

A ACTIVIDADE DA N-ACETIL- β -GLUCOSAMINIDASE NO HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO PRIMÁRIO

CRISTINA PINTO, CARLOS MARQUES, MARIA AZEVEDO, CARLOS MANSO

Centro de Metabolismo e Endocrinologia. Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa. Portugal

RESUMO

A actividade sérica total da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e específica — isoenzima termolábil A e isoenzima termo-estável B — bem como as provas da função tiroideia, foram doseadas num grupo de 12 bebés com hipotiroidismo congénito primário (idade média de 30 dias). Utilizaram-se como controlo dois grupos — um grupo constituído por 10 recém-nascidos em que as determinações foram efectuadas no sangue do cordão umbilical e um outro grupo de 10 recém-nascidos com a idade média de 15 dias. No hipotiroidismo congénito primário os níveis da NAG total expressos em nmol/ml/h — $985,667 \pm 167,352$ (média e desvio padrão) e do isoenzima termolábil A — $433,833 \pm 51,630$ encontravam-se significativamente reduzidos quando comparados o grupo controlo de recém-nascidos em que as determinações foram feitas no sangue do cordão umbilical — NAG total $1181,00 \pm 182,921$ ($p < 0,02$) e isoenzima A — $482,000 \pm 35,599$ ($p < 0,02$). As reduções são altamente significativas quando se compara o grupo patológico com o grupo controlo dos recém-nascidos do mesmo grupo etário: NAG total $1370,2 \pm 186,531$ ($p < 0,001$) e isoenzima A — $771,4 \pm 62,288$ ($p < 0,001$). Não se observaram correlações significativas para os valores do isoenzima termo-estável B entre o grupo patológico e os grupos controlo.

SUMMARY

Serum NAG activity in primary congenital hypothyroidism

Serum total N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity as well as isoenzyme A and isoenzyme B were determined in 12 babies with primary congenital hypothyroidism (average age — 30 days). Conventional thyroid tests were performed as well. Two control groups were used. Group I included 10 neonates with an average age of 15 days and in group II assays were performed in 10 cord blood samples. In congenital hypothyroidism, total NAG activity — 985.667 ± 167.352 mol/ml/h as well as termolabile isoenzyme A — 433.833 ± 51.630 was significantly decreased when compared to the control group with assays in cord blood — total NAG = $1,181.00 \pm 182.921$ ($p < 0.02$) and isoenzyme A — 482.000 ± 35.599 ($p < 0.02$). The reductions were highly significant between the pathological group and the control neonates: total NAG $1,370.2 \pm 186.531$ ($p < 0.001$) and isoenzymes A: 771.3 ± 62.288 ($p < 0.001$). No significant correlations were observed regarding isoenzyme B activity both in controls and hypothyroid babies.

INTRODUÇÃO

Tem sido estabelecida a relação entre os níveis da hormona tiroideia e a actividade de enzimas lisosómicos, do tipo da N-acetil- β -glucosaminidase.¹

A N-acetil- β -glucosaminidase — EC 3.2.1.30 — (NAG) é uma hexosaminidase, ou seja, um hexoenzima capaz de hidrolisar o resíduo N-acetil-glucosaminil da extremidade não redutora de vários substratos glucídicos. O termo hexosaminidase indica a falta de especificidade da orientação do carbono 4 do amino-açúcar,² podendo o enzima evidenciar tanto a actividade- β -D-N-acetilglucosaminidase como o β -D-N-acetilgalactosaminidase.

Os principais isoenzimas da NAG são o isoenzima A e o isoenzima B.³

Robinson e Stirling,⁴ ao isolarem aqueles dois enzimas, demonstraram uma actividade aminidásica idêntica em substratos sintéticos relativamente a valores de K_M a pH óptimo e a especificidade para vários inibidores, mas uma diferente labilidade ao calor, revelando-se o isoenzima A termolábil e o isoenzima B termo-estável.

