

Sistema Enzimático Gerador de Peróxido de Hidrogênio - NADPH Oxidase na Tireóide Humana

Luciene C. Cardoso
Márcia D.L. Figueiredo
Manoel G. Domingos
Mario Vaisman
Denise P. Carvalho

RESUMO

No presente estudo avaliamos a atividade geradora de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em frações particuladas de tireóides suínas e humanas. Inicialmente, analisamos as propriedades bioquímicas da NADPH-oxidase - enzima geradora de H_2O_2 - localizada na membrana apical da célula tireóide suína. Nossos resultados demonstram que a atividade geradora de H_2O_2 na tireóide suína ocorre, principalmente, na fração de membrana apical tireóide (P 3.000g). Entretanto, no P 3.000g a enzima NADPH-oxidase é apenas parcialmente cálcio-dependente, ao contrário do que acontece em frações purificadas de membrana tireóide suína, nas quais a enzima é completamente dependente de cálcio, conforme estudos anteriores. Nossos resultados confirmam os previamente descritos para a NADPH-oxidase tireóide suína. Em tecidos tireóides humanos, a geração de H_2O_2 ocorreu, tanto na fração microsomal (P 100.000g) quanto na fração de membrana apical (P 3.000g). Nossos dados revelam ainda que a NADPH-oxidase humana é completamente cálcio-dependente, ativada por altas concentrações de fosfato e parece ser tão ativa na glândula humana quanto na suína. Além disto, a enzima humana é dependente de adenina-flavina-dinucleotídeo (FAD) no meio de reação, ou seja, parece ser uma flavoproteína, assim como a proteína suína. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 352-357**)

Unitermos: Peróxido de hidrogênio; NADPH-oxidase; Tireóide suína; Tireóide humana

ABSTRACT

In the present study we evaluated the enzyme responsible for hydrogen peroxide (H_2O_2) generation in porcine and human thyroid glands. First, we analyzed the biochemical properties of the hydrogen peroxide generating enzyme (NADPH-oxidase), localized in the apical membrane of porcine thyroid cells. Our results showed that the H_2O_2 generating activity in porcine thyroids occurs mainly in the apical membrane fraction (P 3.000g). In the porcine P 3.000g, thyroid NADPH-oxidase was partially calcium-dependent; however, in a purified porcine thyroid membrane fraction the enzyme is completely calcium-dependent, as previously determined. These data agree with those already reported for the porcine enzyme. In humans, H_2O_2 generation occurred both in the microsomal (P 100.000g) and in the apical membrane fractions (P 3.000g). Our data reveal that NADPH-oxidase seems to be as active in human thyroid glands as in porcine thyroids; both are activated by phosphate and calcium in high concentrations. Furthermore, the human NADPH-oxidase is completely calcium-dependent and requires flavine adenine dinucleotide (FAD) in the reaction mixture, suggesting the human NADPH-oxidase to be a flavoenzyme, as the porcine protein. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 352-357**)

Keywords: Hydrogen peroxide; NADPH-oxidase; Porcine thyroid; Human thyroid

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (LCC, DPC) e Serviços de Endocrinologia (MDLF, MV) e de Cirurgia Geral (MGD), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Recebido em 05/09/1999
Revisado em 18/02/2000
Aceito em 10/04/2000

A TIREÓIDE É RESPONSÁVEL PELA SÍNTESE e secreção da triiodotironina (T3) e da tiroxina (T4); em menor proporção é formada triiodotironina reversa (rT3). Os precursores destes hormônios são derivados da iodação de resíduos tirosila da molécula de tireoglobulina, originando a moniodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT). Assim, formação de T3 e T4 ocorre em várias etapas: transporte ativo do iodeto para a tireóide, oxidação do iodeto, síntese da tireoglobulina (Tg), iodação dos resíduos tirosila da Tg para formação das iodotirosilas (MIT e DIT) e acoplamento das iodotirosilas (1).

