

Trabalhos Premiados com o POC de 1985 / 86

TRABALHO PREMIADO COM O POC DE 1985 NA ÁREA BÁSICA

ENDOCRINE DISORDERS RENDER RATS HYPO-REACTIVE TO NON-STEROIDAL BUT NOT TO STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Claudio C. N. Valle
E. Hacad
Lia S. Sudo
João Garcia Leme

Research supported in part by FINEP (Grant nº 4.3.84.0305.00)

1. SUMMARY

1. The effect of cortisol, indomethacin and piroxicam on the proliferative component of inflammation was investigated in normal, diabetic, adrenalectomized and diabetic-adrenalectomized rats using the cotton pellet test.

2. Whereas cortisol was equally effective in preventing granulation tissue formation in all groups of animals, indomethacin and piroxicam were much less active in animals with hormonal dysfunctions.

3. Indomethacin and piroxicam in the doses employed reduced thymus weight of normal and diabetic animals as much as cortisol. This was assumed as an strong indication

of an effect on the adrenal cortex with increased secretion of adrenal corticosteroids.

4. It is suggested that at least part of the anti-inflammatory effect of indomethacin and piroxicam, in the present circumstances, can be ascribed to the release of endogenous corticosteroids. This would explain the decreased sensitivity of adrenalectomized animals to the non-steroidal anti-inflammatory drugs used. An additional component, however, seems to intervene for the full expression of the anti-inflammatory effect of these drugs, since diabetic animals were also less responsive to them. When both components are lacking, as in diabetic-adrenalectomized animals, indomethacin and piroxicam were practically devoid of an anti-inflammatory effect.

2. INTRODUCTION

There is considerable interaction between neuroendocrine systems and vascular, cellular and tissue components of inflammation. Not infrequently, the initiation and development of an inflammatory response, as well as the subsequent tissue regeneration and repair are affected by endocrine disorders (Bonta, 1978; Garcia Leme, 1981). Consequently, endocrine dysfunctions are recognized as factors in variation of both the early and late features of inflammation. Since an elementary understanding of hormonal influences on the inflammatory reaction is desirable in any

consideration of drug therapy of inflammation, the investigation of hormone actions on host defenses – inflammation included – gains practical relevance. Surprisingly enough, little is known about the effect of endocrine disorders on the individual response to anti-inflammatory drugs.

Particularly endogenous corticosteroids and insulin play important roles in the development of inflammatory reactions (Garcia Leme et al., 1974; Garcia Leme and Schapoval, 1975). The present experiments were, therefore, undertaken to investigate the effectiveness of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs in preventing the full expression of an inflammatory response in diabetic, adrenalectomized, diabetic-adrenalectomized and normal animals.

3. MATERIAL AND METHODS

Male Wistar rats weighing between 200-250 g at the beginning of the experiments were used. The animals were allocated in groups as follows: (i) alloxan-diabetic; (ii) adrenalectomized; (iii) diabetic-adrenalectomized; and (iv) control rats. Each group received either steroidal (cortisol) or non-steroidal (indomethacin and piroxicam) anti-inflammatory drugs which were tested for their effectiveness in preventing the formation of granulation tissue (cotton pellet test). The drugs were administered in equal doses twice daily, at 12-hour intervals, for 7 days, and the dosage required to produce 40 to 50% inhibition of granulation tissue formation determined in control rats. At least two dosage levels were used for such determination. These were then tested in animals with hormonal dysfunctions. Cortisol was given subcutaneously, indomethacin and piroxicam by the oral route. Untreated animals were injected with the same volume of physiological saline by the same route. At the end of the experiments, thymus weight was determined in control and diabetic animals.

COTTON PELLET TEST

The test was basically as described by Meier et al. (1950) and Kellett (1965). Two weighed cotton pellets, each of 8 mg, were implanted subcutaneously in the pectoral region under ether anesthesia. Implantation of cotton pellets was coincidental with the initiation of anti-inflammatory drug therapy. The animals were killed at the end of the 7th day. The pellets and granulation tissue were then dissected free from the surrounding tissue, dried at 37°C for 24 h and weighed. The increase over the original pellet weight gave the weight of granulation tissue formed. Animals in which septic inflammation developed at the site of the surgical incision in the thoracic skin were not considered.

PRODUCTION OF ALLOXAN-DIABETES

The animals were fasted for 15 h with water *ad libitum*, then injected intravenously with 40 mg/kg alloxan. Ten days later blood sugar levels were determined as described by King and Garner (1947). Animals with glycemia above 200 mg/100 ml were then immediately used for cotton pellet implantation.

SURGICAL PROCEDURES

Adrenalectomy was performed under ether anesthesia. The two adrenal glands were removed through a small midline incision in the dorsal skin, and bilateral muscle incisions to allow entrance into the peritoneal cavity. Adrenalectomized animals were supplied with physiological saline in addition to water. Diabetic animals were adrenalectomized 10 days after alloxan injection. In mock operated rats, surgical incisions and closure of incisions were performed to a similar extent as for actual surgery. Cotton pellets were implanted immediately after surgery.

DRUGS

The following were used: alloxan hydrate (Carlo Erba); cortisol sodium succinate (Solu-Cortef, Upjohn); indomethacin (Indocid, Merck, Sharp & Dohme); piroxicam (Feldene, Pfizer). Cortisol was dissolved in distilled water; indomethacin and piroxicam were suspended in physiological saline. In order to preserve the condition in which the drugs are regularly administered for therapeutic uses, no attempt was made to solubilize suspensions of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

STATISTICAL ANALYSIS

Mean values for two experimental groups were compared by the Student's t test. Results from various groups were compared by the analysis of variance and the Q method (Snedecor and Cochran, 1974) used to test differences among means. $P < 0.05$ was taken as statistically significant.

4. RESULTS

EFFECTIVENESS OF STEROIDAL AND NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN PREVENTING THE FORMATION OF GRANULATION TISSUE IN NORMAL RATS

Table 1 shows the effect of cortisol, indomethacin and piroxicam on the formation of granulation tissue in normal rats, following the subcutaneous implantation of cotton pellets in the pectoral region. For each drug, results are expressed as the percentage inhibition of granulation tissue formation at two dosage levels. With the highest dosage, 40 to 50% inhibition of granulation tissue formation was observed.

EFFECT OF HORMONAL DYSFUNCTIONS ON GRANULATION TISSUE FORMATION

Alloxan-diabetes significantly reduced granulation tissue formation in the cotton pellet test, as compared to the response of normal and adrenalectomized animals. Removal of the adrenal glands of diabetic rats did not improve their capacity to react to the irritant implanted subcutaneously. Results are presented in Figure 1. In this and in the subsequent series of experiments, mock operated animals behaved as controls (data not shown).

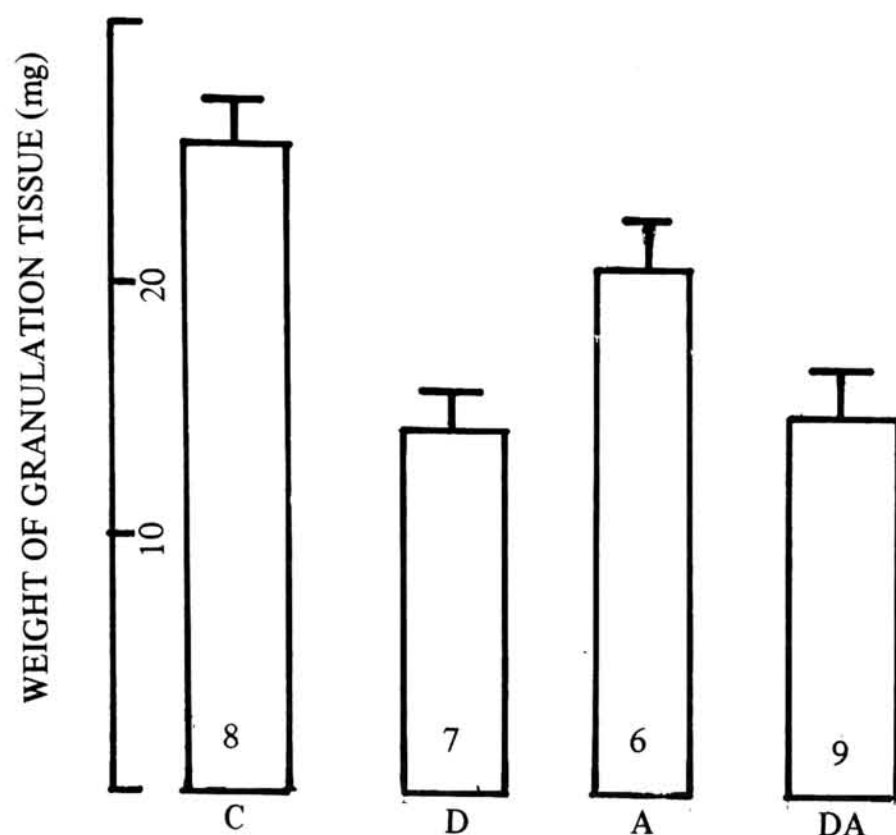


Figure 1 – Granulation tissue formation (cotton pellet test) in control (C), diabetic (D), adrenalectomized (A), and diabetic-adrenalectomized (DA) rats. Results are mean \pm s.e.mean. Figures within bars indicate number of animals. * $P < 0.05$ (analysis of variance) in comparison with control values.