Entre outros isoenzimas da NAG está descrita uma for-

ma intermediária no soro de mulheres grávidas — o isoenzima P.⁵

O estudo das doenças metabólicas, como as glicoproteínoses, implicando a deficiência de uma ou de ambas as formas dos isoenzimas, tem contribuído para uma melhor informação sobre a actividade das hexosaminidasas.⁶

As glicoproteínoses são caracterizadas por um défice total ou parcial da actividade de certas hidrolases lisosómicas e consequente acumulação nos tecidos e na urina de material glucídico resultante do catabolismo incompleto das glicoproteínas, dos glicolipídios e dos glicosaminoglicanos.

Na doença de Sandhoff-Jatz Kewitz existe uma falta tanto da hexosaminidase A como da hexosaminidase B, levando à acumulação de substâncias contendo N-acetil-hexosamina terminal, como lípidos (gangliósidos GM₂, globósidos),⁷ glicopéptidos⁸ e mucopolissacáridos.⁹ Na clássica doença de Tay-Sachs em que só a hexosaminidase A está deficiente,¹⁰ a substância que se acumula é o gangliósido GM₂. Isto sugere que a hexosaminidase A é específica para o catabolismo do GM₂, enquanto outras substâncias podem ser clivadas quer pela hexosaminidase A quer pela hexosaminidase B, o que foi confirmado em estudos *in vitro*.^{11, 12}

Oberkotter e col.¹³ descreveram em estudos recentes a existência de uma correlação significativa entre os níveis da NAG sérica e o estado tiroideu em adolescentes do sexo feminino.

Esta correlação era predominante com a hexosaminidase A, ou seja, o isoenzima termolábil que está deficiente em várias formas de gangliosidose GM₂.¹⁴ Pelo contrário, as alterações da forma termo-estável ou isoenzima B não acompanhavam a actividade da hormona tiroideia no soro.

Em estudos efectuados numa população adulta com disfunção tiroideia¹⁵ confirmámos os dados de Oberkotter e col.,¹³ mas obtivemos nos hipertiroideos correlações altamente significativas entre as provas da função tiroideia e a actividade da NAG total e específica, isto é, tanto do isoenzima A como do isoenzima B.

O objectivo deste trabalho foi o de estudar a actividade total e específica da NAG no hipotiroidismo congénito primário, procurando avaliar o comportamento do isoenzima termolábil, A, dada a sua deficiência nos tipos de doenças metabólicas congénitas referidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudaram-se 12 crianças com hipotiroidismo congénito primário, 7 do sexo feminino e 5 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 4 e os 60 dias (idade média: 30 dias).

Os controlos eutiroideos incluíram dois grupos de 10 recém-nascidos cada sem evidência de patologia. Um grupo com idades entre os 4 e os 30 dias (idade média de 15 dias), sendo 6 do sexo feminino e 4 do sexo masculino, e, um 2.º grupo em que as determinações foram efectuadas no sangue do cordão umbilical.

A disfunção tiroideia foi diagnosticada com base nos sinais e sintomas clínicos, bem como nos doseamentos de T₄, T₃ e TSH.

Dada a pequena quantidade de sangue disponível nestes grupos etários não se recorreu ao doseamento de T₄ livre, estando descritas correlações igualmente significativas da NAG com a T₄ e a T₄ livre.¹⁶

A T₄ sérica total, bem como a T₃ e a TSH foram determinadas radio-imunologicamente (Amerlex T₄ RIA kit, Amerlex T₃ RIA kit e Amerlex TSH RIA kit) com os valores de referência explicitados no Quadro 1 — Valores médios com limites de variação até 95%.¹⁷

As determinações foram efectuadas em sangue venoso colhido para um tubo seco, e, após coagulação, o soro era separado por centrifugação, procedendo-se de imediato aos doseamentos, e guardando-se a -20 °C até ser utilizado.

A actividade do NAG total foi medida segundo o método de Laback e Walker,¹⁸ e a específica — isoenzima termolábil A e isoenzima termolábil B — segundo a técnica descrita por Oberkotter e col.¹⁹

Usou-se o substrato fluorogénico 4-metil-umbeliferil-β-N-acetil-glucosaminido (Sigma), tendo sido determinada previamente a linearidade com o tempo e com a concentração.

