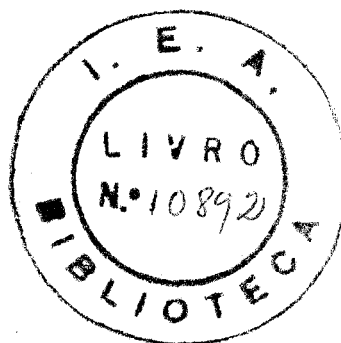


ETSUKO IKEDA

SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS IODADOS DA BILE E DO CONTEÚDO
INTESTINAL DO RATO POR FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX

Prof. Dr. Wilian Nicolau

Orientador



Tese apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
"mestre em ciências"

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Wilian Nicolau

Orientador

Prof. Dr. Metry Bacila

Coordenador

Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Diretor do Instituto de Energia Atômica

Prof. Dr. Lício Marques de Assis

Livre Docente da Faculdade de Medicina da USP

Chefe de Pesquisa da Divisão de Radiobiologia do IEA

Emiko Muramoto

Farmacêutica Bioquímica

e a todos que direta ou indiretamente colaboraram

o meu agradecimento

ÍNDICE

	página
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II	
HISTÓRICO	5
1. Metabolização dos hormônios tireoidianos	5
1.1. Conjugação	5
1.1.1. Conjugação hepática	5
1.1.2. Outros locais de conjugação da T ₄	7
1.2. Degradação	8
2. Circulação enterohepática	12
3. Métodos utilizados para a separação dos aminoácidos iodados	16
PROPÓSITO DO TRABALHO	19
CAPÍTULO III	
MATERIAIS E MÉTODOS	21
1. Material biológico	21
1.1. Coleta da bile	22
1.2. Coleta do conteúdo intestinal	22
1.3. Tratamento do material biológico	23

	página
2. Métodos analíticos	24
2.1. Gel filtração da bile em Sephadex	24
2.1.1. Preparo do gel de Sephadex	24
2.1.2. Gel filtração em Sephadex G 25 M	25
2.2. Tratamento das frações obtidas na gel filtração em Sephadex	26
2.3. Cromatografia em papel	27
2.4. Hidrólise enzimática dos compostos iodados biliares e fecais	29
3. Reativos e solventes	31

CAPÍTULO IV

RESULTADOS	33
1. Estudo da bile	33
1.1. Separação em gel de Sephadex dos componentes iodados da bile	33
1.2. Comportamento e identificação, por cromatografia em papel, dos compostos iodados biliares obtidos por filtração em gel de Sephadex	34
1.3. Gel filtração dos extratos butanólicos biliares	35
1.4. Gel filtração dos hidrolisados enzimáticos dos com postos iodados biliares	37
1.5. Alteração porcentual das frações biliares frente a uma sobrecarga exógena de T ₄ estável	38
2. Gel filtração dos extratos butanólicos dos conteúdos intes tinais	39

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO	59
1. Quanto à metodologia	59
2. Quanto à decomposição do material na coluna de Sephadex ..	61
3. Composição da bile	61
4. Alteração porcentual das frações biliares frente a uma sobrecarga exógena de T ₄ estável	63
5. Gel filtração em Sephadex do conteúdo intestinal do reto .	63
6. Coleta do material diretamente do intestino delgado	63

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES	65
SUMÁRIO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A tireóide é uma glândula de secreção interna, altamente especializada na sua estrutura e função, que está integrada para fornecer suprimento estável de dois produtos metabolicamente ativos, a tiroxina (T_4) e a triiodotironina (T_3), que são os hormônios tireoidianos. Eles são formados, essencialmente, de um aminoácido, a L-tironina

Trabalho realizado na Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

Abreviaturas : AA - álcool amílico terciário saturado com NH_4OH 2 N ,
n-B:AcAc:H₂O - n-butanol: ácido acético:água (4:1:5), n-B:Am -n-butanol saturado com NH_4OH 2 N, col:H₂O(NH_4OH) - colidina:água (100:35) em ambiente de NH_4OH , DIT - diiodotirosina, metanol:amônia - 99 ml de álcool metílico + 1 ml de NH_4OH 2 N, MIT - metiodotironina, Na¹³¹I, iodeto de sódio marcado com ¹³¹I, Sephadex - Sephadex G 25 M, TRIS - tampão de tris-(hidroximetil)aminometano 0,05 M em HCl, pH 7,4, T₂ - diiodotironina, T₃ - triiodotironina, T₄ - tetraiodotironina ou tiroxina, T₁₂₅ - tiroxina marcada com ¹²⁵I, T₁₃₁ - tiroxina marcada com ¹³¹I.

AA e NH_4OH - estas flechas indicam os níveis, nos quais o tampão de TRIS-HCl foi substituído por AA e NH_4OH 2 N, respectivamente.

e de átomos de iôdo. O aminoácido não fazendo parte daqueles essen
ciais e não havendo, até hoje, descrição de impedimentos metabólicos na
sua síntese pelo organismo, existe sempre em quantidade suficiente para
a tireóide, o que não ocorre com o iôdo. Este existe em quantidades va
riáveis, dependendo de sua ingestão e absorção, distribuição comparti
mental e depuração através de alguns órgãos e excreção.

Além do iôdo e do aminoácido, que constituem a maté
ria prima para a elaboração do hormônio, é necessário todo um sistema
enzimático de que é possuidora a célula tireoidiana, para que a sínte
se se processe. A falta de uma dessas enzimas leva à não produção dos
hormônios.

O iôdo penetra no organismo através da mucosa gas
trintestinal. São, eventualmente, vias acessórias de absorção, a pele
e o alvéolo pulmonar. No tubo gastrintestinal, quase tôdas as formas
de compostos iodados são primeiramente reduzidas a iodeto e, nesta for
ma, absorvidas. A absorção do iodeto é rápida, praticamente total e as
quantidades eliminadas nas fezes são desprezíveis. A forma pela qual
circula o halogênio absorvido é a de iodeto e é chamado iôdo pré-tirei-
diano, isto é, aquele que ainda não sofreu os processos de metaboliza
ção nos folículos tireoidianos. A tireóide retira o iodeto da circula
ção e o acumula por um mecanismo enzimático ativo, em nada comparável
com a difusão passiva através de membranas. No mesmo espaço de tempo,
o rim também retira da circulação parte do iodeto. Outros tecidos tam
bém depuram iodeto da circulação, ativamente, mas nenhum desses proces
sos têm significância fisiológica já que, em última análise, eles pare
cem não organificar o iodeto.

A proteína precursora da tireoglobulina é formada no citoplasma e deve ser iodada durante ou após a sua síntese, o que provavelmente se dá na interfase célula-colóide do folículo.

Ao que tudo indica, é na mitocôndria que o iodeto se transforma em uma forma mais reativa, pela perda de elétrons e é onde se encontram sistemas enzimáticos completos capazes de conduzir a reação: a iodeto-peroxidase, que seria responsável pela reação de iodação através da formação de um intermediário iodado de natureza desconhecida e a tirosina-iodase que seria necessária para a reação do composto hipotético e a tirosina.

A formação de T_3 e T_4 dá-se pelo acoplamento de dois resíduos iodotirosínicos com a perda de um radical alifático e formação de um grupamento difenil éter iodado. A existência dos grupos tirosínicos distantes uns dos outros faz supor que a tireoglobulina adquira uma forma espiralada com a aproximação daqueles resíduos. Desta forma o acoplamento destes grupamentos torna-se-ia possível.

A tireoglobulina, forma de armazenamento de T_3 e T_4 , deve, quando o organismo necessita, ser hidrolisada para lançar os hormônios em circulação. Esta proteólise deve-se dar no citoplasma da célula tireoidiana. Uma vez proteolisada, a tireoglobulina dá origem a dois aminoácidos hormonais, T_3 e T_4 e dois residuais sem ação metabólica, MIT e DIT.

A T_3 e T_4 são lançadas na circulação, provavelmente, através de sistemas de transportes específicos o mesmo não acontecendo

com a MIT e DIT que, sendo resíduos portadores de iôdo, devem ser desalogenados num mecanismo útil de poupança de iôdo.

Os únicos produtos de secreção conhecidos são as tironinas iodadas, que circulam no plasma ligadas a várias proteínas. A principal proteína carregadora de T_3 e T_4 é uma globulina que foi denominada TBG ^{*}. Uma pequena fração hormonal permanece livre em circulação.

A concentração das frações livre e ligada segue a lei da ação das massas. A fração livre que penetra na célula liga-se, provavelmente, às proteínas intracelulares e é liberada, paulatinamente, para a degradação. Entre os vários padrões de degradação o mais aceito é o da desalogenação total e simultânea de T_3 e T_4 concomitantemente à sua ação metabólica. Liberado dessa maneira, o iodeto livre difunde-se para o espaço extracelular de onde é novamente retido pela tireóide ou é excretado pelo rim seguindo as mesmas vias de iodeto recém ingerido.

Parte dos hormônios circulantes é excretada pela bile sob diversas formas de conjugação e de degradação. Uma vez no lúmen intestinal esses compostos podem ser metabolizados de diversas maneiras, e serem reabsorvidos, estabelecendo-se então uma circulação enterohepática.

* "Thyroxine binding globulin"

CAPÍTULO II

HISTÓRICO

1. Metabolização dos hormônios tireoidianos

1.1. Conjugação

1.1.1. Conjugação hepática

Kendall (31) em 1919 demonstrou que o cão injetado in travenosamente com 200 mg de T_4 eliminava na bile iôdo orgânico. Essa foi a primeira demonstração da importância do fígado na excreção da T_4 , fato confirmado por outros autores. (32, 3, 33, 4).

Krayer (32) em 1928, Asimoff e col. (3) em 1931, Leland e col. (33) em 1932, Barnes e col. (4) em 1933 por meio de técnicas di ferentes, relataram em seus trabalhos que a T_4 era excretada, na bile, sem sofrer modificações.

Clayton e col. (14) em 1950 evidenciaram que na bile

de gato após administração de T_4 - ^{131}I , o montante da radioatividade excretada se dividia igualmente em T_4 e iodeto.

Devido aos métodos empregados não foi possível detectar na bile os compostos relacionados com a metabolização da T_4 . Com a introdução de métodos mais sensíveis de separação e detecção Taurog e col. (62) em 1951, administrando L- T_4 - ^{131}I de alta atividade específica, em ratos, estudaram por cromatografia em papel, os compostos eliminados na bile, tendo evidenciado um composto que continha a maior porção da radioatividade total (composto U), além da T_4 , iodeto e um outro metabólito desconhecido.

Os mesmos autores (63) em 1952 estudaram a natureza química do composto U. Após a injeção em ratos da L- T_4 - ^{131}I e cromatografia em papel da bile, separaram o referido composto e o submetem a vários tipos de hidrólise. Ele não se mostrou hidrolisável pelas enzimas tipo tripsina, carboxipeptidase, quimotripsina, extrato pancreático e nem se alterava quando colocado em contacto com a mucosa intestinal. Entretanto, esse composto era facilmente hidrolisável pelo $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, pelo conteúdo do intestino grosso e delgado do rato, bem como pela β -glucuronidase em 30' em pH 7,0. A partir desses experimentos concluíram que o composto U seria um glucuronidato de T_4 . Esse composto que era excretado pela bile, não se encontrava nas fezes dos referidos animais.

Taurog (60) em 1953 realizou estudo mais pormenorizado da conjugação e excreção da T_4 , tendo obtido os mesmos resultados de sua publicação anterior (63), sugerindo que o composto U seria hidrolisável

sado durante sua passagem pelo tubo gastrintestinal do rato. A hidrólise do referido composto, pela β -glucuronidase esplênica, era completamente inibida pelo sacarato ácido de potássio 10^{-3} M. A partir destas observações o autor concluiu que o composto U era um glucuronidato de T_4 , que seria uma das formas de metabolização hepática do hormônio.

Os trabalhos de Lloyd e col. (38) não são concordes com os achados de Taurog, quanto à natureza química do composto U. Aquêles autores, trabalhando com bile de rato, que havia recebido T_4 radioativa, isolaram cromatograficamente um conjugado, que após hidrólise pela β -glucuronidase dava como produto final a $3,3',5-T_3$. A hipótese de que êste composto fôsse um artefato de técnica proveniente da desalogenação, ocorrida durante o tratamento químico, foi abandonada, visto que nas experiências contrôles não se obteve $3,3',5-T_3$ durante a hidrólise da T_4 .

Outra forma de metabolização dos hormônios tireoidianos seria a sua sulfoconjugação que foi estudada por Roche e col. (48), em ratos tireoidectomizados, usando como traçadores, a $3,3',5-T_3(^{131}I)$ e $Na_2SO_4(^{35}S)$. Separaram e identificaram, na bile, sulfatos de T_3 , éster sulfúrico de T_3 (êste também encontrado no plasma) (52) e um metabólito desconhecido.

1.1.2. Outros locais de conjugação da T_4 .

A conjugação da T_3 e/ou T_4 com ácido glucurônico pelo mecanismo microssomal requer ácido glucurônico uridina difosfato (UDPGA) presente nas células hepáticas.

A constatação de conjugados hormonais circulantes, na ausência do tecido hepático, permite postular a existência de um sistema enzimático específico para a glucurono-conjugação em outros tecidos. Flock (18) em 1955 estudou o metabolismo da T_3 e da T_4 em ratos eviscerados. A veia cava era cirurgicamente ligada abaixo dos rins, sendo que uma circulação colateral adequada era estabelecida. Foram removidos o fígado, estômago, intestinos, pâncreas e baço. No animal assim preparado, foi verificada a existência de conjugados hormonais no plasma, na urina, e nos tecidos restantes. A atividade biológica desses conjugados e a importância fisiológica da conjugação da T_4 é desconhecida.

Segundo Flock e col. (19) o fígado não é essencial para a sulfoconjugação dos hormônios tireoidianos, nem para a parcial desiodação da T_3 , que ocorre durante a formação da $3,3',5-T_2$, porque ambos são facilmente sintetizados pelo cão hepatectomizado. Foi verificado que no cão normal a quantidade de glucurono-conjugado é maior que a de sulfoconjugado, enquanto que no cão hepatectomizado, ambos são excretados em igual quantidade.

1.2. Degradação

Além da glucuronização e sulfatação da T_4 outras vias de metabolização foram descritas. Assim, após a administração da T_3 e/ou T_4 , "in vivo", verificou-se que a bile continha derivados parcialmente desiodados ou desaminados dos hormônios tireoidianos, tanto na forma livre quanto na conjugada.

Roche e col. realizaram estudo bastante completo sobre os me

tabólitos dos hormônios tireoidianos excretados na bile. Verificaram , preliminarmente que, na bile de ratos tireoidectomizados, a $3,3',5\text{-T}_3$ era eliminada sob a forma conjugada (53). Posteriormente, analisando a urina e a bile de ratos normais, os referidos autores encontraram os seguintes metabólitos:

a) na bile, o ácido $3,3',5\text{-triodotireopirúvico}$ derivado da $3,3',5\text{-T}_3$ e na urina o ácido $3,3',5,5'\text{-tetraiodotireopirúvico}$ derivado da T_4 . A possibilidade da existência de ambos, tanto na urina, quanto na bile não foi excluída (55);

b) o ácido $3,3',5\text{-triodotireoacético}$ encontrado na bile, sendo que o mesmo poderia ser um metabólito da T_3 que se formaria nas células hepáticas (40).

A desalogenação acoplada à sulfatação da T_4 , como outra via de metabolização hepática, foi também estudada por êsses autores (49). Assim, após administração da T_4 e Na_2SO_4 radioativos, a bile de ratos continha um derivado sulfatado e desalogenado da T_4 , identificado como sendo o sulfato de T_3 radioativo. Foi postulado para êste composto um papel importante, tanto na transferência quanto na reserva de T_3 .

Flock e col. (20) em 1963 administrando T_4 radioativa em ratos, mostraram uma desalogenação mais completa dêste composto. Assim verificaram a existência, na bile, de sulfo e glucurono-conjugados de T_2 e de T_3 .

Para comprovar que os diversos compostos excretados na bile,

derivados da T_4 , eram produtos do metabolismo normal do hormônio, Roche e col. (51) administraram $Na^{131}I$ em ratos, para estudar o metabolismo dêstes compostos endôgenamente formados, já que nas experiências anteriores, foram utilizadas T_3 e T_4 exôgenas. Assim, os hormônios circulantes e seus metabólitos seriam provenientes do próprio animal em experiência. Por êste procedimento confirmaram que a sulfo e a glucurono-conjugação da T_3 e da T_4 eram vias normais do metabolismo dos hormônios, sendo os mesmos encontrados na bile. Analisando o plasma, a urina e a bile dos animais, os autores evidenciaram também, pela mesma técnica, derivados acéticos dos hormônios tireoidianos (50).

A 3,3', 5-triiodotireoamina foi também encontrada no intestino do rato (47) após a administração de dose fisiológica de 3,3', 5- T_3 , demonstrando-se que os hormônios tireoidianos podem ser descarboxilados "in vivo". Como esta descarboxilação é via normal de degradação dos aminoácidos pelas bactérias intestinais, é provável que o referido composto, ausente na bile, seja formado no intestino, a partir dos hormônios livres ou conjugados. Foi postulado que êste composto seria um derivado do éster sulfúrico de T_3 pela ação da aril-sulfatase bacteriana.

A DIT também foi encontrada na bile de ratos e de indivíduos normais, após administração de T_4 - ^{131}I (9). Wynn e col. (64) estudando os produtos de degradação da T_4 "in vitro" pelos microsomas de fígado de rato evidenciaram a DIT na fração da bile solúvel em butanol.

Um esquema simplificado e resumido de algumas etapas metabólicas dos hormônios tireoidianos é apresentado na Figura 1.

