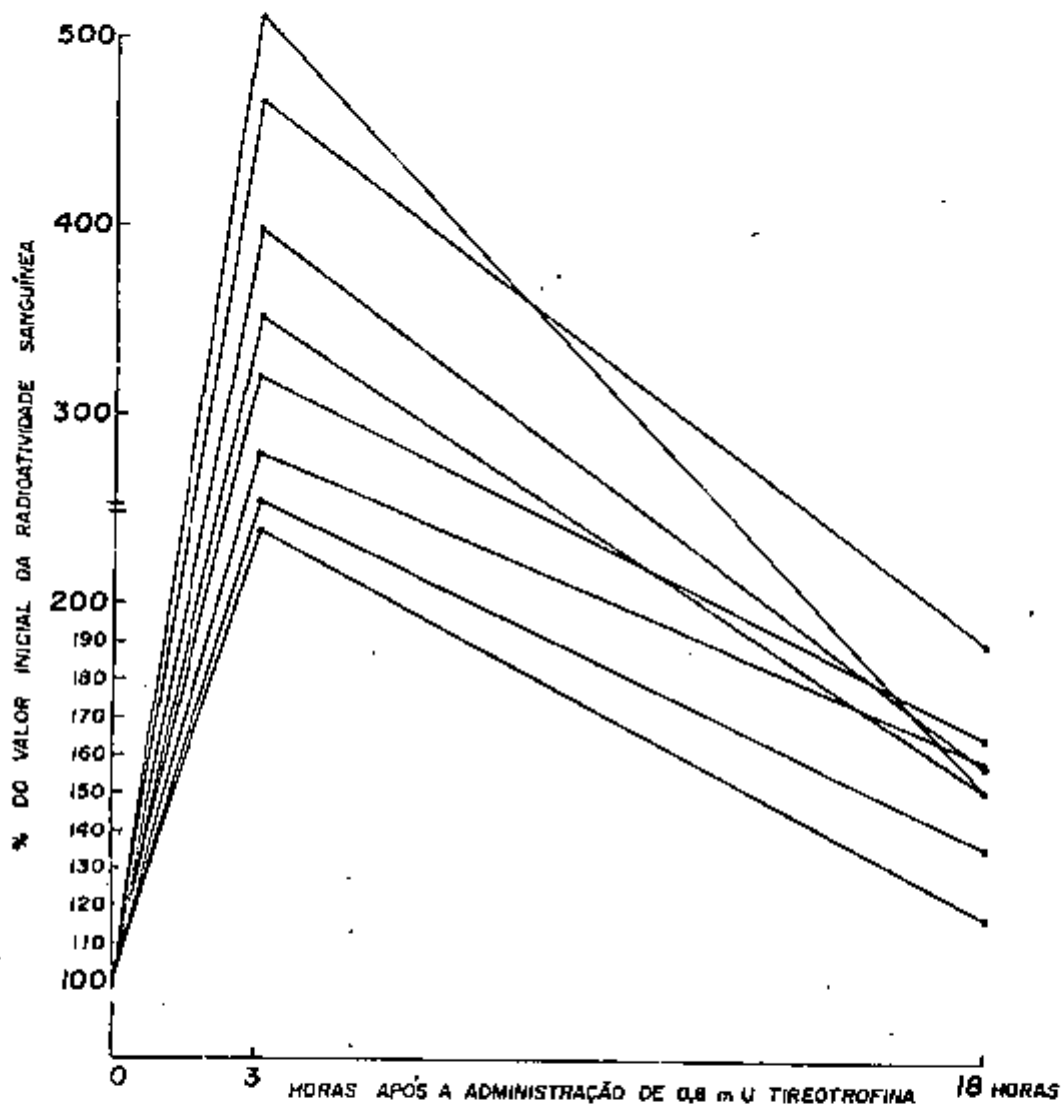


FIGURA 1. Resposta obtida pela administração de 0,8 mU de TSH bovino a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos fêmeas devidamente preparados. Os resultados estão expressos em porcento da contagem radioativa de 100  $\mu$ l de sangue de camundongos coletados às 3 e 18 horas após a administração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

tividade 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 por cento do valor inicial (zero hora) da radioatividade de variou entre 228,3% a 510,5% com uma média de 338,0% (Figura 1), revelando, assim grande variabilidade das respostas.

Quanto aos animais machos verificam-se que em 2 das três experiências as respostas sensivelmente menores que a média obtida nas experiências realizadas em fêmeas. Na experiência restante a resposta foi de boa magnitude. Essa variabilidade nos levou a preferir a utilização de animais fêmeas em todos os ensaios realizados.

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

Afim 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 0,4 ml de um mesmo soro possuidor de atividade de LATS por análises prévias. (2, 3).

A Tabela 3 mostra a média e os respectivos desvios padrões obtidos na contagem da radioatividade sanguínea dos animais testes. Verifica-se que para a dose de 0,1 , 0,2 e 0,4 ml de mesmo soro administrado houve um incremento relativamente bem proporcionado na

Tabela III - Relação dose-resposta obtida pela administração de soro possuidor da atividade de LATS. \*

VOLUME DE SORO INJETADO	0 HORA	3 HORAS	18 HORAS
0,1	3272 ±1592	4209 ±2326	14947 ±10677
0,2	3193 ±1648	5569 ±2914	27642 ±12512
0,4	4122 ±1793	11456 ± 9477	74189 ±54280

\* Médias das contagens em 10 minutos de 100 µl de sangue do camundongo com seus respectivos desvios padrões. Respostas obtidas em relação à quantidade de soro injetado no animal.

resposta exibida pelos animais ( Figura 2). Assim foram obtidas respostas de 456,8%, 866,2% e 1797,3%, respectivamente. A análise estatística demonstrou serem altamente significantes a níveis de  $p < 0,01$  as respostas obtidas nas 3 experiências considerando de 18 horas em relação a zero hora ( $R_3$ ).

Nesse soro, em particular, já se evidenciava uma resposta precoce às 3 horas, estatisticamente significativa ( Tabela 4). A Figura 2 mostra a relação dose-resposta obtida.

##### 5. Reprodutibilidade nas amostras obtidas pela administração de um mesmo soro possuidor de atividade de IATS

Um mesmo soro ensaiado por 5 vezes em dias diferentes. Utilizaram-se nessas experiências 0,1 ml de soro por animal. Os resultados obtidos nessas experiências são mostrados na Tabela 5. 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 resposta média de 517,1%  $\pm$  101,0 com um erro padrão de 45,45.