EFFECTIVENESS OF STEROIDAL AND NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN PREVENTING THE FORMATION OF GRANULATION TISSUE IN DIABETIC, ADRENALECTOMIZED, AND DIABETIC-ADRENALECTOMIZED RATS

The dosage of cortisol required to produce 40 to 50% inhibition of granulation tissue formation in normal rats, also inhibited, to the same extent, the response of diabetic, adrenalectomized and diabetic-adrenalectomized animals in the cotton pellet test. Contrarily, indomethacin and piroxicam were much less effective to prevent granulation tissue formation in animals with hormonal dysfunctions. Treatments producing 40 to 50% inhibition of the response in controls were practically indistinguishable from treatments in which half the dose was employed. Actually, in diabetic-adrenalectomized rats, indomethacin and piroxicam were almost devoid of an effect on granulation tissue formation. Results are summarized in Table 2.

EFFECT OF STEROIDAL AND NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON THYMUS WEIGHT OF NORMAL AND DIABETIC RATS

All drugs used significantly reduced thymus weight of control rats in a dose-dependent way. In addition, thymus weight which is already decreased in diabetic animals, was further reduced by either of the drugs employed. Results are presented in Table 3.

5. DISCUSSION

Significance of observations on anti-inflammatory actions of drugs depends largely on satisfactory animal

models. Endocrine disorders affect the vascular, cellular and tissue components of inflammation. Therefore, to investigate the influence of hormonal dysfunctions on the individual response to anti-inflammatory drugs, the method employed should allow the administration of the drugs for relatively long periods and allow the observation of their effects subsequent to the early vascular and exudative changes. The assay test used was aimed at fulfilling such requisites and at providing a meaningful procedure to interfere with the proliferative component of inflammation which is relevant for clinical purposes.

The data presented here gave further insight into the interaction between hormones, inflammation and anti-inflammatory drugs. First, granulation tissue formation was reduced in diabetic and diabetic-adrenalectomized rats, in comparison with the response of normal and adrenalectomized animals. The finding lend credence to the suggestion by Nagy et al. (1961) that insulin plays a role in tissue regeneration and repair, though the nature of this role is not clear. Second, the results allowed the identification of marked differences between the responses of normal animals and animals with hormonal dysfunctions to anti-inflammatory drugs. Whereas cortisol was equally potent to reduce granulation tissue formation in normal, diabetic, adrenalectomized and diabetic-adrenalectomized rats, the non-steroidal compounds, indomethacin and piroxicam, were much less active in animals with endocrine disorders induced by alloxan administration or ablation of the adrenal glands. All drugs used significantly reduced thymus weight in normal animals and, in addition, further reduced the already decreased thymus weight of diabetic rats. Whenever given in supraphysiological doses for prolonged periods, all available glucocorticoids cause involution of lymphoid tissues. The finding that indomethacin and piroxicam in the doses employed also affected thymus weight of normal and diabetic animals is a strong indication that this might be related to coincidental increased levels of circulating adrenal corticosteroids. Pregnant rats form lesser amounts of granulation tissue and this is associated with adrenal cortical hyperactivity (Meyer *et al.* 1953). Accordingly, at least part of the anti-inflammatory effect of indomethacin and piroxicam, in the present circumstances, could be ascribed to the release of endogenous glucocorticoids. This might explain the decreased sensitivity of adrenalectomized animals to indomethacin and piroxicam. In this respect, our findings differ from those of Winter *et al.* (1963), who showed that in normal animals adrenal and thymus weights, which are sensitive indicators of adrenal stimulation, remained unchanged by indomethacin treatment. The following differences could possibly account for the difference in results: higher doses of indomethacin were presently used; this was required to produce 40 to 50% inhibition of granulation tissue formation in control animals, whereas in the test procedure employed by Winter *et al.* (1963) the inhibition observed was of a lower magnitude. Furthermore, closer scrutiny of the work referred to above reveals that whereas in normal animals daily doses of 0.1, 0.3 and 0.9 mg/kg indomethacin resulted in 21, 30 and 39% inhibition of granulation tissue formation, respectively, in animals adrenalectomized at the time of pellet implantation the same doses of the drug caused 5, 20 and 30% inhibition of granulation tissue formation, respectively.

However, an additional component seems to intervene for the full expression of the anti-inflammatory effects of

indomethacin and piroxicam, since diabetic animals were also less responsive to these drugs. Most non-steroidal anti-inflammatory drugs are potent inhibitors of prostaglandin biosynthesis (Ferreira *et al.* 1971; Smith and Willis, 1971; Vane, 1971). There is a reasonably good rank-order correlation between the anti-cyclooxygenase activity of these drugs and their anti-inflammatory activity, as well as their capacity to reduce prostaglandin production at an inflamed site (Higgs *et al.* 1976). Accordingly, hormonal dysfunctions, might also interfere with the anti-inflammatory effect of indomethacin and piroxicam through an effect on the cyclooxygenation reaction in prostaglandin formation. Experiments are in progress to test this possibility. When both components were lacking, as in diabetic-adrenalectomized rats, indomethacin and piroxicam were practically devoid of an anti-inflammatory effect.

Finally, it should be noted that, in order to preserve the usual routes of administration, indomethacin and piroxicam were given orally, whereas cortisol was administered parenterally. It is unlikely that the endocrine derangements investigated may have influenced the absorption of indomethacin and piroxicam from the gastrointestinal tract. Firstly, because the drugs still produced a slight inhibitory effect on granulation tissue formation of diabetic and adrenalectomized rats. The effect, however, was not dose-dependent as indicated by equivalent inhibitions observed with the use of single and double doses, despite the fact that the concentration of a drug influences its rate of absorption. Secondly, because indomethacin and piroxicam further reduced the already decreased thymus weight of diabetic animals.

In conclusion, whereas cortisol remained fully active as an anti-inflammatory agent in all groups of animals tested, indomethacin and piroxicam were less effective in diabetic and adrenalectomized animals, thus suggesting that the effect of non-steroidal anti-inflammatory compounds can be influenced by endocrine disorders affecting the secretion of insulin or adrenal glucocorticoids.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Ms. Yara Corradini for her expert secretarial assistance.

REFERENCES

- Bonta, I.L. (1978). Endogenous modulators of the inflammatory response. In: Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Editors). *Inflammation (Handbook of Experimental Pharmacology 50/1)*. Springer, Berlin, pp. 523-567.
- Ferreira, S.H., Moncada, S. and Vane, J.R. (1971). Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature (New Biology)*, 231: 237-239.
- Garcia Leme, J. (1981). Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. *General Pharmacology*, 12: 15-24.
- Garcia Leme, J., Böhm, G.M., Migliorini, R.H. and Souza, M.Z.A. (1974). Possible participation of insulin in the control of vascular permeability. *European Journal of Pharmacology*, 29: 298-306.
- Garcia Leme, J. and Schapoval, E.E.S. (1975). Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *British Journal of Pharmacology*, 53: 75-83.
- Higgs, G.A., Harvey, E.A., Ferreira, S.H. and Vane, J.R. (1976). The effects of antiinflammatory drugs on the production of prostaglandins in vivo. In: Samuelsson, B. e Paoletti, R. (Editors), *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, vol. 1, Raven Press, New York, pp. 105-110.
- Kellett, D.N. (1965). On the anti-inflammatory activity of protamine sulphate and of hexadimethrine bromide, inhibitors of plasma kinin formation. *British Journal of Pharmacology*, 24: 705-713.
- King, E.J. and Garner, R.J. (1947). Colorimetric determination of glucose. *Journal of Clinical Pathology*, 1: 30-33.
- Meier, R., Schuler, W. and Desaulles, P. (1950). Zur Frage des Mechanismus der Hemmung des Bindegewebswachstums durch Cortisone. *Experientia*, 6: 469-471.
- Meyer, R.K., Stucki, J.C. and Aulsebrook, K.A. (1953). Effect of pregnancy and lactation on granuloma tissue formation and joint permeability in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84: 624-628.
- Nagy, S., Redei, A. and Karady, S. (1961). Studies on granulation tissue production in alloxan-diabetic rats. *Journal of Endocrinology*, 22: 143-146.
- Smith, J.B. and Willis, A.L. (1971). Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature (New Biology)*, 231: 235-237.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1974). *Statistical Methods*. 6th edn. State University Press, Ames, pp. 258.298.
- Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature (New Biology)*, 231: 232-235.
- Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. (1963). Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 141: 369-376.

Table 1 – Effectiveness of cortisol, indomethacin and piroxicam in preventing the formation of granulation tissue in normal rats (cotton pellet test). Results are mean \pm s.e.mean; n = number of animals; *P < 0.05 (Student's t test) in comparison with values obtained in the same group, when smaller doses were used.

Treatment (twice daily, 7 days)	Dose (mg/kg/day)	Weight of granulation tissue (mg)	Inhibition %	n
Saline	—	25.45 \pm 1.58	—	8
Cortisol (s.c.)	10	18.00 \pm 1.30	29.3	4
	20	13.67 \pm 0.68*	46.3	11
Indomethacin (oral)	2	18.70 \pm 0.98	26.5	10
	4	14.63 \pm 0.46*	42.5	9
Piroxicam (oral)	10	17.69 \pm 0.65	30.5	8
	20	14.88 \pm 0.54*	41.5	8

Table 2 – Effectiveness of cortisol, indomethacin and piroxicam in preventing the formation of granulation tissue in diabetic, adrenalectomized and diabetic-adrenalectomized rats (cotton pellet test). Results are mean \pm s.e.mean; n = number of animals. In all groups, indomethacin and piroxicam produced equivalent effects at the two dosage levels.