QUADRO 1 Valores médios da concentração sérica das hormonas tiroideias (com limites de variação até 95%)

Idade	T ₄ μ/dl	T ₃ ng/dl	TSH μU/dl
recém-nascidos	11,5 (6-20)	0,5 (0,15-0,85)	5,4 (1,5-9,5)
1-2 dias	16,5 (11,5-21,5)	4,19 (1,0-7,4)	12,0 (1-20)
1 mês	12,0 (8-16)	1,70 (1,05-2,35)	1,9 (0,6-6,3)

A 4-metil-umbeliferona (4-MU) liberta foi convertida para a sua forma aniónica altamente fluorescente pela adição do tampão alcalino de glicina, e o produto da reacção doseado num espectrofluorímetro Aminco-Bowman, a 360 nm de excitação e 440 nm de emissão.

A actividade enzimática é referida em mmoles de 4-metil-umbeliferona (4-MU) liberta por hora a 37 °C, expressa em unidades por ml.

CONCLUSÕES

O Quadro 2 mostra que as actividades da NAG total e específicas — isoenzimas A — estão significativamente elevadas no sangue do cordão umbilical e nos recém-nascidos normais comparadas com as do grupo do hipotiroidismo congénito primário.

São altamente significativas (p < 0,001) as diferenças de actividades do isoenzima termolábil A no grupo de crianças com disfunção tiroideia vs recém-nascidos do mesmo grupo etário (grupo III — bebés com idade média de 15 dias).

No que respeita à actividade enzimática do isoenzima B não se observam alterações significativas comparando-se os diversos grupos.

QUADRO 3 Hipotiroidismo congénito primário — regressão linear (Método dos mínimos quadrados)

NAG total (nmol/ml/h)	T ₄ (μg/dl)	a = 8,732 b = -0,0036 r = 0,148 t = 0,473	p = n.s.
y = bx + a	NAG = -277,778 T ₄ = -0,0036	T ₄ = 2425,833 NAG = 8,733	
NAG B (nmol/ml/h)	T ₄ (μg/dl)	a = 4,701 b = -0,00107 r = 0,062 t = 0,195	p = n.s.
y = bx + a	T ₄ = -0,00107 B = -934,579	B = 4,701 T ₄ = 4393,458	
NAG A (nmol/ml/h)	T ₄ (μg/dl)	a = -13,246 b = 0,040 r = 0,660 t = 2,777	p < 0,02
y = bx + a	T ₄ = 0,040 A = 25	A = -13,246 T ₄ = 331,15	

a = ordenada na origem; b = declive; r = coeficiente de correlação; t = Test de Student; p = probabilidade.

Da análise do Quadro 3 ressalta que não se verifica qualquer correlação entre os valores de T₄ e a actividade da NAG total e do isoenzima termo-estável B. Os traçados das rectas de regressão não teriam qualquer significado pelos baixos coeficientes de correlação. Existe, porém, uma correlação positiva significativa entre a tiroxina total e o isoenzima termolábil A. A recta de regressão na Fig. 1 demonstra bem esta correlação.

DISCUSSÃO

Tenore e col.²⁰ referiram uma elevação paralela das hexosaminidases séricas e dos níveis de T₄ no recém-nascido. Há evidência de que a NAG, à semelhança do que acontece com a β-glucosaminidase, está sob um controlo hormonal comum no útero do rato.²¹

Foi sugerido por Walker e col.²² que o progressivo aumento sérico da NAG ao longo da gravidez pode ser devido aos efeitos da produção crescente de estrogéneos, sendo máximo na grávida de termo e regressando à normalidade 8 dias pós-parto. Esta elevação seria feita essencialmente à custa do aumento da forma P cuja origem não se encontra ainda estabelecida, tendo sido evidenciada pelos referidos Autores a presença de uma elevada concentração de NAG nas células deciduais e no corion com uma eventual participação destes tecidos na elevação enzimática observada durante a gravidez.