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

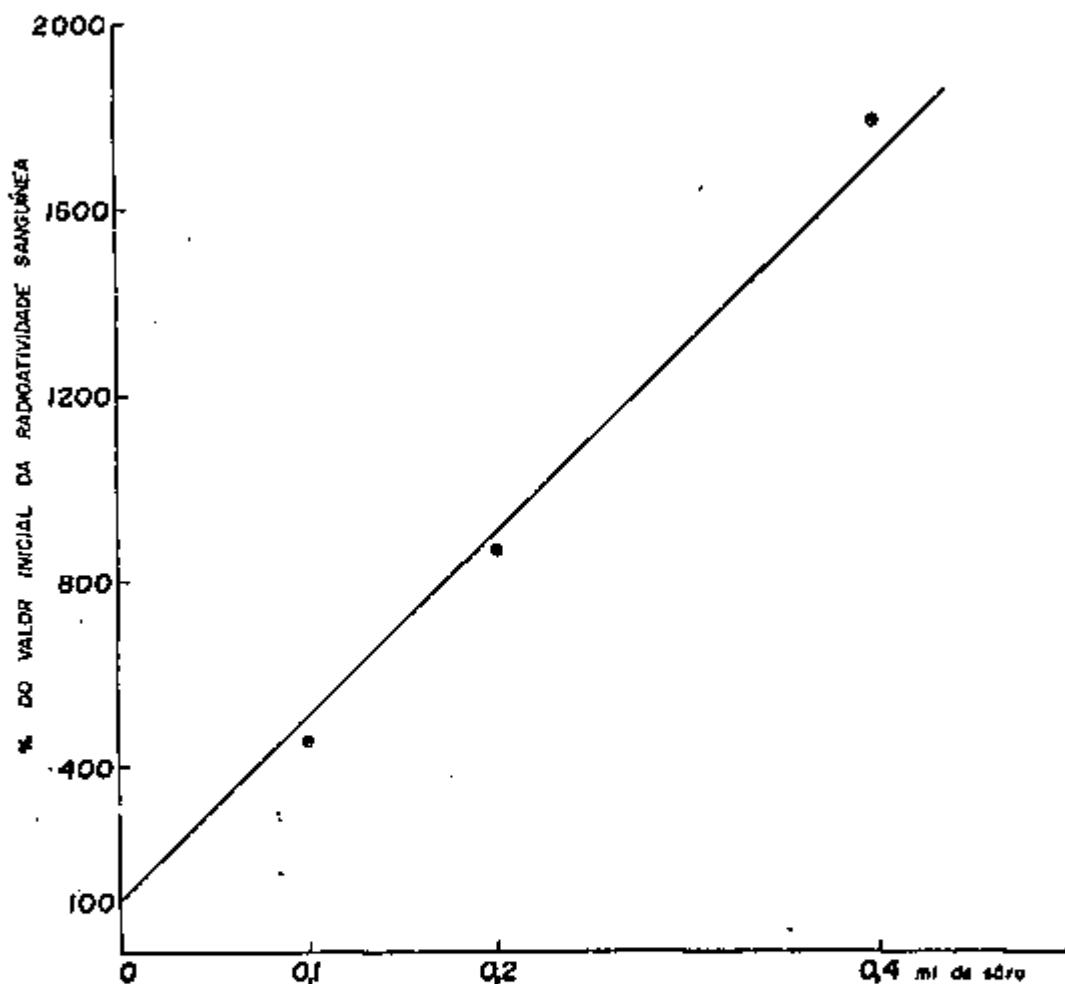


FIGURA 2. Respostas obtidas em relação à quantidade de soro administrada a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos devidamente preparados. Os resultados estão expressos em percento da contagem radioativa de 100  $\mu$ l de sangue de camundongos coletados às 3 e 18 horas após a administração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

Tabela IV - Relação dose-resposta obtida pela administração de soro possuidor de atividade de IATPS.\*

VOLUME DE SORO INJETADO	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
0,1	128,5 0,02 > p > 0,05	355,0 p < 0,01	456,8 p < 0,01
0,2	174,5 p < 0,01	496,3 p < 0,01	866,0 p < 0,01
0,4	278,0 0,02 > p > 0,05	646,6 p < 0,01	1797,3 p < 0,01

\* Níveis de respostas obtidas em relação à quantidade de soro injetado no camundongo expresso em porcento do valor inicial da radioatividade sanguínea. O incremento da radioatividade do sangue do camundongo verificado às 3 e 18 horas após a administração do soro a ser ensaiado foi submetido a análise estatística e os níveis de significância encontram-se expressos na tabela.

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

EXPERIÊNCIA nº	3 hs/0 h (R <sub>1</sub> )	18 hs/3 hs (R <sub>2</sub> )	18 hs/0 h (R <sub>3</sub> )
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
Média	123,6	426,1	517,1
Desvio Padrão	± 27,9	± 56,0	± 101,0
Erro Padrão	12,5	25,2	45,45

\* Resultados de 5 ensaios obtidos pela administração de 0,1 ml 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 porcento 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).



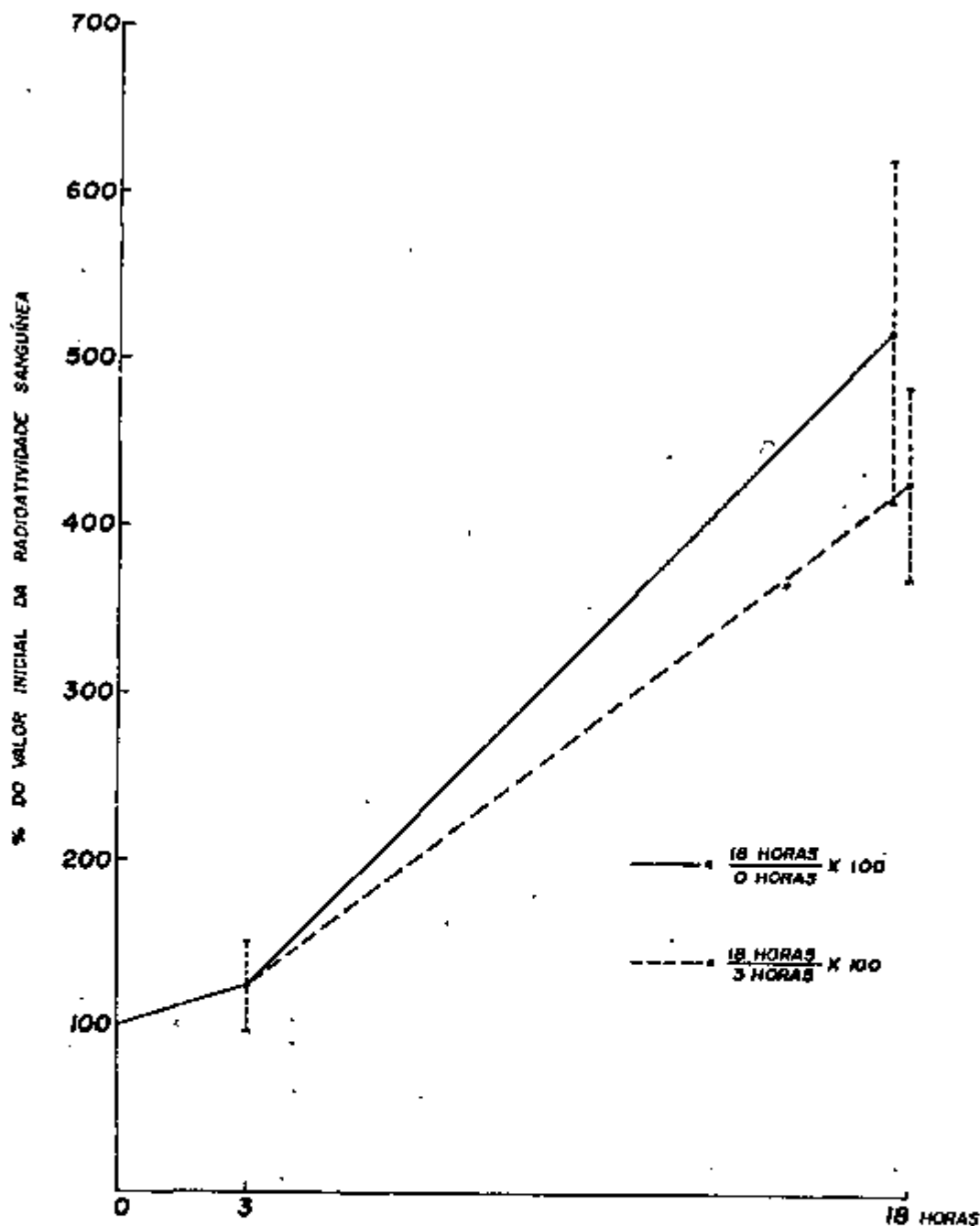


FIGURA 3. Média e respectivo desvio padrão das respostas de 5 experiências obtida de um mesmo soro sabidamente portador de atividade de de LATS. Administrou-se a cada animal 0,1 ml de soro de lotes de 6 a 10 animais devidamente preparados. Os resultados estão expressos em porcento da contagem radioativa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

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

Foram ensaiados 42 sôros provenientes de 40 pacientes com doença de Graves. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6, em ordem decrescente da magnitude das respostas de 18 horas expressa em porcentagem 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 de 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 obtidas 30% de casos positivos nos pacientes portadores de doença de Graves.

O nível de positividade variou amplamente desde 150% a 1.797,3%. Seguindo os trabalhos de McKenzie (46) os ensaios positivos foram divididos em 2 subgrupos: um cujo incremento foi maior que 300% da atividade inicial (ensaios nº 1 a 5) e considerados como possuidores de grandes quantidades de LATS (Figura 4) e o outro cujo incremento foi menor que 300% (pacientes nº 6 a 13), portanto, com quantidade moderada de LATS (Figura 5).

