

**Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza**

**AÇÃO DO FENOBARBITAL SOBRE ALGUNS ASPECTOS  
DO METABOLISMO HEPÁTICO DA TIROXINA**

**Dissertação apresentada  
ao Instituto de Biociências  
da Universidade de São  
Paulo para obtenção do  
título de "Mestre em  
Ciências".**

**SÃO PAULO  
1977**

61

*Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza*

**AÇÃO DO FENOBARBITAL SOBRE ALGUNS ASPECTOS  
DO METABOLISMO HEPÁTICO DA TIROXINA**



Dissertação apresentada ao  
Instituto de Ciências  
da Universidade de São Pau  
lo para obtenção de título  
de "Mestre em Ciências"

SAO PAULO

1977

Dissertação elaborada no Centro de  
Aplicações Biomédicas de Radioisó-  
topos e Radiações do Instituto de  
Energia Atômica - São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Milian Nicolau

*À minha mãe.*

*A meus filhos.*

*Aos Professores*

*Dr. Wilian Nicolau*

*Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni*

*Dr. Lício Marques de Assis*

*Dr. Antonio Sesso,*

*As colegas*

*Clara Bojarczuk*

*Emiko Muramoto*

*Etsuko Ikeda de Carvalho*

*Josefa Paredes Villalobos*

*Neusa Maria Alves Abelin*

*Margô V. Hehl Rebelo dos Santos*

*Vânia Caira Borghi,*

*A*

*Sra. Idelma Freitas Pagliusi,*

*nossos agradecimentos.*

## RESUMO

Estudaram-se as modificações ocasionadas pelo fenobarbital em ratos submetidos a doses diárias de 20 mg durante cinco dias.

Houve alteração da massa hepática com incremento de peso e proliferação do retículo endoplasmático liso e rugoso, acompanhado de aumento na velocidade do fluxo e do iodo total biliar nos ratos sob estímulo do fenobarbital.

Não se verificou alteração no P.B.I. sérico, evidenciando, entretanto, maior conjugação da tetraiodotironina e um incremento significativo na excreção biliar do glicuronidato de tiroxina. Embora menos acentuado, houve também aumento na excreção da  $T_4$  hepática.

## ABSTRACT

Some aspects of  $T_4$  metabolism were studied in rats submitted to daily doses of 20 mg of phenobarbital for 5 days.  $^{125}\text{I}-T_4$  was used as tracer material.

An enlargement of hepatic mass accompanied by proliferation of smooth and rough endoplasmic reticulum was observed. PBI remained unchanged. Total iodine, biliary flux,  $T_4$  and its glucuronidate increased after phenobarbital administration.

## SUMÁRIO

	pág.
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. PROPÓSITO DO TRABALHO .....	6
3. MATERIAL E METODOS .....	7
3.1. Animais .....	7
3.2. Ambiente .....	7
3.3. Dieta .....	8
3.4. Manuseio dos animais .....	8
3.4.1. Pesagem .....	8
3.4.2. Cirurgia .....	8
3.4.3. Injeção de tetraiodotironina ( $T_4$ - $^{125}I$ ) .....	9
3.4.4. Coleta da bile .....	9
3.4.5. Coleta de amostra sanguínea .....	9
3.4.6. Remoção do fígado .....	9
3.4.7. Hepatectomia para microscopia eletrônica .....	10
3.5. Métodos analíticos .....	10
3.5.1. Obtenção do hormônio marcado .....	10