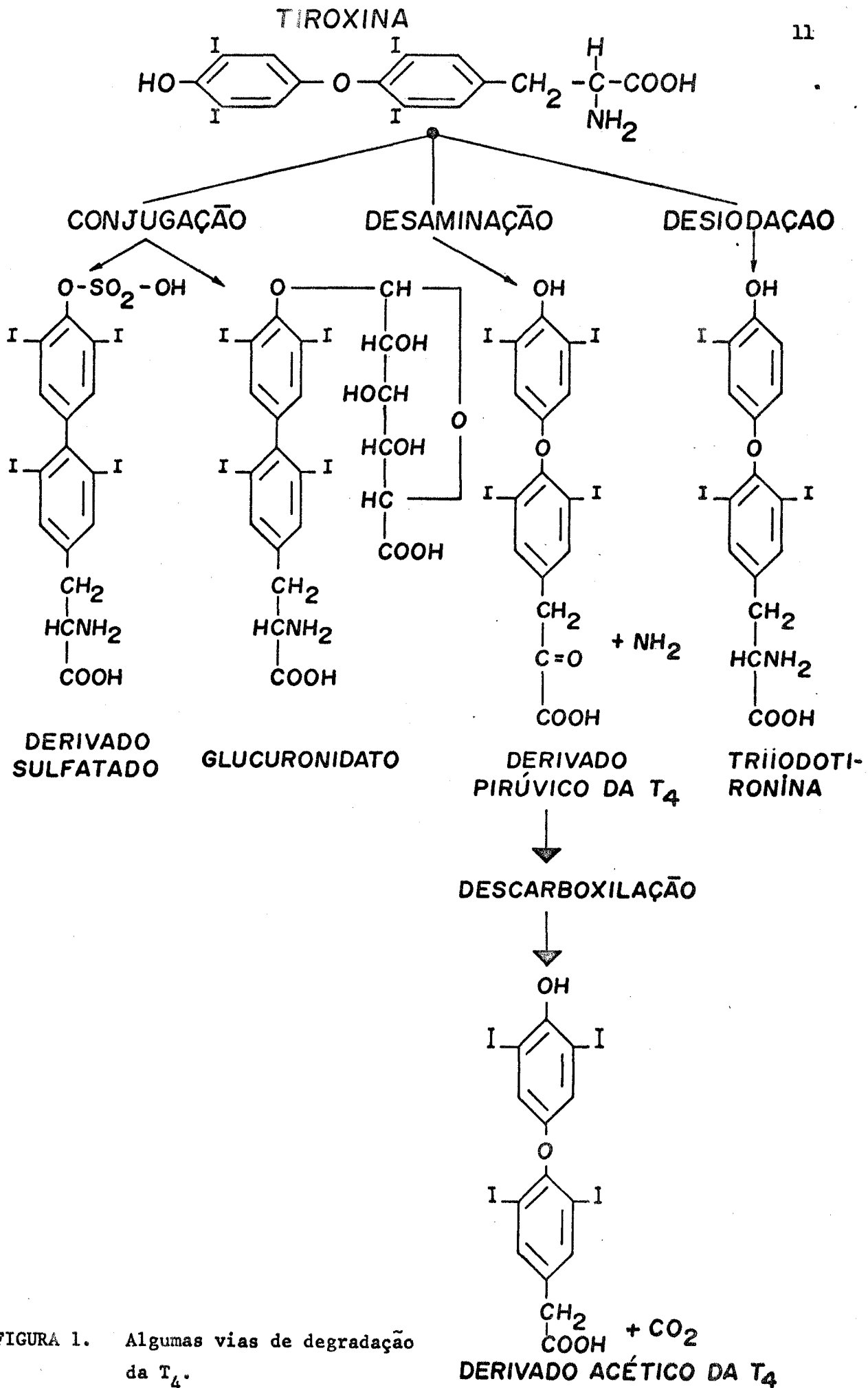


FIGURA 1. Algumas vias de degradação da T₄.

2. Circulação enterohepática

Parece estar bem estabelecida a existência de um ciclo enterohepático para a T_4 . Esta parece ser eliminada por via biliar, primordialmente, sob a forma conjugada e sofreria uma hidrólise enzimática no lúmen intestinal, sendo reabsorvida sob a forma livre.

Cálculos baseados na velocidade de excreção dos hormônios tireoidianos endógenos pela bile e na velocidade de liberação do hormônio pela glândula tireóide, indicam que uma significativa fração do hormônio é excretada por via biliar, possivelmente 50%. Assim, se toda a T_4 fosse subsequentemente eliminada nas fezes, a tireóide deveria secretar quase o dobro da quantidade de hormônio normalmente necessária, para suprir as necessidades metabólicas dos tecidos. Portanto considera-se que uma parte do hormônio excretado na bile seja posteriormente reabsorvida no intestino.

Albert e col. (1), administrando T_4 a ratos, demonstraram que a radioatividade fecal excretada era menor que a biliar. Pelo cálculo das diferenças de radioatividade biliar e fecal concluíram que a circulação enterohepática era de considerável magnitude. À parte de uma certa variabilidade nas proporções reabsorvidas pelo intestino, estes resultados foram confirmados pela maioria dos autores.

Diversas tentativas têm sido realizadas para o estudo da absorção intestinal dos hormônios tireoidianos diretamente, "in vivo" e "in vitro".

Evidências de que a T_3 e a T_4 são absorvidas "in vivo" são deriva

das das respostas terapêuticas. Estas foram obtidas pela administração destes hormônios a indivíduos hipotireoidianos por via oral. O estudo dessa absorção utilizando preparações "in vitro" foi realizado por Albert e col. (2) com T_4 radioativa. Nessas experiências constataram que 20% do hormônio eram absorvidos pelo intestino delgado e 25% pelo grosso.

De acôrdo com Chung e col. (11) a absorção da T_4 pelas alças intestinais do íleo é maior que pelas do duodeno e jejuno.

Cottle e col. (16) verificaram que tanto a forma levôgira como a dextrôgira de T_4 eram igualmente absorvidas pelo intestino do rato.

Experimentalmente pode-se avaliar as diferenças de absorção intestinal entre a T_4 livre e conjugada, reproduzindo-se condições as mais prôximas possíveis das fisiológicas.

Estas diferenças podem ser aquilatadas pelos dados fornecidos pelos trabalhos de Briggs e col. (10). Estes autores, infundindo bile de rato que tinha recebido T_4 radioativa (que portanto deveria ter grande quantidade de T_4 conjugada) no duodeno de outro rato, verificaram que a absorção era menor (25 a 35%) comparativamente aos resultados obtidos quando infundiam T_4 radioativa misturada com bile não radioativa (41 a 68%). Verificaram também que o conjugado de T_4 radioativa eluído, após a sua separação cromatográfica da bile, quando adicionado à bile não radioativa apresentava uma absorção menor (24 a 40%) que a T_4 livre.

Chung e col. (12) estudaram a bsorção da T_4 pelo íleo e colon de ra

tos "in vivo", na presença de variáveis fisiológicas tais como : concentração de T_4 , dieta e flora intestinal. Em uma hora, menos de 40% da dose de T_4 foram absorvidas pelas alças do intestino quando estas eram previamente lavadas, independentemente da dose administrada. Comparativamente, a absorção era maior no rato mantido em jejum e livre de germes intestinais que naqueles alimentados e intactos. Este trabalho e aqueles de Cottle (16) e Herz (28) sugerem que o mecanismo de transporte da T_4 do lúmen intestinal poderia envolver uma difusão passiva de uma forma livre de T_4 presente no lúmen intestinal.

Pelas diferenças de absorção da T_4 pelas alças intestinais intactas e pelas alças intestinais isentas de germes pôde-se concluir que as proteínas endógenas plasmáticas são continuamente transportadas para o lúmen do trato gastrintestinal a estas proteínas juntamente com os resíduos alimentares insolúveis e a flora intestinal, limitariam a absorção da T_4 . Foi sugerido que a T_4 livre, no lúmen intestinal, seria a fração primária disponível para a absorção.

O acúmulo de radioatividade pelo fígado é geralmente observado nas experiências em que se utiliza T_4 - ^{131}I exógena mesmo quando esta é administrada em dose pequena. Em contraste, o fígado não concentra hormônio endógeno, pelo menos no rato (27). É questionável se as observações feitas com o hormônio exógeno, particularmente em relação ao metabolismo no fígado, refletiria o destino normal do hormônio endógeno. Tentativas para se confirmar a excreção biliar e fecal do hormônio tireoideano marcado endogenamente em ratos, conduziram a resultados discordantes quanto à reabsorção intestinal. Segundo Myant (43), 30% da T_4 biliar eram reabsorvidos, enquanto que Cottle não encontrou reabsorção

intestinal do hormônio (15).

Uma tentativa para esclarecer este problema foi realizada por Galton e col. (23). Os referidos autores administrando ^{125}I de atividade específica conhecida na dieta de ratos estabeleceram o equilíbrio isotópico ($^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$). O iôdo orgânico (ug/24 horas) foi dosado na bile e nas fezes, para a determinação da quantidade absoluta do hormônio. Pe los resultados verificaram que a quantidade de hormônio excretada nas fezes era maior que na bile, contrariando o conceito corrente da reab sorção intestinal. Entretanto as diferenças de técnica empregada em relação aos trabalhos anteriores, poderiam explicar estas discrepâncias. Segundo estes autores parece que a reabsorção intestinal da T_4 endôgena não ocorre no rato, e é compatível com a ausência de um sistema ativo de transporte para este hormônio através da parede intestinal (28). Exis tindo, ainda a possibilidade de que haja alguma transferência de T_4 plas mática para o intestino.

Considera-se que somente a T_4 livre do sôro é utilizada pelos tec dos. Assim, a velocidade de remoção da mesma pelo fígado, deveria es tar relacionada com a concentração de hormônios livre circulante. Foi verificado que a administração do hormônio exógeno aumentava a quantida de de T_4 excretada na bile (41, 42). A administração de salicilato de sódio ou butil-4-hidroxi-3,5-diiodobenzoato, também aumentava a quanti dade de T_4 excretada na bile, pelo deslocamento da mesma dos locais de ligação nas proteínas plasmáticas. Flock (21) administrando salicilato de sódio, antes da injeção de T_4 radioativa, em ratos com fístula bi liar, verificaram que a maior parte da radioatividade na bile estava sob a forma de glucuronidato de T_4 .

A avaliação do grau de absorção é dificultada quando são administradas doses traçadoras do hormônio. A absorção da radioatividade pode, meramente, refletir uma troca isotópica entre a T_4 radioativa administrada exôgenamente, e a endôgena, ou uma transferência de iodo radioativo.

Embora a T_4 livre seja absorvida mais rapidamente que a forma conjugada (10) os resultados obtidos nos estudos do transporte dos análogos da T_4 pelos intestinos invertidos de ratos (28), mostraram que a passagem efetiva do hormônio através da parede intestinal era dependente da formação de glucuronidato dentro da parede interna do intestino invertido. A absorção parece ser dependente da concentração de hormônio livre em ambos os lados da parede. Nas condições normais, a concentração de hormônio endógeno no intestino seria insuficiente para promover um significativo gradiente de concentração e, assim, toda a T_4 biliar seria eliminada nas fezes. Entretanto, quando a concentração de hormônio no intestino é aumentada, pela introdução de T_4 exógena no lúmen, diretamente, ou através da bile, uma considerável absorção de T_4 poderia ocorrer.

3. Métodos utilizados para a separação dos aminoácidos iodados.

Em todos os trabalhos citados, com exceção daqueles realizados por Flock e col. (19, 20), que utilizaram coluna de sílica gel e os de Furth e col. (22), que estudaram uma fração da bile em colunas de DEAE-celulose e Sephadex, a metodologia empregada foi a da cromatografia em papel.

A boa especificidade desse procedimento é indiscutível, para a identificação dos compostos iodados em análise. Falha, porém, essa metodo

logia no tocante às quantidades de substâncias a serem separadas, o que limita sua aplicação a materiais biológicos tais como, fezes e bile, visto que a quantidade de "impurezas" como pigmentos e lipídeos é bastante significativa.

A cromatografia em coluna, utilizando meios suportes como resinas trocadoras de íons, DEAE-celulose, amido, celulose, tem sido largamente aplicada a materiais biológicos, como soro, plasma, urina e hidrolisado de tireóide, como também para a purificação e verificação da homogeneidade da tireoglobulina.

A separação dos aminoácidos iodados de hidrolisado de tireóide (de diferentes animais) foi realizada em diversos tipos de fase estacionária. Assim, a sílica gel foi utilizada por Gross e col. (25); o amido por Dobyns e col. (17) e a celulose por Rosenberg (57).

Blanquet e col. (5) sugeriram pela primeira vez a utilização de resina de troca iônica (Dowex 1 e 2) para a separação dos aminoácidos iodados do soro. Essa metodologia com algumas modificações tem sido aplicada para diversos materiais biológicos. Assim, Lissitzky e col. (37) utilizaram-na para a análise do hidrolisado de tireóide de rato; Roche e col. (54) para a tireoglobulina de porco e Galton e col. (24) para a tireóide de camundongo. A resina Dowex 50 x 2 associada à Dowex 1 x 2 foi utilizada por Blanquet e col. (6) para a separação dos aminoácidos iodados do plasma e a Dowex 50 W por Block e col. (8) para o fracionamento das proteínas tireoidianas digeridas.

A homogeneidade da tireoglobulina de animais tem sido analisada em

DEAE-celulose por vários autores: Peterson e col. (56), Ingbar e col. (50), Shulman e col. (58), Roche e col. (56), Spiro (59) e Robbins (46). Em tôdas as análises a recuperação do material colocado na coluna de DEAE-celulose era muito baixa.

Desde 1962 o gel de Sephadex vem sendo amplamente utilizado para a separação dos compostos iodados de diversos materiais biológicos.

Lissitzky e col. (36) mostraram que a filtração em gel de Sephadex G 25 M possibilitava a separação de MIT, DIT e iodeto das tironinas iodadas livres. O método foi aplicado para determinação quantitativa da distribuição da radioatividade nos compostos iodados do sôro de pacientes após dose de Na^{131}I . A metodologia foi também aplicada no hidrolisado de tireóide de rato. O sôro "in natura" foi filtrado em Sephadex. A T_4 ligada às proteínas, o iodeto, a MIT e a DIT (eluídas nesta sequência) eram separadas das tironinas iodadas livres, que ficavam retidas no gel. Estas eram posteriormente eluídas com AA. O método apresentava boa reprodutibilidade. Este método foi modificado pelos autores (35) para a separação das tironinas iodadas das ligações com as proteínas. Assim, introduziram na metodologia a digestão enzimática prévia do sôro com papaina. A T_3 e/ou T_4 , que se liberavam, ficavam retidas na coluna e eram eluídas conjuntamente com AA e separadas posteriormente por cromatografia em papel.

Investigações das funções da glândula tireóide pela determinação da relação entre a T_3 livre e ligada às proteínas do sôro (45).

Liewendahl e col. (34) separaram o iodeto livre da T_4 - ^{131}I , sendo o

método aplicado como etapa acessória para a determinação da iodemia proteica.

Clark e col. (13) verificaram que alguns fatores físico-químicos (não tireoidianos) influenciavam a dissociação da T_4 radioativa do soro, durante a gel filtração. Esses fatores eram importantes, quando a metodologia era utilizada para a avaliação da função da tireoide.

Hocman (29) realizou uma análise crítica sobre a separação da T_4 livre e ligada às proteínas. Verificou-se que a T_4 era degradada espontaneamente em iodeto, como também apresentava pequena adsorção irreversível no gel. A forma e o tamanho da coluna influenciavam a proporção relativa dos compostos separados.

Determinação de hormônios livres no soro mesmo na presença de contrastes radiológicos iodados (7).

Makowetz e col. (39) realizaram a separação e a determinação dos hormônios tireoidianos, na ordem de nanograma, baseados nas propriedades do Sephadex. Utilizaram Sephadex G 25 fino com a separação de T_3 da T_4 em uma só etapa.

PROPÓSITO DO TRABALHO

O estudo da bile e do conteúdo intestinal em compostos iodados sempre foi, grandemente, prejudicado pela falta de uma boa

técnica de separação e quantificação, visto que, nas análises cromatográficas em papel, apenas pequenas quantidades destes materiais podiam ser analisados. Era fator agravante a baixa atividade radioativa recuperada nos extratos a serem analisados principalmente quando se trabalhava com fezes.

A utilização do gel de Sephadex na separação dos compostos iodados séricos por Lissitzky e col. (36) nos levou a testar a capacidade separadora do mesmo material para os produtos biliares e conteúdo intestinal, visando a possibilidade de se poder trabalhar com maior quantidade de produtos biológicos e identificar com maior precisão os seus componentes iodados, bem como verificar alguns dados sobre o metabolismo enterohepático da T_4 radioativa.

Portanto, este trabalho em resumo se propõe a :

1. Estudo da separação dos compostos iodados fecais e biliares por filtração em gel de Sephadex.
2. Apresentação de alguns dados do metabolismo hepato-intestinal de T_4 no rato, obtidos com a aplicação desta técnica de separação.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material biológico

Foram utilizados ratos adultos, normais, da raça Wistar, mantidos no biotério do Instituto de Energia Atômica, sob dieta normal, com peso médio de 250 a 300 gramas.

A T_4 radioativa foi administrada ao rato, por via intraperitoneal, sendo que a absorção da mesma, segundo Hall e col., seria de 64,6% (26).

Os animais utilizados foram divididos em três grupos :

- a) grupo de 4 ratos, cada um dos quais recebeu uma dose única de 70 μCi de T_4 - ^{125}I , com atividade específica de 55 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de T_4 .
- b) grupo de 2 ratos, cada um dos quais recebeu 70 μCi de T_4 - ^{125}I , após adição de 400 μg de T_4 , o que reduziu enormemente a atividade

específica do produto administrado (0,137 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$).

c) um terceiro grupo de 2 ratos, cada um dos quais recebeu uma dose única de 30 μCi de $\text{T}_4\text{-}^{125}\text{I}$, após a percolação em resina aniônica forte (Amberlite IRA 400) sob a forma de cloreto para a eliminação do iodeto livre. A $\text{T}_4\text{-}^{125}\text{I}$ foi a seguir eluída com soro humano normal. Portanto, a T_4 radioativa foi injetada neste último grupo em associação com soro humano.