Pela aplicação do teste t às 42 experiências realizadas verificou-se que (tabela 5) os incrementos observados foram esta

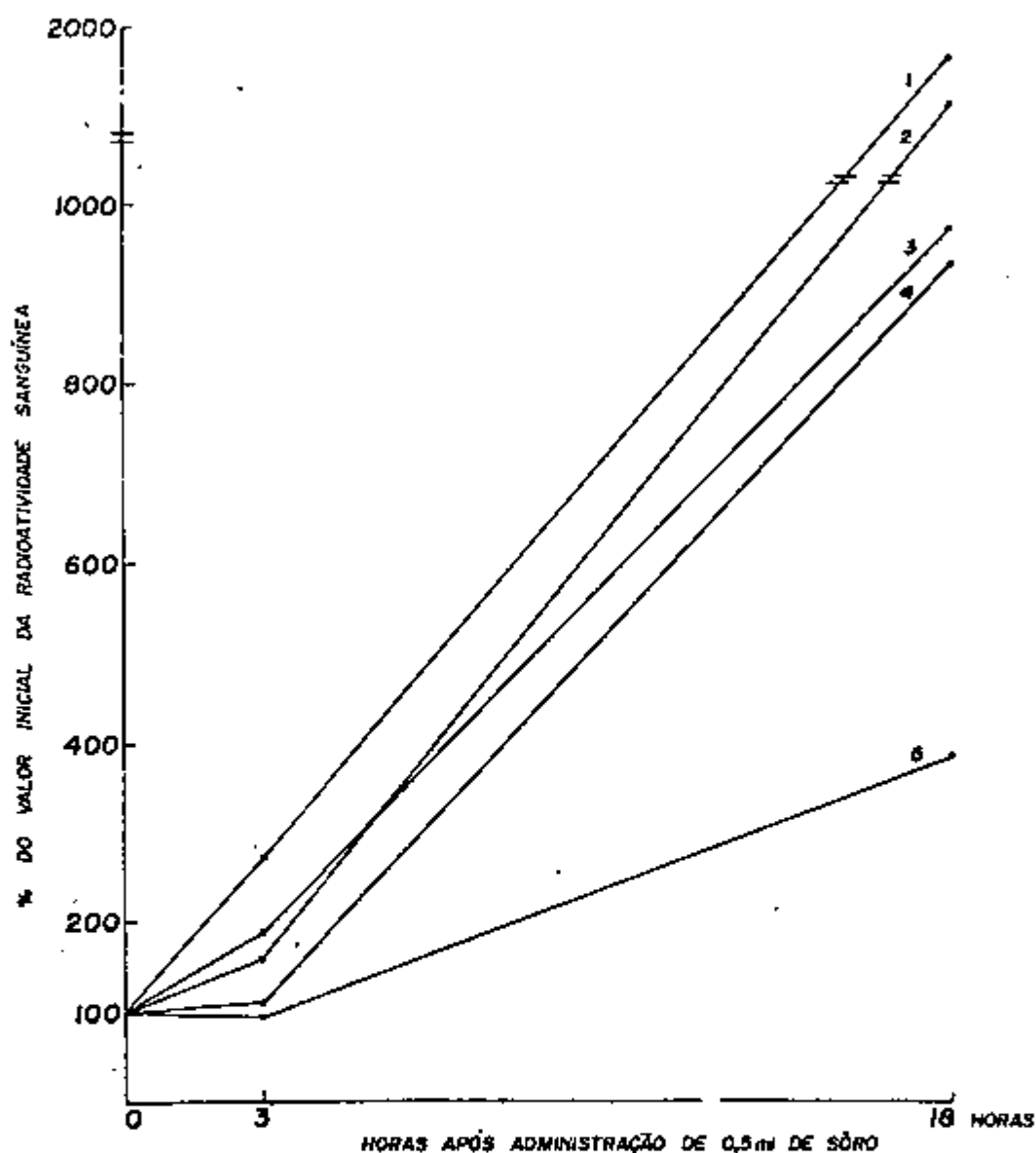


FIGURA 4. Cinco experiências com resposta fortemente positivas de atividade de LATS ( $> 300$  % da atividade inicial). Administrou-se 0,5 ml de soro de paciente portador de doença de Graves a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos devidamente preparados. Os resultados estão expressos em porcento 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).

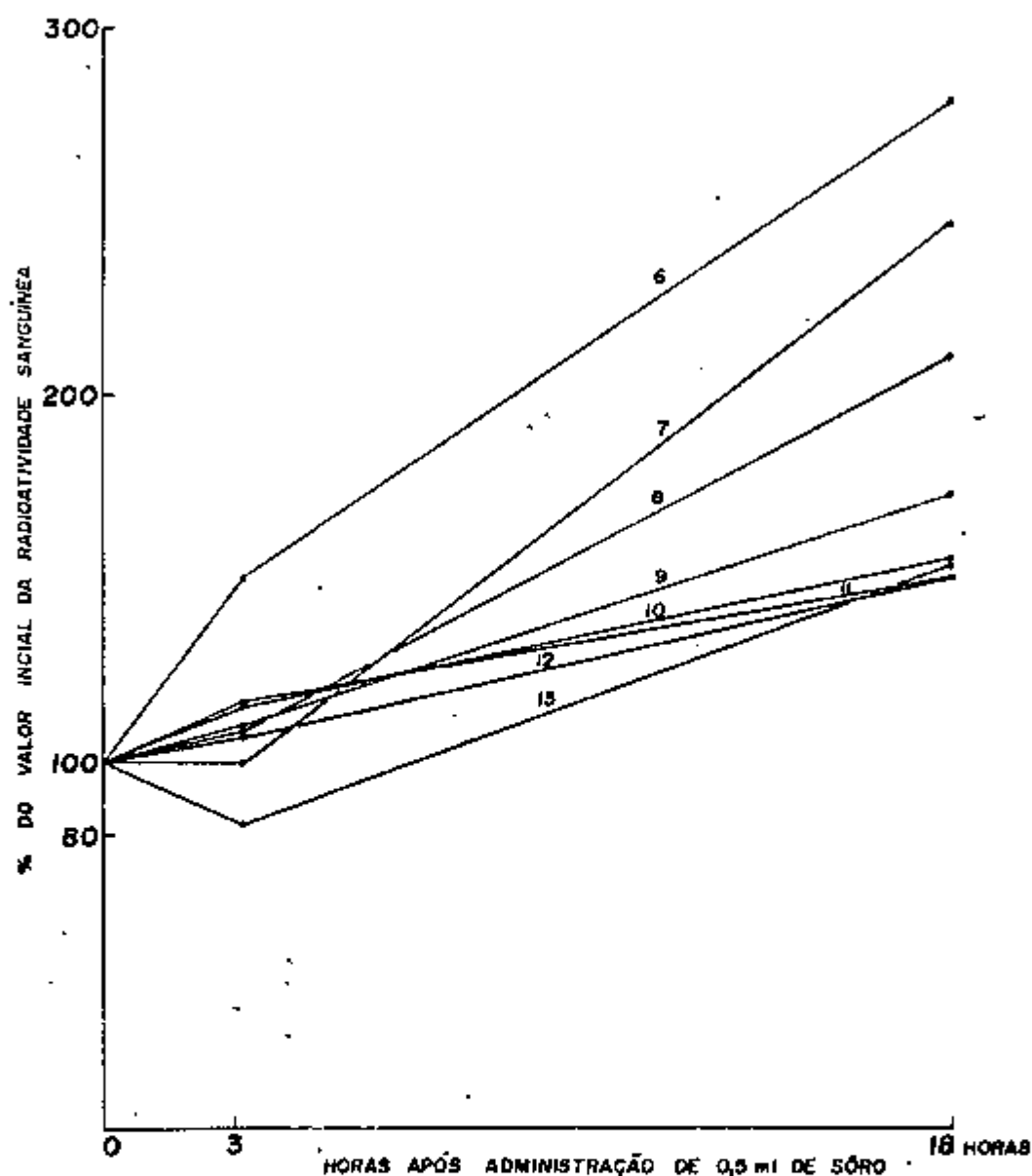


FIGURA 5. Oito experiências com respostas moderadamente positivas de atividade LATS (<300% da atividade inicial). Administrou-se 0,5 ml de soro de paciente portador da moléstia de Graves a cada um dos animais dos lotes de 6 a 10 camundongos devidamente preparados. Os resultados estão expressos em porcento 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).

tisticamente significantes em 18 ocasiões correspondentes a 16 pacientes (ensaios de nº 1 a 5 e nºs. 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 porcentual, 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) (vide apêndice).

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 nº 1 a 11 e nº 14, 17 e 26).

1.