Animals	Treatment (twice daily, 7 days)	Dose (mg/kg/day)	Weight of granulation tissue (mg)	Inhibition %	n	
Diabetic	Saline	–	15.07 \pm 1.11	–	7	
	Cortisol (s.c.)	10	11.00 \pm 1.40	27.0	4	
		20	8.00 \pm 0.34	46.9	14	
	Indomethacin (oral)	2	12.68 \pm 0.39	15.9	14	
		4	12.84 \pm 0.77	14.8	6	
	Piroxicam (oral)	10	12.53 \pm 0.83	16.9	5	
		20	12.83 \pm 0.56	14.9	6	
	Adrenalectomized	Saline	–	21.58 \pm 2.16	–	6
Cortisol (s.c.)		20	12.31 \pm 0.85	43.0	8	
Indomethacin (oral)		2	15.41 \pm 0.74	28.6	7	
		4	15.58 \pm 0.58	27.8	6	
Piroxicam (oral)		10	15.74 \pm 1.16	27.1	5	
		20	14.58 \pm 0.80	32.4	6	
Diabetic-Adrenalectomized		Saline	–	15.20 \pm 0.96	–	9
		Cortisol (s.c.)	20	8.56 \pm 0.56	43.7	8
	Indomethacin (oral)	2	14.82 \pm 0.86	2.5	6	
		4	14.97 \pm 0.70	1.5	6	
	Piroxicam (oral)	10	15.42 \pm 1.02	0	5	
		20	15.34 \pm 1.12	0	4	

Table 3 – Thymus weight of normal and diabetic rats after a 7-day interval of anti-inflammatory drug administration. Results are mean \pm s.e.mean; n = number of animals; *P < 0.05 (analysis of variance) in comparison with values obtained in saline-injected animals.

Animals	Treatment (twice daily, 7 days)	Dose (mg/kg/day)	Thymus weight (mg)	n
Control	Saline	–	289 \pm 21	8
	Cortisol (s.c.)	10	196 \pm 7*	4
		20	154 \pm 16*	11
	Indomethacin (oral)	2	220 \pm 15*	10
		4	187 \pm 16*	9
	Piroxicam (oral)	10	185 \pm 15*	8
		20	177 \pm 13*	8
	Diabetic	Saline	–	75 \pm 12
Cortisol (s.c.)		10	49 \pm 15*	4
		20	42 \pm 3*	14
Indomethacin (oral)		2	69 \pm 7	14
		4	51 \pm 6*	6
Piroxicam (oral)		10	25 \pm 1*	5
		20	32 \pm 4*	6

PREVENTIVA

O POC na Área de Medicina Preventiva não foi conferido a nenhum trabalho em 1985.

TRABALHO PREMIADO COM O POC DE 1985 NA ÁREA CLÍNICA

NATIMORTOS: AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA E COMPARAÇÃO COM A POPULAÇÃO GERAL DE PARTURIENTES

Luiz Ferraz de Sampaio Neto
Fabíola de Rezende Pereira
Regina Helena Garcia

Os autores revisaram todos os casos de natimortos que ocorreram no serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina da PUC-SP de janeiro de 1980 a dezembro de 1983, verificando variáveis maternas (idade, cor, paridade, idade gestacional, período interpartal e pré-natal), patologias maternas, tipo de indução, tipo de parto, complicações de indução e alguns dados do recém-nascido (aspecto e malformações). Esses itens foram comparados com a população total de parturientes desse serviço, no mesmo período.

TRABALHO PREMIADO COM O POC DE 1985 NA ÁREA DE CIRURGIA

“QUANTIFICAÇÃO DAS COMUNICAÇÕES ARTERIO-VENOSAS EM MEMBROS INFERIORES COM GRAUS VARIADOS DE ISQUEMIA”



Paulo Kauffman
Marcio Alberto Steinbruch
Ricardo Gomes de Lemos
José Maria Fernandes Neto

TRABALHO REALIZADO NA DISCIPLINA DE CIRURGIA VASCULAR DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E NO CENTRO DE MEDICINA NUCLEAR, COMPLEMENTAR DO DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FMUSP.

RESUMO/SUMMARY INTRODUÇÃO

As medidas de fluxo sanguíneo total de um membro estudadas através de pletismografia têm mostrado resultados diferentes dos obtidos através de métodos baseados em perfusão capilar. Isto se deve à resistência de anastomoses artério-venosas funcionantes que divergem o sangue do leito arterial para o venoso, sem que haja maior proveito metabólico tecidual com o incremento do fluxo sanguíneo total do membro que ocorre nesta situação. Esta quota de sangue desviada é detectada pletismograficamente mas não através do estudo da perfusão capilar.

As comunicações artério-venosas são estruturas orgânicas cujas principais funções incluem termorregulação, controle da pressão sanguínea, liberação ou extração de hormônios vasoativos da circulação e autorregulação local do fluxo sanguíneo^{8,14}.

Nos membros inferiores elas predominam na pele dos pés, sendo questionada sua existência na musculatura esque-

lética^{1,2}. Admite-se que nessas extremidades estes canais tenham calibre variável de 30 a 60 micra¹². Dessa maneira, se injetarmos na artéria femoral partículas radioativas, de diâmetro menor do que o dessas comunicações, porém maior do que o dos capilares (8 micra aproximadamente), elas ficarão transitoriamente retidas nesses capilares, se as anastomoses artério-venosas estiverem fechadas. Em caso contrário, uma fração das partículas passará através das comunicações e embolizará os capilares pulmonares, podendo então serem aí detectadas.

Utilizando-se este princípio, procurou-se neste trabalho estudar quantitativamente as comunicações artério-venosas em membros inferiores com graus variáveis de isquemia, empregando macroagregado de soro albumina humana marcado com tecnécio-99m (MAA-^{99m}Tc) e um contador de corpo total.

CASUÍSTICA E MÉTODO

Foi estudada a fração do fluxo sanguíneo que atravessa as comunicações artério-venosas em 27 membros inferiores de 21 doentes (20 do sexo masculino e um do sexo feminino) portadores de insuficiência arterial crônica com obstrução ao nível do segmento fêmoro-poplíteo e/ou artérias de perna, diagnosticada clínica e arteriograficamente. Em 12 pacientes a arteriosclerose era a patologia responsável pelas lesões arteriais; em sete, tratava-se de doença arterial inflamatória (arterite); um paciente tinha úlcera isquêmica hipertensiva e em outro a obstrução arterial era de origem traumática. Seis doentes tiveram ambos os membros inferiores estudados. Os membros foram divididos em dois grupos: no primeiro, constituído por 12 extremidades, foram incluídos aqueles em que somente havia dor isquêmica muscular ao esforço (claudicação intermitente); no segundo, composto por 15 extremidades, incluíram-se os membros que apresentavam lesões tróficas e/ou queixa, por parte do doente, de dor isquêmica em repouso. Três pacientes foram incluídos em ambos os grupos porque apresentavam isquemia de repouso em um e isquemia muscular ao esforço no outro membro. Nenhum doente desta série havia sido submetido a desnervação simpática do membro estudado.

O método utilizado, já descrito em trabalho anterior⁶, consistiu, em linhas gerais, das seguintes fases:

a) Injeção em veia antecubital de aproximadamente 1,2 mCi de MAA-^{99m}Tc, seguida da varredura do corpo inteiro. Todo o radiofármaco, nestas condições, vai se localizar nos pulmões, onde é calculada sua concentração.

b) Injeção na artéria femoral de dose equivalente à anterior, seguida de varredura do corpo inteiro, calculando-se novamente a concentração do traçador na área dos pulmões.

c) Duas novas varreduras foram realizadas para se determinar, para cada doente, a meia-vida física efetiva do MAA-^{99m}Tc nos pulmões.

d) Cálculo do acréscimo da concentração do radiofármaco na área dos pulmões após a injeção arterial que representa a fração do fluxo sanguíneo que atravessou as comunicações artério-venosas do membro.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Constou do cálculo das médias, desvio-padrão e respectivos intervalos de confiança para o parâmetro analisado (fração do fluxo sanguíneo que atravessou as comunicações

artério-venosas) tanto no grupo de pacientes com claudicação intermitente, como no de doentes portadores de isquemia de repouso.

O teste “t” de Student, ao nível de 5% ($p < 0,05$), foi utilizado para estudar as diferenças na percentagem de comunicações artério-venosas verificadas em ambos os grupos.

RESULTADOS

Os valores obtidos para o parâmetro analisado encontram-se nas tabelas I e II.

Na Tabela I verifica-se que em membros que apresentam somente isquemia muscular ao esforço, a fração do fluxo sanguíneo que passa pelas comunicações artério-venosas é muito pequena, sendo em média inferior a 3%.

Na Tabela II pode-se observar que nos membros com manifestações isquêmicas em repouso o percentual de comunicações artério-venosas é bem mais elevado, sendo em média superior a 8%.

A análise estatística mostrou que os valores médios obtidos nos dois grupos de pacientes são significativamente diferentes.

