

Atividade Colinesterásica em Tireóide de Ratos: Resposta a Uma Sobrecarga de Iodo

artigo original

RESUMO

A utilização do iodo antes de cirurgias de tireóide visa a redução do fluxo sanguíneo para a glândula e melhora da hemostasia. Para tentar elucidar o mecanismo pelo qual a vasoconstricção se instala, foi determinada a atividade colinesterásica em tireóides de ratos Wistar machos (240-250g de peso corporal), submetidos a uma sobrecarga oral de iodo pela oferta de solução aquosa de iodato de potássio (KIO_3 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como água de beber, por 3 e 7 dias; o grupo controle recebeu água durante o mesmo período. Ao final do tratamento os animais foram sacrificados e suas tireóides retiradas, limpas e pesadas; o rim direito e o lobo direito do fígado foram usados como controles da atividade colinesterásica. Foram preparados homogeneizados em tampão fosfato (pH=8,0), contendo 0,32M de sacarose, na concentração de 40mg de tecido/ml. Os ratos que receberam KIO_3 por 7 dias tiveram diminuição no peso da tireóide quando comparados aos controles ($p<0,05$), o mesmo não acontecendo aos 3 dias de tratamento. Aos 3 dias de tratamento, a atividade colinesterásica tireóidea foi de $5,38\pm 0,36$ nmol/min.mg para o grupo controle ($n=12$) e de $5,43\pm 0,98$ nmol/min.mg para o grupo tratado ($n=11$) (NS); valores bastante similares foram também encontrados com o tratamento de 7 dias (controles: $5,42\pm 0,27$ nmol/min.mg ($n=8$) e tratados: $5,63\pm 0,88$ nmol/min.mg ($n=8$); NS). Nossos resultados sugerem que, a despeito da vasoconstricção, não há alteração da atividade colinesterásica na tireóide em resposta a sobrecarga oral de iodo. (Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 347-351)

Heraldo E. Borges
Andréia C.P. Martins
Paulo C.F. Mathias
Roberto Z. Esteves

Departamento de Biologia Celular e
Genética e Departamento de
Medicina, Universidade Estadual de
Maringá (UEM), Maringá, PR.

Unitermos: Tireóide; Atividade colinesterásica; Iodo; Excesso de iodo

ABSTRACT

Iodine is given during the 7 to 10 days immediately preceding thyroid operation to decrease the vascularity of the gland, making it less friable and decreasing difficulties for the surgeon. The present work evaluated cholinesterase activity in rat thyroid glands on high iodine intake to establish a possible relationship between high iodine-induced vasoconstriction and parasympathetic activity. Male Wistar rats weighing 240-250g were given KIO_3 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) as drinking water for 3 and 7 days; the control groups received tap water. At the end of the treatment period rats were sacrificed and their thyroid glands taken out, washed and weighed; the liver and the kidney were used as parameters of cholinesterase activity. Rats that received KIO_3 for 7 days had a decreased thyroid gland weight compared to controls ($p<0.05$). However, no significant decrease in thyroid weight occurred after 3 days of treatment. At 3 days thyroid gland cholinesterase activity (nmol of acetylthiocholine hydrolysed/min.mg of protein) was 5.38 ± 0.36 (mean \pm SD) in the control group ($n=12$) and 5.43 ± 0.98 in the treated group ($n=11$) (NS). After 7 days of treatment cholinesterase activity was 5.42 ± 0.27 in the control group ($n=8$) and 5.63 ± 0.88 in the treated group ($n=8$) (NS). Our results suggest that the iodine-induced thyroid gland vasoconstriction is not due to changes in thyroid

Recebido em 11/09/1999
Revisado em 18/02/2000
Aceito em 10/04/2000

cholinesterase activity. (**Arq Bras Endocrinol Metab** 2000;44/4: 347-351)

Keywords: Thyroid gland; Cholinesterase activity; Iodine; Iodine excess

ABIOSÍNTESE DE HORMÔNIOS TIREÓIDEOS de (HT) é dependente da presença de quantidades adequadas de iodo. Durante deprivação de iodo, os níveis séricos de HT são mantidos constantes devido à mobilização de consideráveis reservas de T_4 e T_3 presentes no colóide, pela otimização do transporte de iodeto para o interior da célula folicular tireóide e aumentando a eficiência da síntese de iodotironinas catalisada pela enzima tireoperoxidase (1). Da mesma maneira, durante ingestão elevada de iodo, níveis estáveis de HT são mantidos na corrente sanguínea devido, em parte, a uma autorregulação do transporte de iodeto, o que limita sua captação e organificação pelas células foliculares (2,3).