Tabela VI - Resultados obtidos no ensaio de 42 sôros de pacientes portadores de doença de Graves.\*

NÚMERO	PACIENTE	horas da retirada do sangue do animal após a administração do sôro					
		zero hora	3 horas		18 horas		R <sub>3</sub>
		contagem em 10'	contagem em 10'	R <sub>1</sub>	contagem em 10'	R <sub>2</sub>	
1	IIP	4122	11456	278,0 0,05 > p > 0,02	74189	646,6 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	IIP	2967	5817	196,0 0,2 > p > 0,1	28674	492,8 0,05 > p > 0,02	966,0 0,05 > p > 0,02
4	SA	2803	3042	108,0 0,1 > p > 0,05	26400	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	13061	412,9 p < 0,01	391,8 p < 0,01
6	DC	6541	9888	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	100,0 0,9 > p > 0,8	11721	245,5 p < 0,05	246,2 0,07 > p > 0,01

2.

NÚMERO	PACIENTE	horas da retirada do sangue do animal após a administração do soro					
		zero hora	3 horas		18 horas		$R_3$
		contagem em 10'	contagem em 10'	$R_1$	contagem em 10'	$R_2$	$R_3$
8	JG	2697	2933	108,7 0,8 > p > 0,7	5670	193,3 0,05 > p > 0,02	210,3 0,2 > p > 0,1
9	JT	9879	10887	100,7 0,5 > p > 0,4	17123	158,0 p < 0,01	173,3 p < 0,01
10	ZSS	3214	2918	85,4 p > 0,9	5230	179,2 0,02 > p > 0,01	162,7 0,05 > p > 0,02
11	KH	4787	5581	116,5 0,05 > p > 0,02	7435	133,0 0,02 > p > 0,01	155,3 p < 0,01
12	IES	3670	3919	106,8 0,3 > p > 0,2	5493	140,1 0,2 > p > 0,1	150,3 0,1 > p > 0,05
13	AAS	2913	3407	116,9 0,1 > p > 0,05	4362	128,0 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	6528	7468	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	158,5 0,05 > p > 0,02	137,6 0,9 > p > 0,8

3.

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>
17	MOL	4996	4856	97,1 0,9 > p > 0,8	6843	140,9 p < 0,01	136,9 0,02 > p > 0,01
18	ZMF	3850	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
22	JB	6917	8280	119,7 0,2 > p > 0,1	8584	103,6 0,6 > p > 0,7	124,1 0,02 > p > 0,01
23	MJM	9086	10677	114,0 0,6 > p > 0,5	11134	100,6 0,9 > p > 0,8	122,5 0,05 > p > 0,02
24	MFS	2841	3455	121,6 0,2 > p > 0,1	3479	100,6 0,4 > p > 0,3	122,4 0,02 > p > 0,01
25	GL	7652	8567	111,9 0,1 > p > 0,05	9115	106,3 0,5 > p > 0,4	119,1 0,5 > p > 0,4



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>
26	SFD	6667	5819	87,2 0,8 > p > 0,7	7980	136,2 p < 0,01	118,9 0,02 > p > 0,01
27	CS	8099	7633	94,2 0,4 > p > 0,3	9496	124,4 0,02 > p > 0,01	117,2 0,2 > p > 0,1
28	BC	3224	3072	95,3 0,9 > p > 0,8	3763	122,5 0,5 > p > 0,4	116,7 0,2 > p > 0,1
29	MASS	8360	10922	130,6 0,1 > p > 0,05	9690	88,7 0,9 > p > 0,8	116,0 0,02 > p > 0,01
30	MIN	3536	3241	91,6 0,9 > p > 0,8	4055	125,1 0,2 > p > 0,1	114,7 0,4 > p > 0,3
31	MASS	9267	8934	96,4 0,4 > p > 0,3	10619	118,8 0,2 > p > 0,1	114,5 0,4 > p > 0,2
32	MWC	3464	3235	93,3 0,5 > p > 0,4	3850	118,7 0,4 > p > 0,3	112,6 0,1 > p > 0,05
33	IAS	4716	4111	87,2 0,9 > p > 0,8	5125	121,9 0,2 > p > 0,1	108,6 0,6 > p > 0,5
34	MND	2141	1498	73,4 0,7 > p > 0,6	2278	151,9 0,05 > p > 0,02	106,4 0,4 > p > 0,3

NÚMERO PACIENTE	horas de 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>
35	5441	4187	78,3 0,9 > p > 0,8	5625	134,1 0,02 > p > 0,01	104,1 0,4 > p > 0,3
36	7143	7009	98,1 0,8 > p > 0,7	7297	104,1 0,6 > p > 0,5	102,1 0,9 > p > 0,8
37	3463	2988	86,5 0,7 > p > 0,6	3284	109,9 0,4 > p > 0,3	99,7 0,5 > p > 0,4
38	5157	4732	91,7 0,9 > p > 0,8	4983	105,0 0,3 > p > 0,2	96,6 0,8 > p > 0,7
39	5977	5236	87,7 0,7 > p > 0,6	5625	108,7 0,6 > p > 0,5	95,2 0,8 > p > 0,7
40	4822	4992	103,5 0,7 > p > 0,6	4577	93,7 0,7 > p > 0,6	94,9 0,8 > p > 0,7
41	5623	5019	89,4 0,5 > p > 0,4	4567	91,7 0,7 > p > 0,6	81,2 0,8 > p > 0,7
42	4160	3346	80,4 0,9 > p > 0,8	3346	100,0 0,8 > p > 0,7	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 ho-  
ras ; R<sub>3</sub> relação da radioatividade entre 18 horas/0 hora. Cada R é acompanhado do resultado obtido pela  
aplicação do teste t entre as contagens relacionadas, a fim de se determinar o grau de significância dos  
incrementos da radioatividade do sangue do camundongo.

## CAPÍTULO IV

## DISCUSSÃO

Afim de verificar a possível utilização indiscriminada de animais de ambos os sexos foram feitas experiências para estimar a responsividade dos animais. Embora sem conclusão definitiva, devido ao pequeno número de ensaios realizados, preferiu-se utilizar animais fêmeas tendo em vista o melhor nível de resposta obtido nestas últimas. Nos dados fornecidos pela literatura observa-se também maior preferência pelo uso de fêmeas não obstante alguns utilizassem com bons resultados animais machos (51, 56). Nesses trabalhos nenhuma referência é feita as possíveis diferenças de respostas entre os dois sexos.

A sensibilidade dos animais é variável como pode ser verificado nas experiências catalogadas no apêndice deste trabalho. A falta de padrão de LAIS torna impossível a construção de uma curva de referência. Usa-se normalmente, afim de assegurar bom procedimento durante as experiências um lote controle injetado com TSH bovino ao qual

os camundongos respondem satisfatoriamente (14, 26, 31, 43, 50). A sensibilidade dos animais ao TSH bovino relatada nos diversos trabalhos varia grandemente. É freqüente observarem-se falhas de respostas às doses pequenas (43, 50) tais como 0,05 mU e 0,2 mU.

No presente trabalho verifica-se que os animais não responderam de modo nítido à administração de 0,2 mU de TSH ; a resposta a 0,8 mU desse hormônio mostrou ser mais constante.

A supressão do TSH endógeno do animal teste inicia-se logo após a administração do iodo radioativo é, geralmente, feita injetando-se  $L-T_4$  por vários dias (4 a 5) (9, 14, 17, 26, 43, 58) e adicionando-se à alimentação, tireóide dessecada. Bowers e col. (13) utilizaram em suas preparações biológicas a  $T_3$  como supressor do hormônio trófico no que foram seguidos por Furth e col. (25). 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 (31, 53). Em alguns trabalhos, no entanto, é relatada pequena resposta positiva (16, 32) 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, de sôros de pacientes que mostrem títulos elevados do ativador, utilizando-os para testes de reprodutibilidade e de níveis de respostas em relação à dose administrada. Neste último teste (26, 32, 33), verificou-se linearidade satisfatória das respostas em relação às doses administradas fato que concorda com os dados obtidos na literatura.

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

Os níveis de resposta positiva que se dava considerar como indicativo de atividade de IATS é variável desde 118% a 200%, de acordo com os diversos trabalhos (14, 18, 22, 27, 28, 30, 54).

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 porcentagem de sôros IATS positivos quando se compara o número de pacientes considerados possuidores de IATS 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 sôros de pacientes com doença de Graves que deveriam ser considerados como "IATS 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 da atividade de IATS.

A aplicação da teste t de Student (12), no entanto, leva às vezes à não obtenção de significância em ensaios com  $R_3$  evidentemente aumentados como sucedeu em 3 ocasiões (ensaios nº6, 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.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES

1. O método para a avaliação da atividade de IATS apresenta características razoavelmente boa para que seja aplicado correntemente na investigação clínica.