3.5.1.1.	Técnica de iodação .....	10
3.5.1.2.	Purificação do hormônio marcado .....	11
3.5.1.3.	Contagem das frações .....	11
3.5.1.4.	Teste de rendimento da iodação e de pureza do hormônio iodado .....	11
3.5.2.	Filtração da bile em gel de Sephadex G-25M .....	12
3.5.2.1.	Preparação da coluna de Sephadex .....	12
3.5.2.2.	Cromatografia biliar em Sephadex G-25M ....	14
3.5.2.3.	Identificação do glicuronidato de tiroxina. 14	
3.5.2.3.1.	Hidrólise do glicuronidato de ti roxina .....	16
3.5.2.3.2.	Cromatografia do hidrolizado em Sephadex G-25M .....	16
3.5.2.3.3.	Cromatografia em papel .....	16
3.5.3.	Dosagem do PBI sérico e iodo total biliar .....	18
3.5.4.	Microscopia eletrônica .....	20
3.5.5.	Análise estatística .....	20
4.	RESULTADOS .....	23
4.1.	Peso dos animais .....	23
4.2.	Peso do fígado .....	23
4.3.	Fluxo biliar .....	26
4.4.	Avaliação do PBI sérico e iodo total biliar .....	26
4.5.	Cromatografia dos compostos iodados biliares.....	30
4.6.	Microscopia eletrônica .....	37
5.	DISCUSSÃO .....	40

5.1. Peso dos animais e peso do fígado .....	40
5.2. Fluxo biliar .....	41
5.3. Iodo ligado às proteínas séricas (PBI) .....	42
5.4. Iodo biliar total .....	42
5.5. Cromatografia biliar em coluna de Sephadex G-25 M .....	43
5.6. Tiroxina e glicuronidato de tiroxina .....	43
6. CONCLUSÕES .....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Alguns anos após a identificação da tetraiodotironina ( $T_4$ ), KENDALL<sup>(20)</sup> evidenciou a importância da excreção biliar como via metabólica e/ou excretora deste hormônio em cães que receberam intravenosamente  $T_4$ - $^{131}\text{I}$  exógeno (45% do  $^{131}\text{I}$  era eliminado na bile após 50 horas). A partir deste relato outros autores<sup>(8,43,44,45)</sup> confirmaram a excreção da  $T_4$  inalterada através da bile.

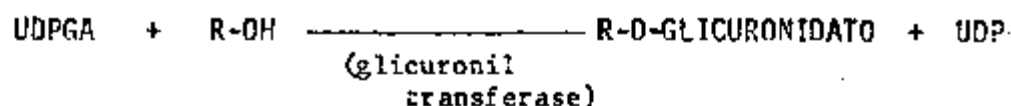
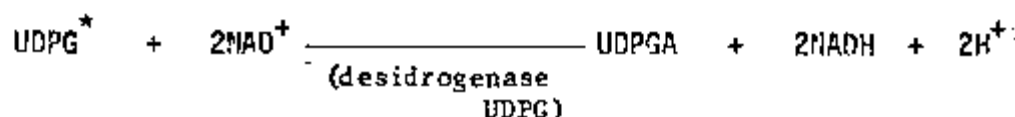
ALBERT e col.<sup>(1)</sup> afirmam em suas experiências que este hormônio é concentrado rapidamente pelo fígado e, um minuto após a injeção traçadora, 40% da  $T_4$ - $^{125}\text{I}$  encontra-se presente no fígado; a seguir há acréscimo paulatino da radioatividade hepática, acompanhado por um aumento paralelo na bile, que é lançada no trato gastrointestinal.

Nos anos seguintes, outros autores<sup>(8,43)</sup> tentaram evidenciar os componentes biliares, porém devido à falta de melhor desenvolvimento da metodologia de separação só identificaram a  $T_4$  e o iodeto. Em 1950, TAUROG<sup>(44)</sup> introduziu novas técnicas de separação cromatográfica em papel e conseguiu identificar mais duas frações além da  $T_4$  e iodeto : um metabolito desconhecido e um composto conjugado da  $T_4$  que se denominou composto U.

O mesmo autor<sup>(45)</sup>, em trabalho posterior, identificou este

composto através de hidrólise com beta-glicuronidase (componente estrutural do retículo endoplasmático liso), que excretado por via biliar no trato gastrointestinal não era encontrado nas fezes dos animais estudados, visto ser o mesmo hidrolizado pela beta-glicuronidase entérica. A partir destas observações o autor concluiu que o composto U era glicuronidato de tiroxina e uma das formas de metabolização hepática do hormônio (43).