A tireóide recebe um fluxo sanguíneo que corresponde a cerca de cinco vezes o seu peso, sendo um dos órgãos mais vascularizados do organismo. Este suprimento sanguíneo elevado se deve à necessidade da tireóide ser exposta a uma quantidade adequada de iodo a fim de manter a função normal da glândula. Conseqüentemente, a alteração do fluxo sanguíneo é um importante fator para manter os níveis de HT constantes em condições de variação da ingestão de iodo (4). Altas concentrações de iodo são geralmente administradas durante os 7 a 10 dias anteriores à intervenção cirúrgica na tireóide, com o objetivo de reduzir seu fluxo sanguíneo (5,6). A glândula torna-se mais firme, melhorando as condições cirúrgicas.

A tireóide é ricamente inervada por fibras colinérgicas originadas do nervo vago. Estas fibras estão presentes em volta e entre os folículos e vasos sanguíneos tireóideos (7-9). O estímulo colinérgico promove vasodilatação, inibição da liberação de HT (10) e acúmulo de óxido nítrico (11) e GMP cíclico (12-14) no tecido tireóideo. A acetilcolinesterase (AChE) tem papel importante na neurotransmissão colinérgica, por ser responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), controlando o nível de ACh presente na fenda sináptica (15). A AChE está localizada na membrana pós-sináptica (16) e o número de moléculas disponíveis parece ser controlado pela interação entre a ACh e seu receptor (17). Sua atividade pode ser regulada positivamente ou negativamente (18,19). Com isso a AChE pode ser utilizada como indicador do tônus parassimpático.

Com base no efeito vasoconstritor do iodo (em altas concentrações) na tireóide e nos efeitos da estimulação colinérgica, o presente trabalho procurou

avaliar a existência de uma relação entre vasoconstrição induzida pelo iodo e tônus parassimpático.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar machos, pesando 240-250g foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais receberam solução aquosa de KIO_3 (3 μ g/ml) como água de beber, por 3 e 7 dias, enquanto os grupos controle receberam apenas água. Ambos os grupos tiveram livre acesso à ração (NUVILAB) que continha 2ppm (partes por milhão) de iodo. Durante o período de tratamento, os animais foram mantidos em biotério com controle de temperatura (23 \pm 2°C) e fotoperíodo de 12h de claro/escuro (luz de 07:00 às 19:00h).

Preparo dos tecidos

Ao final do tratamento os animais foram anestesiados com Nembutal® (40mg/kg); em seguida a glândula tireóide e amostras do fígado e rim foram retirados e mantidos em solução salina (NaCl 0,9%) sob baixa temperatura (4°C). Após a retirada dos órgãos os animais foram sacrificados. Os tecidos foram isolados, pesados e recolhidos em tampão fosfato 0,01M, pH 8,0, contendo 0,32M de sacarose. As amostras de fígado e rim, foram obtidas como parâmetros de atividade colinesterásica alta e baixa, respectivamente.

Preparo dos homogeneizados

Os homogeneizados (40mg/ml) foram preparados em tampão fosfato 0,01M (pH=8,0), contendo 0,32M de sacarose, utilizando homogenizador GLAS-COL® (GKH-GT MOTOR CONTROL) e centrifugados a 6.000 rpm durante 2 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C.