TABELA I

PORCENTAGEM DE COMUNICAÇÕES ARTÉRIO-VENOSAS EM MEMBROS COM ISQUEMIA MUSCULAR AO ESFORÇO

NOME	SEXO	IDADE	DOENÇA	MEMBRO	*T _{1/2} Ef. (em min.)	% DE COMUNICAÇÕES A – V	
N.F.S.	M	33	Arterite	MID	213	0	
F.V.	M	59	A.E.O.**	MID	279	6,2	
				MIE		4,1	
A.S.M.	F	71	A.E.O.	MID	331	5,5	
F.M.M.	M	28	Trauma	MID	276	3,6	
O.M.	M	49	A.E.O.	MID	255	3,7	
D.M.	M	29	Arterite	MID	348	5,0	
				MIE		4,4	
A.A.S.	M	48	A.E.O.	MIE	291	0	
B.G.G.	M	22	Arterite	MIE	519	0	
O.L.	M	59	A.E.O.	MIE	243	0	
R.H.H.	M	28	Arterite	MID	273	0	
						Média	2,71
						Desvio-Padrão	2,49
						Intervalo de Confiança	1,26 – 4,16

*T_{1/2} Ef. – Meia-vida efetiva do traçador nos pulmões

**A.E.O. – ARTERIOESCLEROSE OBLITERANTE

TABELA II

PORCENTAGEM DE COMUNICAÇÕES ARTÉRIO-VENOSAS EM MEMBROS COM ISQUEMIA DE REPOUSO

NOME	SEXO	IDADE	DOENÇA	MEMBRO	*T _{1/2} Ef. (em min.)	% DE COMUNICAÇÕES A – V
A.R.S.F.	M	59	A.E.O.**	MID	387	5,9
A.J.C.	M	58	A.E.O.	MID	354	6,4
J.P.C.	M	36	Arterite	MIE	250	6,6
V.B.A.	M	22	Arterite	MIE	267	10,0
A.S.M.	F	71	A.E.O.	MIE	331	12,4
E.S.	M	49	A.E.O.	MIE	270	10,0
O.M.	M	49	A.E.O.	MIE	255	11,7
C.G.F.	M	59	Úlc. Hipert.	MIE	348	7,9
J.U.L.	M	63	A.E.O.	MID	330	9,8
J.S.	M	63	A.E.O.	MIE	264	7,7
J.F.N.	M	47	Arterite	MID	252	4,3
				MIE		3,6
R.H.H.	M	28	Arterite	MIE	273	3,6
J.B.	M	76	A.E.O.	MID	237	12,9
O.O.	M	52	A.E.O.	MID	381	8,0

*T_{1/2} Ef. – Meia-vida efetiva do traçador nos pulmões

**A.E.O. – ARTERIOESCLEROSE OBLITERANTE

Média 8,05
Desvio-Padrão 3,04
Intervalo de Confiança 6,37 – 9,73

COMENTÁRIOS

Fisiologicamente o papel das comunicações artério-venosas nas doenças vasculares ainda não está bem definido. Assim por exemplo, Piulachs e Barraquer¹¹ consideraram estas comunicações como fatores causais das varizes dos membros inferiores. Em contrapartida, Haimovici e cols⁴ e Malan¹⁰ através de estudos angiográficos, sugeriram que a abertura desses canais era consequência da presença de veias varicosas: a hipertensão venosa, transmitindo-se ao leito capilar, aumentaria a resistência nesse setor, levando à abertura das anastomoses artério-venosas que por sua vez agravariam a doença venosa pré-existente.

Nas doenças do sistema arterial as comunicações artério-venosas tem sido constatadas em várias circunstâncias. Assim, Malan⁹ descreveu a síndrome funcional da artéria tibial anterior devido à dilatação das anastomoses artério-venosas do ante-pé, o que desviaria o sangue do leito capilar, resultando, como consequência, isquemia tecidual dessa região.

Nas arteriopatias oclusivas dos membros inferiores, Haimovici e cols⁴ através de estudos angiográficos, mostraram retorno venoso proximal precoce em um terço dos casos estudados, interpretando este fato como desvio do sangue pelas anastomoses artério-venosas, em detrimento da circulação capilar, o que poderia representar um fator agravante na insuficiência arterial da extremidade. Consideraram estas anastomoses como consequência e não causa do quadro isquêmico.

Schraibman e Ledingham¹³ mostraram que o fluxo sangüíneo do pé, medido com pletismógrafo, em condições basais, era maior, paradoxalmente, quando havia lesões isquêmicas do que nos pacientes claudicantes que, nessas condições, se comportavam de maneira semelhante aos normais. Esta observação vem de encontro aos nossos dados e a abertura das comunicações A-V explicaria este fato paradoxal.

Solti e cols¹⁵ demonstraram arteriografica, hemodinâmica e cintigraficamente em 17 membros com sinais de isquemia grave a presença de comunicações artério-venosas, que explicavam o aumento paradoxal do fluxo sangüíneo total do membro, a diminuição na diferença artério-venosa do oxigênio, com redução do seu consumo pelos tecidos. Explicam que a isquemia tecidual do membro levaria, em alguns casos, à abertura dessas comunicações. Observaram regressão dessas anastomoses após cirurgia arterial reconstrutora realizada com sucesso.

Desde que a simpatectomia pode determinar abertura de comunicações artério-venosas³, nenhum dos membros estudados no presente trabalho havia sofrido desnervação simpática.

Em pacientes que apresentam somente dor do tipo claudicação intermitente, a porcentagem de comunicações artério-venosas por nós encontrada no membro com insuficiência arterial se superpõe àquela observada em extremidades normais. Assim, em trabalho anterior⁶, constatamos que, nestes membros com circulação normal, a fração do fluxo sangüíneo da extremidade que atravessa estes canais foi, em média, de 2,2%. Outros autores^{7,12} também mostraram percentuais pequenos (inferiores a 5%) de comunicações artério-venosas funcionantes nestes membros normais. Dessa forma concluímos que em condições de repouso, as extremidades que apresentam isquemia muscular ao esforço se comportam como as normais, observação esta também verificada por outros autores¹²

Na presença de isquemia grave do membro, com sofrimento tecidual, os nossos resultados mostram que há abertura significativa de comunicações artério-venosas, o que também foi observado em outros trabalhos^{3,13,15}. Hipóxia tecidual e acidose local têm sido responsabilizados por este fato³. Este desvio de sangue através de vasos sem função nutritiva pode, em última análise, prejudicar a circulação capilar, agravando a isquemia da extremidade. Quanto mais grave a insuficiência arterial, maior a fração do fluxo sangüíneo do membro que atravessa as anastomoses artério-venosas⁷

Apesar de Delaney³ chamar a atenção para a possibilidade dessas comunicações poderem ser responsáveis pela necrose de dedo do pé na presença de pulsos podais normais, por roubarem sangue do leito capilar, a teoria mais aceita atualmente para este evento é da microembolização distal a partir de placa de ateroma localizada proximalmente na árvore arterial, o chamado ateroembolismo⁵.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARLOW, T.E.; HAIGH, A.L. & WALDER, D.N. – Evidence for two vascular pathways in skeletal muscle. *Clin. Sci.*, 20: 367,1961.
2. BOYD, S.D. – General survey of visceral vascular structures. *In: Ciba Foundation Symposium, Visceral Circulation*. London. Churchill, 1952. p. 3-20.
3. DELANEY, J.P. – Control of arteriovenous anastomoses in the limb. *In: RUTHERFORD, R.B. – Vascular Surgery*. Philadelphia, Saunders, 1977 cap. 87, p. 785-91.
4. HAIMOVICI, H.; STEINMAN, C. & CAPLAN, L.H. – Angiographic evaluation of arteriovenous shunting in peripheral vascular diseases. *Radiology*, 87: 696, 1966.
5. KARMODY, A.M. & LEATHER, R.P. – Atherothrombotic microemboli of the lower limb. *In: RUTHERFORD, R.B. – Vascular Surgery*. Philadelphia. Saunders, 1984, 2ª Ed. cap. 49, p. 536-46.
6. KAUFFMAN, P.; FERNANDES NETO, J.M.; DIAS NETO, A.L.; CAMARGO, E.E.; LANGER, B. & PUECH LEÃO, L.E. – Quantificação das comunicações artério-venosas dos membros inferiores. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, 38: 195, 1983.
7. LOCHER, J.T.; DUNANT, J.H.; FRIDRICH, R. & WAIBEL, P. – Nachweis von arteriovenöse Kurzschlüssen in den unteren Extremitäten mit ¹³¹I-J-MAA und ^{99m}Tc – Mikrosphers an Beispiel der lumbalen Sympathektomie. *Fortschr. Röntgenstr.*, 120: 78, 1974.
8. LOPES-MAJANO, V.; RHODES, B.A. & WAGNER, H.N. – Arteriovenous shunting in extremities. *J. appl. Physiol.*, 27: 752, 1969.
9. MALAN, E. – Syndrome fonctionnel de l'artere tibiale antérieure du a une dérivation sanguine a travers les communications artério-veineuses du talon. *Presse med.* 62: 1447, 1954.
10. MALAN, E. – Vascular syndromes from dilatation of arteriovenous communications of the sole of the foot. *Arch. Surg.*, 77: 783,1958.
11. PIULACHS, P. & BARRAQUER, F.V. – Pathogenic study of varicose veins. *Angiology*, 4: 59,1953.
12. ROSENTHALL, L.; GREYSON, N.D.; HERBA, M.J. & KISS, J. – Measurement of lower extremity arteriovenous shunting with ¹³¹I – Macroaggregates of albumin. *J. Canad. Assn. Radiol.*, 21: 153,1970.
13. SCHRAIBMAN, L.G.; LEDINGHAM, I.M.A. – Hiperbaric oxygen and regional vasodilatation in pedal ischemia. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 129: 761, 1969.
14. SHERMAN, J.L. – Normal arteriovenous anastomoses. *Medicine*, 42: 247,1963.
15. SOLTÍ, F.; SZLAVI, L.; ENTZ, L. & ISKUM, M. – Arteriovenous shunts associated with peripheral obliterative arterial disease. *J. Cardiovasc. Surg.*, 24: 493, 1983.