Sabe-se que uma das importantes vias metabólicas dos produtos naturais, das drogas e das substâncias tóxicas é através da reação esquematizada a seguir:



Estes produtos são excretados na urina e nas fezes como glicuronidatos através de esterificação direta ou após prévia hidroxilação (46).

Existem numerosos estudos sobre os efeitos de drogas causadoras de aumento da atividade enzimática dos microsomas hepáticos para metabolização desses produtos (9,14,17). Um dos métodos que permite melhor análise deste mecanismo enzimático seria o estudo das alterações produzidas por barbitúricos ou drogas no sistema.

A observação de que o fenobarbital estimula a síntese proteica, através de aumento na relação RNA/DNA, sugere um alargamento das cē

\* UDPG = uridina-difosfato-glicose; NAD = nicotinamida-adenina-dinucleotídeo; UDPGA = ácido uridina difosfoglicurônico; NADH = nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido; UDP = uridina-difosfato.

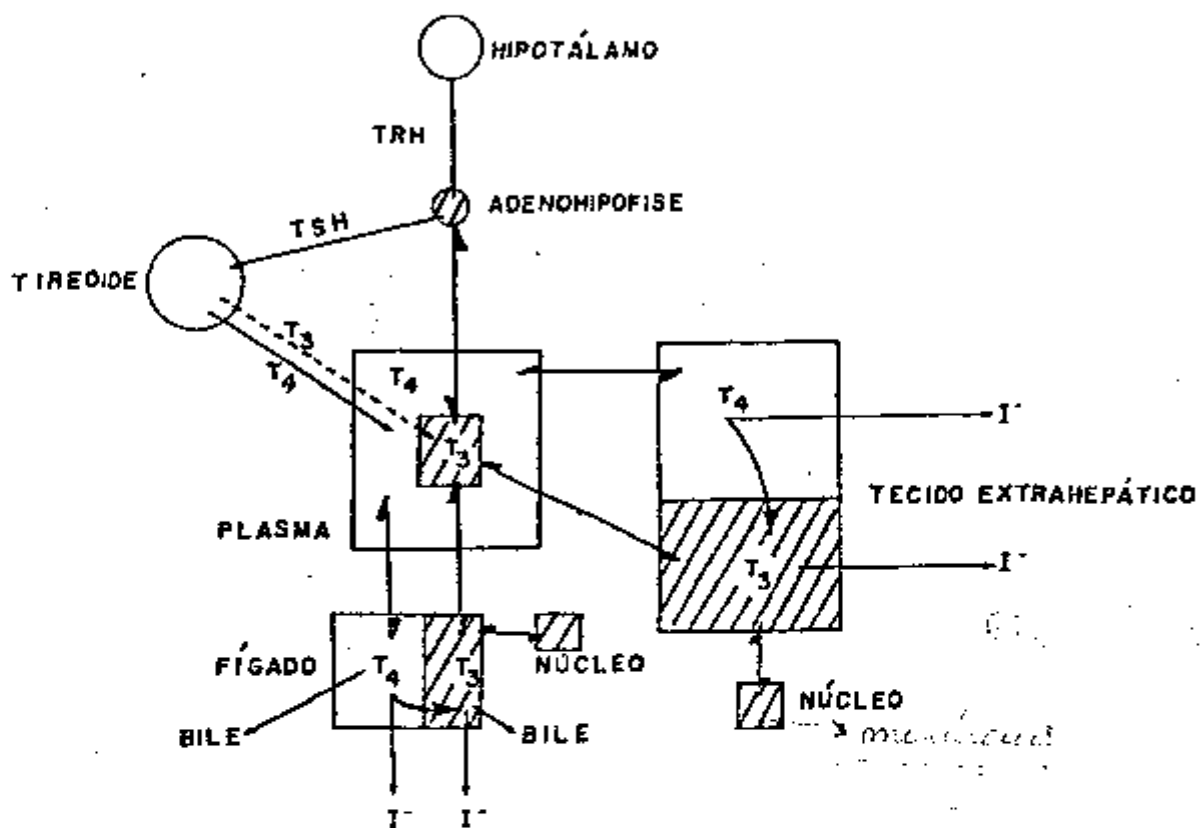
lulas individuais que levariam a um acréscimo no peso do fígado<sup>(3)</sup>.