Determinação da atividade colinesterásica

A atividade colinesterásica foi determinada pelo método descrito por Ellman et al. (20), usando iodeto de acetiltiocolina (Asch) na concentração final de 0,5mM como substrato. Todas as soluções foram mantidas a 4°C durante a dosagem e as amostras foram analisadas em duplicata. As cubetas continham um volume final de 1560 μ l: 1300 μ l de tampão fosfato, 200 μ l de homogeneizado da glândula tireóide, 50 μ l de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 10 μ l de Asch. Para a avaliação da atividade colinesterásica em fígado e rim, foram utilizados 100 μ l e 150 μ l de homogeneizados, respectivamente. O *blank* era composto por tampão fosfato, DTNB e Asch. A determinação do

conteúdo de proteínas foi feito pelo método de Lowry et al. (21); albumina bovina foi utilizada como padrão. Os resultados foram expressos como nmoles de Asch hidrolisados por minuto e miligrama de proteína (nmol/min.mg prot.).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média±desvio-padrão. O teste t de Student foi usado para determinar diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre grupo controle e tratado e o teste ANOVA foi usado para comparar a atividade colinesterásica entre os tecidos (rim, fígado e tireóide).

Materiais

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), com exceção do iodato de potássio (Merck - Darmstadt, Germany) e da sacarose (Vetec - Duque de Caxias, RJ, Brasil).

RESULTADOS

Os animais tratados com KIO_3 durante 3 dias não apresentaram diferença estatística na atividade colinesterásica na tireóide; isto também foi observado para o rim e fígado. No tratamento de 7 dias, também não ocorreu alteração na atividade colinesterásica (tabela 1) (tireóide $p=0,53$; rim $p=0,51$; fígado $p=0,66$). Quando os diferentes tratamentos (3 e 7 dias) foram comparados, também não se encontrou diferença significativa entre eles.

A atividade colinesterásica no fígado ($3,32 \pm 0,76$ nmol/min.mg prot) corresponde a aproximadamente 62% da encontrada na tireóide ($5,38 \pm 0,36$ nmol/min.mg prot) e no rim ($1,61 \pm 0,26$ nmol/min.mg prot) a atividade corresponde a 30% da encontrada na tireóide ($p < 0,0001$).

Os ratos que receberam KIO_3 durante 7 dias tiveram diminuição significativa no peso da tireóide (figura 1). No entanto, esta alteração não ocorreu durante o tratamento de 3 dias (controle: $52,36 \pm 8,75$ mg; tratado: $49,74 \pm 6,35$ mg). Quando se relacionou o peso da tireóide ao peso corporal, os resultados foram semelhantes.

DISCUSSÃO

Para a realização de nossos experimentos foram utilizados tratamentos com dieta elevada de iodo, nos períodos de 3 e 7 dias, pois durante o processo de instalação do fenômeno de vasoconstrição induzido por iodo poderia haver alteração transitória ou tempo-dependente na atividade colinesterásica. Apesar da vasoconstrição induzida pelo iodo ser demonstrada por vários autores (4,6,22), a natureza do processo pelo qual ele se instala ainda é incerto.

Nossos dados mostraram alta atividade colinesterásica na tireóide, quando comparados aos outros tecidos, corroborando os achados de vários autores (7-9) que demonstraram a presença de fibras parassimpáticas em tireóides de camundongos e humanos. Estes resultados sugerem uma influência do sistema nervoso parassimpático na função tireóidea.

Ao final do tratamento de 7 dias houve diminuição do peso da glândula, o que não ocorreu durante o tratamento de 3 dias. Com base nestes dados, pode-se propor que a diminuição do peso da tireóide foi tempo-dependente; o mecanismo permanece incerto.

Estudos anteriores em tireóide, mostraram que o estímulo por agonistas colinérgicos promove acúmulo de GMPc (12-14). Esteves e cols. (11) realizaram estudos em tireóide de cão e verificaram que o acú-

Tabela 1. Atividade colinesterásica em tireóide, fígado e rim de ratos submetidos a dieta elevada de iodo durante 3 e 7 dias.

	ATIVIDADE COLINESTERÁSICA (nmol/min.mg prot) *	
	CONTROLE	TRATADO
RIM		
3 dias	$1,61 \pm 0,26$	$1,42 \pm 0,28$ NS
7 dias	$1,63 \pm 0,21$	$1,72 \pm 0,38$ NS
FÍGADO		
3 dias	$3,32 \pm 0,76$	$3,34 \pm 0,88$ NS
7 dias	$3,35 \pm 0,47$	$3,24 \pm 0,50$ NS
TIREÓIDE		
3 dias	$5,38 \pm 0,36$	$5,43 \pm 0,97$ NS
7 dias	$5,42 \pm 0,27$	$5,36 \pm 0,88$ NS

NS=Não significativo

* Resultados apresentados como média ± desvio-padrão, sendo expressos em nmoles de Asch hidrolisada por minuto e miligrama de proteína (n=8 a12).