RESUMO

Neste trabalho se estuda as comunicações artério-venosas em 27 membros inferiores com insuficiência arterial, divididos em 2 grupos: no primeiro estão incluídos 12 membros nos quais os pacientes referem dor tipo claudicação intermitente e no segundo, 15 que apresentam isquemia de repouso. O método empregado é o de injeções venosa e arterial, consecutivas, de doses semelhantes de macroagregado de soro albumina humana marcado com tecnécio – 99m , seguidas respectivamente de varreduras de corpo inteiro em um contador de corpo total. O acréscimo da atividade pulmonar após a injeção arterial (porcentagem de comunicações artério-venosas) foi calculado.

No grupo de extremidades onde havia somente isquemia muscular ao esforço, a fração do fluxo sanguíneo do membro que atravessou as comunicações artério-venosas foi, em média, inferior a 3%, resultado superponível ao observado em membros com circulação normal. No grupo de extremidades com isquemia de repouso a porcentagem dessas comunicações foi significativamente superior, atingindo, em média, níveis acima de 8%.

SUMMARY

This manuscript analyses arteriovenous shunting of 27 lower limbs with arterial insufficiency. They were divided into two groups: the first group included 12 lower limbs whose patients complained of intermittent claudication; the second group included 15 lower limbs with ischemia at rest. Our method consisted of sequential venous and arterial injections of equal doses of MAA- 99m Tc followed, each of them, by a whole body scanning with a whole body counter. The increment in lung activity after the arterial injection (percent A-V shunting) was calculated.

The group with muscular ischemia at exercise showed a less than 3% A-V shunting, similar to values obtained in normal lower limbs. The group with ischemia at rest showed a significantly higher percent A-V shunting, with an average above 8%.

TRABALHO PREMIADO COM O POC DE 1986 NA ÁREA BÁSICA

ESTUDO DE RECEPTORES DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO (hGH) EM FÍGADO DE MULHER GRÁVIDA

Rosana S.C. Alves
Roseli Svartman
Francisco H. D'Abronzio

LABORATÓRIO DE RADIOIMUNOENSAIO DA 1ª CLÍNICA MÉDICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP.

Unitermos: Receptores hormonais, microssoma hepático, somatotrofina, mulher grávida, prolactina, lactogênio placentário.

APOIO FINANCEIRO: FAPESP E CNPq

RESUMO

Foram feitos ensaios de radioreceptor de 125 I-hGH e microssomas de 18 fígados humanos, obtidos em necrópsia.

O hGH foi proveniente do IPEN, HC-FMUSP e do NIH e a PRL (prolactina humana) e o HPL (lactogênio placentário humano) do NIH. Os hormônios foram marcados pela técnica de lactoperoxidase.

Os microssomas de mulher grávida apresentaram capacidade ligadora de 125 I-hGH significativamente maior que os de homens e mulheres não grávidas. A ligação específica de 125 I-hGH aumentou com concentrações crescentes destes microssomas, mas isto não ocorreu com 125 I-PRL e 125 I-HPL.

A ligação com 125 I-hGH mostrou-se reversível e dependente da temperatura e tempo de incubação.

O deslocamento competitivo de 125 I-hGH demonstrou que pequenas concentrações de hGH são capazes de promover deslocamento importante, enquanto que, são necessárias altas concentrações de PRL e HPL para promover o mesmo deslocamento.

A análise de Scatchard indicou a existência de dois receptores com afinidades diferentes pelo hGH no fígado de mulher grávida.

SUMMARY

STUDY ON THE HUMAN GROWTH HORMONE (hGH) RECEPTORS IN PREGNANT WOMAN LIVER.

A 125 I-hGH radioreceptor assay of liver from 18 subjects obtained at autopsy was developed. The hGH was obtained from HC-FMUSP, NIH and IPEN. Human Prolactin (PRL) and Human Placental Lactogen (HPL) were provenient from NIH. The hormones were iodinated by the lactoperoxidase method.

The microssomes of pregnant woman showed ligand capacity of 125 I-hGH significantly higher than men's and non-pregnant women's. The 125 I-hGH specific binding increased with higher concentrations of microssomes, 125 I-PRL e 125 I-HPL showed no specific binding to membranes. The binding of 125 I-hGH appeared to be reversible and dependent on temperature and incubation time.

Competitive displacement curve of 125 I-hGH showed that small concentrations of hGH were effective in promoting displacement while high concentrations of PRL and HPL were necessary to promote the same displacement.

The Scatchard analysis suggested the existence of two receptors with different affinities for hGH in pregnant woman liver.

I – INTRODUÇÃO:

A idéia de que a adeno-hipófise produz substâncias estimuladoras do crescimento, só passou a ser seriamente considerada a partir de 1921, quando Evans e Long produziram ratos gigantes através da administração de homogenatos de hipófises.

O GH só foi finalmente isolado na década de 40 e desde então vários estudos foram realizados. Particularmente, aqueles que analisaram os efeitos do GH sobre ossos e cartilagens permitiram a descoberta de uma proteína sérica, denominada somatomedina ou fator de sulfatação, dependente do GH e que age diretamente sobre estes e outros tecidos, promovendo a incorporação de sulfato e seu crescimento (1, 2). O GH teria, portanto, além de sua ação direta (3, 4), efeito indireto através da somatomedina (5) sendo fígado um órgão importante de sua produção (6, 7).

Muitos estudos sobre os efeitos do GH foram realizados em animais, observando-se, entre outras coisas, que os GH bovino e suíno não tinham efeito fisiológico sobre o Homem (8). Li (9) em 1956, isolou o GH humano (hGH) e posteriormente sua ação no Homem foi demonstrada (10, 11). Estes experimentos confirmaram a questão da especificidade zoológica do GH. Mais recentemente percebeu-se que esta especificidade é conferida pelo receptor humano do GH, que não interage com GH de outras espécies a não ser dos primatas (12, 13, 14, 15). Em vista destas considerações, pode-se compreender os motivos de um esforço crescente no estudo e identificação de receptores para o hGH nos mais variados tipos celulares da espécie humana.

Em animais ficou demonstrado que o fígado é o órgão que mais contém receptores para o GH (16, 17, 18). Em humanos, embora tenham sido desenvolvidas pesquisas em cultura de linfócitos (13, 19), fibroblastos de pulmão fetal (20), de pele (21) e adipócitos (22), são poucos os trabalhos utilizando fígado.

Em cadáveres humanos encontrou-se quantidade mensurável de receptores para hGH somente no fígado (15, 24).

A importância destes receptores de hGH pode ser evidenciada no Nanismo de Laron (23, 25), que apresenta resistência à ação do hGH endógeno e exógeno e cujas biópsias hepáticas revelaram ausência de receptor para hGH (26, 27).

Trabalho recente, realizado neste laboratório (28), demonstrou que fígados de mulheres grávidas apresentam níveis de ligação específica de ^{125}I -hGH muito superior aos demais fígados humanos testados. A análise de Scatchard (29), usando ^{125}I -hGH e hGH frio resultou numa linha curva, que pode ser decomposta em duas retas, sugerindo a presença de dois sítios ligadores na gravidez humana. A prolactina (PRL) e o hormônio lactogênio placentário (HPL) cir-

culam em concentrações altas na gravidez (30). Sabe-se de modelos animais, que a PRL induz a síntese de seus receptores (31, 32) e que o hGH liga-se a receptores lactogênicos. O grupo de H.G. Friesen que iniciou o estudo de receptores de GH no fígado obteve indicação, confirmada por outros autores, que a membrana celular de coelha grávida contém dois tipos de receptores que ligam o GH (16, 17). Por análise de deslocamento competitivo, um é específico para o GH e outro para a PRL (18).

O objetivo inicial deste trabalho foi esclarecer se estes eventos também estão ocorrendo em fígado de mulher grávida e obter informações acerca da natureza somatogênica e/ou lactogênica destes receptores.

II – MATERIAL E MÉTODOS

Os hGH utilizados foram provenientes do IPEN, NIH e do Hospital das Clínicas (28). Os fígados foram obtidos no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital, dentro dos princípios éticos correntes. Os microsomas de fígado foram preparados por homogeneização e centrifugação diferencial (15, 28).

A PRL e o HPL foram provenientes do NIH. Os hormônios foram marcados pelo método de lactoperoxidase (36). Os microsomas foram quantificados pelo teor de proteínas (35) e a concentração final nos ensaios foi 10mg/ml nos experimentos da Tabela I, 5mg/ml do fígado 2 nas Figuras 2 e 4 e 2mg/ml do fígado 20 nas Figuras 3 e 5.

Dos hormônios marcados com ^{125}I adicionaram-se entre 10.000 e 30.000 cpm por tubo (os experimentos das Figuras 1, 3 e 5 utilizaram hGH-NIH, das Figuras 2 e 4 hGH-IPEN e da Tabela I hGH-HC). A atividade específica dos hormônios variou entre 22 e 98 Ci/g. O volume de reação foi 0,2 ml e o tampão Tris 25 mM, pH 7,4, BSA 0,1%. A concentração de MgCl_2 foi 20 mM. A mistura foi incubada

TABELA I – Ligação específica de ^{125}I -hGH por diferentes preparações de microsoma de fígado humano obtido em autópsia.