Diversos autores têm feito experiências em homogeneizados de fígado de rato com intuito de verificar a alteração enzimática produzida pelo fenobarbital. PLATT<sup>(37)</sup> e ORRENIUS<sup>(35)</sup> encontraram um aumento na atividade da glicuronil transferase, entretanto LUCIER<sup>(28)</sup> verificou existir redução da referida enzima.

Por outro lado, os barbitúricos, por suas ações sedativas centrais, têm sido usados há muito tempo como auxiliares no tratamento das tireotoxicoses e, no curso dos últimos vinte anos, obtiveram-se novos dados sobre a interação destas drogas com os sítios de ligação dos hormônios tireoideanos, tanto nas células como no plasma. Tais interações afetariam a concentração das iodo-tironinas na circulação ou influenciariam a distribuição, o metabolismo e a excreção dos hormônios tireoideanos<sup>(3)</sup>, podendo-se citar, como exemplo, as alterações da depuração fecal de  $T_4$ <sup>(6,44)</sup>.

Levando em consideração as características da distribuição periférica e do metabolismo dos hormônios tireoideanos (Figura 1), OPPE-  
NHEIMER e col.<sup>(31)</sup>, numa série de estudos experimentais em ratos, demonstraram que o fenobarbital estimula a velocidade de depuração da  $T_4$  em maior proporção que a de triiodotironina ( $T_3$ ). Este efeito é devido, não a uma alteração nas proteínas plasmáticas transportadoras dos hormônios, mas a um aumento nas ligações hepatocelulares e estímulo no mecanismo de captação hepática da  $T_4$ .

SCHWARTZ e col.<sup>(41)</sup> sugerem existir aumento nas ligações de  $T_4$  nos hepatócitos após administração do fenobarbital, devido ao aumento do número de sítios de ligações nas frações microssomais, presumível



**FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO E DISTRIBUIÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS**

mente pela proliferação do retículo endoplasmático liso.

GOLDSTEIN<sup>(15)</sup> sugere que as modificações na excreção hepática "in vivo" da  $T_4$  estariam mais ligadas ao aumento do fluxo biliar que às alterações da glicuronil transferase. O incremento de excreção de  $^{131}I$  na bile em ratos prē-tratados com fenobarbital foi acompanhado de aumento proporcional do fluxo biliar, permanecendo inalterada a concentração do isótopo. Neste trabalho, as quantidades relativas de  $T_4$  e de seu glicuronidato se assemelhavam às do grupo controle em experiências tanto "in vivo" quanto "in vitro".

## 2. PROPÓSITO DO TRABALHO

De posse de metodologia mais refinada de separação dos compostos iodados biliares, nos propusemos:

- a) Estudar as modificações qualitativas e quantitativas ocasionadas pela administração de fenobarbital em ratos, no que se refere à excreção biliar da tiroxina radioativa e seu glicuronidato;
- b) Reavaliar os achados da literatura, quanto ao aumento do fluxo biliar e da massa hepática, nos animais submetidos à referida droga;
- c) Verificar se à essas alterações correspondem modificações na iodoproteïnemia e na concentração biliar de iodo total.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais.

Foram utilizados 24 ratos fêmeas da raça Wistar, normais, com peso variando de 150 a 200 gramas, mantidos no Biotério do Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

Os animais foram separados em dois grupos:

##### a) Grupo tratado com fenobarbital (GF):

Composto de 12 animais que receberam, durante cinco dias, injeções intraperitoneais diárias de 20 mg de fenobarbital sódico diluídos em solução fisiológica. Dez ratos foram submetidos à sequência experimental abaixo descrita. Dois animais (GF1) foram utilizados para estudo da citologia hepática por microscopia eletrônica.

##### b) Grupo controle (GC):

Composto de 12 animais que receberam solução fisiológica, via intraperitoneal, durante cinco dias. Dez ratos foram submetidos à sequência experimental abaixo descrita. Dois animais (GC1) foram utilizados para estudo da citologia hepática por microscopia eletrônica.