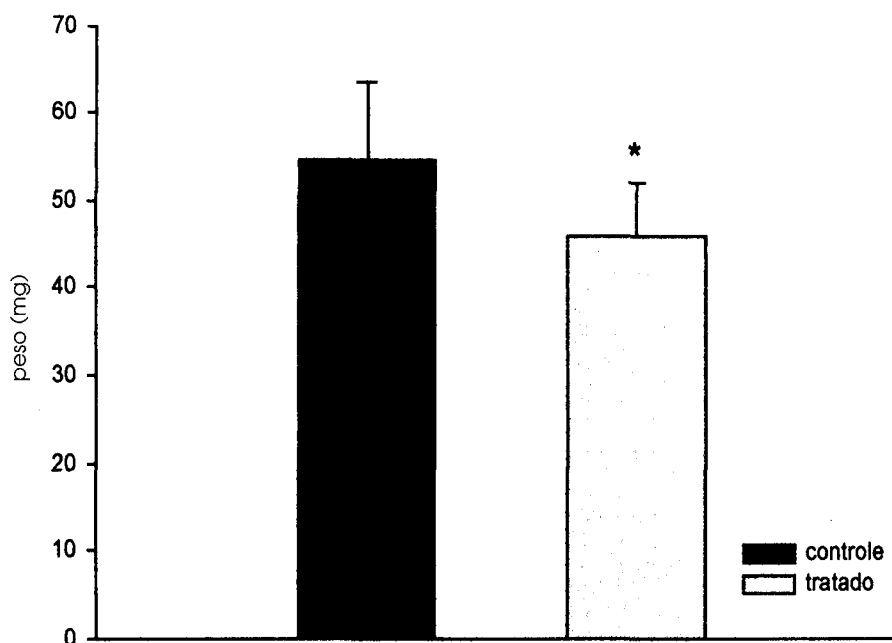


Figura 1. Peso da glândula tireóide (mg) de ratos tratados durante 7 dias com KIO_3 (3 μ g/ml). Os dados representam média \pm desvio-padrão (n=8). * p<0,05

mulo de GMP cíclico induzido pela carbamilcolina era bloqueado por inibidores da NO sintase e da guanilato ciclase. A enzima NO sintase depende de vários cofatores, entre eles o NADPH (23). Stuehr e cols. (24) mostraram que o DPI (difênileno-iodônio), um inibidor de enzimas dependentes de NADPH, inibe a ativação da NO sintase. Com base nestes estudos sugerimos que, durante elevada ingestão de iodo, compostos aromáticos iodados, como o DPI, poderiam estar aumentados e então diminuir o acúmulo de GMPc. Hoje sabe-se que o efeito vasodilatador do NO é mediado por GMPc (25), o que reforça a hipótese que a diminuição do acúmulo de GMPc poderia ser um processo importante na instalação do fenômeno de vasoconstrição. Esta hipótese deverá ser testada nos nossos trabalhos subsequentes.

Nossos resultados sugerem que, a despeito da vasoconstrição, não há alteração da atividade colinesterásica na tireóide em reposta a sobrecarga de iodo.

AGRADECIMENTOS

Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq, processo N^o 52.1815/96-7 (PCFM) e processo N^o 300569/97-1(RZE).