Houve reprodutibilidade razoável e boa correlação entre a quantidade de soro ensaiado e as respostas obtidas.

2. O ensaio de 42 séros de pacientes portadores de moléstia de Graves mostrou positividade de IATS em 40% dos casos quando se aplica o teste t para verificação da significância das respostas obtidas nos animais, independentemente, dos incrementos de radioatividade obtidos entre zero e 18 horas.

Quando se considera, como resposta positiva aquela obtida às 18 horas igual ou maior que 150% da atividade radioisotópica inicial do sangue do camundongo, a porcentagem dos pacientes possui

dores de atividade de LATS foi apenas de 30%.

O encontro de indivíduos portadores de molés-  
tias de Graves que apresentam positividade de LATS poderá, possivelmente,  
aumentar a medida que se possa concentrar o sôro a ser ensaiado sem au-  
mentar a sua atividade tóxica.



## CAPÍTULO VI

## 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 tireoidiano de ação prolongada" - (LATS) nos sôros de pacientes portadores de doença de bôcio difuso tóxico acompanhadas de exoftalmo não progressivo (doença de Graves).

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

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

1. cálculo em por cento do valor da radioatividade inicial obtida na contagem do sangue do animal 18 horas após a administração do sôro de paciente. Consideraram-se como positivos os ensaios cuja porcentagem do valor inicial da radioativi

dade 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 de 40% de positivities para a presença de LAIS, em 42 sôros ensaiados, provenientes de 40 pacientes com doença de Graves.

## APÊNDICE

## Observação

$t_1$  = valor de  $t$  quando se comparam as contagens das 3 horas e 0 hora.

$t_2$  = valor de  $t$  quando se comparam as contagens das 18 horas e 0 hora.

$t_3$  = valor de  $t$  quando se comparam as contagens das 18 horas e 3 horas.

APÊNDICE Apresentação manuciosa dos protocolos das experiências realizadas com 42 sôros de pacientes portadores de moléstia de Graves.

ENSAIO	período após a administração do sôro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	2506	19919	91849
2	6649	36332	177288
3	1654	3248	36666
4	3284	10204	85699
5	5330	10298	154808
6	3853	12500	54308
7	6767	5987	40437
8	2141	2676	9444
9	4962	8872	55332
10	4076	13532	36059
MÉDIA	4122	11456	74189
D. PADRÃO	1793	9477	54280
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 2,6894$	$0,05 > p > 0,02$	$R_1 = 278,0$	
$t_2 = 4,185$	$p < 0,01$	$R_2 = 646,6$	
$t_3 = 4,199$	$p < 0,01$	$R_3 = 1.797,3$	

Ensaio do sôro de paciente ITP, portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 10 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5ml de sôro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do sôro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa: a nível de  $p < 0,01$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	14233	32603	313119
2	2947	5844	117147
3	5990	8171	74710
4	5607	6729	71738
5	17832	20068	193816
6	4653	4961	31236
7	5153	11732	73679
MÉDIA	8059	12872	125063
D.PADRÃO	5628	10117	94448
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 2,0218$	$0,1 > p > 0,05$	$R_1 = 159,7$	
$t_2 = 3,3775$	$0,02 > p > 0,01$	$R_2 = 971,0$	
$t_3 = 3,3248$	$0,02 > p > 0,01$	$R_3 = 1.552,0$	

Ensaio do soro de paciente CAS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 7 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,02$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	2319	2043	22210
2	5738	14187	40502
3	2811	2415	10091
4	1139	997	4041
5	1572	905	5673
6	1057	730	14360
7	3023	5486	46477
8	764	553	3889
9	8284	25045	110827
MÉDIA	2967	5817	28674
D. PADRÃO	2504	8415	34547
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 1,4298$	$0,2 > p > 0,1$	$R_1 = 196,0$	
$t_2 = 2,5634$	$0,05 > p > 0,02$	$R_2 = 492,8$	
$t_3 = 2,3907$	$0,05 > p > 0,02$	$R_3 = 966,0$	

Ensaio do soro de paciente ITP portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 9 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LAITS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,05$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	5266	5769	40977
2	3871	4289	36716
3	2123	2271	36182
4	1583	1691	11465
5	1175	1181	6661
MÉDIA	2803	3042	26400
D.PADRÃO	1719	1927	16025
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 2,516$	$0,1 > p > 0,05$	$R_1 = 108,9$	
$t_2 = 3,608$	$0,05 > p > 0,02$	$R_2 = 871,0$	
$t_3 = 3,603$	$0,05 > p > 0,02$	$R_3 = 945,0$	

Ensaio de soro de paciente SA portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 5 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,05$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	2243	2346	16408
2	1016	1021	4614
3	10400	9187	25946
4	1860	1551	9997
5	3354	3309	13891
6	1132	1887	7542
MÉDIA	3334	3183	13061
D. PADRÃO	3564	3044	7606
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,623$	$0,6 > p > 0,5$	$R_1 = 95,4$	
$t_2 = 4,875$	$p < 0,01$	$R_2 = 413,0$	
$t_3 = 5,189$	$p < 0,01$	$R_3 = 391,8$	

Ensaio do soro de paciente JF portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,05$ .

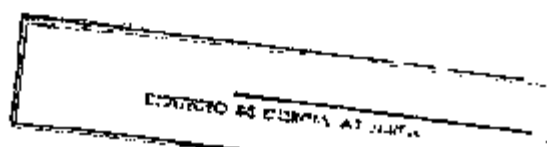


ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	10759	19880	42466
2	4888	8078	18271
3	1535	1608	3102
4	3921	3407	7836
5	6925	7415	9824
6	11222	18943	28521
MÉDIA	6541	9888	18336
D.PADRÃO	3860	7768	14837
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 1,973$	$0,2 > p > 0,1$	$R_1 = 151,2$	
$t_2 = 2,649$	$0,05 > p > 0,02$	$R_2 = 185,0$	
$t_3 = 2,4686$	$0,1 > p > 0,05$	$R_3 = 280,0$	

Ensaio do soro de paciente DC portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,05$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	9971	10080	20445
2	6173	6226	16107
3	4730	4375	14534
4	2286	4287	10625
5	2637	1390	3255
6	2746	2165	5361
MÉDIA	4760	4753	11721
D. PADRÃO	2962	3127	6581
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,419$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 100,0$	
$t_2 = 4,013$	$0,02 > p > 0,01$	$R_2 = 245,5$	
$t_3 = 4,533$	$p < 0,01$	$R_3 = 246,2$	

Ensaio do soro de paciente DSL portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,02$ .



ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	1816	1503	3265
2	2418	2143	3822
3	3853	5154	9223
MÉDIA	2697	2933	5670
D.PADRÃO	1049	1949	3077
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,445$	$0,8 > p > 0,7$	$R_1 = 108,7$	
$t_2 = 3,890$	$0,05 > p > 0,02$	$R_2 = 193,3$	
$t_3 = 2,446$	$0,2 > p > 0,1$	$R_3 = 210,3$	

Ensaio do soro de paciente JG portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 3 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de 0 hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem de 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	7256	7318	12086
2	3848	4245	11556
3	15324	15038	22138
4	9848	9490	15971
5	15223	14976	25672
6	9230	17406	20673
7	8490	7441	11567
MÉDIA	9879	10887	17123
D. PADRÃO	4163	4939	5736
teste t	significância		por cento do valor inicial
$t_1 = 0,836$	0,5 > p > 0,4		$R_1 = 100,7$
$t_2 = 6,673$	p < 0,01		$R_2 = 158,0$
$t_3 = 6,553$	p < 0,01		$R_3 = 173,3$

Ensaio do soro de paciente JT portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 7 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	1435	2313	3534
2	3450	2803	4729
3	2789	2105	3756
4	2862	2547	3877
5	2536	2309	7438
6	6217	5434	8050
MÉDIA	3214	2918	5230
D. PADRÃO	1612	1255	1997
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,1179$	$p > 0,9$	$R_1 = 85,4$	
$t_2 = 3,859$	$0,02 > p > 0,01$	$R_2 = 179,2$	
$t_3 = 3,327$	$0,05 > p > 0,02$	$R_3 = 162,7$	