Foi sugerido por Stirling²³ que a elevação da NAG poderia resultar da associação dos isoenzimas A ou B com algum componente sérico, ainda por determinar, que estaria elevado durante a gestação. Este Autor demonstrou que a forma P tem uma termo-estabilidade semelhante à da forma B, não sendo possível distinguir estas duas formas recorrendo-se à determinação diferencial da actividade destas glucosaminidases aplicando o método de termo-estabilidade.¹³

Num estudo efectuado em grávidas (dados ainda não publicados) observámos níveis altamente significativos da forma termo-estável da NAG ($p < 0,001$) comparados com os das mulheres não grávidas, sendo presumível que esta fracção incluía não só a forma B como a forma P.

Assim, a elevação da actividade do isoenzima B que observámos no sangue do cordão umbilical pode dever-se à transmissão placentária do enzima. Da mesma forma explicar-se-ia uma elevação relativa do isoenzima A, à custa da redução ou desaparecimento parcial da forma estável (B + P) a partir do 4.º dia do nascimento.

A hormona tiroideia modula muitos aspectos do metabolismo celular.²⁴⁻²⁵ No homem, o hipotiroidismo é caracterizado por uma plêiade de sinais e sintomas clínicos, incluindo o atraso no crescimento e atraso mental.²⁶

No hipotiroidismo grave há uma tendência para a deposição de material mucinoso na pele resultando no característico edema-sem godé. Este material é constituído por mucopolissacarídeos ácidos, glicosaminoglicans e polissacarídeos complexos.²⁷

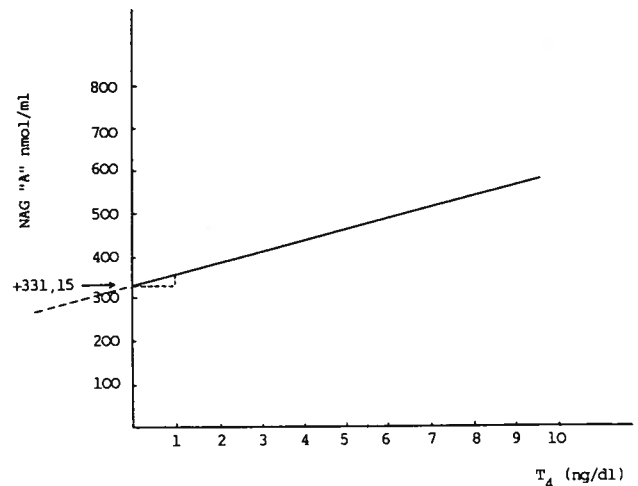


Figura 1: Correlação entre tiroxina total e enzima termolábil.

A adição da hormona tiroideia inibe a acumulação dos glicosaminoglicans em culturas de fibroblastos incubados num meio deficiente em hormona tiroideia.²⁸

Sabe-se que os fibroblastos da pele elaboram normalmente grandes quantidades de glicosaminoglicans (GAG) a maior parte constituída por ácido hialurónico.²⁹ Foi descrito por Smith e col.³⁰ um efeito inibidor da hormona tiroideia na síntese do ácido hialurónico, não estando claro se a T_3 afecta o alongamento da cadeia ou a síntese *de novo* (é necessário ter presente que o metabolismo das hormonas tiroideia pelo fibroblasto implica uma conversão de T_4 para T_3).³¹

QUADRO 2 Actividade da NAG total, A e B, e provas de função tiroideia num grupo de 12 hipotiroidismos congénitos primários e 20 recém-nascidos controlo (10 com determinações efectuadas com sangue do cordão umbilical e 10 recém-nascidos com uma idade média de 15 dias)