Caso	Nome	Sexo	Idades (anos)	Óbitos há (horas)	Causa mortis	Outros dados	Ligação específica (%)
2	V.M.S	F	33	10	hemorragia cer.	grávida (8m)	28,2
3	E.F.S	F	10d	4	broncopneumonia	prematura	2,3
4	H.A.P	M	32	12	A.V.C.	—	1,5
5	S.P.S	F	69	12	neoplasia de P.	—	7,2
6	A.S.S	M	31	4	broncopneumonia	—	0,8
8	—	M	—	—	aterosclerose	—	0,3
10	—	M	—	—	insuf. mitral	—	0,6
11	—	F	—	—	broncopneumonia	—	1,3
12	M.C.M	M	48	—	aterosclerose	—	4,7
13	N.M.P	F	46	12	valvulite + ICC	—	9,0
14	G.S.A	F	14	12	insuf. Respirat.	—	0,1
15	S.S.S	F	26	—	LLA + septicemia	grávida (3m)	0,1
16	—	F	—	—	A.V.C.	—	10,3
17	R.B.	M	47	6	broncopneumonia	—	5,8
18	B.L.O	M	54	15	A.V.C.	—	3,4
19	J.I.	F	30	—	edema agudo de P.	grávida (8m)	31,1
20	M.A.B	F	30	6	crise asmática	grávida (4m)	49,7
21	—	F	40	—	choque hipovol.	parto à 1 d	28,2

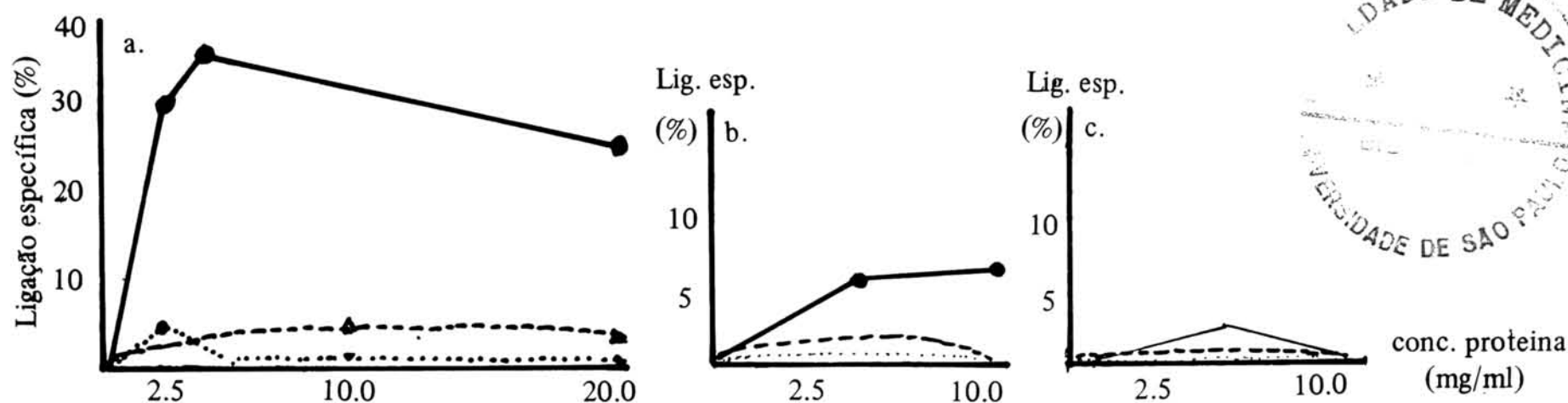


FIGURA 1 – Representação gráfica da ligação específica de ^{125}I -hGH, ^{125}I -hPRL e ^{125}I -hPL com microsomas de mulher grávida (a), mulher não grávida (b) e homem (c), em função da concentração microssomal. ^{125}I -hGH (●—●), ^{125}I -hPRL (◄—◄) e ^{125}I -hPL (x—x).

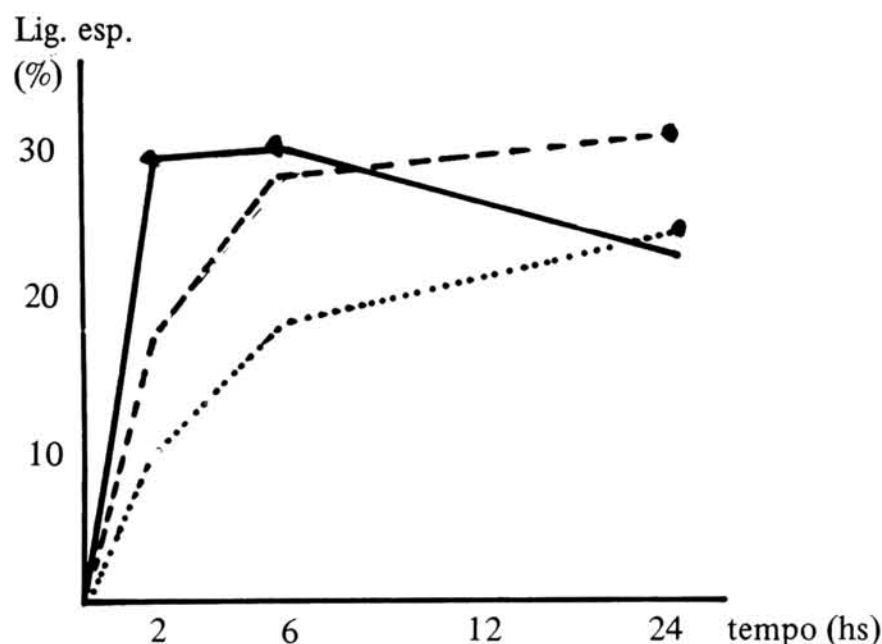


Figura 2 – Representação gráfica da ligação específica de I-hGH com microsoma de mulher grávida em função da temperatura e período de incubação. (◄—◄) 37 C, (o—o) temperatura ambiente e (●—●) 4 C.

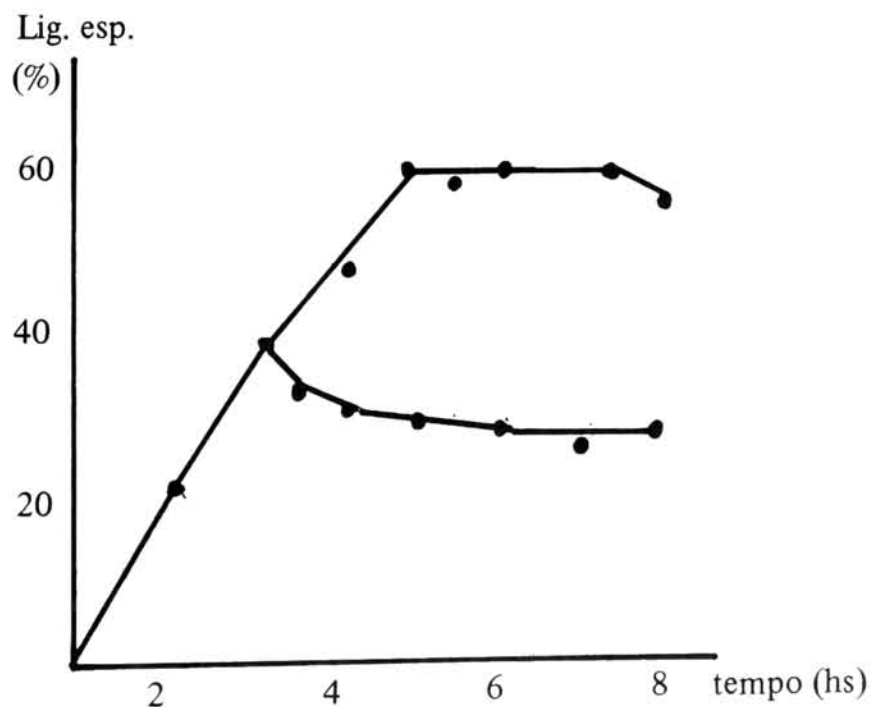


Figura 3 – Curvas de associação e dissociação do complexo hGH-receptor em função do período de incubação com microsoma de mulher grávida. Temperatura de incubação-24 C. (●—●) Associação e (◄—◄) dissociação.

por 16 hs à temperatura ambiente exceto no experimento da Figura 2. Ao final do período de incubação adicionaram-se 2 ml do tampão Tris, relatado acima, e centrifugou-se 10 minutos a 10.000 gravidades. O precipitado, contendo o complexo hormônio receptor foi levado ao contador de radiação gama. A ligação específica foi calculada subtraindo-se da cpm de cada tubo a cpm residual encontrada em tubos incubados paralelamente na presença de 1 µg de hGH, ou seja, a ligação inespecífica. Esta variou entre 3,5 e 15% nos vários ensaios. Todos os pontos experimentais foram determinados em duplicata.

III – RESULTADOS

Observa-se a existência de um grande aumento na capacidade de LE (Ligação Específica de ^{125}I -hGH) pelos MFMG (microsoma de fígado de mulher grávida) em relação aos de homens e mulheres não grávidas (Tabela I).