A formação de quantidades adequadas dos hormônios tireóideos depende, em primeira instância, da disponibilidade de iodo. O transporte de iodeto para as células foliculares tireóideas é realizado contra um gradiente eletroquímico, através de um co-transportador Na^+/I^- que é positivamente regulado pelo hormônio tireotrófico (TSH) (2). No interior da célula folicular tireóidea, o iodeto é rapidamente oxidado e, posteriormente, organificado na molécula de Tg (3). A enzima chave nestes processos de iodação e acoplamento dos resíduos iodotirosila da Tg é a tireoperoxidase (TPO) (4), uma hemoproteína glicosilada ancorada à membrana plasmática apical da célula tireóidea, com o domínio catalítico voltado para o colóide (5). A expressão do gene da TPO é restrita ao tecido tireóideo (6) e está sob controle do TSH (7). A reação de oxidação do iodeto catalisada pela TPO requer como cofator o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um aceptor de elétrons essencial para as reações de iodação e acoplamento (4). Nunez e cols. (8) postularam a existência de dois sítios catalíticos na TPO oxidada pelo peróxido de hidrogênio (composto I), um favorecendo o iodeto e o outro favorecendo a tirosina. Ambos os substratos sofrem oxidação monoelétrica, havendo formação dos radicais livres $I^\cdot$ e $Tyr^\cdot$. Estes radicais se unem, enquanto ligados à enzima, formando um complexo ternário, originando a MIT. Esta pode sofrer oxidação monoelétrica e reagir com $I^\cdot$, formando a DIT (4).

Vários sistemas enzimáticos foram propostos como responsáveis pela geração de H_2O_2 na tireóide, entre eles: NADPH-citocromo c redutase (9), NADH-citocromo b_5 redutase (10), monoamina oxidase (11) e xantina oxidase (12). Porém, estes sistemas estão mais associados às frações microsomal (10) ou mitocondrial das células tireóideas (11) do que com a fração relacionada à atividade TPO, ou seja, membrana apical. Bjorkman e cols. (13-15) demonstraram, em folículos tireóideos murinos e porcinos, que o sistema gerador de H_2O_2 está localizado na superfície apical da

célula folicular tireóidea, que utiliza NADPH como substrato e que há aumento da sua atividade quando se adiciona ao meio o ionóforo de cálcio A23187, sugerindo que os níveis de cálcio intracelular poderiam regular a geração de H_2O_2 . Posteriormente, demonstrou-se que a enzima responsável pela geração de H_2O_2 é cálcio-dependente (16,17). Foi sugerido que seria necessária a ligação do cálcio a uma sub-unidade inibitória da enzima, ou a um domínio auto-inibitório, para convertê-la da forma inativa para a forma ativa (17,18).

O sistema enzimático responsável pela geração de H_2O_2 foi melhor caracterizado em tireóides suínas, tendo sido demonstrado que a enzima é uma flavoproteína, já que utiliza um dinucleotídeo flavina-adenina (FAD) como grupamento prostético (19). O mecanismo bioquímico da geração de H_2O_2 e a natureza molecular do transporte de elétrons associado à membrana tireóidea ainda não está completamente elucidado, porém este mecanismo foi muito estudado (16-26), com algumas divergências entre os resultados obtidos. Os autores concordam que o sistema gerador de H_2O_2 é dependente de cálcio e que envolve uma NADPH-oxidase.

O principal hormônio regulador da NADPH-oxidase tireóidea é o TSH. Bjorkman e cols. (15), utilizando folículos abertos de porcos, demonstraram que o efeito estimulador do TSH não seria através do aumento de AMPc, portanto, deveria estar ligado ao aumento intracelular de cálcio. Resultados similares foram obtidos em amostras tireóideas de bovinos (27). Em ratos, a geração de H_2O_2 estimulada por TSH parece ser mediada tanto pelo AMPc, quanto por aumento de fosfatidil-inositol/cálcio (28). Além disto, Raspé e Dumont (2) demonstraram que o H_2O_2 celular era liberado sob controle tônico do TSH, via cascata de AMPc, em tireócitos caninos. Estes dados estão de acordo com os descritos posteriormente por Carvalho e cols. (29) em tireócitos suínos, nos quais a enzima responsável pela geração de H_2O_2 também foi induzida pelo TSH através do aumento de AMPc. Desta maneira, assim como a TPO e a Tg, o sistema gerador de H_2O_2 (NADPH-oxidase tireóidea) parece ser um marcador de diferenciação celular tireóidea, já que sua síntese é regulada por TSH (2,29).