Casos estudados e médias das idades	N.º	Actividade da NAG ($\mu\text{mol/ml/h}$)											
		T_3 (ng/dl)		T_4 ($\mu\text{g/dl}$)		TSH ($\mu\text{U/dl}$)		NAG total		A		B	
		\bar{x}	DP	\bar{x}	DP	\bar{x}	DP	\bar{x}	DP	\bar{x}	DP	\bar{x}	DP
Hipotiroidismo congénito primário (30 dias) (I)	12	0,973 \pm 0,90		4,108 \pm 3,13		74,925 \pm 12,036		985 667 167 352	433 833	51 630	551 833	148 573	
Sangue do cordão umbilical (II)	10	0,50 \pm 0,35		13,0 \pm 6,5		10,0 \pm 9,5		1181 000 182 921	482 000	33 599	699 000	188 862	
Recém-nascidos (15 dias) (III)	10	1,7 \pm 0,65		12,0 \pm 4,0		3,0 \pm 2,9		1370 200 186 531	771 400	61 288	558 800	109 243	
Teste de Student													
I vs II		t = 1,493 p = n.s.		t = 3,996 p = 0,001		t = 13,196 p = 0,001		t = 2,491 p = 0,02		t = 2,418 p = 0,02		t = 1,552 p = n.s.	
I vs III		t = 2,133 p = 0,05		t = 4,948 p = 0,001		t = 17,597 p = 0,001		t = 4,856 p = 0,001		t = 13,252 p = 0,001		t = 0,117 p = n.s.	
II vs III		t = 4,876 p = 0,001		t = 0,393 p = n.s.		t = 2,114 p = 0,05		t = 2,173 p = 0,05		t = 12,268 p = 0,002		t = 1,515 p = n.s.	

Smith e col.³⁰ sugerem que a hormona tiroideia regula a síntese dos glicosaminoglicans e a sua acumulação, devendo-se esta acumulação mais provavelmente à redução da síntese do que à alteração na degradação dos GAG. Já Argobast e col.³² tinham referido a ausência da actividade da hialuronidase em fibroblastos da pele humana.

A inibição da acumulação dos GAG é aparentemente devida a efeitos específicos na velocidade da síntese macromolecular, dado que não foi demonstrada uma alteração na síntese total das proteínas celulares.

Os nossos resultados no hipotiroidismo congénito primário confirmam a redução dos níveis da hexosaminidase A, já descrita num grupo de hipotiroideus adultos,¹⁹ e a correlação entre a actividade deste isoenzima e a hormona tiroideia.

A redução do isoenzima termolábil observada no presente estudo, torna-se ainda mais evidente, atendendo ao facto de se observar uma elevação da NAG total na gravidez e consequente aumento relativo dos seus isoenzimas.³³

Walker e col.²² observaram igualmente uma elevação da actividade da NAG total no sangue do cordão umbilical embora com valores mais baixos quando comparados com os do sangue materno.

Os nossos resultados parecem indicar que esta redução de actividade se manifesta essencialmente na alteração da forma termo-estável com uma subida relativa do isoenzima termolábil A. A redução selectiva de A na falta da hormona tiroideia torna-se ainda mais significativa se atendermos a que a depuração das hidrolases ácidas séricas *in vivo* é mediada pelo menos por dois sistemas de reconhecimento distintos.

Fischer e col.³⁴ descrevem uma depuração plasmática mediada por receptores dos hepatocitos.

Trabalhos efectuados por Furbisch e outros Autores,³⁵⁻³⁶ referindo-se às hidrolases ácidas e outras glicoproteínas com manose e/ou N-acetil glucosamina como açúcares terminais, descrevem receptores ligados às células do sistema reticulo-endotelial. As glicoproteínas, após a sua depuração seriam degradadas nos lisosomas e este fenómeno contribuiria para uma elevação das gluco-hidrolases nas alterações lisosómicas.³⁷ A não maturação do *equipamento* de depuração enzimática poderia explicar também os elevados níveis da NAG observados nos recém-nascidos. Em muitas glicoproteínas não se verifica um aumento das hidrolases séricas.

Uma explicação plausível seria a de que nas doenças com patologia lisosómica em que são afectados preferencialmente órgãos, do sistema reticulo-endotelial conduzindo por exemplo a uma hepatopatia, haveria uma falência de depuração das hidrolases ácidas pela disfunção hepática, e a *sobrecarga* lisosómica resultante levaria a um compromisso de todo o *aparelho* lisosómico com redução da própria síntese das gluco-hidrolases.

Assim, a redução total e específica da NAG no hipotiroidismo congénito primário terá que ser valorizada em termos de deficiência da hormona tiroideia e/ou disfunção dos lisosomas como consequência da falência na depuração das glicoproteínas.