A LE aumentou com concentrações crescentes de MFMG, microsomas de fígado de mulher não grávida e de homens. Contudo, mais uma vez, nota-se que os MFMG têm uma capacidade de LE muito maior (Figuras 1a, b e c). A LE pelos MFMG aumentou de 3,5 a 40,0% com concentrações crescentes de MgCl_2 ou CaCl_2 variando entre 0 e 20 mM. Entre 20 e 100 mM formou-se um platô (resultados não mostrados). A LE pelos MFMG aumentou com o tempo e a temperatura de incubação até atingir o platô (Figura 2), sendo parcialmente reversível (Figura 3).

A ligação específica de ^{125}I -PRL e ^{125}I -HPL pelos microsomas foi muito pequena ou ausente (Figuras 1a, b e c). A PRL e o HPL apresentaram, respectivamente, 0,4% e 0,06% da potência do hGH em deslocar o ^{125}I -hGH dos MFMG, pois o ponto de 50% de deslocamento para hGH foi 5,4 ng/ml. As curvas de hGH e PRL mostraram-se paralelas entre si e divergentes da curva de HPL (Figura 4).

O deslocamento competitivo entre hGH e ^{125}I -hGH pela ligação com os MFMG foi submetido à análise de Scatchard (28, 29), revelando uma linha curva que pode ser decomposta em duas retas. A reta mais inclinada forneceu uma KA (constante de associação) = $5,2 \times 10^9$ l/mol e q (concentração de receptores) = $13,4 \times 10^{-15}$ mol/mg de proteína microssomal. A reta de inclinação menor forneceu uma KA = $0,65 \times 10^8$ l/mol e q = 102×10^{-15} mol/mg de proteína microssomal.

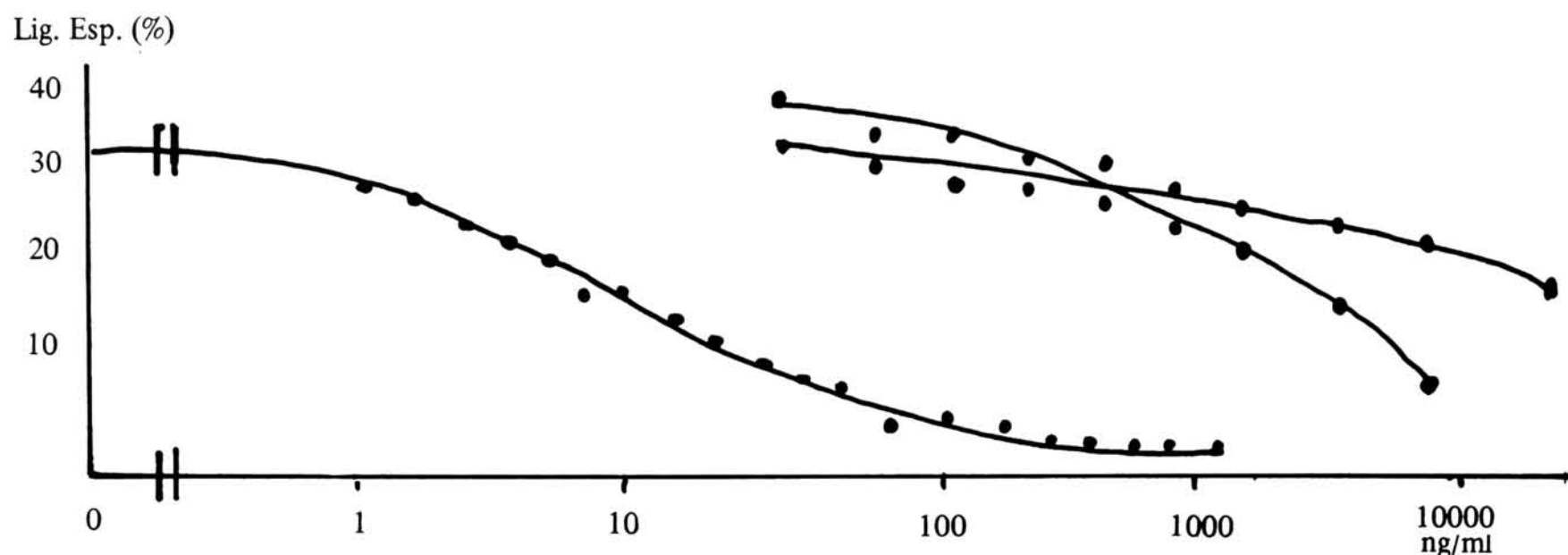


FIGURA 4 – Deslocamento competitivo de ^{125}I -hGH por hGH (●—●), hPRL (x—x) e hPL (←—→) em microssoma de fígado de mulher grávida.

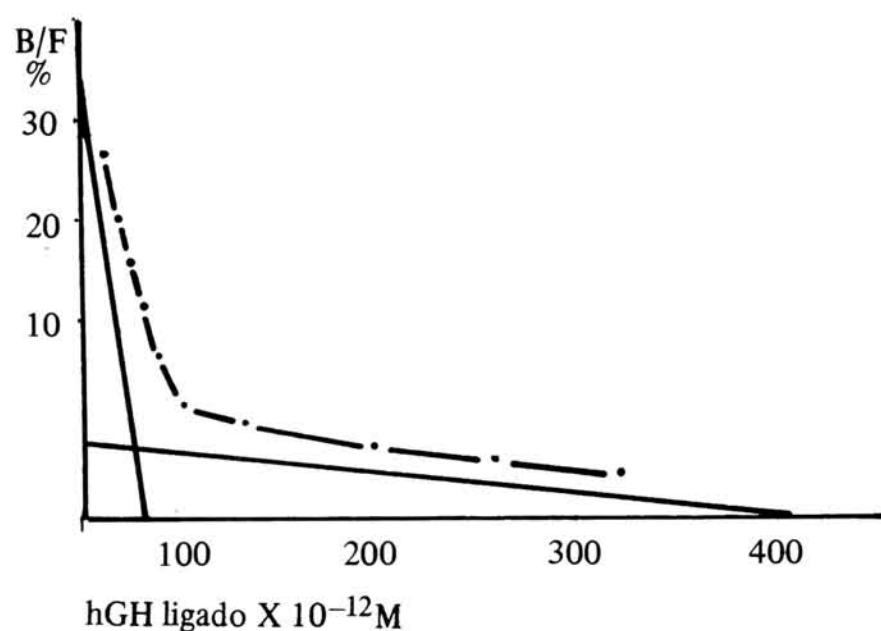


Figura 5 – Curva de Scatchard para hormônio de crescimento humano e microssoma de fígado de mulher grávida.

B/F % – Razão entre hGH ligado e livre no tubo, em porcentagem.

IV – DISCUSSÃO

Os dados deste trabalho confirmam relatos de outros autores (15, 24) acerca dos níveis baixos de ligação de hGH com microssomas de fígado humano. Adicionalmente, demonstram pela primeira vez, um grande aumento na capacidade ligante de hGH de microssomas de fígado de mulher grávida, obtido em necrópsia. De 5 mulheres grávidas estudadas somente uma não ligou o hGH especificamente, caso que veio a óbito devido a leucemia linfóide aguda, cujo fígado encontrava-se infiltrado pela neoplasia e sofrera tratamento com drogas citostáticas (Tabela I).

As curvas de concentração de microssomas mostraram níveis de ligação de ^{125}I -hGH (Fig. 1, 2 e 3) jamais atingidos por receptores de hGH em fígado humano (15, 24 e 26) e linfócitos humanos (13, 19).

Como acontece com outros receptores (19, 37) o sistema mostrou-se sensível a íons divalentes (28), alterações de tempo e temperatura de incubação (Figura 2), sendo a reação parcialmente reversível (Fig. 3) como também acontece em outros sistemas (40).

Os presentes dados sugerem também que os sítios ligadores nos microssomas de fígado de mulher grávida são específicos para ^{125}I -hGH. Assim, o hGH produziu deslocamentos do ^{125}I -hGH em concentrações semelhantes àsquelas encontradas no soro humano. Também, a PR da PRL-NIH (padrão para marcação altamente purificado) em deslocar o ^{125}I -hGH foi de 0,4%, valor muito próximo da sua potência relativa ao hGH, de 0,7%, no radioimunoensaio do hGH divulgado no catálogo do próprio NIH. Além disso, as curvas de PRL e hGH mostraram-se paralelas (Fig. 4), corroborando estas duas observações, a hipótese de que o deslocamento competitivo observado deva-se a traços de contaminação da PRL-NIH por hGH. Mesmo admitindo-se que o deslocamento seja devido à PRL, esta, provavelmente, teria um significado marginal "in vivo", pois na gravidez os níveis máximos de PRL situam-se entre 200 e 250 ng/ml, níveis que produzem deslocamento discreto no experimento descrito na Figura 4. É citado um PR para a PRL (41) de 0,6% em fígado de mulher não grávida, utilizando hGH e PRL do NIH, similar portanto ao encontrado aqui para mulher grávida. Carr e Friesen (15) não encontraram deslocamento com PRL por eles purificada. A PR do HPL, ainda menor que da PRL, foi de 0,06% e as curvas divergentes entre si (Fig. 4). Os níveis de HPL oscilam no último trimestre da gravidez, entre 4000 e 12000 ng/ml, os quais no experimento da Fig. 4 deslocam entre 44 e 51% do ^{125}I -hGH e poderiam perfeitamente ter atuação sobre estes receptores "in vivo". Os 85% de homologia de seqüência entre hGH e HPL poderiam explicar o deslocamento observado. Com fígado de mulher não grávida (38,41) o HPL-NIH efetivamente não deslocou o hGH, contrariando os trabalhos de Carr e Friesen (15), que revelou uma PR de 0,5%, com HPL por eles purificado. Adicionalmente, não foram demonstrados sítios ligadores de ^{125}I -PRL e ^{125}I -HPL (Fig. 1a), sugerindo mais uma vez que os sítios são específicos para o hGH.