Ensaio do soro de paciente ISS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,05$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	3742	5849	5804
2	3225	3561	5517
3	5106	5716	8949
4	6870	7600	9335
5	4448	4973	5803
6	5335	5787	9203
MÉDIA	4787	5581	7435
D. PADRÃO	1295	1315	1898
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 2,558$	$0,05 > p > 0,02$	$R_1 = 116,5$	
$t_2 = 3,381$	$0,02 > p > 0,01$	$R_2 = 133,0$	
$t_3 = 6,426$	$p < 0,01$	$R_3 = 155,3$	

Ensaio do soro de paciente KH portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	6186	7466	9402
2	2686	2778	3260
3	4905	4834	9915
4	2642	2501	4671
5	2093	2291	2488
6	3412	3695	3224
MÉDIA	3654	3919	5493
D. PADRÃO	1609	1972	3306
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 1,270$	$0,3 > p > 0,2$	$R_1 = 106,9$	
$t_2 = 1,935$	$0,2 > p > 0,3$	$R_2 = 140,1$	
$t_3 = 2,260$	$0,1 > p > 0,05$	$R_3 = 150,3$	

Ensaio do soro de paciente LES portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos, devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativo.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl. de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	2116	2520	2588
2	3852	5075	6925
3	2230	2952	3747
4	2974	3146	3449
5	3394	3346	5106
MÉDIA	2913	3407	4364
D. PADRÃO	744	980	1693
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 2,224$	$0,1 > p > 0,05$	$R_1 = 116,9$	
$t_2 = 2,607$	$0,1 > p > 0,05$	$R_2 = 128,0$	
$t_3 = 3,017$	$0,05 > p > 0,02$	$R_3 = 150,0$	

Ensaio do soro de paciente AAS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 5 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é positiva quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtido a 18 horas após a administração do soro a ser analisado, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativo a nível de  $p < 0,05$ .



ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	1487	1136	2316
2	3429	3087	5236
3	1635	1338	2217
4	2591	1930	4116
5	4178	4322	5385
6	942	622	1165
MÉDIA	2377	2072	3405
D. PADRÃO	1248	1387	1754
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,289$	$0,8 > p > 0,7$	$R_1 = 87,1$	
$t_2 = 4,795$	$p < 0,01$	$R_2 = 164,3$	
$t_3 = 4,223$	$p < 0,01$	$R_3 = 143,2$	

Ensaio do soro de paciente AN portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação aquela da zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	10460	15893	14365
2	4703	3752	6185
3	9270	10754	12713
4	7174	7571	10144
5	1443	1249	1635
6	6121	5593	10436
MÉDIA	6528	7968	9246
D. PADRÃO	3248	5249	4642
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,977$	$0,4 > p > 0,5$	$R_1 = 114,4$	
$t_2 = 2,015$	$0,1 > p > 0,05$	$R_2 = 123,6$	
$t_3 = 4,218$	$0,05 > p > 0,02$	$R_3 = 141,6$	

Ensaio do soro de paciente IAA portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtido a 18 horas após a administração do soro a ser analisado, em relação àquela de zero hora, mostrou estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	6602	5033	6487
2	9397	6630	6929
3	4539	4759	5914
4	6041	3769	3141
5	2742	3078	4697
6	7017	6183	7687
7	2847	4574	5075
<b>MÉDIA</b>	5597	4860	7704
<b>D. PADRÃO</b>	2397	1249	1531
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 1,220$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 86,8$	
$t_2 = 2,704$	$0,05 > p > 0,02$	$R_2 = 158,6$	
$t_3 = 0,136$	$0,9 > p > 0,8$	$R_3 = 137,6$	

Ensaio do soro de paciente EAT portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 7 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, não mostrou ser estatisticamente significante.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	5537	5397	7034
2	8449	8329	10309
3	4179	4317	7062
4	2789	2279	3704
5	4030	3961	5115
MÉDIA	4997	4856	6844
D.PADRÃO	2161	2241	2864
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,134$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 97,1$	
$t_2 = 4,317$	$0,02 > p > 0,01$	$R_2 = 140,9$	
$t_3 = 5,426$	$p < 0,01$	$R_3 = 136,9$	

Ensaio do soro de paciente MOL portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 5 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	1737	1875	2180
2	2266	1975	2776
3	2560	2097	2612
4	3222	2574	2832
5	2354	2139	2579
6	2861	1860	3093
7	8161	8428	8357
8	7735	9698	17105
9	3762	2293	3355
MÉDIA	3850	3659	5098
D.PADRÃO	2396	3087	4871
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,590$	$0,6 > p > 0,5$	$R_1 = 95,0$	
$t_2 = 1,892$	$0,1 > p > 0,05$	$R_2 = 140,0$	
$t_3 = 1,223$	$0,3 > p > 0,2$	$R_3 = 132,4$	

Ensaio do soro de paciente ZMF portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 9 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	4547	3097	2643
2	9995	9272	10833
3	6330	3493	8017
4	6636	6962	8895
5	10092	11360	21608
6	2282	1581	1446
MÉDIA	6647	5960	8807
D. PADRÃO	3054	3862	7221
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,11852$	$p > 0,9$	$R_1 = 94,5$	
$t_2 = 1,8065$	$0,1 > p > 0,05$	$R_2 = 149,4$	
$t_3 = 1,1545$	$0,4 > p > 0,3$	$R_3 = 134,1$	

Ensaio do soro de paciente MSS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou  $0,5 \text{ ml}$  de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade do LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àque-la de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ e $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	3695	4736	10717
2	3725	4431	7792
3	20510	19972	15666
4	5674	6998	9993
MÉDIA	8401	9034	11042
D.PADRÃO	8125	7381	3324
teste 5	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 1,5432$	$0,3 > p > 0,2$	$R_1 = 107,5$	
$t_2 = 0,9096$	$0,5 > p > 0,4$	$R_2 = 122,5$	
$t_3 = 1,0224$	$0,4 > p > 0,3$	$R_3 = 131,4$	

Ensaio do soro de paciente MM portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 4 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração de soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	2380	3540	2954
2	3181	2514	4706
3	2326	1096	2326
4	1323	2001	1856
5	1111	1119	1070
MÉDIA	2064	2054	2582
D. PADRÃO	847	1026	1371
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,235$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 99,4$	
$t_2 = 1,0275$	$0,4 > p > 0,3$	$R_2 = 125,7$	
$t_3 = 1,8331$	$0,2 > p > 0,1$	$R_3 = 125,4$	

Ensaio do soro de paciente MJC portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 5 camundongos devidamente preparados (vide metodologia), aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.



ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	4646	3063	8686
2	3050	2244	3833
3	12060	12081	15917
4	5404	5319	7027
5	9255	7586	9066
6	20101	32830	22277
MÉDIA	9086	10687	11134
D. PADRÃO	6323	11365	6745
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,7154$	$0,6 > p > 0,5$	$R_1 = 114,0$	
$t_2 = 0,1974$	$0,9 > p > 0,8$	$R_2 = 100,6$	
$t_3 = 2,9940$	$0,05 > p > 0,02$	$R_3 = 122,5$	

Ensaio do soro de paciente MJM portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LAIS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,05$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^3$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	4778	4644	5253
2	5298	7271	6738
3	3112	4127	3761
4	1411	1937	1879
5	1280	1345	1665
6	1167	1410	1583
MÉDIA	2841	3455	3479
D.PADRÃO	1851	2339	2158
: teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 1,9392$	$0,2 > p > 0,1$	$R_1 = 121,6$	
$t_2 = 0,1379$	$0,9 > p > 0,8$	$R_2 = 100,6$	
$t_3 = 3,8828$	$0,02 > p > 0,01$	$R_3 = 122,4$	

Ensaio do soro de paciente MRS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,02$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	9749	9594	11393
2	3547	1746	3653
3	5573	4576	6629
4	7945	6770	8543
5	8207	8240	10914
6	4985	3943	6449
MÉDIA	6667	5819	7930
D. PADRÃO	2335	2914	2947
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,305$	$0,8 > p > 0,7$	$R_1 = 87,2$	
$t_2 = 13,889$	$p < 0,01$	$R_2 = 136,2$	
$t_3 = 3,417$	$0,02 > p > 0,01$	$R_3 = 118,9$	

Ensaio do soro de paciente SFD portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, mostrou ser estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,02$ .