1.1. Coleta da bile

A coleta da bile foi feita, nos ratos, por cateterização do cólédoco, com tubo de polietileno de 0,5 mm de diâmetro interno, sob anestesia com pentobarbital sódico (0,2 a 0,3 ml) intraperitoneal. A cânula foi inserida no duto biliar, o mais próximo possível do fígado, como foi sugerido por Taurog (60), para não haver diluição da bile com o suco pancreático.

A maioria dos animais foi canulada antes da administração do material radioativo e, imediatamente, foi iniciada a coleta da bile. Em alguns animais, procedeu-se a canulação 24 horas após a dose de T_4 radioativa. Obteve-se, assim, uma bile precoce e outra tardia. Em todas as experiências foi realizada, em média, uma coleta contínua da bile, de 10 horas, sendo os animais mantidos anestesiados, administrando-se cada 4 horas, 0,2 ml de pentobarbital sódico.

1.2. Coleta do conteúdo intestinal

Para a coleta do conteúdo do intestino delgado e grosso, foram utilizados ratos nos quais não houve canulação biliar. Os ratos foram sacrificados 24 horas após a administração da T_4 radioativa. Afim de evitar a mistura do conteúdo das diversas porções intestinais, pela manipulação, elas foram previamente amarradas. Cada porção foi seccionada e cuidadosamente lavada com solução fisiológica para a retirada das possíveis contaminações com sangue. O conteúdo intestinal de cada porção foi obtido por lavagem.

No presente trabalho foram utilizados o duodeno, o íleo e o reto.

1.3. Tratamento do material biológico

Um volume adequado de bile foi acidificado com H_2SO_4 a pH 1,0. Foram feitas 4 extrações sucessivas, com igual volume de n-butanol, acertando-se o pH, após cada extração. Os extratos foram reunidos e o pH foi elevado entre 9 e 10 com NaOH 10%, para que não houvesse desidratação dos compostos iodados, o que poderia ocorrer em meio ácido. Sob corrente de nitrogênio e aquecimento entre 35 a 40°C, o n-butanol foi evaporado até obtenção de um extrato seco, totalmente isento de solvente, isto porque este poderia interferir na posterior gel filtração em Sephadex. O extrato seco foi dissolvido em água destilada e acertou-se o pH com H_2SO_4 10%.

O conteúdo de cada porção intestinal foi também submetido ao tratamento descrito para a bile.

2. Métodos analíticos

2.1. Gel filtração da bile em Sephadex

2.1.1. Preparo do gel de Sephadex

Utilizou-se a propriedade do Sephadex descrita por Lisitzky e col. (36) em seu trabalho sôbre a separação dos compostos iodados do sôro, introduzindo-se na metodologia original algumas modificações.

Usou-se uma coluna de vidro de 40 cm de altura e 2,5cm de diâmetro interno, com afunilamento na parte inferior, onde foi adaptado um tubo de borracha ligado a uma pipeta de Pasteur para o contrôle do fluxo de saída do percolado e, logo acima da parte afunilada, colocou-se lã de vidro para a retenção do gel. A coluna foi cuidadosamente alinhada na vertical.

Em 120 ml de água destilada foram colocados 35 g de Sephadex G 25 M, sob agitação, deixando-se a mistura em repouso durante 24 horas (4°C) afim de permitir um entumescimento homogêneo do gel. Os grãos mais finos, que permaneceram sobrenadantes, foram eliminados por decantação. O gel entumescido foi colocado na coluna até atingir o nível de 20 cm, sob agitação constante para que não houvesse formação de bôlhas de ar o que produziria uma solução de continuidade da coluna.

A horizontalidade da superfície do leito da coluna foi mantida com um disco de papel de filtro de dimensão igual ao diâmetro

interno da mesma. O gel foi equilibrado com uma solução tampão de TRIS-HCl, 0,05 M de pH 7,4, percolada através da coluna durante várias horas. Um nível líquido de mais de 2 cm foi constantemente mantido acima da superfície do gel.

2.1.2. Gel filtração em Sephadex G 25 M

Um volume adequado de bile ou extrato fecal, foi cuidadosamente colocado, com uma pipeta, na coluna de Sephadex. Iniciou-se a coleta das frações numa velocidade de 1 ml/minuto. Após a penetração total do material no gel, a parede da coluna foi lavada, 4 vezes, com 5 ml de tampão, esperando-se sempre que o mesmo penetrasse totalmente no gel. A seguir foram adicionados, paulatinamente, 120 ml de tampão de TRIS-HCl e a velocidade de saída foi novamente controlada para 1 ml/minuto. Após a percolação dos 120 ml de tampão, pela coluna, (que retira sucessivamente, proteínas iodadas, iodeto e tirosinas iodadas, se existentes), introduziram-se 80 ml de AA (que promove a eluição das tirosinas iodadas livres). Finalmente a coluna foi percolada com 80 ml de NH_4OH 2N.

Frações de 4,5 a 5,0 ml foram coletadas por coletor automático* em tubos especiais de 15 x 110 mm, e a radioatividade determinada em contador automático de "poço" dotado de um cristal de NaI (Tl) de 2 x 2 polegadas.**

* ARTHUR THOMAS

** AUTOMATIC GAMMA COUNTING SYSTEM - NUCLEAR CHICAGO CORPORATION

O tempo de contagem, para cada amostra, foi variável de 1 a 10 minutos, dependendo da atividade radioativa de cada uma. No caso das frações com atividade muito baixa, um tempo maior de acúmulo de contagens foi utilizado, para haver diminuição do erro estatístico nas contagens.

Construiu-se um gráfico para cada experiência, lançando-se nas abcissas as frações coletadas e nas ordenadas as contagens das mesmas em função do tempo.

2.2. Tratamento das frações obtidas na gel filtração em Sephadex

Afim de se preparar as diversas frações obtidas na filtração em gel de Sephadex, para a cromatografia em papel, cada uma foi manipulada convenientemente como se segue :

As frações 1,2 e 4 foram concentradas por aquecimento entre 30 a 40°C (sob corrente de nitrogênio para evitar a oxidação).

Na fração 3, além dos compostos iodados, os pigmentos e os lipídeos são eluídos concomitantemente pelo solvente orgânico utilizado na gel filtração em Sephadex. Estas "impurezas" iriam interferir na posterior cromatografia em papel. Para sua eliminação, uma amostra da fração 3 foi misturada com igual volume de NH_4OH 2N num funil de separação e agitada. Após a separação das duas fases, a inferior (aquosa) foi recolhida. Em seguida foram realizadas mais duas extrações, com metade do volume originariamente empregado, para garantir a extração total. (As "impurezas" permanecem, na sua maior parte, no solvente orgânico, en

quanto que a T_3 e T_4 são extraídas pela fase aquosa). As 3 fases foram reunidas e concentradas por aquecimento entre 30 a 40° C sob corrente de nitrogênio.

Os extratos assim obtidos foram eluídos com um volume mínimo (0,1 a 0,2 ml) de metanol:amônia (99:1). Estas soluções foram colocadas no papel de cromatografia em uma faixa de alguns cm de largura, equidistantes 1 cm das margens.

2.3. Cromatografia em papel

A cromatografia em papel foi utilizada com dois propósitos:

1. Para identificação dos compostos iodados, previamente separados pela filtração em gel de Sephadex.
2. Para separação das tironinas iodadas (T_3 e T_4) eluídas concomitantemente da coluna de Sephadex.

Foi utilizada a cromatografia em papel Whatman nº3, monodimensional, descendente, com os seguintes sistemas de solventes:

a) sistema (1):

n-butanol:ácido acético:água (4:1:5).

Os componentes foram colocados, na proporção acima citada, em um funil de separação e em seguida a mistura foi agitada para a saturação do solvente orgânico com água. Para a separação das fases a mistura foi deixada em repouso durante 4 horas. Por esse processo obti

veram-se 2 fases: uma, a butanólica que foi utilizada como fase móvel e a outra, como fase estacionária;

b) sistema (2):

2,4,6-colidina:água (100:35) em ambiente de NH_4OH .

A colidina e a água foram misturadas na proporção indicada acima e utilizadas como fase móvel. O NH_4OH colocado na parte inferior da cuba serviu como fase estacionária;

c) sistema (3):

n-butanol: NH_4OH 2 N (1:1).

Em um funil de separação, o n-butanol e o NH_4OH 2 N foram colocados na proporção acima citada. Após agitação da mistura para saturação do solvente orgânico com água, a mistura foi deixada em repouso durante 4 horas e as duas fases obtidas foram separadas. A butanólica foi usada como fase móvel e a aquosa como fase estacionária.

Os padrões não radioativos, MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4 foram utilizados separadamente para a determinação dos respectivos Rfs nas condições experimentais, nos respectivos sistemas de solventes empregados. Da solução, preparada como será descrita em "Reativos e solventes" (pg 31), foram empregados 40 μl para cada análise.

A mistura de padrões não radioativos, num volume de 40 μl foram cromatografados, conjuntamente e paralelamente, com a amostra a ser analisada. Como a substância radioativa, em função da massa, estava presente em concentração muito baixa, os padrões não radioativos desempenhavam o papel de "substância carregadora" que poderiam ser revelados

quimicamente.

Os cromatogramas, assim preparados, foram levados à cuba cromatográfica, que continha somente a fase aquosa na parte inferior, afim de permitir saturação do papel com a fase estacionária. Após 5 horas, colocou-se o solvente na cubeta através de um orifício superior da cuba, sem que a mesma fosse aberta, para não haver rompimento do equilíbrio previamente estabelecido. O tempo de desenvolvimento cromatográfico variou de 15 a 20 horas. Após o desenvolvimento dos cromatogramas eles foram secados sob corrente de ar quente.

Os padrões não radioativos foram localizados no cromatograma - por meio de reações químicas. Para os compostos com agrupamentos fenólicos foi utilizada a reação de Pauly e na identificação do iodeto de sódio, o cloreto de paládio.

Após a "revelação química", os cromatogramas foram novamente - secados e recortados em tiras de 1 cm de largura. A radioatividade de cada tira foi determinada em contador automático de poço dotado de um cristal de cintilação de NaI(Tl) de 2 x 2 polegadas.

2.4. Hidrólise enzimática dos compostos iodados biliares e fecais.

Algumas frações (Figura 2) foram submetidas à hidrólise enzimática com β -glucuronidase e submetida uma outra vez à filtração em gel de Sephadex, afim de se determinar a constituição química das mesmas. Para isso foram utilizadas 5000 unidades de β -glucuronidase para cada 5 ml de solução. A fração a ser analisada era tampona com acetato de pH

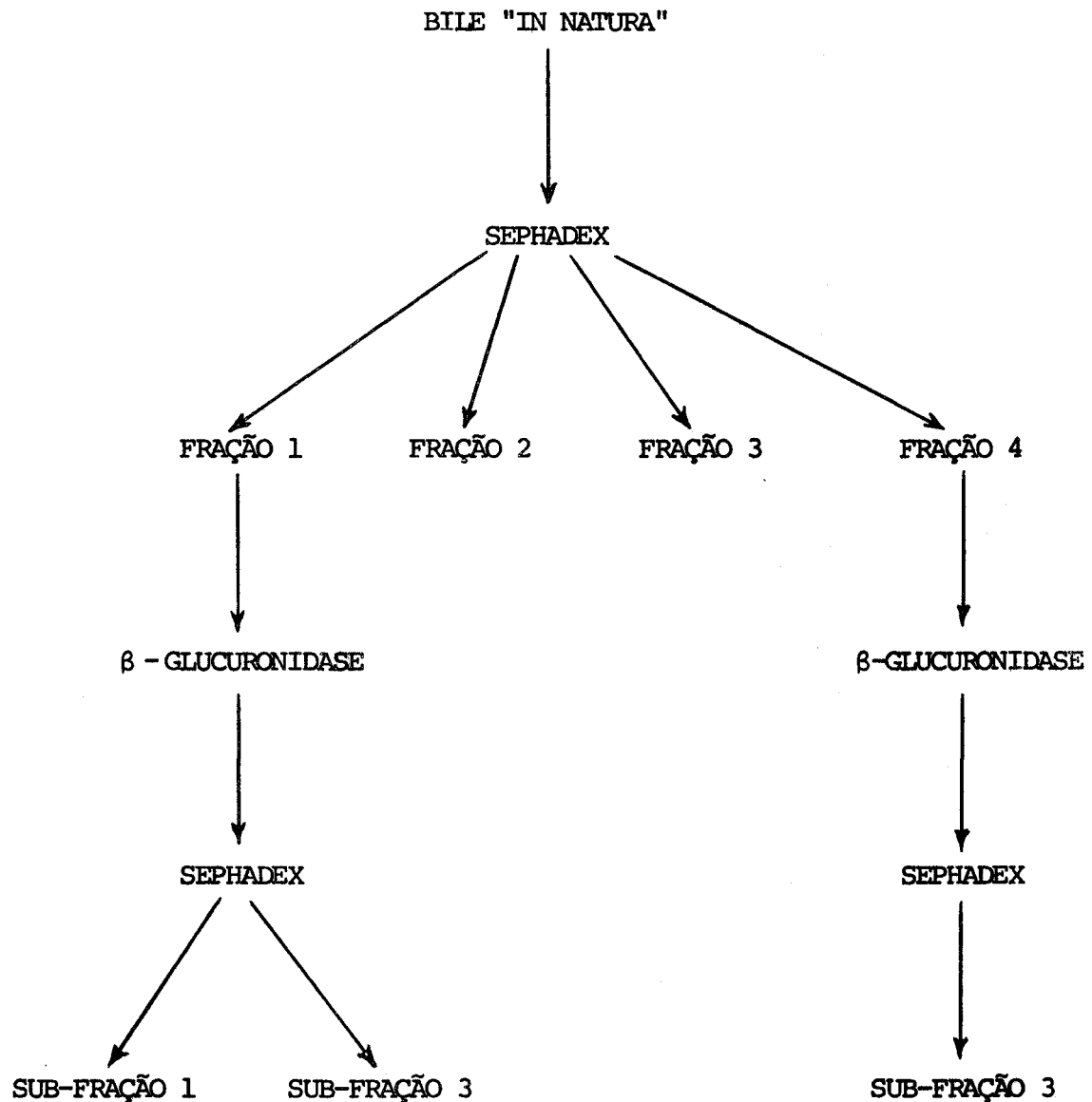


FIGURA 2

Esquema simplificado dos procedimentos a que foi submetido a bile na tentativa de identificação das diversas frações. Verifica-se que pelo tratamento com a β -glucuronidase a fração 1 é decomposta em parte, dando origem a uma sub-fração, que passa a ser eluída com AA (sub-fração 3). A fração 4, pelo mesmo tratamento, passava a se comportar quase que totalmente como sub-fração 3.

4,5 e a hidrólise era realizada a 37°C durante 15 horas.

3. Reativos e solventes

1. Tampão de TRIS-HCl, 0,05 M, pH 7,4

125 ml de tris (hidroximetil) aminometano 2M

105 ml de solução de 6,1 ml de HCl/1000ml de água

água destilada, q.s.p. 500 ml.

2. Reativo de Pauly.

A. solução de NaNO₂ 5%

B. solução de ácido sulfanílico { 4 g de ácido sulfanílico
90 ml de HCl concentrado
900 ml de água destilada

C. solução de Na₂CO₃ 10%

Misturar as soluções A e B (1:1) e esperar 3 minutos com agitação. A seguir adicionar igual volume da solução C.

3. Padrões não radioativos

A. solução da mistura dos padrões não radioativos : 1 mg de MIT, 1 mg de DIT, 1 mg de NaI, 4 mg de T₃, 4mg de T₄ em 2 ml de NH₄OH 2 N.

B. solução dos padrões utilizados separadamente : 1 mg de MIT em 2 ml de NH₄OH 2 N ; 1 mg de DIT em 2 ml de NH₄OH 2 N ;

1 mg de NaI em 2 ml de NH_4OH 2 N; 4 mg de T_3 em 2ml de NH_4OH 2 N ;
4 mg de T_4 em 2ml de NH_4OH 2 N.

4. Drogas empregadas.

- L-Tiroxina- ^{125}I , com atividade específica de 55 $\mu\text{Ci}/\text{ug}$ de tiroxina e atividade de 0,5 mCi/ml, procedente da Amershan Searle Corporation, EUA.
- Monoiodotirosina e Diiodotirosina - procedentes da Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, EUA.
- L-3,3', 5-triiodotironina sódica e L-3,3',5,5'-tetraiodotironina sódica - procedentes da Calbiochem, Los Angeles, California EUA .
- Sephadex G 25 M - procedente da Pharmacia, Uppsala, Sweeden.
- β -glucuronidase (Ketodase) com 5000 unidades/ml. Derivada de fígado de boi, tamponada com acetato de pH 5,0. Procedente da General Diagnostics Division, Warner, Chilcott Division, Morris Plains, New Jersey, EUA.
- Amberlite IRA 400 - Laboratório Qeel - São Paulo.
- Todos os demais reagentes empregados foram pró-análise.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

1. Estudo da bile

1.1. Separação em gel de Sephadex dos componentes iodados da bile

Para a verificação do comportamento dos compostos iodados biliares no Sephadex, a bile foi filtrada "in natura". Foi utilizada bile de rato que havia recebido T_4 - ^{125}I por via intraperitoneal.

Obtiveram-se, consistentemente, 4 frações de radioatividade, sendo a distribuição porcentual da radioatividade a seguinte : (Figura 3).