A caracterização deste sistema enzimático em tireóides humanas contribuirá para o melhor entendimento da fisiopatologia de algumas doenças desta glândula. Assim, no presente estudo, padronizamos a dosagem do sistema gerador de peróxido de hidrogênio na tireóide e o estudamos em tecidos paratiróides de nódulos frios.

PACIENTES E MÉTODOS

Estudo do sistema gerador de H_2O_2 em particulados tireóideos de porco

A dosagem do sistema gerador de H_2O_2 tireóideo foi padronizada em particulados tireóideos de porco, gentilmente cedidos pelo Dr. Alain Virion (INSERM, França), para possibilitar a comparação de nossos resultados àqueles obtidos anteriormente no laboratório do grupo francês (17,19).

Diferentes volumes de particulado tireóideo suíno (25, 50, 100, 150 e 200 μ l) foram incubados em tampão fosfato de sódio 50mM ou 150mM, pH 7,2 contendo 10 μ M NaN_3 (para inibir qualquer enzima que pudesse destruir o peróxido gerado), 10 μ M EGTA, 12 μ M $CaCl_2$ e 100 μ M NADPH (substrato da enzima). As amostras foram incubadas em banho-maria a 30°C. Após 5, 10, 15 e 20 minutos de incubação 100 μ l do incubado foram transferidos para tubo contendo 10 μ l de HCl 2,4N para paralisar a reação e destruir o NADPH restante. Deste modo evitamos a geração adicional de H_2O_2 após os intervalos de tempo determinados. O H_2O_2 gerado foi medido pelo método da escopoletina, conforme anteriormente descrito (17).

Processamento dos tecidos humanos para caracterização da geração de H_2O_2

Utilizamos amostras de tecidos paranodulares tireóideos provenientes de quatro pacientes com bócio nodular atóxico (nódulos hipocaptantes). Todos os pacientes estavam eutireóideos no dia da cirurgia e não receberam nenhuma medicação no período pré-operatório. Este estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ.

As amostras de tecido tireóideo foram dissecadas e as áreas hemorrágicas e o tecido conjuntivo foram removidos em placa de petri sobre gelo. O tecido com aspecto homogêneo foi pesado e homogeneizado em Ultra-Turrax, 1g de tecido para 3ml de tampão H (fosfato de sódio 50mM, sucrose 250mM, EGTA 1mM, DTT 200 μ M, pH 7,2). O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 3.000g, 15 min, 4°C (rotor SS 34, Sorval - centrifugação I). O precipitado foi ressuspensão em 3ml de tampão A2 (fosfato de sódio 50mM, sucrose 250mM, cloreto de magnésio 2mM, pH 7,2) e centrifugado nas mesmas condições anteriores; o mesmo processo foi repetido duas vezes, sendo esses sobrenadantes desprezados. O último precipitado (P 3.000g) foi ressuspensão em 1ml de tampão A2. O sobrenadante da centrifugação I foi centrifugado a 100.000g, 1h, 4°C (rotor 70.1 Ti, ultracentrífuga Beckmann - centrifu-

gação II). O precipitado foi ressuspensão em 3ml de tampão A2 e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspensão em 1ml de tampão A2 (P 100.000g).

Diferentes volumes das preparações P 3.000g (membrana apical) e P 100.000g (microsoma) foram incubados em tampão fosfato de sódio 50, 170 ou 200mM, pH 7,2 contendo 10 μ M NaN_3 , 10 μ M EGTA, 0,4 μ M FAD, 15 μ M $CaCl_2$ e 200 μ M NADPH (30). As amostras foram incubadas em banho-maria a 30°C. Após 5, 10, 15 e 20 minutos de incubação 100 μ l do incubado foram transferidos para tubo contendo 10 μ l de HCl 2,4 N. O H_2O_2 gerado foi medido pelo método da escopoletina (30).

A dosagem protéica das amostras foi feita usando-se o método de Bradford (31). As dosagens enzimáticas foram feitas em pelo menos dois experimentos diferentes para cada amostra de tecido humano.