O doseamento da NAG oferece uma nova perspectiva na abordagem destes doentes impondo-se um controlo a longo prazo para avaliar do valor desta determinação em termos de prognóstico e/ou evolução terapêutica.

AGRADECIMENTOS

O nosso agradecimento à Dr.^a Maria Amélia Vaz Guedes e ao pessoal da Unidade de Neo-natologia do Serviço de Pediatria do Hospital de Santa Maria por nos ter sido facultado o estudo dos recém-nascidos saudáveis usados como controlo.

BIBLIOGRAFIA

- WEISSMANN, G.; SEGAL, R.: Serum β -glucuronidase in thyroid disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1970; 134: 812.
- O'BRIEN, J.; OKADA, S.; CHEN, A.: Tay-Sachs disease. Detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay. *New Engl. J. Med.*, 1970; 283: 15.
- LALLEY, P.; RATAZZI, M.; SHOWS, T.: Human β -D-N-acetylhexosaminidases A and B: Expansion and linkage relationship in somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Academ. Science USA*, 1974; 71: 1596.
- ROBINSON, D.; STIRLING, J.: N-acetyl- β -glucosaminidases in human spleen. *Biochem. J.*, 1968; 107: 321.
- WOOLLEN, J. W.; TURNER, P.: Plasma N-acetyl- β -glucosaminidase and β -glucuronidase in health and disease. *Clin. Chim. Acta*, 1965; 12: 671.
- STRECKER, G.; MONTREUIL, J.: Glycoproteins et glycoproteinoses. *Biochimie*, 1979; 61: 1199.
- KIN YING, N. M.; WOLFE, L. S.: Oligosaccharides accumulating in the liver from a patient with GM₂ — gangliosidosis variant O (Sandhoff-Jatzkewitz disease). *Biochem Biophys Res. Cmo.*, 1974; 59: 837.
- SANDHOFF, K.; HARZER, K.: In: lysosomes and storage disorders (Hers, H. G.; Van Hoof, F.; eds.) *Academic. Press.*, New York, 1973; p. 345.
- CANTZ, M.; KRESS, H.: Sandhoff disease: Defective glycosaminoglycan catabolism in cultured fibroblasts and its correction. *Eur. J. Biochem*, 1974; 47: 581.
- OKADA, S.; O'BRIEN, J.: Tay-Sachs Disease: generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science*, 1969; 165: 698.
- LI, Y. T.; MAZZOTTA, M.; WAN, C.; ORTH, R.; LI, C. L.: Hydrolysis of Tay-Sachs ganglioside by β -hexosaminidase A of human liver and urine. *J. Biol Chem.*, 1973; 248: 7512.
- BACH, G.; SUZUKI, K.: Heterogeneity of human hepatic N-acetyl- β -D-hexosaminidase A activity towards natural glycosphingolipid substrates. *J. Biol Chem.*, 1973; 248: 7512.
- OVERKOTTER, L.; TENORE, A.; KOLDOVSKY, O.: Changes in serum N-acetyl- β -hexosaminidase levels after treatment of hypothyroid and hyperthyroid individuals with L-thyroxine and propylthiuracil. *Clin. Chim. Acta*, 1980; 108: 62.
- YOUNG, E.; ELLIS, R.; LAKE, D.; PATRICK, A.: Tay-Sachs disease and related disorders: fractionation of brain N-acetyl- β -hexosaminidase on DEAE-cellulose. *FEBS Letters*, 1970; 9: 1.
- PINTO, C.; GALVÃO TELES, A.; MARQUES, C.; MANSO, C.: Relação das hormonas tiroideias com actividade sérica total e específica da N-acetyl- β -D-glucosaminidase (em publicação).
- GUILLOIN, H.; DAVID, V.; LORCY, Y.; LE, TREUT, A.; ALLANNIC, H.; LE, GALL, J.: Serum lysosomal acid hydrolase activities in graves disease. *Clin. Chim. Acta*, 1982; 120: 219.
- FISHER, D.: Serum thyroid hormone concentration variation with age. Presented at the 28 th Annual Post-graduate Assembly of the Endocrine Society, Sealte, Washington, 1976.
- WOOLEEN, J.; WALKER, P.: The fluorimetric estimation of N-acetyl- β -galactonidase and β -galactonidase in blood plasma. *Clin. Chim. Acta*, 1965; 12: 647.
- OVERKOTTER, L.; TENORE, A.; PALMIERI, M.; KOLDOVSKY, O.: Relationship of thyroid status and serum N-acetyl- β -glucuronidase isoenzyme activities in humans. *Clin. Chim. Acta*, 1979; 94: 281.
- TENORE, A.; OVERKOTTER, L.; KOLDOWSKY, O.: Age and sex associated differences in the relationship of serum hexosaminidase and T₄ levels in human neonates. *Early Hum. Develop.*, 1980; 4: 41.