Fração 1	-	9,07%
Fração 2	-	21,09%
Fração 3	-	10,03%
Fração 4	-	59,81%

1.2. Comportamento e identificação, por cromatografia em papel, dos compostos iodados biliares obtidos por filtração em gel de Sephadex.

As diferentes frações, obtidas na gel filtração em Sephadex, foram cromatografadas em 2 sistemas de solventes: sistema (1) - n-B:Ac Ac:H₂O e sistema (2) - col:H₂O(NH₄OH), com exceção da fração 3, que foi cromatografada nos sistemas (1) e (3) - n-B:NH₄OH 2 N.

Em tôdas as cromatografias os padrões não radioativos foram colocados juntamente com os compostos radioativos a serem analisados.

A fração 1 do Sephadex analisada cromatograficamente nos dois sistemas de solventes não pôde ser devidamente caracterizada. No sistema (1) a radioatividade distribuiu-se principalmente em dois picos: um que se localizou na origem e, outro com Rf semelhante, mas não idêntico à T₃ e/ou T₄ livres. No sistema (2), apenas uma pequena zona de radioatividade foi encontrada em correspondência com a T₄, sendo que a maior parte localizou-se em regiões distintas dos padrões utilizados. Uma zona de radioatividade correspondente ao iodeto foi consistentemente encontrada nas análises cromatográficas em ambos os sistemas. Assim, a fração 1 obtida na gel filtração em Sephadex não pareceu ser constituída de T₃ e/ou T₄ livres.

No sistema (2) a radioatividade correspondente ao iodeto foi de tal monta maior que aquela obtida no sistema (1), que permite postular nesta zona, a existência de dois compostos radioativos de Rfs semelhantes. (Figuras 4 e 5).

A fração 2 do Sephadex, em ambos os sistemas, na cromatografia em papel, comportou-se como iodeto livre. As porcentagens relativas de radioatividade foram de 88,18% no sistema (1) e 91,01% no sistema (2). (Figuras 6 e 7).

A análise cromatográfica em papel nos dois sistemas de solventes ($n\text{-B:AcAc:H}_2\text{O}$ e $n\text{-B:NH}_4\text{OH}$) evidenciou que a fração 3 do Sephadex era constituída de T_3 e T_4 . (Figuras 8 e 9).

Quanto à radioatividade eluída na fração 4 do Sephadex, foi verificada que, no sistema (1), 65,86% da radioatividade total localizaram-se na região entre a MIT e DIT. No sistema (2), 88,04% da radioatividade localizaram-se também entre a MIT e DIT, isto é, na região dos glucuronidatos, segundo os trabalhos de Taurog (60). O iodeto livre, também estava presente na proporção de 13,96% e 10,43% do total nos sistemas (1) e (2), respectivamente. (Figuras 10 e 11).

1.3. Gel filtração dos extratos butanólicos biliares

A extração da bile com butanol acidificado foi realizada com dois propósitos:

1. Comparar os resultados obtidos na bile "in natura", como também para verificar a possível existência de proteínas iodadas.
2. Para poder se comparar, nas mesmas condições experimentais,

os resultados obtidos com a gel filtração em Sephadex do conteúdo intestinal.

Em quatro extrações sucessivas o butanol acidificado extraia 93,00% da radioatividade total. A fração da bile extraível pelo butanol, foi filtrada em Sephadex. Verificou-se que o comportamento, durante a eluição, era o mesmo, quando da utilização da bile "in natura", isto é, a eluição de 4 frações de radioatividade.

A porcentagem relativa de radioatividade devida à fração 1 foi ligeiramente menor, cerca de 4,93%, em relação a 9,07% obtida usando-se a bile "in natura". (Figura 12). A presença desta fração foi encontrada em todas as gel filtrações dos extratos butanólicos.

A distribuição da radioatividade nas diversas frações foi a seguinte : (Figura 12)

Fração 1	-	4,93%	(desconhecida)
Fração 2	-	26,71%	(iodeto)
Fração 3	-	15,59%	(T ₃ e/ou T ₄ livres)
Fração 4	-	52,77%	(T ₃ e/ou T ₄ conjugadas)

Visto que a análise em cromatografia em papel, da fração 1 da bile "in natura", mostrava que uma parte da radioatividade permanecia na origem foi postulado que a mesma pudesse ser uma proteína iodada.

A fração 1 do Sephadex da bile "in natura" foi extraída separadamente com butanol, tendo-se verificado que 15,00% permanecia insolú

vel, o que poderia ser devido as proteínas iodadas.

Assim, a fração 1 poderia ser composta de proteínas iodadas e de metabólitos derivados de T_3 e/ou T_4 .

1.4. Gel filtração dos hidrolisados enzimáticos dos compostos iodados biliares.

As frações 1 e 4 do Sephadex foram submetidas à hidrólise enzimática com β -glucuronidase e os hidrolisados refiltrados em Sephadex.

A refiltração em Sephadex da fração 1, após a hidrólise, mostrou a existência de 2 sub-frações principais: uma que permanecia inalterada e era eluída precocemente (sub-fração 1) e outra de menor atividade radioativa, que passava a se comportar como T_3 e/ou T_4 livres (sub-fração 3). Uma pequena sub-fração de iodeto estava presente, provavelmente, devido à desalogenação ocorrida durante o processamento físico-químico. Duvidosamente, pôde-se evidenciar uma pequena sub-fração correspondente a conjugados (Figura 13).

Assim, após a hidrólise e refiltração, a distribuição da radioatividade nas diferentes sub-frações passou a ser a seguinte: (Figura 13).

Sub-fração 1	-	53,95%	(desconhecida)
Sub-fração 2	-	6,40%	(iodeto)
Sub-fração 3	-	32,89%	(T_3 e/ou T_4 livres)
Sub-fração 4	-	6,76%	(T_3 e/ou T_4 conjugadas)

Comparar as Figuras 3 e 13.

A fração 4 da bile "in natura", que havia se comportado na cromatografia em papel com glucuronidato de tironina, quando hidrolisada e refiltrada em Sephadex mostrou que a quase totalidade da radioatividade, passava a se comportar como T_3 e/ou T_4 livres (sub-fração 3). Pequenas zonas de radioatividade inferiores a 10% foram encontradas correspondentes a iodeto e a conjugados de tironinas (Figura 14). Assim, após a hidrólise e refiltração em Sephadex, a distribuição da radioatividade nas diversas sub-frações passou a ser a seguinte: (Figura 14).

Sub-fração 1	-	9,94%	(desconhecida)
Sub-fração 2	-	2,08%	(iodeto)
Sub-fração 3	-	78,79%	(T_3 e/ou T_4 livres)
Sub-fração 4	-	9,19%	(T_3 e/ou T_4 conjugadas)

Comparar as Figuras 3 e 14.

- 1.5. Alteração porcentual das frações biliares frente a uma sobrecarga exógena de T_4 estável.

De acordo com os trabalhos de Taurog (62) a capacidade hepática de converter T_4 em glucurono-conjugado é limitada. Quando grandes doses de T_4 eram injetadas em ratos (420 μ g) a maioria da radioatividade biliar passava a ser excretada durante as primeiras horas, como T_4 livre.

A fim de confirmar estes dados, utilizando-se a presente técnica

ca, 400 μg de T_4 não radioativa, conjuntamente com doses traçadoras do mesmo hormônio marcado com ^{125}I foram administradas a ratos. Verificou-se, confirmando os trabalhos anteriores, que a maior parte da radioatividade excretada, nestas condições, era devida à tironinas iodadas livres (fração 3), sendo que a devida a conjugados estava diminuída em relação aos valores obtidos em ratos "intactos" (Figura 15).

A distribuição da radioatividade nas diferentes frações foi a seguinte : (Figura 15)

Fração 1	-	8,01%	(desconhecida)
Fração 2	-	15,25%	(iodeto)
Fração 3	-	56,31%	(T_3 e/ou T_4 livres)
Fração 4	-	23,43%	(T_3 e/ou T_4 conjugadas).

Comparar as Figuras 3 e 15.

2. Gel filtração dos extratos butanólicos dos conteúdos intestinais

O butanol acidificado extraiu 72% da radioatividade total em 4 extrações sucessivas. Foram analisados os conteúdos intestinais do reto, do duodeno e do íleo.

Em todas as análises da gel filtração em Sephadex, dos extratos butanólicos dos conteúdos das diversas porções intestinais, foram obtidas 4 frações de radioatividade. As porcentagens relativas das diversas frações variaram, dependendo da porção intestinal analisada.

Após a extração butanólica e filtração em Sephadex do material obtido do reto, foi verificado que houve diminuição bastante significativa da radioatividade eluída na fração 4, indicando que os compostos iodados excretados na bile, na forma conjugada, seriam desconjugados durante o trânsito intestinal. Quanto à fração 3, a de hormônios livres, verificou-se que houve incremento de radioatividade, quando comparada com os resultados obtidos na bile.

A distribuição da radioatividade nas diversas frações do Sephadex do conteúdo intestinal do reto, nos animais do grupo 1, foi a seguinte: (Figura 16)

Fração 1	-	16,87%	(desconhecida)
Fração 2	-	18,29%	(iodeto)
Fração 3	-	59,11%	(T ₃ e/ou T ₄ livres)
Fração 4	-	5,73%	(T ₃ e/ou T ₄ conjugadas)

Comparar as Figuras 3 e 16.

Esta distribuição não diferiu significativamente quanto às frações 2, 3 e 4, quando se utilizaram animais do grupo 3. Assim, foram obtidas as seguintes porcentagens: (Figura 17)

Fração 1	-	6,65%	(desconhecida)
Fração 2	-	24,19%	(iodeto)
Fração 3	-	62,02%	(T ₃ e /ou T ₄ livres)
Fração 4	-	7,14%	(T ₃ e /ou T ₄ conjugadas).

Para a determinação do local de desconjugação foram analisados os conteúdos intestinais do duodeno e do íleo. De acordo com a técnica descrita em "Materiais e Métodos", os conteúdos intestinais obtidos separadamente, após extração com butanol, foram analisados por gel filtração em Sephadex. Assim, no duodeno a fração 3 (T_3 e/ou T_4 livres), que correspondia a 22,59% da radioatividade total, no íleo, constituía-se de 64,66%, demonstrando uma desconjugação hormonal. Inversamente, a fração 4 (correspondente às tironinas iodadas conjugadas), que no duodeno correspondia a 35,68%, no íleo apresentava-se em uma proporção de 5,26%.

Comparar as Figuras 18 e 19.

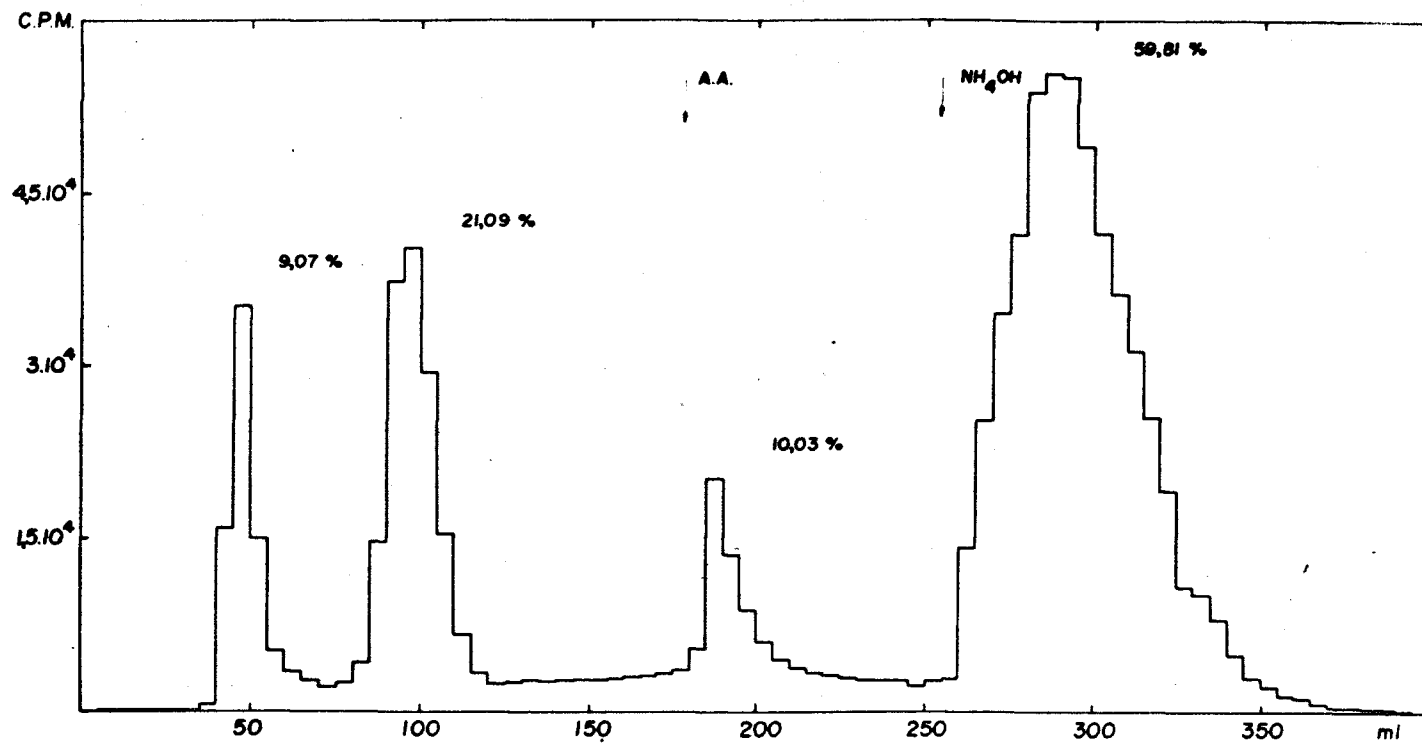


FIGURA 3. Gel filtração em Sephadex da bile (T_4 - ^{125}I). 10 ml de bile (T_4 - ^{125}I) "in natura" eluidas com 140 ml de tampão de TRIS-HCl, 100 ml de AA e 100 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 4,5 ml. A radioatividade de cada fração foi determinada em contador automático de "poço" dotado de cristal de cintilação de NaI (Tl).

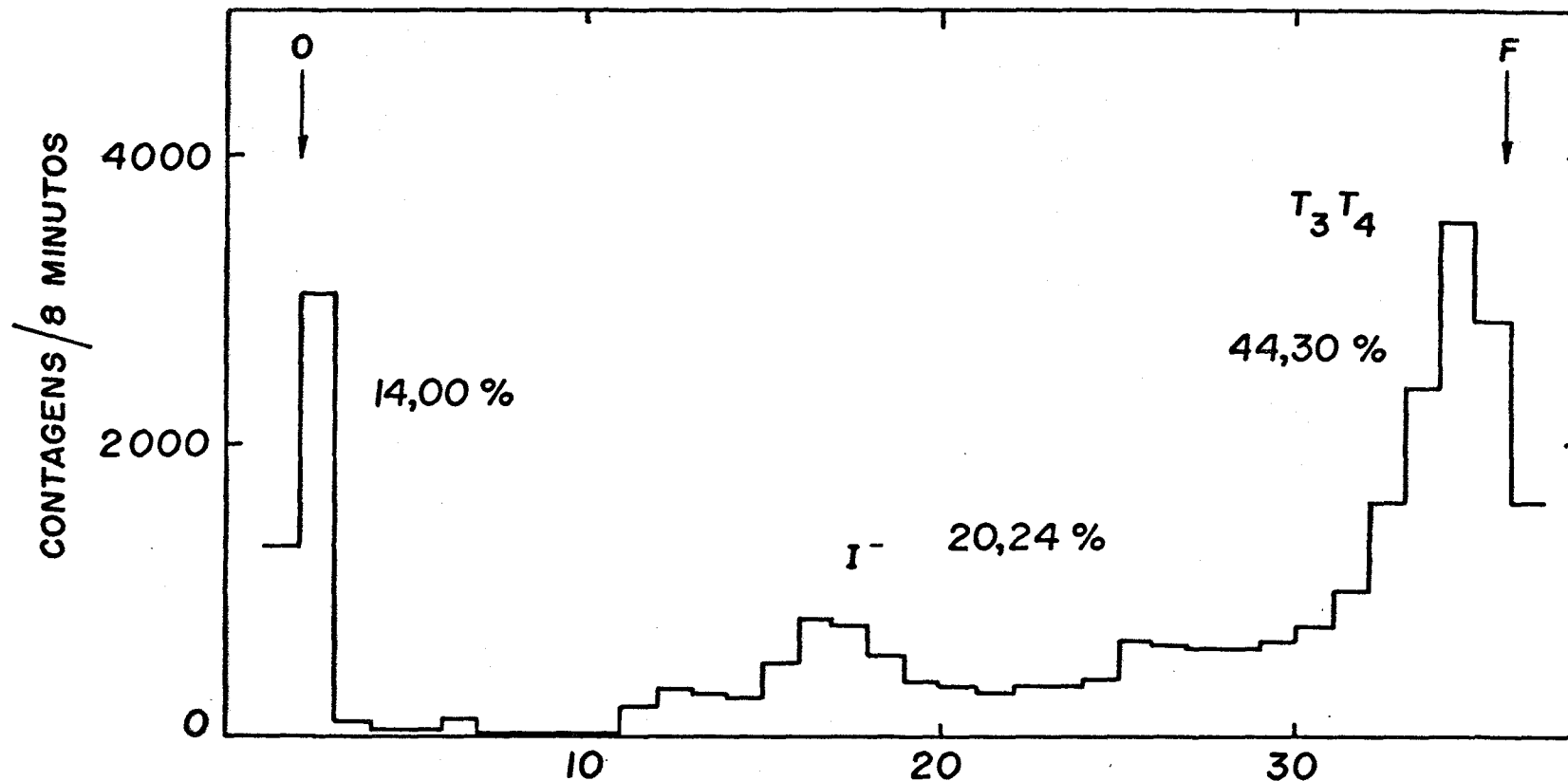


FIGURA 4. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em n-B:AcAc:H₂O do pico 1 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol;amônia e 30 µl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T₃ e T₄) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente: n-B:AcAc:H₂O. Tempo de desenvolvimento:15 horas. O: origem, F:fron te.