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	6772	6916	9441
2	8565	8095	10674
3	3523	3215	3279
4	11789	11373	11866
5	12769	10063	12105
6	5576	6139	9611
MÉDIA	8099	7633	9496
D.PADRÃO	3631	2911	3239
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,955$	$0,4 > p > 0,3$	$R_1 = 94,2$	
$t_2 = 3,461$	$0,02 > p > 0,01$	$R_2 = 124,2$	
$t_3 = 1,756$	$0,2 > p > 0,1$	$R_3 = 117,2$	

Ensaio do soro de paciente CS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativo quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	6309	5632	5566
2	1423	1681	1741
3	2280	1980	3537
4	3835	3942	3713
5	2357	2406	3468
6	3137	2795	4554
MÉDIA	3224	3072	3763
D. PADRÃO	1720	1480	1275
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,243$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 95,3$	
$t_2 = 0,610$	$0,5 > p > 0,4$	$R_2 = 122,5$	
$t_3 = 2,007$	$0,2 > p > 0,1$	$R_3 = 116,7$	

Ensaio do soro de paciente BC, portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 8 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	2321	2013	2862
2	1953	1616	2408
3	849	777	861
4	1082	955	1702
5	994	756	132
6	6874	6583	11072
7	885	1273	1065
8	13330	11961	12340
MÉDIA	3536	3242	4055
D. PADRÃO	4436	4012	4812
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,169$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 91,6$	
$t_2 = 1,462$	$0,2 > p > 0,1$	$R_2 = 125,1$	
$t_3 = 0,913$	$0,4 > p > 0,3$	$R_3 = 114,7$	

Ensaio do soro de paciente MIN portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 8 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do sôro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	5579	5965	6424
2	29438	30545	34824
3	6027	5644	7252
4	12793	12673	13456
5	3188	2522	2693
6	4297	2385	3242
7	3558	2808	3442
MÉDIA	9267	8934	10619
D.PADRÃO	9462	10183	12555
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,924$	$0,4 > p > 0,3$	$R_1 = 96,4$	
$t_2 = 1,178$	$0,2 > p > 0,1$	$R_2 = 118,8$	
$t_3 = 1,115$	$0,4 > p > 0,3$	$R_3 = 114,5$	

Ensaio do sôro de paciente MASS, portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 7 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de sôro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade do IATS é negativo quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do sôro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora *	3 horas	18 horas
1	3909	4494	4592
2	4705	3337	5854
3	3224	3087	3520
4	3684	3531	3691
5	2936	2323	3108
6	2281	2636	2336
MÉDIA	3436	3235	3850
D. PADRÃO	852	760	1228
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,782$	$0,5 > p > 0,4$	$R_1 = 93,3$	
$t_2 = 1,508$	$0,3 > p > 0,2$	$R_2 = 118,7$	
$t_3 = 2,216$	$0,1 > p > 0,05$	$R_3 = 112,6$	

Ensaio do soro de paciente MMC portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente pretratados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade do IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtido 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significante.



ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	4858	4863	5898
2	2991	2842	2119
3	4783	4756	5389
4	5218	3306	4042
5	2245	1720	2375
6	8204	7184	10929
MÉDIA	4716	4111	5125
D.PADRÃO	2074	1918	3228
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,198$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 87,2$	
$t_2 = 1,687$	$0,2 > p > 0,1$	$R_2 = 121,9$	
$t_3 = 0,707$	$0,6 > p > 0,7$	$R_3 = 108,6$	

Ensaio do soro de paciente LAS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do sôro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	1996	1803	2200
2	2224	1441	2300
3	1068	781	1317
4	2991	1992	2657
5	1601	1130	1481
6	2370	1846	3716
MÉDIA	2141	1499	2278
D. PADRÃO	661	471	869
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,439$	$0,7 > p > 0,6$	$R_1 = 73,4$	
$t_2 = 3,378$	$0,05 > p > 0,02$	$R_2 = 151,9$	
$t_3 = 0,992$	$0,4 > p > 0,3$	$R_3 = 106,4$	

Ensaio do sôro de paciente MND portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de sôro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do sôro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	3018	1215	3062
2	6647	5151	6702
3	11558	11293	13588
4	10054	7117	10399
5	3641	2391	3226
6	7008	3526	6537
7	2495	2476	3071
8	2381	3451	3066
9	1295	1067	967
MÉDIA	5441	4187	5625
D. PADRÃO	3655	3473	4112
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,238$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 78,3$	
$t_2 = 3,314$	$0,08 > p > 0,01$	$R_2 = 134,1$	
$t_3 = 1,085$	$0,4 > p > 0,3$	$R_3 = 104,4$	

Ensaio do soro de paciente MRS, portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 9 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade do LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100µl de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	13270	12673	10655
2	8488	7838	8896
3	4369	4684	4914
4	5615	6721	7525
5	6527	6818	9616
6	4590	3320	2575
MÉDIA	7143	7009	7297
D. PADRÃO	3355	8222	3018
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,382$	$0,8 > p > 0,7$	$R_1 = 98,1$	
$t_2 = 0,461$	$0,6 > p > 0,5$	$R_2 = 104,1$	
$t_3 = 0,179$	$0,9 > p > 0,8$	$R_3 = 102,1$	

Ensaio do soro de paciente MN portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LAIS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10 de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	3142	2314	3266
2	1793	1476	1821
3	4465	3898	4552
4	4002	3931	3932
5	4006	3308	2692
6	3363	3001	3422
MÉDIA	3463	2988	3452
D. PADRÃO	947	955	3284
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,421$	$0,7 > p > 0,6$	$R_1 = 86,5$	
$t_2 = 0,133$	$0,9 > p > 0,8$	$R_2 = 109,9$	
$t_3 = 0,671$	$0,5 > p > 0,4$	$R_3 = 99,7$	

Ensaio do soro de paciente MCT portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) os quais administrou 0,5 ml do soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade do IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em 10' de 100 µl do sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	4726	4550	5404
2	5139	5402	6100
3	7583	7339	7762
4	4595	3962	3906
5	5178	3530	2996
6	3724	3612	3730
MÉDIA	5157	4732	4983
D. PADRÃO	1299	1454	1779
teste t	significância	por cento do valor inicial	
$t_1 = 0,157$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 105,3$	
$t_2 = 1,193$	$0,2 > p > 0,1$	$R_2 = 105,2$	
$t_3 = 0,376$	$0,4 > p > 0,3$	$R_3 = 96,6$	

Ensaio do soro de paciente ZRL portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml. de soro a ser analisado. Os resultados mostraram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou estatisticamente significante.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	6064	5845	8472
2	5843	4996	5623
3	2262	1289	1388
4	9317	7986	6515
5	5817	5397	4567
6	6859	5907	7593
MÉDIA	5977	5237	5693
D.PADRÃO	2251	2193	2522
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,454$	$0,7 > p > 0,6$	$R_1 = 87,7$	
$t_2 = 0,729$	$0,5 > p > 0,4$	$R_2 = 108,7$	
$t_3 = 0,382$	$0,8 > p > 0,7$	$R_3 = 95,2$	

Ensaio do soro de paciente ZP, portador de moléstia de Grave. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtido 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativo.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	8542	8027	3422
2	2911	3544	7668
3	5162	7338	5942
4	5446	4196	4465
5	1806	2049	2019
6	3248	3075	2516
7	7188	6817	5690
8	4278	4895	4899
MÉDIA	4822	4992	4577
D. PADRÃO	2250	2175	1885
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,469$	$0,7 > p > 0,6$	$R_1 = 103,5$	
$t_2 = 0,488$	$0,7 > p > 0,6$	$R_2 = 93,7$	
$t_3 = 0,251$	$0,9 > p > 0,8$	$R_3 = 94,9$	

Ensaio do soro de paciente MDR, portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 8 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade do LATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.



ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de 100 $\mu$ l de sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	6178	4877	5168
2	5663	1228	3448
3	7445	7940	7694
4	11250	14300	7443
5	5910	4610	4700
6	1767	1588	1643
7	2188	1406	2294
8	4485	4206	4152
MÉDIA	5623	5019	4567
D.PADRÃO	3008	4386	2189
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,808$	$0,5 > p > 0,6$	$R_1 = 89,2$	
$t_2 = 0,472$	$0,4 > p > 0,3$	$R_2 = 91,7$	
$t_3 = 0,214$	$0,9 > p > 0,8$	$R_3 = 81,2$	

Ensaio do soro de paciente MPC, portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 8 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade de IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àquela de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

ENSAIO	período após a administração do soro		
	contagem em $10^4$ de $100\mu\text{l}$ do sangue		
	0 hora	3 horas	18 horas
1	8169	6090	6124
2	6856	5758	6130
3	5166	3900	4010
4	1631	1211	1432
5	2244	2415	1750
6	897	703	659
MÉDIA	4160	3346	3350
D. PADRÃO	3002	2283	2422
teste t	significância	porcento do valor inicial	
$t_1 = 0,242$	$0,9 > p > 0,8$	$R_1 = 80,04$	
$t_2 = 0,318$	$0,8 > p > 0,7$	$R_2 = 100,4$	
$t_3 = 0,283$	$0,8 > p > 0,7$	$R_3 = 80,5$	

Ensaio do soro de paciente EPS portador da moléstia de Graves. Utilizou-se 6 camundongos devidamente preparados (vide metodologia) aos quais administrou 0,5 ml de soro a ser analisado. Os resultados mostram que a atividade do IATS é negativa quando se considera  $R_3$ . O incremento da radioatividade verificado na amostra sanguínea do camundongo obtida 18 horas após a administração do soro, em relação àque de zero hora, não mostrou ser estatisticamente significativa.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams, D.D. e Purves, H.D. - Endocrinology 57: 17, 1955.
2. Adams, D.D. e Purves, H.D. - Proc.Univers.Otago Med.School 34:11, 1956.
3. Adams, D.D. - J.Clin. End. and Met. - 18: 669, 1958.
4. Adams, D.D. - Endocrinology 66: 658, 1960.
5. Adams, D.D., Purves, H.D. e Sirett, N.E. - Endocrinology 69: 154, 1961.
6. Adams D.D. e Kennedy, T.H. - Proc. Univ. Otago Med.School. 40: 6, 1962.
7. Bach, R. e Hirschoom K. - Exptl. Cell Res. 32 : 592, 1963.
8. Beall, G.N. e Solomon, D.H. - J. Clin. Invest. 45 : 552, 1966.
9. Beall, G.N. e Solomon, D.H. - J. Clin. End. and Met. 26 : 1382,1966
10. Becker D.V. - J.Clin. End.and Met. 19 : 840, 1959.
11. Becker, D.V. e Furth , E.D. - In Current topics in Thyroid Research,

- Proc. Intern. Thyroid Conf. 5th Rome 1965, Edited by C.Cassano and M.Andreoli New York:Academic, p. 455, 1965.
12. Bernstein, L., Weatherall, M.-Statistics for Medical and other biological students. p.86, 1952.
  13. Bowers, C. Lee, Y.K. e Schally A. - Endocrinology 82 : 303, 1968.
  14. Burke, G. - J.Clin. End. and Met. 27 : 1095 , 1967.
  15. Burke G. - J.Clin. End. and Met. 27 : 1161, 1967.
  16. Burke G. - J.Lab. and Clin. Med. 69 :713, 1967.
  17. Carneiro, L. , Dorrington, K.J. e Munro, D.S. Clin.Sci. 31: 215,1966.
  18. Dobyns, B. M, Rudd, A. e Liebe,D.Current Topics in Thyroid Res., Proc. Intern. Thyroid Conf. 5th Rome, 1965, edited by C.Cassano and M.Andreoli, New York: Academic, 1965, p 84.
  19. Dorrington, K.J., Carneiro, L.Munro, D.S. - In Current Topics in Thyroid Research, Proc.Intern.Thyroid Conf. 5th Rome, 1965, edited by C.Cassano and M. Andreoli, New York : Academic, 1965, p 45.
  20. Dorrington, K.J. e Munro, D.S. - Clin. Sci 28 : 165 , 1965.
  21. Dorrington, K.J., Carneiro, L. e Munro, D.S. - J.Endocrinology 34 133, 1966.

22. El Kabir, D.J., Benhamou-Glynn, N., Doniach D. e Roitt I.M., *Nature* 210 : 319, 1966.
23. Földes, J., Krasznai I., Alfalahi, S. e Piroscá E. - In : *Current Topics in Thyroid Research, Proc.Intern.Thyroid Conf., 5th, Rome, 1965*, edited by C.Cassano and M. Andreoli. New York : Academic, p.617, 1965.
24. Forbes, I.J. e Henderson D.N. - *Ann. Internal Med.* 65 : 69, 1966.
25. Furth, E., Rathbeen, N. e Posillico J. - *Endocrinology* 85 : 592, 1969.
26. Kriss, J.P., Pleshakov, V. e Chien, J. - *J.Clin.End.and Met.* 24 : 1005, 1964.
27. Kideren, W.J. Der. - (ed) *Thyrotoxicosis. Proceed. of an Intern. , Symposium Edinburg, 1967* E.& S.Livingstone Ltd. London, p-221,1967.
28. Kurihara, Y.Iwatsubo, H., Miyai, K., Masui, H. e Fukuchi, M. In: *Current Topics in Thyroid Research, Proc.Intern.Thyroid Conf.5th , Rome, 1965*, edited by C.Cassano e M. Andreoli, New York : Academic p.603, 1965.
29. Kurihara, Y. Noguchi, A., Cozeki, Y, e Sato S. *J.Clin. End. and Met.* 27 : 612, 1967.

30. Lanberg, B.A. - Acta Endocrinologica (Kbh), Suppl. 124: 153, 1967.
31. Lanberg, B.A., Gordin, A., Viherkoski, M. e Kvist, G. - Acta Endocrinologica 62 : 199, 1969.
32. Major, P.W. e Munro, D.S. - Clin. Sci. 23 : 463, 1962.
33. Mason, E.K., Hetzel, B.S., Good, B.F. e Stenhouse, N.S. - J.Clin. End. and Met. 27 : 1529, 1967.
34. McGiven, A.R. Adams, D.D. e Purves, H.D. - J.Clin. Endocrinology 52 : 29, 1965.
35. McKenzie, J.M. - Endocrinology 62 : 865, 1958.
36. McKenzie, J.M. Endoc. 63 : 372, 1958.
37. McKenzie, J.M. - J.Clin. End. and Met. 20 : 380, 1960.
38. McKenzie, J.M. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105 : 126, 1960.
39. McKenzie, J.M. - J.Clin. End. and Met. 21 : 635, 1961.
40. McKenzie, J.M. - J. Biol. Chem. 237 : PC - 3571, 1962.

41. McKenzie, J.M. - J. Clin. End. and Met. 25 : 424, 1965.
42. McKenzie, J.M. e Gordon, G. - In: Current Topics in Thyroid. Research, Proc. Intern. Conf. 5th, Rome, 1965, edited by C. Cassano and M. Andreoli. New York : Academic, p.445, 1965.
43. McKenzie, J.M. e Willianson, A. - J. Clin. End. and Met. 26:518, 1966
44. McKenzie J.M. - Recent Progr. Hormone Res. 23 : 1, 1967.
45. McKenzie, J.M. e Haibach, H. Endocrinology 80 : 1097, 1967.
46. McKenzie, J.M. e McCullagh , E.P. - J. Clin. End. and Met. 28 : 1177, 1968.
47. Meek J.C., Jones A.E., Lewis, U.J. e Vanderlaan W.P. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52 : 342, 1964.
48. Miyai, K, e Werner, S.C. - J. Clin. End. and Met. 26 : 504, 1966.
49. Miyai, K. Fukushi, M. Kumahara, Y. e Abe, H. - J. Clin. End. and Met. 27: 855, 1967.
50. Munro, D.S. - J. Endocrinology 19 : 64, 1959.
51. Noguchi, A., Hurihara, H. e Sato, S. - J. Clin. End. and Met. 24 : 160, 1964.

52. Oudin, J. - J.Cell Physiol. 67, suppl. 1 : 77, 1966.
53. Pinchera, A., Pinchera, M.G. e Stanbury, J.B. - J. Clin. End. and Met. 25 : 189, 1965.
54. Pinchera, A., Liberti, P. e Badalamente, G. - Lancet 1 : 374, 1966.
55. Pinchera, A., Liberti, P. Martino, E., Fenzi, G.F., Grasso, L., Rovis. L. e Baschieri, L. - J.Clin. End. and Met. 29 : 231, 1969.
56. Shishiba, Y. Solomon, D.David, H. J.Clin. End. and Met. 29 : 405, 1969.
57. Werner, S.C., Becker, D.V. e Row, V.V. - J.Clin. End. and Met. 19: 953, 1959.
58. Werner, S.C., Tierney, J. e Tallberg, T. - J. Clin. End. and Met. 24 : 189, 1965.