Enquanto que para fígado de homem, de mulher não grávida e linfócitos humanos detecta-se 1 receptor para hGH (15, 13), neste trabalho, a análise de Scatchard dos dados de fígado de mulher grávida (casos 2 e 20) sugeriu a presença de 2 receptores para o hGH, (apresenta-se, contudo, somente os cálculos referentes ao caso 2 – Fig. 5 –,

pois no momento não dispomos de programa de computador necessário para a análise do caso 20) que devem explicar o aumento da ligação de ^{125}I -hGH observada na gravidez. Observações mais antigas (31) e críticas recentes (38) indicam que estudos de receptores de GH em sistemas heterólogos (hormônios e receptores de espécies diferentes) podem induzir a conceitos falsos, motivo pelo qual restringimos este trabalho e esta discussão ao ser humano e, também, devido a ausência deste estudo na gravidez humana. Sabendo-se que os níveis de somatomedina são dependentes da quantidade de receptores para hGH (39), o aumento destes receptores deve explicar o aumento de somatomedinas na gravidez (36). O motivo deste incremento de receptores de hGH e como ele se processa são, contudo, questões abertas à investigação.

PR – Potência Relativa: Relação entre a dose de PRL e HPL que desloca 50% do ^{125}I -hGH e a dose de hGH que desloca 50% do ^{125}I -hGH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salmon Jr., Daughaday, W.H.: "in vitro" stimulation of leucine incorporation into muscle and cartilage protein by a serum fraction with sulfation factor activity: Differentiation of effects from those of growth hormone and insulin. *Endocrinology* 87: 1168-1180, 1970.
2. Daughaday, W.H.; Hall, K.; Raben, M.S.; Salmon, Jr. W.D.; Van den Brande, J.L.; Van Wyk, I.J.J.: Somatomedin: Proposed designation for sulphation factor. *Nature (London)* 235: 107, 1972.
3. Daughaday, W.H.: The adenohipophysis. In: Williams, R.H. ed. textbook of endocrinology. Saunders. Philadelphia, 1981, p. 73-116.
4. Isaksson, O.G.P.; Jansson, I.O.; Gause, I.A.M.: Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216: 1327, 1982.
5. Salmon, Jr. W.D.; Daughaday, W.H.: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage "in vitro" *J. Lab. Clin. Med.* 49: 825-836, 1957.
6. Phillips, L.S.; Vassilopoulou-Sellin, R.; Somatomedins. *New England J. Med.* 302: 371-380, 1980.
7. D'Abronzo, F.H.; Higa, O.Z.; Laudana, A.A.; Lima, S.S.: Serum somatomedin B and growth hormone measured by radioimmunoassay in normal and cirrhotic patients. *Horm. Metab. Res.*, 1983.
8. Friesen, G.H.: Raben lecture 1980: a tale of stature. *Endocrinology Rev.* 1: 309-318, 1980.
9. Li, C.K.; Papkoff, H.: Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. *Science*, 124: 1293, 1956.
10. Raben, M.S.: Preparation of growth hormones from pituitaries of man and monkey. *Science*, 125: 883, 1957.
11. Beck, J.C.; McGany, E.E.; Dyrenfurter, I.; Venning, E.: Metabolic effects of human growth hormone in man. *Science*, 125: 884, 1957.
12. Roth, J.: Peptide hormone binding to receptors: a review of direct studies vitro. *Metabolism* 22: 1059, 1973.
13. Lesniak, M.A.; Roth, J.; Gorden, P.; Gavin III Jr.: Human Growth hormone radioreceptor assay using cultured human lymphocytes. *Nature (New Biol)* 241: 20, 1973.
14. Lesniak, M.A.; Gorden, P.; Roth, J.: Reactivity of non-primate growth hormone receptors on cultured human lymphocytes. *J.C.E. & M.* 44:5, 838-849, 1977.
15. Carr, D.; Friesen, H.G.: Growth hormone and insulin binding to human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42: 484-493, 1976.
16. Tsushima, T.; Friesen, H.G.: Radioreceptor assay for growth hormone. *I. Clin. Metab.* 37: 334-337, 1973.
17. Hughes, J.P.: Identification and characterization of high and low affinity binding sites for GH in rabbit liver. *Endocrinology* 105: 414, 1979.
18. Waters, M.J.; Friesen, H.G.: Purification and partial characterization of a non-primate growth hormone receptor. *J. Biolog. Chem.* 254; 14: 6815-6825, 1979.
19. Lesniak, M.A.; Gorden, P.; Roth, J.; Gavin, III Jr.: Binding of ^{125}I -GH to specific receptors in human cultured lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 249: 1661-1667.
20. Atkinson, P.R.; Weidman, E.R.; Bhaumick, B.; Bala, R.M.: Release of somatomedin like activity by cultured WI-38 human fibroblasts. *Endocrinology* 106: 2006-2012, 1980.
21. Clemmons, D.R.; Underwood, L.E.; Van Wyk, J.J.: Hormonal control of immuno reactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. *The American Society for Clinical Investigation*, 67: 10-19, 1981.
22. Di Girolamo, M.; Isaksson, O.; Eden, S.; Smith, V.: Specific binding of human growth hormone to human adipocytes. Program of the 63rd Annual meeting of the endocrine society, Cincinnati OH, p. 101, 1981.
23. Laron, Z.: Laron-type dwarfism (hereditary somatomedin deficiency): A Review. *Ergn. Inn. Med. Kinderkeikol.* 51: 117-150, 1984.
24. Kobberling, J.; Mc Intosh, C.; Blossey, C.: Binding capacity and affinity of membrane bound hGH receptors from rabbit liver: studies of age dependence, influence of hGH pretreatment and receptor stability. *Acta Endocrinol. Supp. (Kopenhagen)*. 215: 13, 1978.
25. Saldanha, P.H.; Toledo, S.P.A.: Familial dwarfism with high IR-GH: Report of two affected sibs with genetic and epidemiologic considerations. *Hum. Genet.* 59: 367-72, 1981.
26. Laron, Z.; Kowald-SiUbergeld, A.; Eshet, R.; Pertzalan A.: Growth hormone resistance. *Ann. Clin. Res.* 12: 269-277, 1980.
27. Golde, D.W.; Bersch, N.; Kaplan, S.A.; Rimoin, D.L.; Li, C.H.: Peripheral, unresponsiveness to human growth hormone in Laron dwarfism. *New Engl. J. Med.* 303: 1156-59, 1980.
28. D'Abronzo, F.H.: Receptores do hormônio de crescimento no fígado humano. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da USP. 1985.
29. Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Science.* 51: 660, 1949.
30. Simpson, E.R.; McDonald, P.C.: Endocrinology of pregnancy. In: Williams, R.H., ed. Textbook of Endocrinology. Saunders Philadelphia. p. 412-421, 1981.
31. Fix, J.A.; Leppert, P.; Moore, W.V.: Growth hormone and prolactin binding to rabbit liver plasma membranes. *Horm. Metab. Res.* 13: 510-514, 1981.
32. Posner, B.I.: Regulation of lactogen specific binding sites in rat liver. Studies on the role of lactogens and estrogen. 67rd Annual Meeting of the Endocrine Society, New York, 1975.
33. Nicolau, W.; Villares, S.M.; Cardia, R.G.; Palomino, A.C.P.; Mendonça, B.B.; Bloise, W.; Assis, L.M.; Mattar, E.: Extração e purificação do hormônio de crescimento de hipófises humanas congeladas (hGH-HC). *Arq. Bras. Endocr. Metab.* 29: 7, 1985.
34. Schacterle, G.R.; Pollack, R.L.: A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.* 51: 654-55, 1973.
35. D'Abronzo, F.H.: Contribuição ao estudo da somatomedina B. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da USP, na área de Endocrinologia, 1983.
36. Donner, D.B.; Nakayama, K.; Tani, S.; Lutz, U.; Sonenberg, M.: The uptake and degradation of growth hormone fragments by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 253: 6717-23, 1978.
37. Moore, W.V., Draper, S., Chung, H. Hung.: Species variation in the binding of hGH to hepatic membranes. *Hormone Res.* 21: 33, 1985.
38. Maes, M., Underwood, L.E., Gerard, G., Ketelslegers, J.M. Relationship between plasma somatomedin-C and liver somatogenic binding sites in neonatal rats during malnutrition and after short and long term refeeding. *Endocrinology* 115: 786, 1984.
39. Ymer, S.; Stevenson, J.I., Herington, A.C. Identification of rabbit liver cytosolic binding protein for human growth hormone. *Biochem. J.* 221: 617, 1984.
40. Hung, C.H., Karen, K., Moore, W.V. Characteristics of somatotrophic growth hormone binding to homologous liver plasma membranes. *Mol. and Cel. Endocrinol.* 39: 189, 1985.

Um
banco
que
fala
a sua
língua.



BANCO FRANCÊS E BRASILEIRO S.A.
associado ao CREDIT LYONNAIS