RESULTADOS

Inicialmente, padronizamos a metodologia de dosagem de peróxido de hidrogênio. Houve diminuição progressiva da fluorescência com o aumento da concentração de H_2O_2 adicionada ao meio de reação: a oxidação da escopoletina pelo H_2O_2 ocorreu praticamente na razão mol por mol.

A geração de H_2O_2 aumenta progressivamente em função do volume da preparação de particulado de tireóide suína utilizado (figura 1), sendo a atividade máxima alcançada com 100 μ l da preparação. Assim, utilizamos esse volume de amostra (100 μ l) para estudar algumas características do sistema gerador de H_2O_2 . A quantidade de H_2O_2 gerada aumentou progressivamente com o aumento da molaridade de cálcio no meio de incubação (figura 2). Entretanto, não houve variação significativa entre as atividades medidas em diferentes concentrações de fosfato (50 e 150mM) (figura 3).

Nas tireóides humanas, detectamos atividade geradora de H_2O_2 tanto no P 3.000g (207nmol H_2O_2 $\cdot$ h $^{-1}$ $\cdot$ g $^{-1}$ ptn, em média) quanto no P 100.000g (190nmol H_2O_2 $\cdot$ h $^{-1}$ $\cdot$ mg $^{-1}$ ptn, em média) (figura 4), enquanto em tireóides suínas a atividade geradora se restringe à fração P 3.000g. As atividades enzimáticas em ambas as frações de tireóides humanas são completamente cálcio dependentes e ativadas por altas concentrações de fosfato (figura 5).

DISCUSSÃO

O método da escopoletina vem sendo utilizado por diversos autores (16,17,29) para medir a atividade de

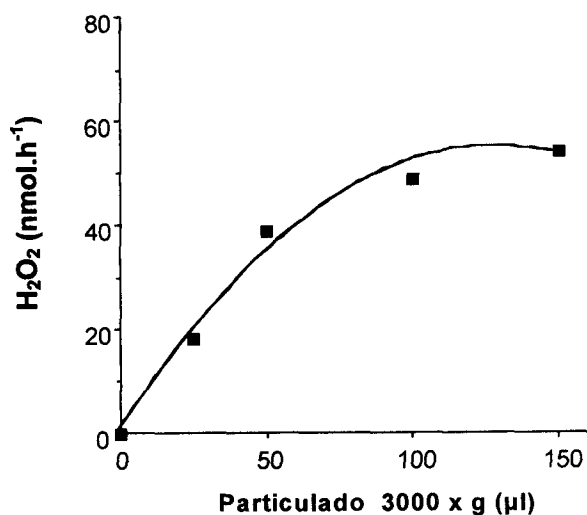


Figura 1. Geração de H_2O_2 com quantidades crescentes de particulado (P3.000g) tireóideo de porco. Os resultados são expressos como a média de duas dosagens.

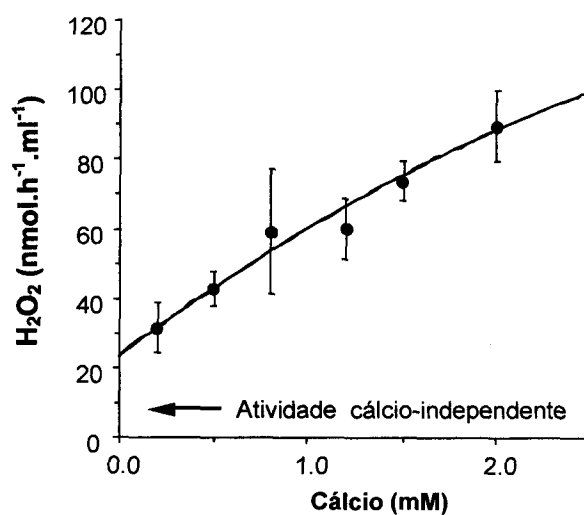


Figura 2. Atividade geradora de H_2O_2 por 100µl de particulado de tireóide de porco, variando-se a concentração de cálcio. Os resultados são expressos por média $\pm$ EPM.