#### 3.2. Ambiente.

Durante o decorrer da experiência os animais foram mantidos à temperatura ambiente, sujeitos à iluminação natural em sala apropriada.

### 3.3. Dieta.

Os animais dos grupos, controle e tratado, foram mantidos com ração balanceada para animais de laboratório\*. Ofereceu-se água natural "ad libitum".

### 3.4. Manuseio dos animais.

#### 3.4.1. Pesagem.

Os animais foram pesados em balança analítica\*\* no quinto dia da experiência.

#### 3.4.2. Cirurgia.

Os animais foram mantidos anestesiados durante todo o decorrer da cirurgia com máscara aberta contendo algodão embebido em éter etílico. Através da incisão sobre a linha alva, penetrava-se na cavidade abdominal expondo-se o fígado. Após rebater o órgão visualizava-se o colédoco, que era cateterizado na sua porção proximal com um tubo de polietileno de 0,5 mm de diâmetro interno. Recolocando-

---

\* Moinho São Cristovão, Rio de Janeiro, RJ

\*\* Mettler P 1000N.

se o fígado na cavidade, suturava-se a seguir a pele, permanecendo exposta a cânula, cuja porção terminal era fechada através de pinça.

#### 3.4.3. Injeção de tetraiodotironina ( $T_4$ - $^{125}I$ ).

Os animais de ambos os grupos receberam por via intraperitoneal uma dose traçadora de 40  $\mu$ Ci de  $T_4$ - $^{125}I$  com atividade específica de 70  $\mu$ Ci/ $\mu$ g.

#### 3.4.4. Coleta da bile.

Imediatamente após a administração do material radioativo, iniciou-se a coleta da secreção biliar. Esta coleta prolongou-se por um período de 4 horas, avaliando-se seu volume final. As amostras foram conservadas à temperatura de  $-20^{\circ}C$ .

#### 3.4.5. Coleta de amostra sanguínea.

Ao final das 4 horas, foi retirada uma amostra sanguínea por punção cardíaca. Após retração do coágulo e centrifugação do sangue, o soro obtido foi conservado à temperatura de  $-20^{\circ}C$ .

#### 3.4.6. Remoção do fígado.

Após a coleta do sangue, procedeu-se à hepatecto-

mia total e pesagem imediata dos órgãos.

### 3.4.7. Hepatectomia para microscopia eletrônica.

Os animais (GFM e GC1) foram sacrificados por golpe brusco no crânio e após abertura do abdômen foi retirado o lóbulo "caudatum" do fígado.

## 3.5. Métodos analíticos.

### 3.5.1. Obtenção do hormônio marcado.

#### 3.5.1.1. Técnica de iodação.

Em tubo de ensaio contendo 1,5 a 2 mCi de Na-<sup>125</sup>I\* com atividade de 521 mCi/ml adicionou-se sucessivamente:

- a) 50 µl de solução alcoólica de iodo metálico (I<sub>2</sub>), contendo 4 µg;
- b) após um minuto, 200 µl de solução amoniacal de T<sub>4</sub> (40 µg);
- c) 200 µl de álcool butírico terciário;
- d) uma gota de solução saturada de fosfato de sódio.

Após agitação, aguardou-se 15 minutos para realização da reação, que foi interrompida pela adição de 500 µl de solução alcoólica de sulfito de sódio, preparada em álcool butírico terciário e água (1:1).

---

\* New England Nuclear, Boston.

### 3.5.1.2. Purificação do hormônio marcado.

A solução contendo o hormônio marcado foi transferida para uma coluna de Sephadex G-25F\* (22 cm de altura x 0,6 cm de diâmetro), previamente equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 11,9. A coluna foi eluída com o mesmo tampão e frações de 2 ml coletadas em tubos contendo uma gota de HCl 1N.