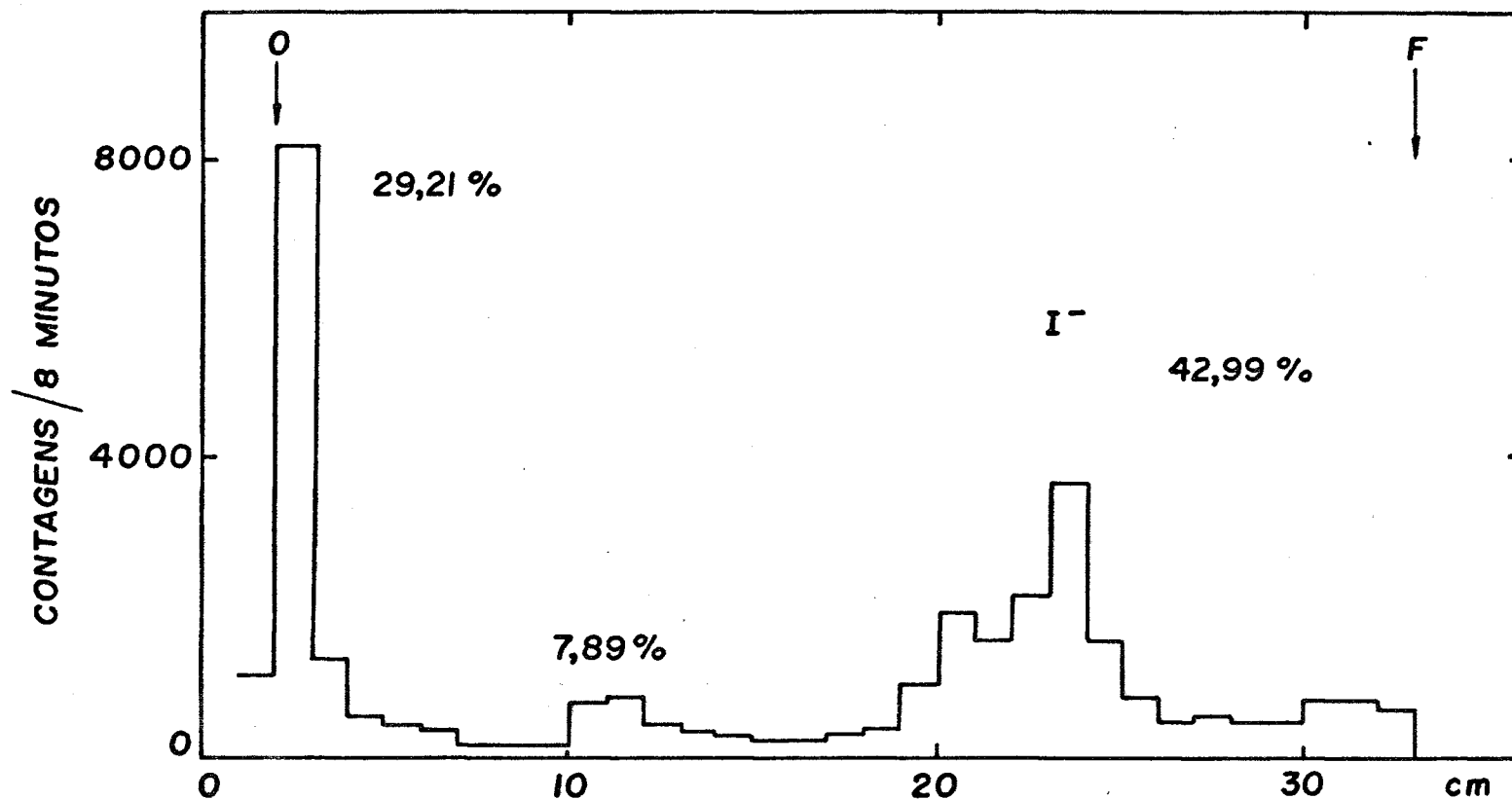


FIGURA 5. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em col:H₂O (NH₄OH) do pico 1 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol:amônia e 30 µl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T₃ e T₄) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman n^o 3. Sistema de solvente: col: H₂O(NH₄OH). Tempo de desenvolvimento: 20 horas. O: origem, F: frente.

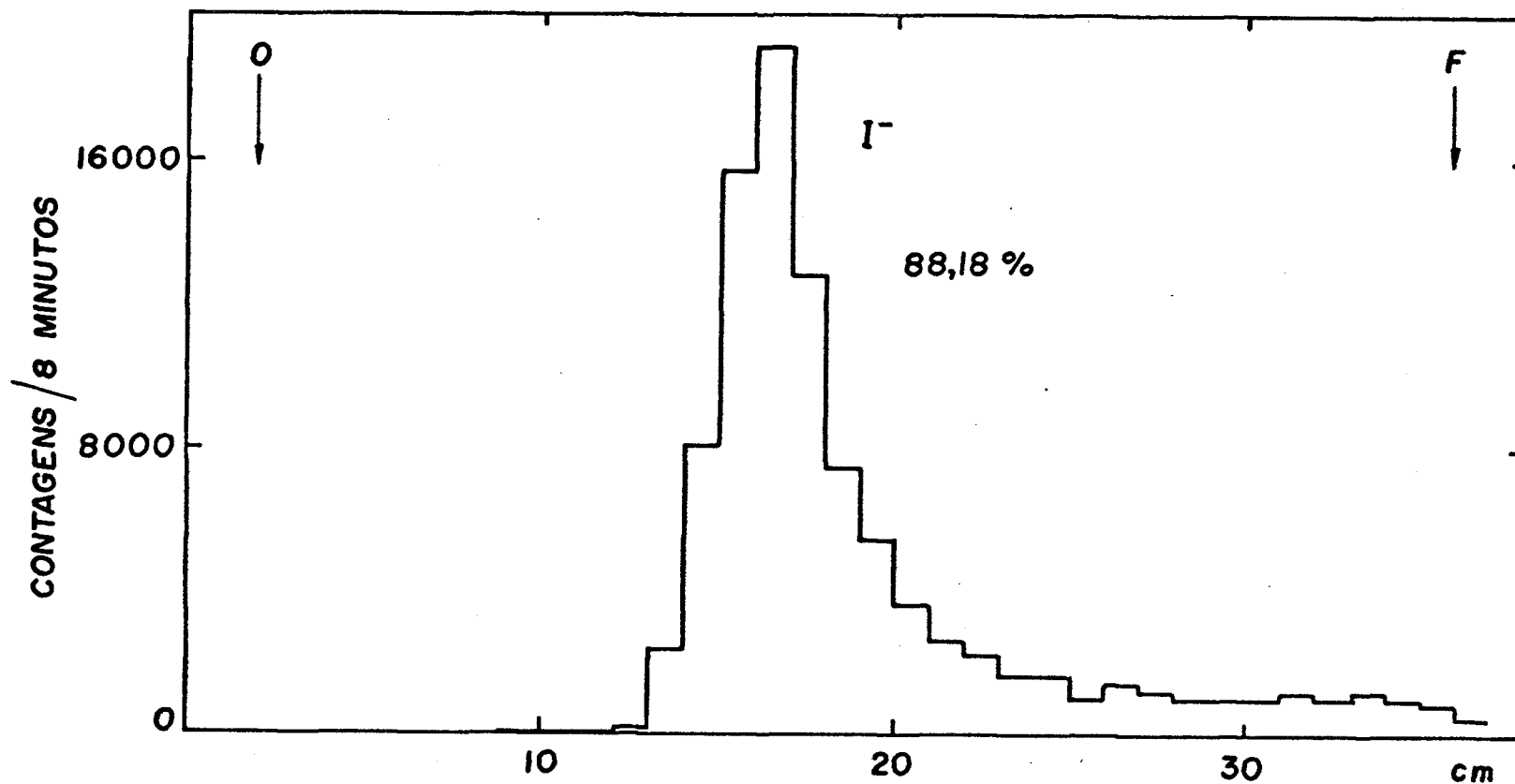


FIGURA 6. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em $n\text{-B:AcAc:H}_2\text{O}$ do pico 2 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol:amônia e 30 μl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente: $n\text{-B:AcAc:H}_2\text{O}$. Tempo de desenvolvimento: 15 horas, O: origem, F: frente.

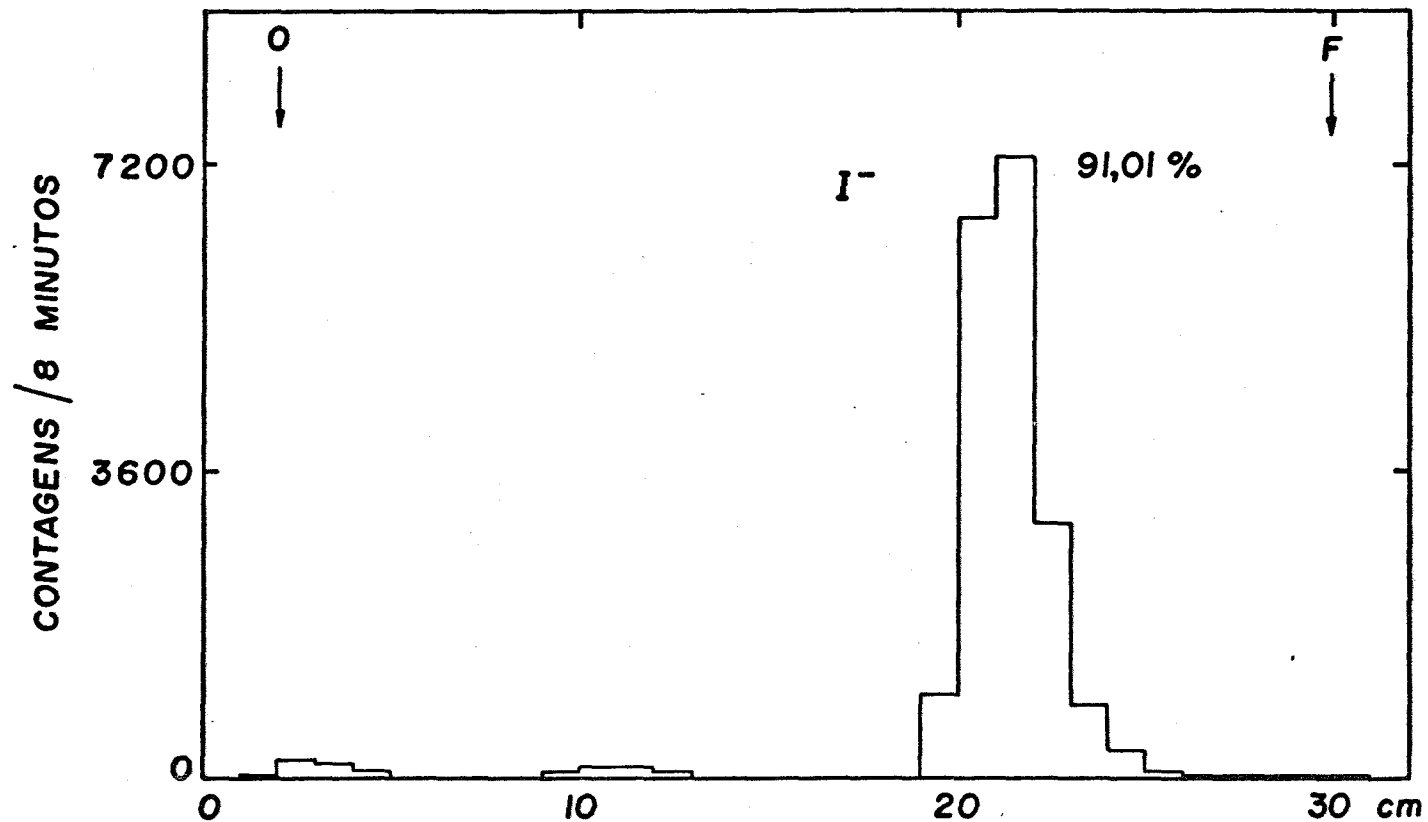


FIGURA 7. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em col:H₂O (NH₄OH) do pico 2 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol:amônia e 30 µl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T₃ e T₄) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente: col:H₂O (NH₄OH). Tempo de desenvolvimento: 20 horas. O:origem, F: frente.

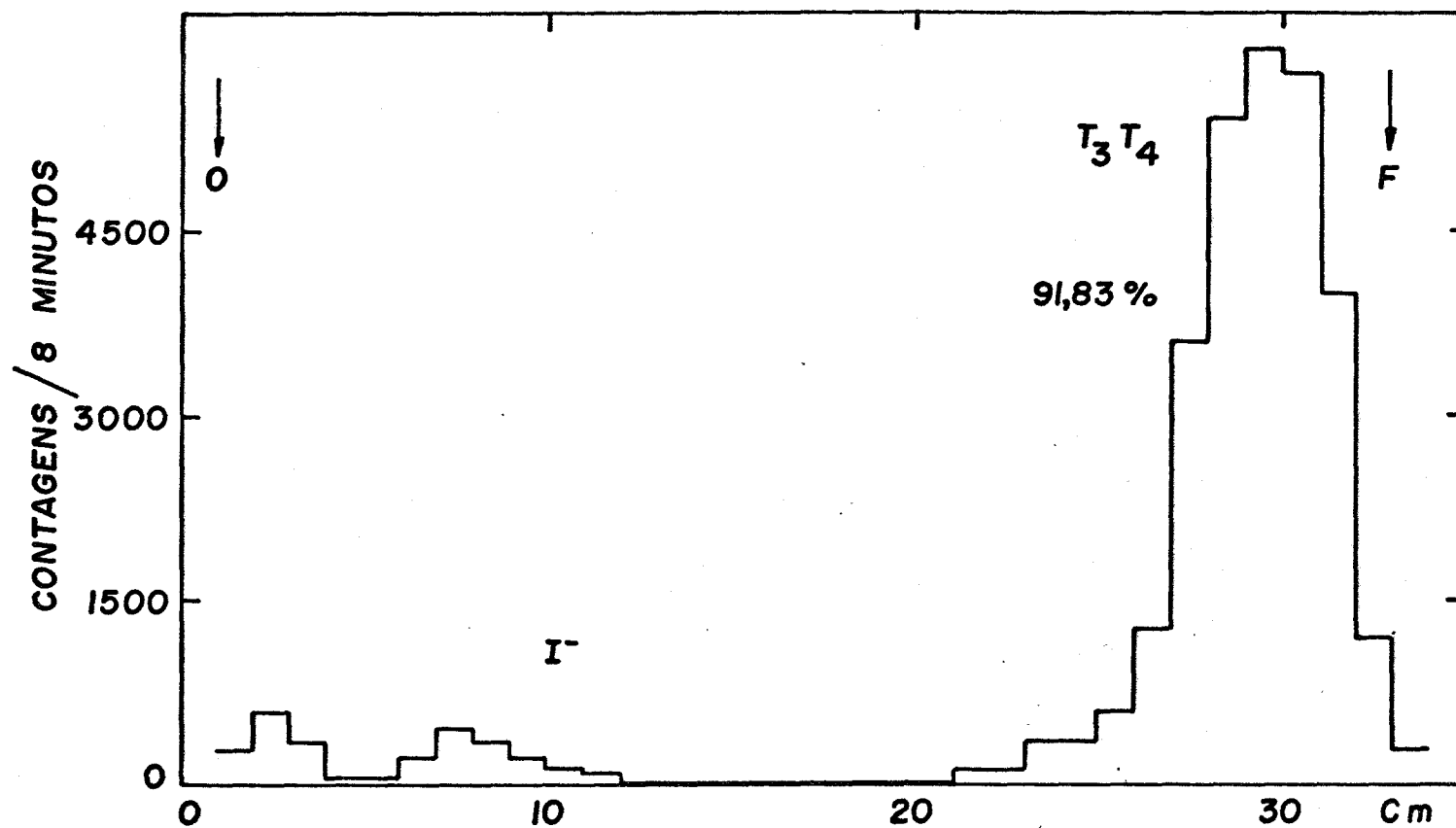


FIGURA 8. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em n-B:AcAc:H₂O do pico 3 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol:amônia e 30 μ l foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T₃ e T₄) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente: n-B:AcAc:H₂O. Tempo de desenvolvimento: 15 horas. O: origem, F: frente.