REFERÊNCIAS

1. Ingbar SH. Autoregulation of the thyroid: response to iodide excess and depletion. **Mayo Clin Proc** 1972;47:814-23.
2. Chazenbalk GD, Valsecchi RM, Krawiec L, Burton G, Juvenal GJ, Montegudo E, et al. Thyroid autoregulation: Inhibitory effects of iodinated derivatives of arachidonic acid on iodine metabolism. **Prostaglandins** 1988;36:163-72.
3. Sherwin JR, Price DJ. Autoregulation of thyroid transport: evidence for the mediation of protein synthesis in iodine-induced suppression of iodide transport. **Endocrinology** 1986;119:2553-9.
4. Michalkiewicz M, Huffman LJ, Connors JM, Hedge GA. Alterations in thyroid blood flow induced by varying levels of iodine intake in the rat. **Endocrinology** 1989;125:54-60.
5. Wilkin TJ, Swanson Beck J, Michie W. Does preoperative iodide treatment for thyrotoxicosis bring about involution? **J Clin Pathol** 1977;30:99-102.
6. Chang DCS, Wheeler MA, Woodcock JP, Curley I, Lazarus JR, Fung H, et al. The effect of preoperative Lugol's iodine on thyroid blood flow in patients with Graves' hyperthyroidism. **Surgery** 1987;102:1055-61.
7. Amenta F, Caporuscio D, Ferrante F, Porcelli F, Zomparelli M. Cholinergic nerves in the thyroid gland. **Cell Tiss Res** 1978;195:367-70.

8. Melander A, Sundler F. Presence and influence of cholinergic nerves in the mouse thyroid. **Endocrinology** 1979;105:7-9.
9. Van Sande J, Dumont JE, Melander A, Sundler F. Presence and influence of cholinergic nerves in the human thyroid. **J Clin Endocrinol Metab** 1980;51:500-2.
10. Maayan ML, Vopert EM, From A. Acetylcholine and nor-epinephrine: compared actions in thyroid metabolism. **Endocrinology** 1993;112:1358-62.
11. Esteves RZ, Van Sande J, Dumont JE. Nitric oxide as a signal in thyroid. **Mol Cell Endocrinol** 1992;90:R1-R3.
12. Yamashita K, Field JB. Elevation of cyclic guanosine 3'5' monophosphate levels in dog thyroid slices caused by acetylcholine and sodium fluoride. **J Biol Chem** 1972;247:7062-6.
13. Van Sande J, Decoster C, Dumont JE. Effects of carbamylcholine and ionophore A-23187 on cyclic 3'5' AMP and cyclic 3'5' GMP accumulation in dog thyroid slices. **Mol Cell Endocrinol** 1979;14:45-57.
14. Brandi ML, Rotella CM, Tanini A, Toccafondi R, Aloj SM. Cholinergic control of cyclic nucleotide metabolism in human thyroid cells. **J Endocrinol Invest** 1987;10:451-8.
15. Brimijoin S. Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature localization and dynamics. **Prog Neurobiol** 1983;21:291-322.
16. Mc Bride WJ, Cohen H. Cytochemical localization of acetylcholinesterase on isolated synaptosomes. **Brain Res** 1972;41:489-93.
17. Fernandez HL, Hodges-Savola CA. Trophic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles. **Neurochem Res** 1992;17:115-24.
18. Moudgil VK, Kanungo MS. Effect of age of the rat on induction of acetylcholinesterase of the by 17 β -estradiol. **Biochem Biophys Acta** 1973;329:211-20.
19. Battie CN, Moran N. Sympathectomy alters acetylcholinesterase expression in adult rat heart. **Cardiovasc Res** 1990;24:335-9.
20. Ellman GL, Courtney KD, Andres JrV, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol** 1961;7:88-95.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951;193:265-75.
22. Brownlie BEW, Turner JG, Ellwood MA, Rogers TGH, Armstrong, DI. Thyroid vascularity-documentation of the iodide effect in thyrotoxicosis. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1977;86:317-22.
23. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 1991;43:109-38.
24. Stuehr DJ, Fasehun AO, Kwon NS, Gross SS, Gonzales JA, Levi R, et al. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. **FASEB J** 1991;5:98-103.
25. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV International Union of Pharmacology: Nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol Rev** 1997;49:137-42.

Endereço para correspondência:

Roberto Zonato Esteves
Universidade Estadual de Maringá (UEM) -
Departamento de Medicina
Avenida Mandacarú 1590
87.080-000 Maringá, PR
Tel/Fax: (044) 225-8484
e.mail: roberto_esteves@wnet.com.br