### 3.5.1.3. Contagem das frações.

A radioatividade foi determinada num contador gama tipo poço\*\*. Obtiveram-se três frações radioativas: a primeira foi  $^{125}\text{I}$  livre, a segunda, proteínas danificadas, e a terceira, o hormônio marcado puro. Esta última foi utilizada na experiência diluída em propileno glicol a 50%.

### 3.5.1.4. Teste de rendimento da iodação e de pureza do hormônio iodado.

Uma alíquota do hormônio marcado, antes da passagem no Sephadex, diluída 1/400 em tampão fosfato 0,05 M, pH 11,9, e outra alíquota das frações obtidas com hormônio puro, diluída a 1/50, no mesmo tampão, foram submetidas a eletroforese em papel Whatman 3M\*\*\* em tampão Veronal 0,05 M, pH 8,6, força iônica = 0,075, submetida à voltagem de 400 V durante 45 minutos.

\* Pharmacia-Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden.

\*\* Automatic Gamma Counting System, Nuclear Chicago Corporation, Illinois, USA.

\*\*\* Whatman England by W & R Balston Ltd.

O rendimento da iodação foi fornecido pela relação entre as contagens totais e as do pico correspondente ao hormônio e variou entre 60 e 80% antes da passagem na coluna de Sephadex (Figura 2). O grau de pureza do hormônio iodado foi obtido pela mesma relação na eletroforese das alíquotas após a passagem na coluna de Sephadex, variando entre 96 e 98% (Figura 2).

### 3.5.2. Filtração da bile em gel de Sephadex G-25 M.

#### 3.5.2.1. Preparação da coluna de Sephadex.

Com base na propriedade do Sephadex de separar os componentes iodados da bile, utilizou-se a metodologia de LISSITZKY e cols. (26,27) modificada por IKEDA e cols. (19).

A coluna de vidro utilizada foi de 40 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro interno com afunilamento na extremidade inferior, onde foi adaptado um tubo de borracha com pipeta de Pasteur para controlar o fluxo de saída do percolado. Logo acima da extremidade afunilada, colocou-se lâ de vidro com o objetivo de reter o gel de Sephadex.

Utilizou-se para cada coluna 35 g de gel de Sephadex G-25 M, previamente mantido em 120 ml de água com agitação esporádica e conservado a 4°C, durante 24 horas, a fim de permitir ao gel um ganho de líquido adequado. O gel, assim preparado, foi colocado na coluna, procurando-se obter um bom empacotamento (homogeneidade, sem formação de bolhas de ar).