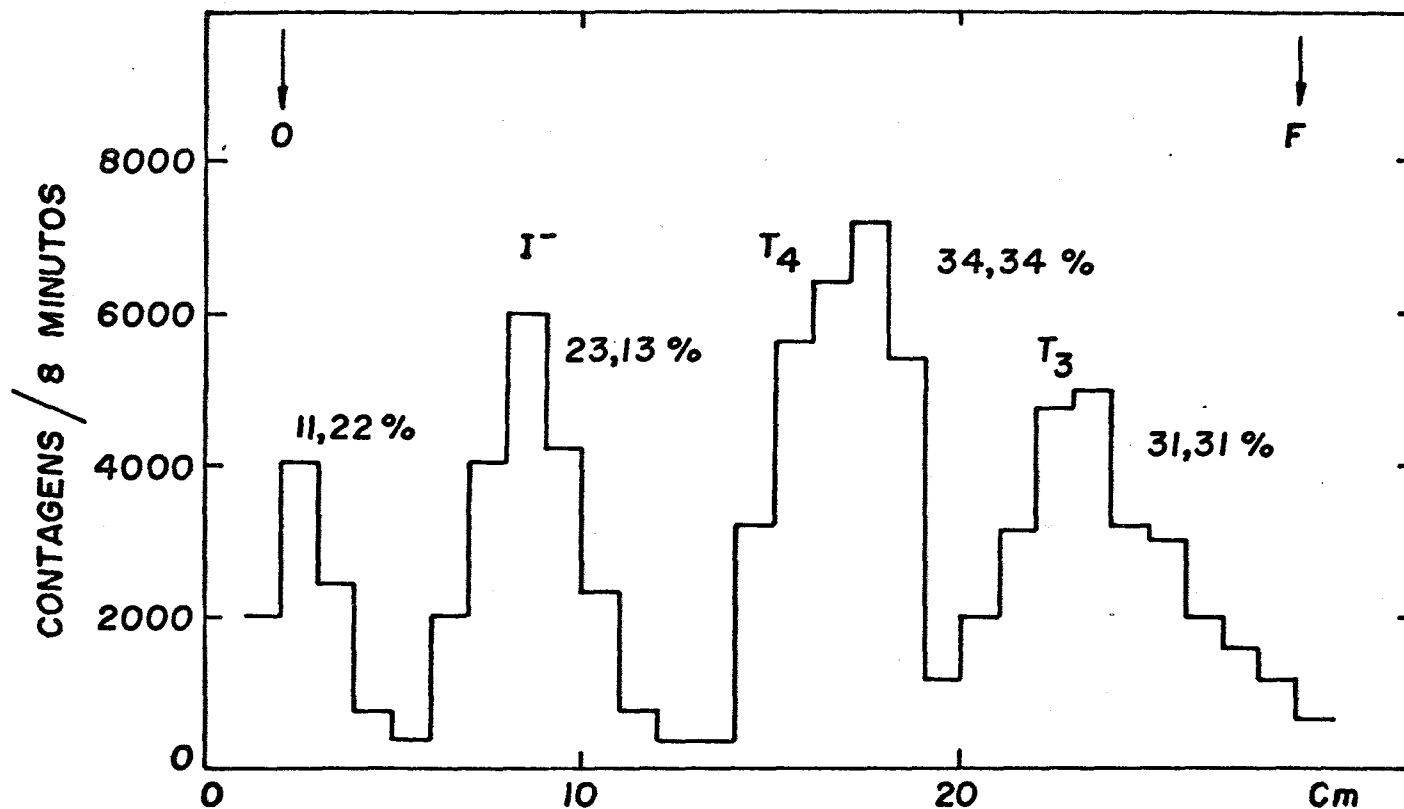


FIGURA 9. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em n-B:Am do pico 3 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol:amônia e 30 μ l foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente n-B:Am. Tempo de desenvolvimento: 20 horas. O: origem, F: frente.

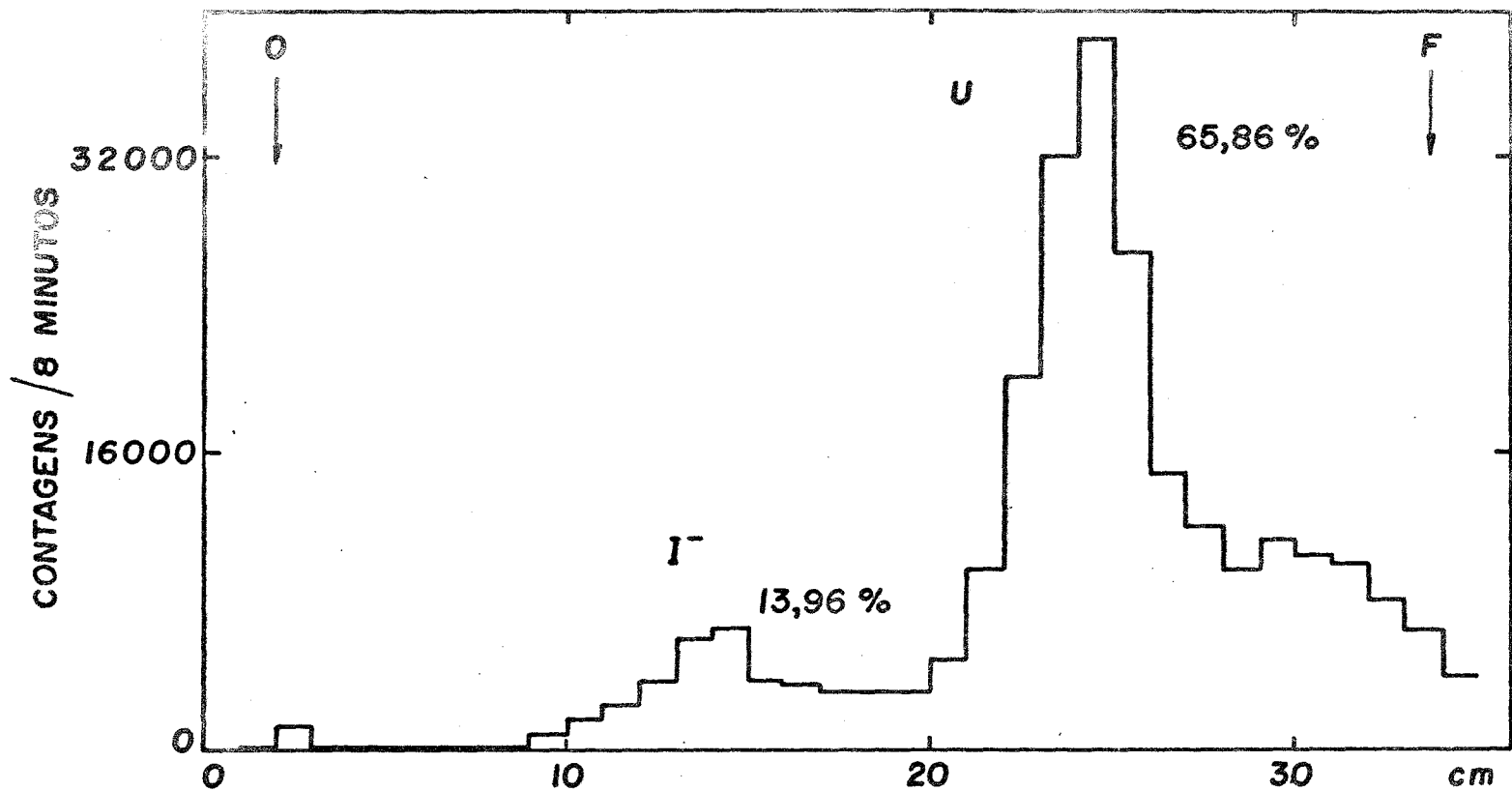


FIGURA 10. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em n-B:AcAc:H₂O do pico 4 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol:amônia e 30 μ l foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T₃ e T₄) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente: n-B:AcAc:H₂O. Tempo de desenvolvimento: 15 horas. O:origem, F: frente.

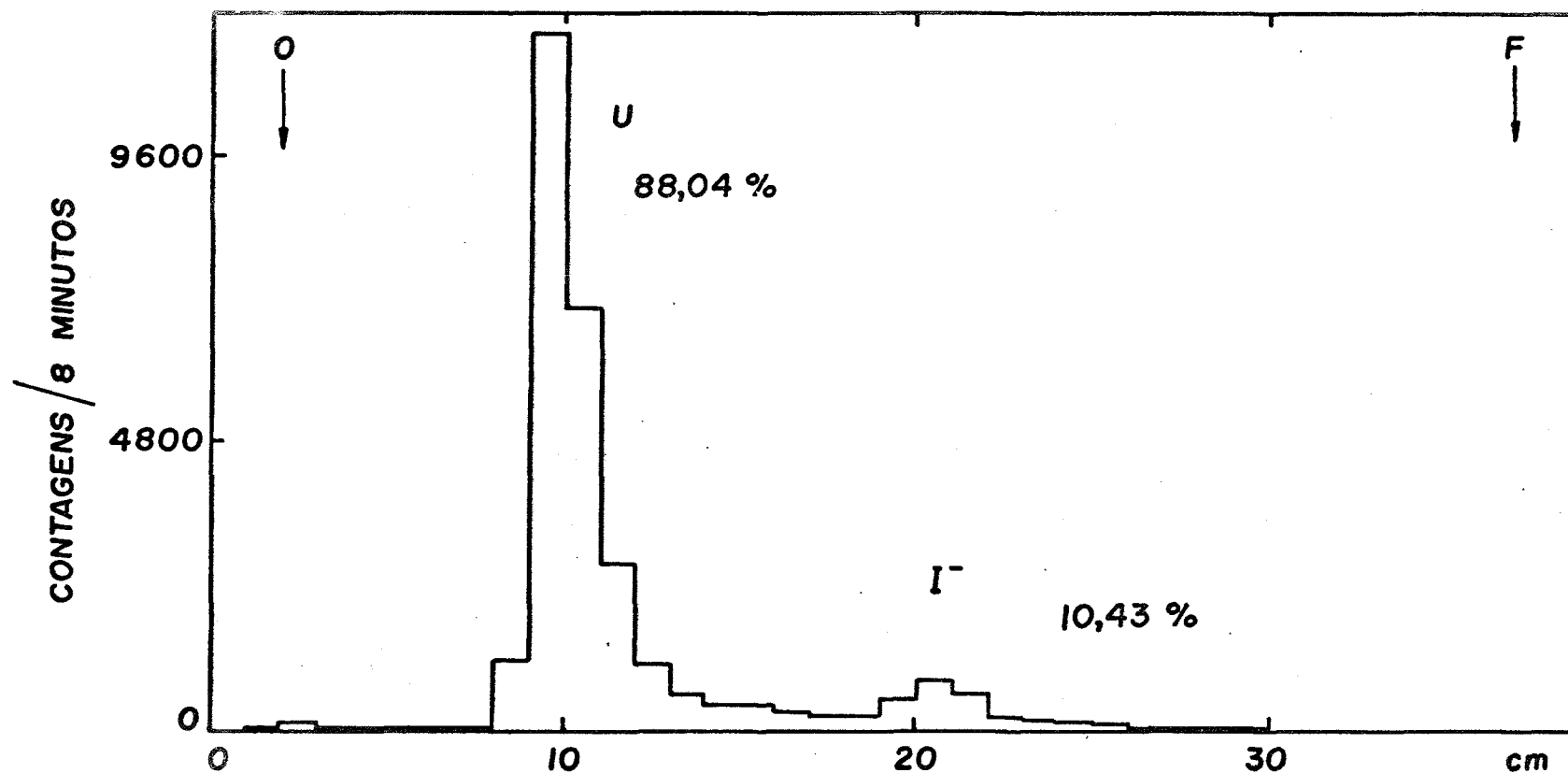


FIGURA 11. Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em col:H₂O (NH₄OH) do pico 4 correspondente à Figura 3. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi eluído com 0,2 ml de metanol:amônia e 30 µl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T₃ e T₄) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente : col:H₂O (NH₄OH). Tempo de desenvolvimento : 20 horas. O:origem, F: frente.

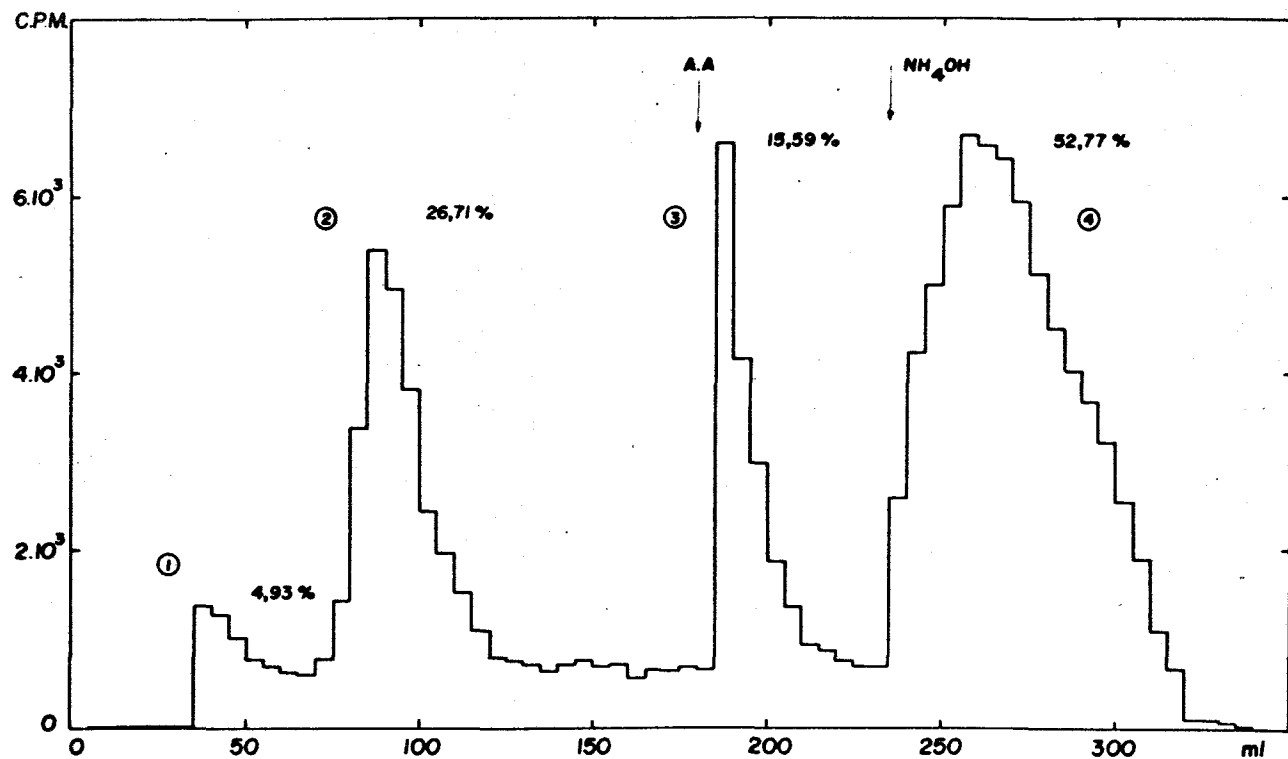


FIGURA 12. Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) da bile (T_4 - ^{125}I). 4ml de bile foram extraídas com butanol (pH 1,0) de acordo com a técnica descrita em "Materiais e Métodos". O extrato sêco foi dissolvido em água e ajustado o pH a 7,4 com H_2SO_4 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 140 ml de TRIS-HCl, 100 ml de AA e 100 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Volume de cada fração : 4,5 ml.

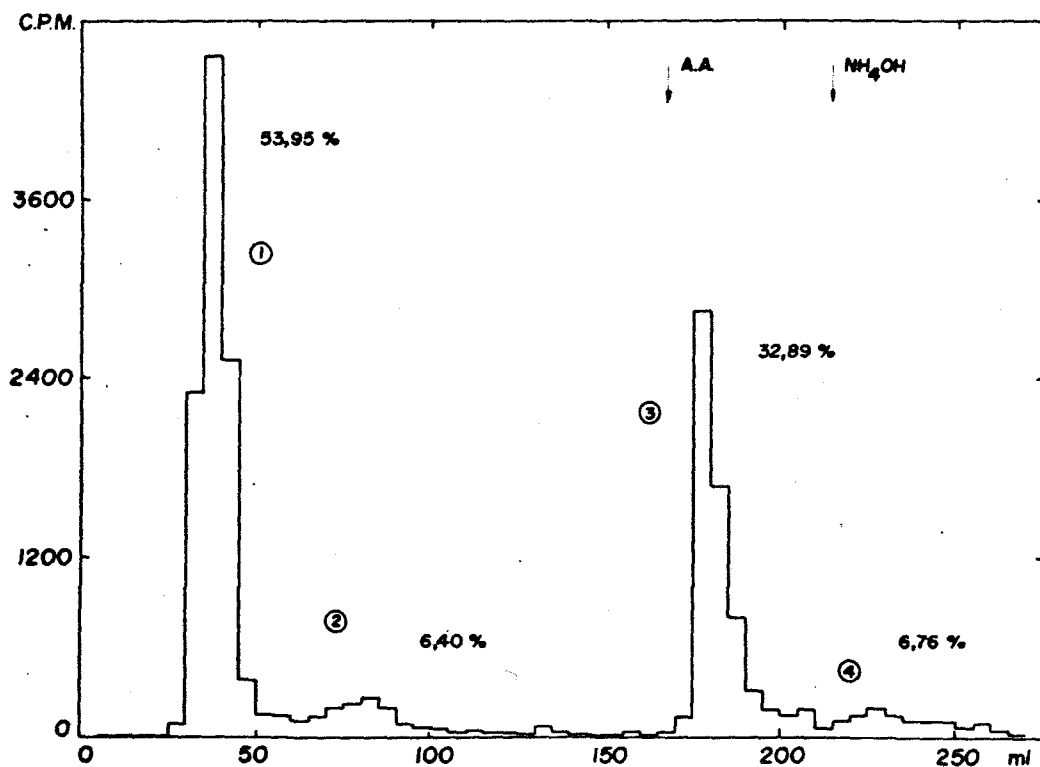


FIGURA 13. Gel filtração em Sephadex do hidrolisado enzimático da fração 1 correspondente à Figura 3. Em uma alíquota de 5 ml da fração 1 foram adicionadas 5000 unidades de β -glucuronidase, o pH ajustado a 4,5 com ácido acético 10% e tamponado com acetato de pH 4,5 e colocada a 37°C durante 15 horas. O pH elevado a 7,4 com NaOH 10%. O hidrolisado foi refiltrado em Sephadex com 140 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA e 80 ml de NH_4OH 2 N, em coluna de 2,5 x 20 cm, com velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5 ml.