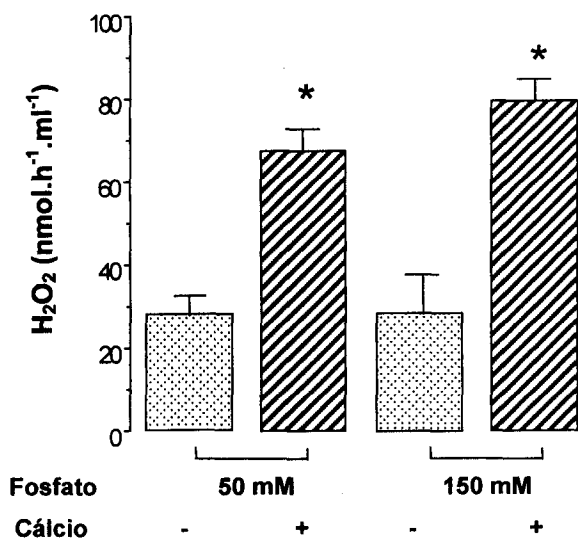


Figura 3. Atividade geradora de H_2O_2 por 100µl de particulado de tireóide de porco, variando-se as concentrações de fosfato no meio de incubação. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$.

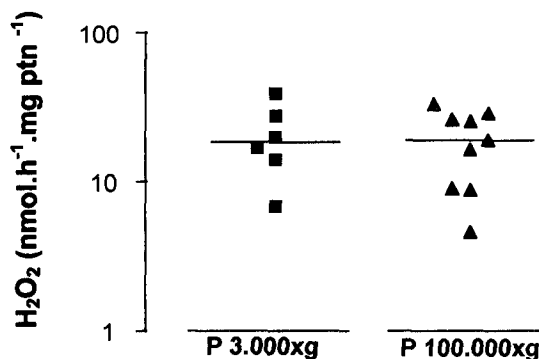


Figura 4. Atividade geradora de H_2O_2 nas frações de membrana apical (P3.000g) e frações microsomais (P100.000g) de amostras de tireóides humanas (tecido paranodular de nódulos frios)

geração de H_2O_2 em particulados tireóideos de porco. No nosso laboratório, esta metodologia foi padronizada durante o presente estudo, sendo os resultados similares aos anteriormente obtidos em outro laboratório (17).

Dême e cols. (17), já demonstraram o papel ativador do cálcio na produção de H_2O_2 em particulados de tireóides suínas. Anteriormente, foi sugerido que a regulação da concentração intracelular de cálcio livre deve ter um papel relevante no controle da produção de H_2O_2 na tireóide (2,16). Mais recentemente, Car-

valho e cols. (29) demonstraram que a geração de H_2O_2 dependente de cálcio é induzida pelo TSH através da cascata de AMPc, em culturas primárias de células tireóideas de porco. Nossos resultados corroboraram os achados de outros autores, sugerindo haver estimulação específica do cálcio sobre o sistema gerador de H_2O_2 . A cálcio dependência do sistema gerador de H_2O_2 foi descrita por diversos autores como sendo específica para o cálcio, pois estudos *in vitro* utilizando Mg^{++} demonstraram que a ativação do Ca^{++} não era

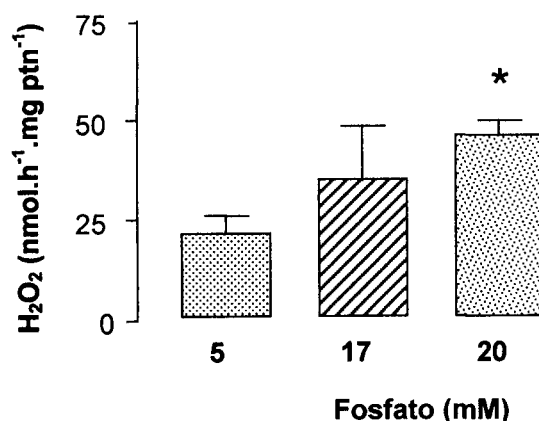


Figura 5. Atividade geradora de H_2O_2 por 100 μ l de particulado de amostras de tireóides humanas, variando-se as concentrações de fosfato no meio de incubação. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$, análise de variância seguida do teste de comparações múltiplas de Neumann Keuls.

reproduzida por este cátion (17). Além disto, os nossos achados de completa cálcio-dependência da NADPH oxidase encontrada em tireóides humanas reforça a idéia da estimulação da enzima por este cátion.