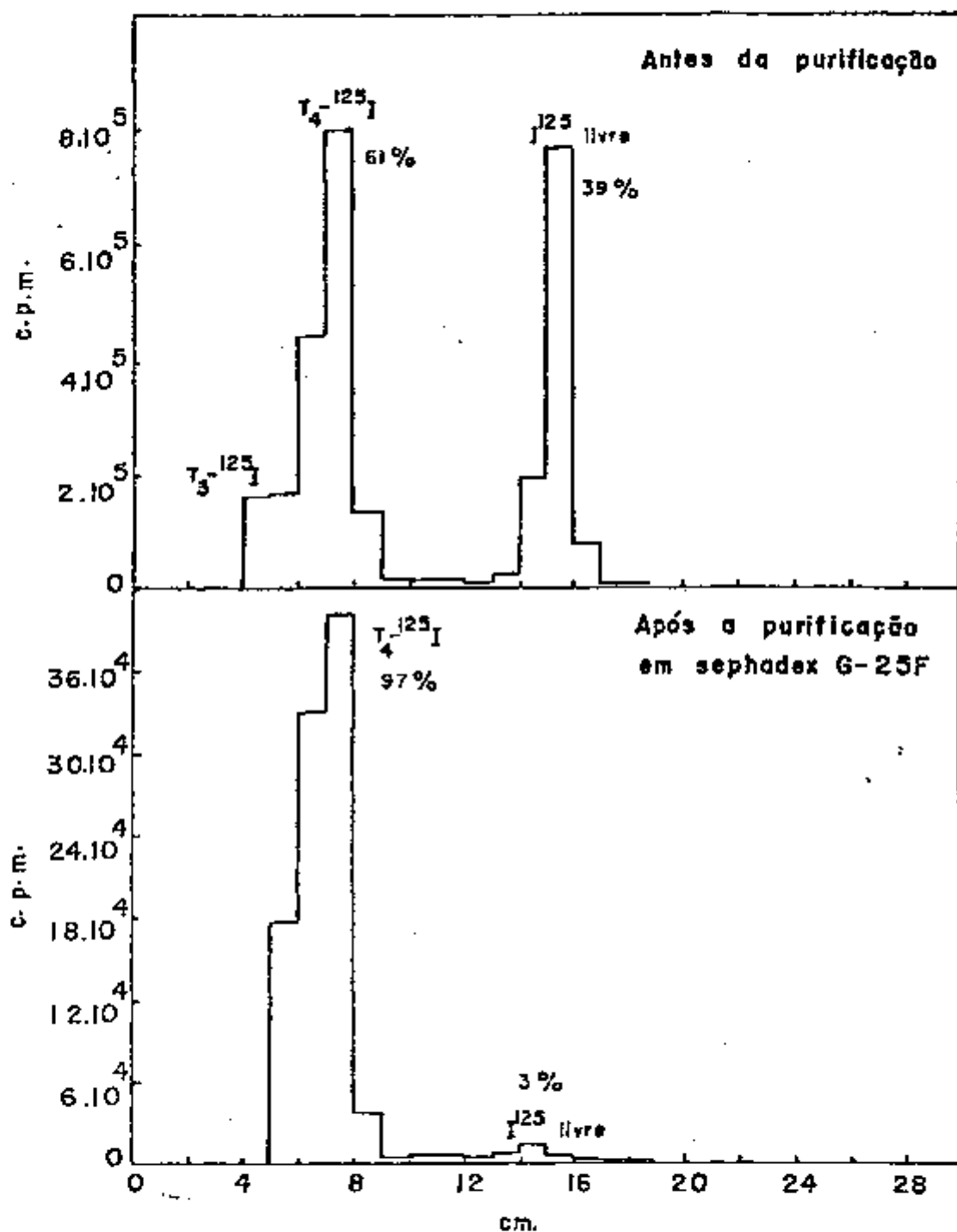


FIGURA 2 - ELETROFORESE EM TAMPÃO VERONAL DE UMA ALÍQUOTA DO HORMÔNIO MARCADO, ANTES E APÓS PURIFICAÇÃO EM SEPHADEX G-25 F

Colocou-se um disco de papel de filtro do mesmo diâmetro interno da coluna sobre o gel, para impedir a penetração de impurezas e manter o empacotamento do mesmo. A coluna, assim preparada, foi equilibrada com tampão TRIS-HCl, pH 7,4, 0,05 M.

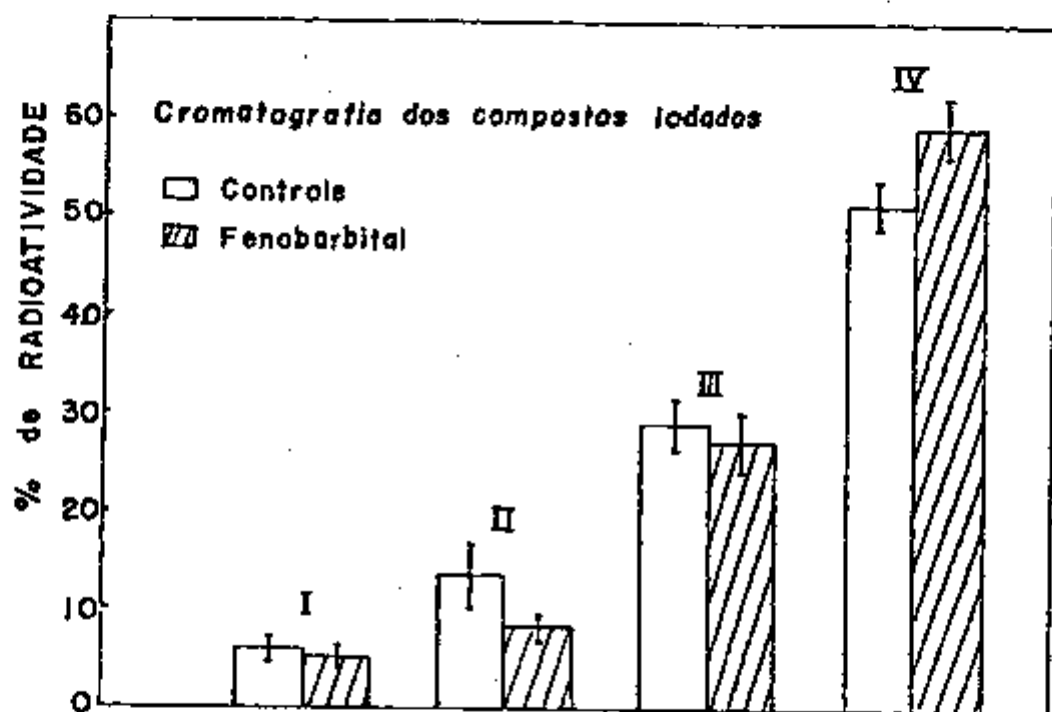
### 3.5.2.2. Cromatografia biliar em Sephadex G-25 M.