21. FISHMAN, W.: Ciba Foundation Symposium on Endocrinology 1952; 2: 235.
22. WALKER, P.; WOOLLEN, M.; PUGH, D.: N-acetyl- β -glucosaminidase in serum during pregnancy. *J. Clin. Pathol.*, 1960; 13: 353.
23. STIRLING, J.: Separation and characterization of N-acetyl- β -glucosaminidase A and P from material serum. *Biophys. Biochem. Acta*, 1972; 271: 154.
24. OPPENHEIMER, J.: Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 1979; 202: 971.
25. STERLING, G.: Thyroid hormone action at the cell level. *New Engl. J. Med.*, 1979; 300: 117.
26. UTIGER, R.: Hypothyroidism. in: Endocrinology. L. J. DeGroot, ed. Grune & Stratton, Inc. New York, 1979; 471.
27. GABRILOVE, J.; LUDWIG, A.: The histogenesis of mixedema. *J. Clin. Endocrinol Metabol*, 1957; 17: 925.
28. SMITH, T.; HORWITZ, A.; REPETOFF, S.: The effect of thyroid hormone on glycosaminoglycan accumulation in human skin fibroblasts. *Endocrinology*, 1981; 108: 2397.
29. HOPWOOD, Y.; DORFMAN, A.: Glycosaminoglycan synthesis by cultured human skin fibroblasts after transformation with simian virus 40. *J. Biol. Chem.*, 1977; 252: 4777.
30. SMITH, T.; MURATA, Y.; HORWITZ, A.; PHILIPSON, L.; REPETOFF, S.: Regulation of glycosaminoglycan synthesis by thyroid hormone in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1982; 70: 1066.
31. REPETOFF, S.; MATALON, R.; BIGAZZI, M.: Metabolism of L-thyroxine (T₄) and L-triiodothyronine (T₃) by human fibroblasts. Evidence for cellular binding proteins and conversion of T₄ to T₃. *Endocrinology*, 1972; 91: 934.
32. ARBOGAST, B.; HOPWOOD, J.; DORFMAN, A.: Absence of hyaluronidase in cultured human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975; 67: 376.
33. NAKAGAWA, S.; KUMIN, S.; NITOWSKY, H.: Studies on human β -D-N-acetylhexosaminidase. *Isozymes. Fed. Proceed.*, 1974; 33: 5.
34. FISHER, H.; NORIEGA, A.; GLY, W.; MORRÉ, D.: Phosphomannosyl-Enzyme receptors in rat liver subcellular distribution and role in intracellular transport of lysosomal enzymes. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 9608.
35. FURBISH, F.; STEER, C.; BARRANGEIR, J.: The uptake of native and desialylated glucocerebroside by rat hepatocytes and kupffer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978; 81: 1047.
36. STAHL, P.; RODMAN, J.; MILLER, M.: Evidence for receptor — mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 1399.
37. HULTBERG, B.; ISAKSSON, A.: Acid hydrolases in serum from patients with lysosomal disorders. *Clin. Chim. Acta*, 1980; 100: 33.

Pedido de separatas: Cristina Pinto
Instituto de Química Fisiológica
Faculdade de Medicina de Lisboa
1600 Lisboa. Portugal.