Recentemente, Leseney e cols. (30) descreveram a presença da NADPH oxidase em amostras de bócios difusos tóxicos. A NADPH oxidase descrita por esses autores tem características bioquímicas semelhantes às encontradas no presente estudo. Entretanto, as atividades enzimáticas detectadas por Leseney e cols. (30) foram muito menores (30) que as por nós determinadas, provavelmente por terem os pacientes recebido iodo no período pré-operatório. Assim, postulamos que a NADPH oxidase seja o alvo principal do mecanismo de auto-regulação, como anteriormente sugerido para o sistema gerador de H_2O_2 em tecidos tireóides caninos e humanos (32).

Foi sugerido, por diversos autores, que em alguns bócios disormonogênicos a causa do defeito na biossíntese hormonal poderia ser alguma alteração na geração de H_2O_2 (33,34). Uma vez que a NADPH oxidase humana está caracterizada, será possível estudar bócios disormonogênicos nos quais possa haver defeito na biossíntese hormonal por diminuição na geração de H_2O_2 e relacioná-los a defeitos na atividade NADPH oxidase.

REFERÊNCIAS

1. Larsen PR, Ingbar SH. The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, eds. **Williams' Textbook of Endocrinology**. 8th ed, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1992:357-487.
2. Raspé E, Dumont JE. Tonic Modulation of dog thyrocyte H_2O_2 generation and I uptake by thyrotropin through the cyclic adenosine 3'5'- monophosphate cascade. **Endocrinology** 1995;136:965-73.
3. Utiger RD. The thyroid: Physiology, Thyrotoxicosis, Hypothyroidism, and the Painful Thyroid. In: Felig P, Baxter JD, Frohman LA, eds. **Endocrinology and Metabolism**. 3rd ed, Mc Graw-Hill, New York, 1996:435-519.
4. Taurog A. Hormone synthesis and secretion. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. **The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text**. 7th ed. Lippincott-Raven, 1996:47-84.
5. Pohl V, Abramowicz M, Vassart G, Dumont JE, Roger PP. Thyroperoxidase mRNA in quiescent and proliferating thyroid epithelial cells: expression and subcellular localization studied by in situ hybridization. **Eur J Biol** 1993;62:94-104.
6. Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R. Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. **Mol Cell Biol** 1992;12:576-88.
7. Zarilli R, Formisano S, Di Jeso B. Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. **Mol Endocrinol** 1995;4:39-44.
8. Nunez J, Pommier J. Formation of thyroids hormones. **Vitam Horm** 1982;39:175-229.
9. Yamamoto K, De Groot LJ. Participation of NADPH-oxidase Cytochrome c Reductase in thyroid Hormones Biosyntheses. **Endocrinology** 1975;96:1022-9.
10. Ohtaki S, Mashimo K, Yamazaki I. Hydrogen peroxide generating system in dog thyroid microsomes. **Biochim Biophys Acta** 1973;292:825-33.
11. Fischer AG, Schulz RA, Oliner L. Thyroid biosynthesis of iodothyronines. II- General characteristics and purification of mitochondrial monoamine oxidase. **Biochim Biophys Acta** 1968;159:460-71.
12. Fischer AG, Lee H. Xanthine oxidase from bovine thyroid gland. **Life Science** 1973;12:267-75.