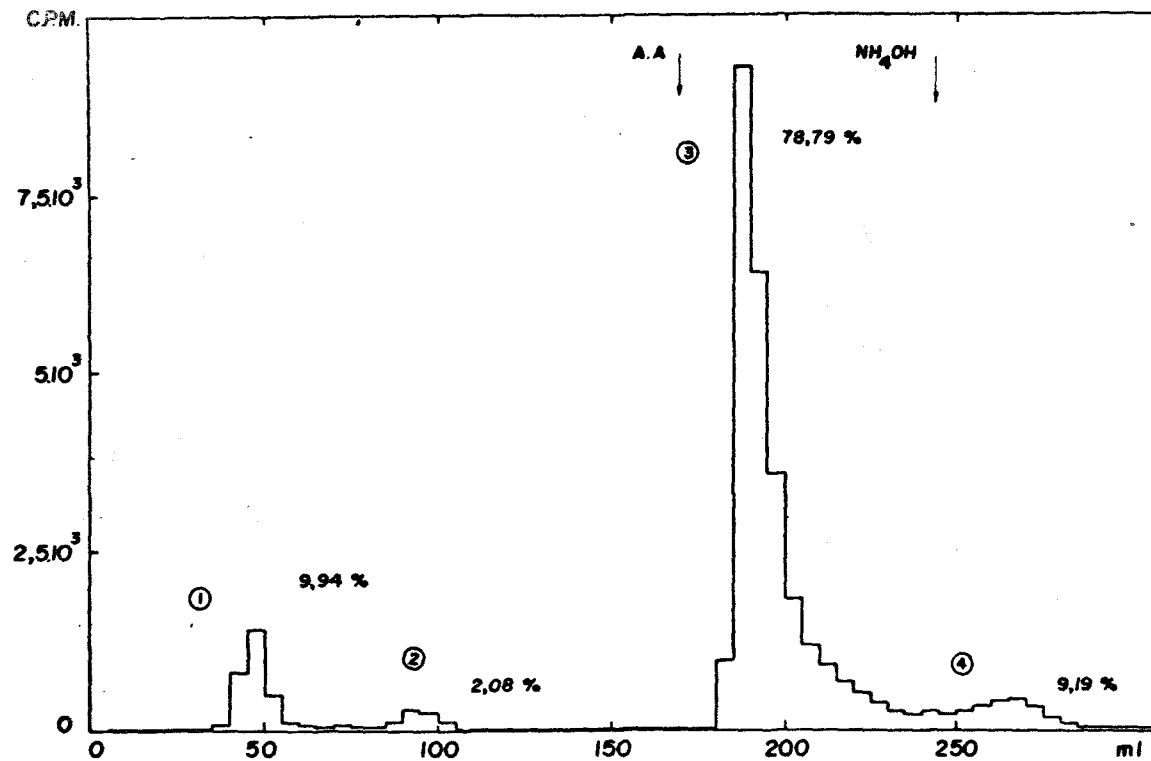


FIGURA 14. Gel filtração em Sephadex do hidrolisado enzimático da fração 4 correspondente à Figura 3. Em uma alíquota de 5 ml da fração 4, após evaporação do NH_4OH , foram adicionadas 5000 unidades de β -glucuronidase, o pH acertado a 4,5 com ácido acético 10% e tamponado com acetato de pH 4,5 e colocada a 37°C durante 15 horas. O pH foi elevado a 7,4 com NaOH 10%. O hidrolisado foi refiltrado em Sephadex com 140 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA a 80 ml de NH_4OH 2 N, em coluna de 2,5 x 20 cm, com velocidade de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

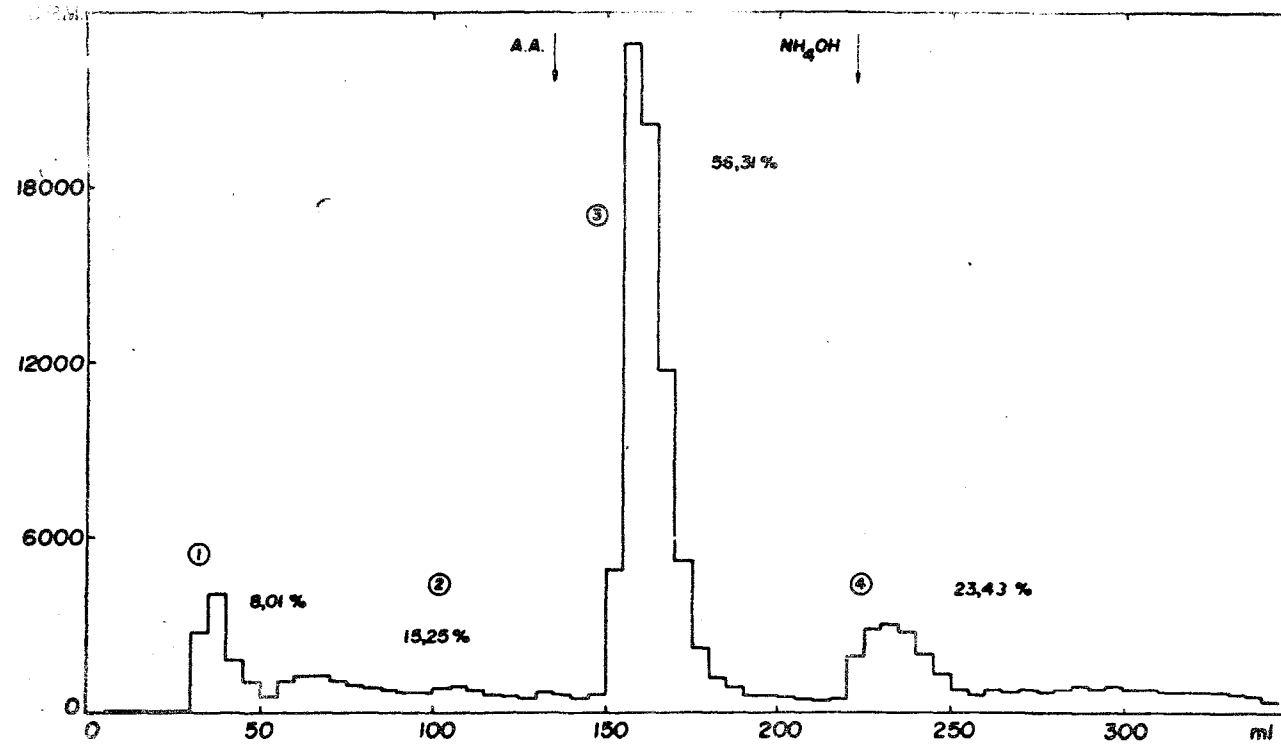


FIGURA 15. Gel filtração em Sephadex da bile com $T_4-^{125}I$ de baixa atividade específica. 4ml de bile "in natura" obtida como foi descrita em "Materiais e Métodos" foram filtradas em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 60 ml de AA e 140 ml de NH_4OH 2 N, em coluna de 2,5 x 20 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

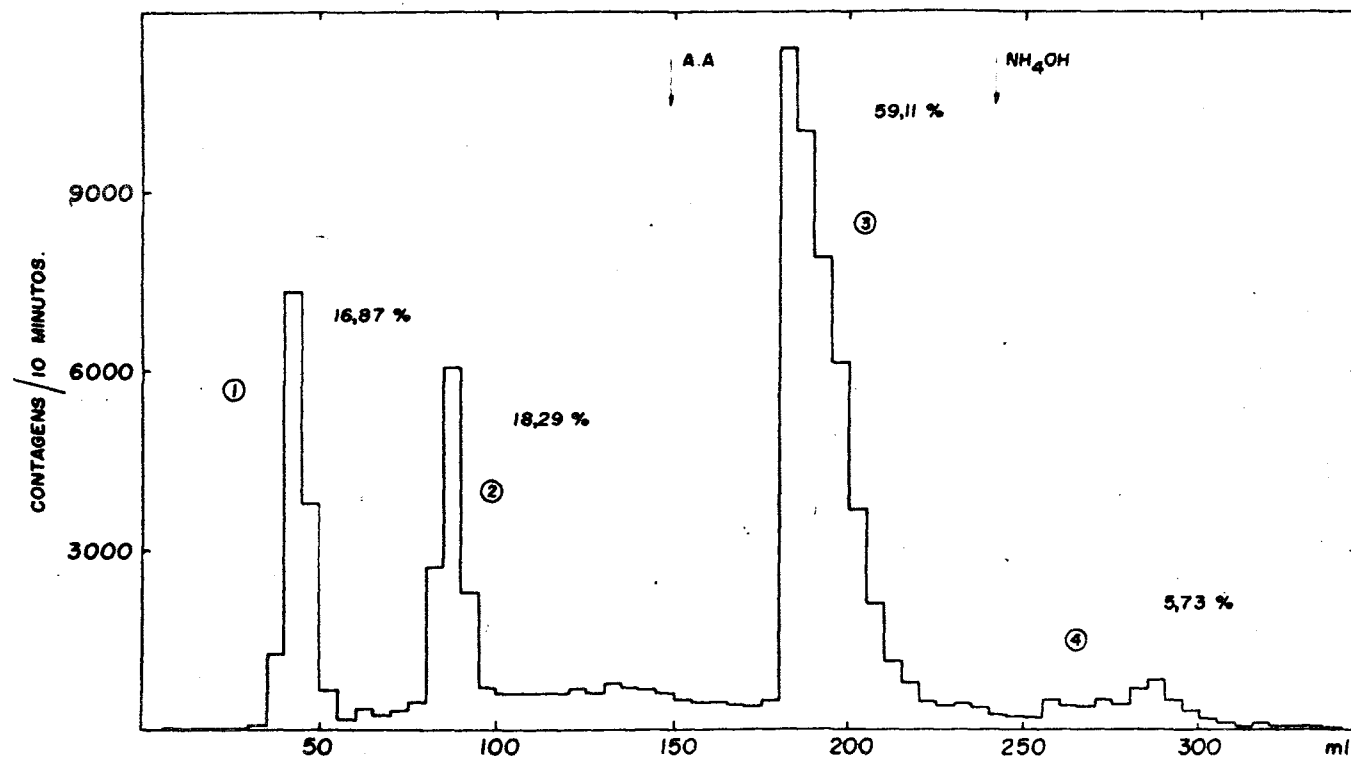


FIGURA 16. Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) do conteúdo intestinal do reto. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi dissolvido em água e acertado o pH a 7,4 com H_2SO_4 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA e 100 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

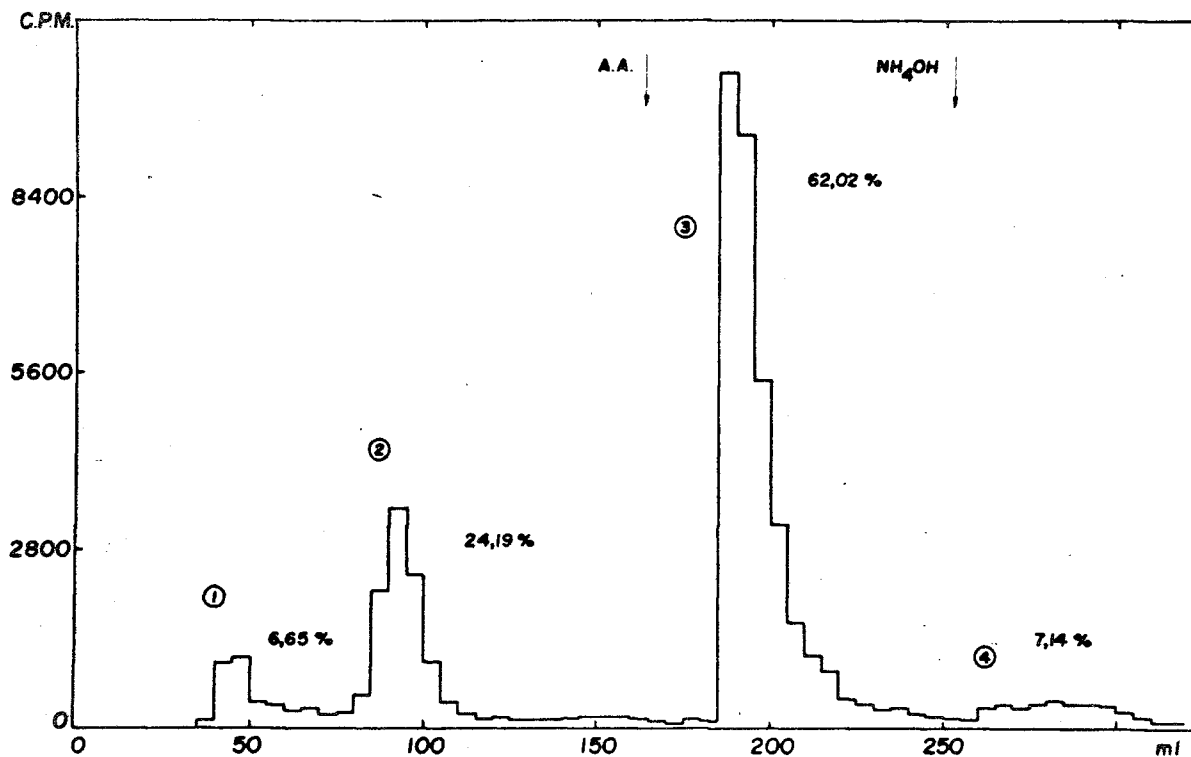


FIGURA 17. Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) do conteúdo intestinal do reto (rato do grupo 3). O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi dissolvido em água e acertado o pH a 7,4 com H₂SO₄ 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA e 100 ml de NH₄OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

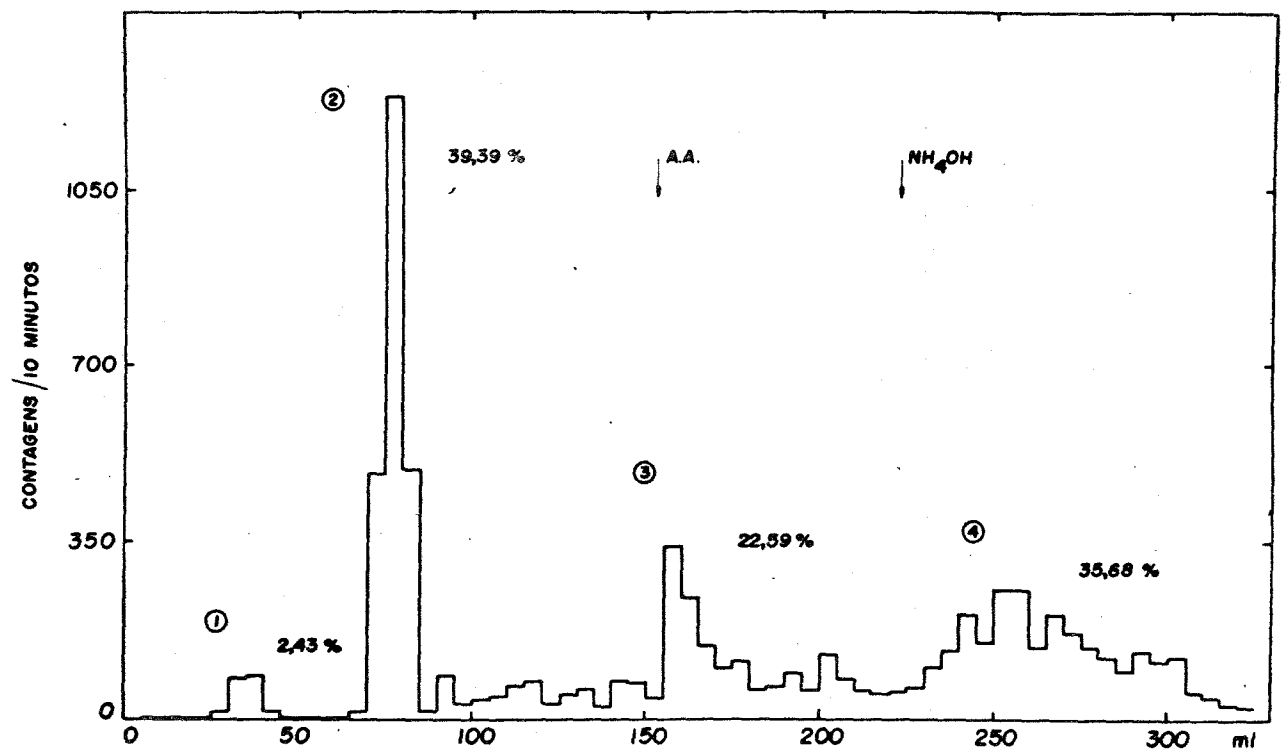


FIGURA 18. Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) do conteúdo intestinal do duode no. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi dissolvido em água e acertado o pH a 7,4 com H₂SO₄ 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 70 ml de AA e 100 ml de NH₄OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

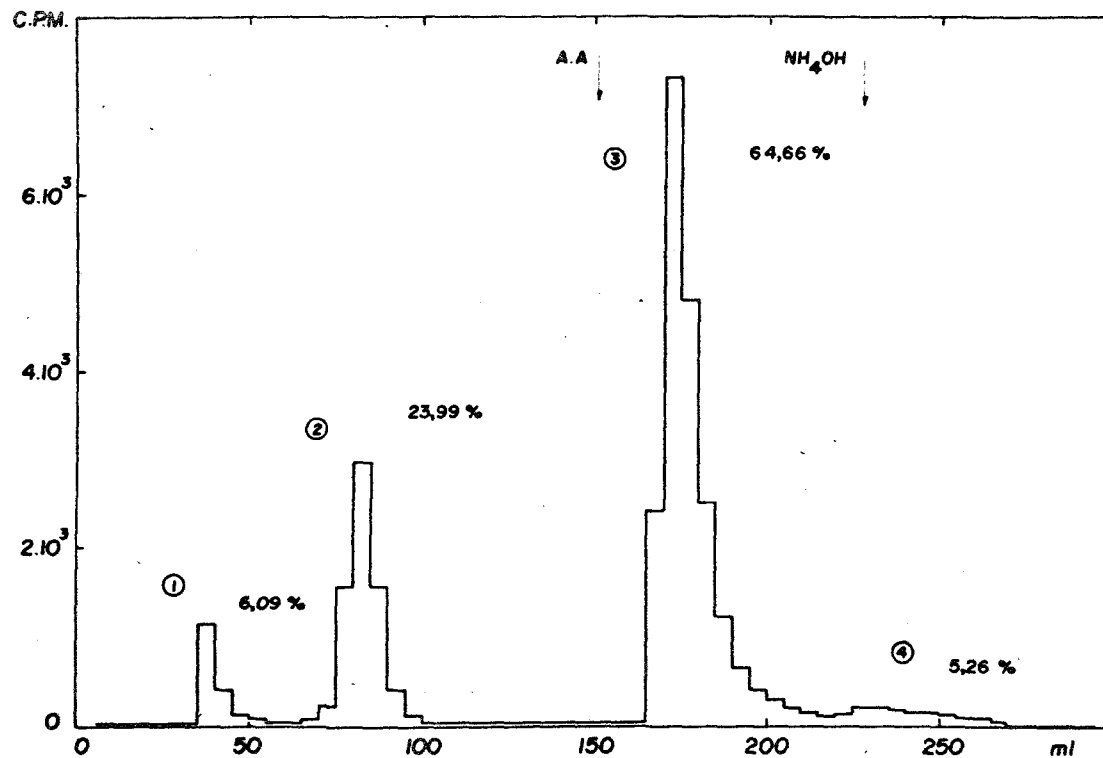


FIGURA 19. Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) do conteúdo intestinal do íleo. O extrato sêco preparado como foi descrito em "Materiais e Métodos" foi dissolvido em água e acertado o pH a 7,4 com H₂SO₄ 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 60 ml de AA e 70 ml de NH₄OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

1. Quanto à metodologia

A gel filtração em Sephadex, juntamente com a técnica dos traçadores isotópicos, apresenta as seguintes vantagens, na separação dos compostos iodados:

a) A separação dos compostos é realizada em uma só etapa com diferentes eluentes (TRIS-HCl, AA e NH_4OH), sendo que o tempo de separação de todos os componentes é de, aproximadamente, 5 horas.

b) O gel de Sephadex, isto é, a fase estacionária da coluna, é relativamente estável em meio alcalino e em meio fracamente ácido. A coluna de gel pode ser reutilizada após sua lavagem com água e tampão. Isto torna o custo operacional relativamente baixo apesar do alto custo do material empregado.

c) Até 10 ml do material a ser analisado podem ser colocados na coluna, para a separação das diversas frações, quantidade esta que é difícil de ser analisada por métodos de cromatografia em papel. Esta vantagem é importante sob dois aspectos: 1. quando a atividade radioativa presente no material fôr baixa ; 2. para a posterior análise das frações coletadas quando se deseja dosar o material por métodos químicos.

O volume máximo, em média, de material a ser separado por cromatografia em papel é de 250 μ l, que em geral é proveniente de 1 a 2 ml de sôro. As diversas etapas utilizadas na cromatografia em papel, como seja, da extração do sôro por solventes, purificação, secagem e deposição na fita de papel do extrato obtido, tornam êste método bastante moroso e complicado em relação a gel filtração em Sephadex.

Nas separações por resina citadas na "Histórico" (pg.16) a quantidade de material que pode ser percolada é comparável com a do método da gel filtração em Sephadex. Entretanto a separação das diversas frações é menos nítida e o número de eluentes utilizados em diferentes pHs é bastante grande.

d) Sob o ponto de vista preparativo, a gel filtração em Sephadex permite separar os compostos iodados num alto grau de pureza. As frações obtidas podem ser utilizadas diretamente, ou após concentração, para outras dosagens químicas. As substâncias separadas, por cromatografia em papel, também podem ser utilizadas com o mesmo propósito, mas os processos de extração do papel são bastante trabalhosos e para a recuperação total da substância existente no papel, várias extrações -

são necessárias, além da utilização de diversos eluentes.

2. Quanto à decomposição do material na coluna de Sephadex

Hocman (29) verificou que 3 a 10% da radioatividade da T_4 colocada na coluna de Sephadex apresentava-se sob a forma de iodeto. De acordo com o autor, pelo menos uma pequena porção da T_4 radioativa ficava, ir reversivelmente, retida no gel de Sephadex. A quantidade não eluível era constante e não interferia de maneira ponderável na análise final. Esta quantidade de T_4 retida pela coluna era facilmente eliminada pela percolação com albumina antes de sua reutilização.

O achado constante da fração 4 (T_3 e/ou T_4 conjugadas), em todas as análises realizadas, levou a testar subsequentemente se a referida fração seria uma parte da T_3 e/ou T_4 livres retida pelo gel, eluível somente com NH_4OH 2 N. Pelos resultados obtidos na análise cromatográfica em papel e hidrólise com β -glucuronidase, a fração 4 mostrou não ser constituída de T_3 e/ou T_4 livres. Além do que a fração retida no gel (fração 4) era sensivelmente maior que aquela que ocorreu nas experiências de Hocman (29).

Apesar dos problemas de decomposição e retenção da T_4 no gel de Sephadex, o mesmo ainda apresenta vantagens maiores em relação aos métodos anteriormente citados. O problema da desiodação da T_4 ocorre também na cromatografia em papel, como foi demonstrado por Taurog (61).

3. Composição da bile

Das 4 frações obtidas pela gel filtração em Sephadex somente a fração 1 não foi identificada.

Uma pequena parte (15%) da fração 1, quando se utilizou a bile "in natura" não era extraível pelo butanol. Por outro lado, a cromatografia em papel da fração 1, nos dois sistemas de solventes, evidenciou a permanência constante de uma zona de radioatividade na origem do cromatograma, o que levou a postular uma possível contribuição protéica para esta fração não extraível pelo butanol.

Wynn e col. (64) analisando cromatograficamente as frações, solúvel e insolúvel da bile, em butanol, evidenciaram a presença de radioatividade ligada às proteínas, somente na fração insolúvel da bile. Pela cromatografia em papel em 3 sistemas de solventes utilizados, a radioatividade permanecia consistentemente na origem do cromatograma, comportando-se como uma proteína.

A possibilidade da fração 1 ser constituída em parte por derivados glucurônicos foi também estudada. Foi verificado que, pelo menos 30% da referida fração, quando tratada com β -glucuronidase passavam a ser eluídos em Sephadex na região da T_3 e/ou T_4 livres. Isto poderia significar que parte da fração 1 seria constituída de glucuronidatos. Na cromatografia em papel da fração 1, entretanto, não foram encontradas zonas de radioatividade correspondentes à região dos glucuronidatos. É possível que a β -glucuronidase, por nós utilizada, apesar das especificações de laboratório, não seja uma enzima pura, isto é, ela poderia conter outros fatores responsáveis pelas modificações ocorridas no comportamento da fração 1.

4. Alteração porcentual das frações biliares frente a uma sobrecarga exógena de T_4 estável.

Foi verificado que a administração em ratos de 400 μg de T_4 estável juntamente com a T_4 radioativa diminuía a porcentagem de conjugados de T_4 eliminados pela bile, confirmando o trabalho anterior (60).

A possível causa da diminuição da conjugação seria a saturação de um sistema glucuronil-transferase específico para a T_4 existente em quantidade limitada nas células hepáticas.

5. Gel filtração em Sephadex do conteúdo intestinal do reto

As experiências mostraram que 4 extrações sucessivas do conteúdo fecal do reto, com butanol acidificado, extraía 72% da radioatividade total. Este valor é inferior aos encontrados por Taurog (76%) (60) e Furth e col. (80%) (22), mas superior aos de Heninger (30 a 60%) (27).

Pela análise, do extrato butanólico do conteúdo intestinal do reto, verificou-se que a fração 4, hidrolisável pela β -glucuronidase, apresentou pequena magnitude, quando comparada com a quantidade excretada na bile. A fração 3 (T_3 e/ou T_4 livres), nas fezes, apresentava-se em maior proporção, possivelmente, devido à ação da β -glucuronidase bacteriana intestinal, conduzindo à liberação de T_3 e/ou T_4 livres.

6. Coleta do material diretamente do intestino delgado

Uma tentativa para a verificação do local de desconjugação do glucuronidato de tironina foi realizada. Pela análise do material duodenal foi verificado que a T_3 e/ou T_4 estava em maior proporção sob a forma conjugada, enquanto que no íleo, a T_3 e/ou T_4 estava quase que totalmente sob a forma livre. A desconjugação das tironinas ocorreu, portanto, durante a passagem do quimo pelo intestino delgado.

Para explicar esta desconjugação no delgado, deve-se postular uma invasão bacteriana nesta parte do intestino, responsável pela produção de β -glucuronidase. Alternativamente e, remotamente, poder-se-ia aventar uma ação do suco entérico do rato, levando à hidrólise deste derivado da T_4 .

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

1. A gel filtração em Sephadex G 25 M apresenta vantagens sobre os outros métodos de separação utilizados anteriormente, em relação à separação dos compostos iodados da bile.
2. Em tôdas as separações dos compostos iodados da bile, em gel de Sephadex, foram obtidas quatro frações de radioatividade, sendo que as mesmas estavam bem separadas.
3. Quanto à composição da bile, em relação aos compostos iodados, após a administração de T_4 - ^{125}I , foram obtidos os seguintes metabólitos:
 - a) T_3 e/ou T_4 livres
 - b) T_3 e/ou T_4 conjugadas com ácido glucurônico (maior fração)
 - c) iodeto

d) uma fração de radioatividade eluída precocemente na gel filtração em Sephadex (fração 1), que não foi identificada. Pelo menos uma parte desta fração não era uma proteína iodada e permanecia na origem do cromatograma, em ambos os sistemas de solventes utilizados.

4. Quanto à composição do conteúdo intestinal em relação aos compostos iodados. As mesmas frações foram encontradas, porém, em proporções relativas diferentes em relação as da bile. Na bile a maior fração era encontrada sob a forma de conjugados. Nas fezes a proporção maior estava na fração correspondente a T_3 e/ou T_4 livres, indicando um processo de desconjugação dos compostos iodados biliares durante a passagem pelo trato intestinal.

5. Foi verificado que a desconjugação do glucuronidato hormonal ocorre principalmente no intestino delgado.

SUMÁRIO

É apresentado um método para a separação dos compostos iodados marcados com ^{125}I em gel filtração em Sephadex G 25 M. Foram utilizados bile e fezes de ratos após administração de T_4 - ^{125}I . Bile "in natura", extratos butanólicos da bile, conteúdo intestinal do duodeno, íleo e reto foram submetidos à gel filtração e as frações resultantes identificadas por cromatografia em papel em vários sistemas de solventes. Por esta metodologia foram separadas a T_3 e/ou T_4 livres, iodeto, glucuronidatos de tironina e uma fração por nós não identificada. Pela análise, do material existente nas diversas porções intestinais, foi verificado que a desconjugação do glucuronidato de tironina ocorre, principalmente, ao nível do delgado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. Albert, A., and Keating, F.R.Jr.,
Endocrinology, 51, 427 (1952).
2. Albert, A., Tenney, A., and Lorenz, N.,
Endocrinology, 50, 374 (1952).
3. Asimoff, G., and Estrin, E.,
Z. Ges. Exper. Med., 76, 399 (1931) - Apud. Brookhaven Symp. Biol.,
7, 111 (1955).
4. Barnes, B.O., and Chang, T.H.,
Am. J.Physiol., 105 , 3 (1933)
5. Blanquet, P., Meyniel, G., Mounier, J., and Tobias, C.A.,
Bull, Soc. Chim. Biol., 39 , 419 (1957).
6. Blanquet, P., Meyniel, G., and Savoie, J.C.,
Compt. Rend., 250, 217 (1960).

* De acôrdo com as normas do Journal Biological Chemistry.

7. Blasi, F., and de Masi, R.V.,
J. Chromatog., 28, 33 (1967).
8. Block, R.J.,
Biochem. J., 81, 37P (1961).
9. Blomsted, B., and Neujahr, H.Y.,
Acta Endocrinol., 47, 343 (1964).
10. Briggs, F.N., Taurog, A., and Chaikoff, I.L.,
Endocrinology, 52, 669 (1953).
11. Chung, S.J., and Van Middlesworth, L.,
Endocrinology, 74, 694 (1964).
12. Chung, S.J., and Van Middlesworth, L.,
Am. J. Physiol., 212, 97 (1967).
13. Clark, F., Goldstein, G., and Crispell, K.R.,
J. Nucl. Med., 7, 464 (1966).
14. Clayton, J.C., Free, A.A., Page, J.E., Somers, G.F., and Woollett,
E.A.,
Biochem. J., 46, 598 (1950).
15. Cottle, W.H.
Am. J. Physiol., 207, 1063 (1964).

16. Cottle, W.H., and Varess, A.T.,
Canad. J.Physiol. Pharmacol., 43 , 801 (1965).
17. Dobyms, B.M., and Barry, S.R.,
J.Biol. Chem., 204 , 517 (1953).
18. Flock, E.V., and Bollman, J.L.,
J. Biol. Chem. 214, 709 (1955).
19. Flock, E.V., Bollman, J.L., and Grindlay, J.H.,
Endocrinology, 67, 419 (1960).
20. Flock, E.V., Bollman, J.L., Grindlay, J.H., and Stobie, G.H.C. ,
Endocrinology, 69, 626 (1961).
21. Flock, E.V., and Owen, C.A.Jr.,
Endocrinology, 77, 475 (1965).
22. Furth, E.D., Becker, D.V., Nunez, E.A., and Reid, C.F.,
Endocrinology, 82, 976 (1968).
23. Galton, V.A., and Nisula, B.C.,
Endocrinology, 85, 79 (1969).
24. Galton, V.A., and Pitt-Rivers, R.,
Biochem. J., 72, 310 (1959).

25. Gross, J., and Pitt-Rivers, R.,
Biochem. J., 53, 645 (1953).
26. Hall, S.W.Jr., and Hershman, J.M.,
Am. J. Physiol., 215, 1049 (1968).
27. Heninger, R.W., Larson, F.C., and Albright, E.C.,
J.Clin. Invest., 42, 1761 (1963).
28. Herz, R., Tapley, D.F., and Ross, J.E.,
Biochim. Biophys. Acta, 53, 273 (1961).
29. Hocman, A.,
J. Chromatog., 21, 413 (1966).
30. Ingbar, S.H., Askonas, B.A., and Work, T.S.,
Endocrinology, 64, 110 (1959).
31. Kendall, E.C.,
Endocrinology, 3, 156 (1919).
32. Kraymer, O.,
Arch. Exper. Pathol. Pharmacol., 128, 116 (1928). Apud Brookhaven
Symp. Biol., 7, 111 (1955).
33. Leland, J.P., and Foster, G.L.,

- J.Biol. Chem., 95, 165 (1932).
34. Liewendahl, K., and Lamberg, B.A.,
J.Clin. Endocrinol. Metab., 25, 991 (1965).
35. Lissitzky, S., and Bismuth, J.,
Clin. Chim. Acta, 8, 269 (1963).
36. Lissitzky, S., Bismuth, J., and Rolland, M.,
Clin. Chim. Acta, 7, 183 (1962).
37. Lissitzky, S., and Lasry, S.,
Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 609 (1958).
38. Lloyd, G.I., and Plaskett, L.G.,
Biochem. J., 89, 958 (1963).
39. Makowetz, E., Muller, K. and Spitz, H.,
Microchem. J., 10, 194 (1966).
40. Michel, R. and Etling, N.,
Compt. Rend. Soc. Biol., 151, 36 (1957).
41. Myant, N.B.,
Clin. Sc., 15, 227 (1956).
42. Myant, N.B.,

- J. Physiol., 135, 426 (1957).
43. Myant, N.B. and Pochin, E.E.,
Clin. Sc., 9, 421 (1950).
44. Peterson, E.A. and Sober, H.A.,
J. Am. Chem. Soc., 78, 751 (1956).
45. Rabinowitz, J.L., Shapiro, B., and Johnson, P.,
J. Nucl. Med., 4, 139 (1963).
46. Robbins, J.,
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg., 32, 215 (1961).
47. Roche, J., Lissitzky, S. and Michel, R.,
Compt. Rend., 234, 992 (1952).
48. Roche, J., Michel, R., Closon, J. and Michel, O.,
Acta Endocrinol. suppl., 38, 1 (1958).
49. Roche, J., Michel, R., Closon, J. and Michel, O.,
Biochim. Biophys. Acta, 33, 461 (1959).
50. Roche, J., Michel, R., Gregorio, P. and Lobo, L.C.G.,
Compt. Rend. Soc. Biol., 154, 536 (1960).
51. Roche, J., Michel, R., Lobo, L.C.G. and Gregorio, P.,
Compt. Rend. Soc. Biol., 154, 495 (1960).

52. Roche, J., Michel, R., Michel, O. and Etling, N.,
Compt. Rend., 245, 1089 (1957).
53. Roche, J., Michel, O., Michel, R. and Tata, J.,
Compt. Rend. Soc. Biol., 147, 1243 (1953).
54. Roche, J., Michel, R. and Nunez, J.,
Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 361 (1958).
55. Roche, J., Michel, R. and Tata, J.,
Biochim. Biophys. Acta, 15, 500 (1954).
56. Roche, J., Nunez, J. and Gruson, M.,
Compt. Rend. Soc. Biol., 154, 2194 (1960)
57. Rosenberg, I.N.,
J. Clin. Endocrinol. Metab., 11, 1063 (1951).
58. Shulman, S. and Witebsky, E.,
Ann. N. Y. Acad. Sci., 86, 400 (1960).
59. Spiro, M.J.,
J. Biol. Chem., 236, 2901 (1961).
60. Taurog, A.,
Brookhaven Symp. Biol., 7, 111 (1955).

61. Taurog, A.,
Endocrinology, 73, 45 (1963).
62. Taurog, A., Briggs, F.N. and Chaikoff, I.L.,
J. Biol. Chem., 191, 29 (1951).
63. Taurog, A., Briggs, F.N. and Chaikoff, I.L.,
J. Biol. Chem., 194, 655 (1952).
64. Wynn, J., Gibbs, R. and Royster, B.,
J. Biol. Chem. 237, 3499 (1962).