13. Bjorkman U, Ekholm R, Denef VF. Cytochemical localization of hydrogen peroxide in isolated thyroid follicles. **J Ult Res** 1981;74:105.
14. Bjorkman U, Ekholm R. 12th Annual Meeting of the European Thyroid Association 1982;Brussels, 6-10 September.
15. Bjorkman U, Ekholm R. Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles. **Endocrinology** 1984;115:392-8.
16. Virion A, Michot JL, Dème D, Kaniewski J, Pommier J. NADPH-dependent H₂O₂ generation and peroxidase activity in thyroid particulate fraction. **Mol Cell Endocrinol** 1984;36:95-105.
17. Dème D, Virion A, Hammou NA, Pommier J. NADPH-dependent generation of H₂O₂ in a thyroid particulate fraction requires Ca²⁺. **Fed Eur Biochem Soc** 1985;186:107-10.
18. Dème D, Doussiere J, de Sandro V. The Ca²⁺/NADPH dependent H₂O₂ generator in thyroid plasma membrane: inhibition by diphenyleneiodonium. **Biochem J** 1994;301:75.
19. Dupuy C, Virion A, Ohayon R, Kaniewski J, Pommier J. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. **Biochem** 1991;266:3739-43.
20. Nakamura Y, Ogihara S, Ohtaki S. Activation by ATP of calcium - dependent NADPH-oxidase generating hydrogen peroxide in thyroid plasma membranes. **J Biochem** 1987;102:1121.
21. Dupuy C, Dème D, Kaniewski J, Pommier J, Virion A. A calcium regulation of thyroid NADPH - dependent H₂O₂ generation. **FEBS Lett** 1988;233:74.
22. Dupuy C, Kaniewski J, Dème D, Pommier J, Virion A. A NADPH - dependent H₂O₂ generation catalyzed by thyroid plasma membrane, studies with electron scavengers. **Eur J Biochem** 1989;185:597.
23. Nakamura Y, Ohtaki S, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y. Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH-oxidase in the porcine thyroid plasma membrane. **J Bio Chem** 1989;264:4759.
24. Nakamura Y, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y, Ohtaki S. Mechanism of H₂O₂ production in porcine thyroid cells: evidence for intermediary formation of superoxide anion by NADPH- dependent H₂O₂- generating machinery. **Biochem** 1991;30:4880.
25. De Sandro V, Dupuy C, Kaniewski J, Ohayon R, Dème D, Virion A, et al. Mechanism of NADPH oxidation catalyzed by horse-radish peroxidase and 2,4-diacetyl - (2H) heme - substituted horse-radish peroxidase. **Eur J Biochem** 1991;201:507-13.
26. Dupuy C, Virion A, De Sandro V, Ohayon R, Kaniewski J, Pommier J, et al. Activation of the NADPH - dependent H₂O₂ generation system in pig thyroid particulate fraction by limited proteolysis and Zn²⁺ treatment. **Biochem J** 1992;283:591-5.
27. Lippes HA, Spaulding SW. Peroxide formation and glucose oxidation in calf thyroid slices: regulation by protein Kinase-c and cytosolic free calcium. **Endocrinology** 1986;116:1306.
28. Bjorkman U, Ekholm R. Hydrogen peroxide generation and its regulation in FRTL-5 and porcine thyroid cells. **Endocrinology** 1992;130:393.
29. Carvalho DP, Dupuy C, Gorin Y, Legue O, Pommier J, Haye B, et al. The Ca²⁺ and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent H₂O₂ generation system is induced by thyrotropin in porcine thyroid cells. **Endocrinology** 1996;137:1007-12.
30. Leseney AM, Dème D, Dupuy C, Ohayon R, Chanson P, Sales JP, et al. Biochemical Characterization of a Ca²⁺/NAD(P)H-dependent H₂O₂ generator in human thyroid tissue. **Biochem** 1999;81:373-380.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins of utilizing the protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976;72:248-54.
32. Corvilain B, Van Sande J, Dumont JE. Inhibition by iodide of iodide binding to proteins: the "Wolff-Chaikoff" effect is caused by inhibition of H₂O₂ generation. **Biochem Biophys Res Comm** 1988;1284:1287.
33. Kusakabe T. Deficient Cytochrome b₅ Reductase Activity in Nontoxic Goiter with Iodide Organification Defect. **Metab Clin Exp** 1975;24:1103-13.
34. Carvalho DP, Rego KGM, Rosenthal D. Thyroid peroxidase in dysmorphonogenetic goiters with organification and thyroglobulin defects. **Thyroid** 1994;4:421-426.

Endereço para correspondência:

Denise Pires de Carvalho
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
CCS - Bloco G, Cidade Universitária, Ilha do Fundão
21.949-900 Rio de Janeiro, RJ
fax: (021) 280-8193
e-mail: dencarv@biof.ufrj.br