Colocou-se cuidadosamente uma alíquota de bile (0,1 a 0,2 ml) na coluna; iniciou-se a coleta das frações com velocidade constante de 1 ml/minuto. Após penetração da bile no gel, eluiu-se a coluna com aproximadamente 120 ml de TRIS-HCl, coletando-se frações de 3 ml em tubos de vidro. O referido tampão elue sucessivamente proteínas iodadas, iodeto e tirosinas iodadas (26,27). Na etapa seguinte, acrescentou-se 80 ml de A-A (amilol-amônia 2N) a fim de separar as tironinas iodadas retidas no gel e, finalmente, 80 ml de amônia 2N, para possibilitar a eluição do glicuronidato de  $T_4$  (19). A radioatividade de cada amostra foi medida num contador gama automático; o tempo de acúmulo de contagens foi de 10 minutos, para diminuir o erro estatístico. Foi calculado o percentual das frações obtidas na separação em relação ao total da radioatividade eluída da coluna (Figura 3).

### 3.5.2.3. Identificação do glicuronidato de tiroxina.

As amostras correspondentes à fração IV, supostamente contendo glicuronidato de tiroxina, foram submetidas a aná





**FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PORCENTUAL DE RADIOATIVIDADE CORRESPONDENTE ÀS FRAÇÕES OBTIDAS NA CROMATOGRAFIA EM SE-  
PHADEX G-25I DOS COMPOSTOS IODADOS BILIARES**

lise a fim de serem identificadas. As frações de maior radioatividade do pico IV foram concentradas por aquecimento (aproximadamente 30°C), sob corrente de nitrogênio para evitar a oxidação das mesmas e, para a retirada da amônia. A seguir, o material foi liofilizado.

#### 3.5.2.3.1. Hidrólise do glicuronidato de tiroxina.

Ao material liofilizado foi adicionado tampão acetato pH 4,5 e solução de beta-glicuronidase\*, contendo 5000 UI de enzima por ml de solução. Realizou-se a hidrólise por incubação durante 18 horas, a 37°C. Após centrifugação, reajustou-se o pH a 7,4 com NaOH 0,1 N no sobrenadante.

#### 3.5.2.3.2. Cromatografia do hidrolizado em Sephadex G-25 M.

Uma alíquota do hidrolizado foi submetida a cromatografia em gel de Sephadex, utilizando-se a mesma técnica descrita no item 5.5.5. Obtiveram-se quatro frações correspondentes: iodoproteína, iodeto, T<sub>4</sub> e glicuronidato de T<sub>4</sub> (Figura 4).

#### 3.5.2.3.3. Cromatografia em papel.

A terceira fração obtida na

\* Ketodase, procedente da General Diagnostic Division, Warner, Chilcott Division - Morris Plain, New Jersey, USA.

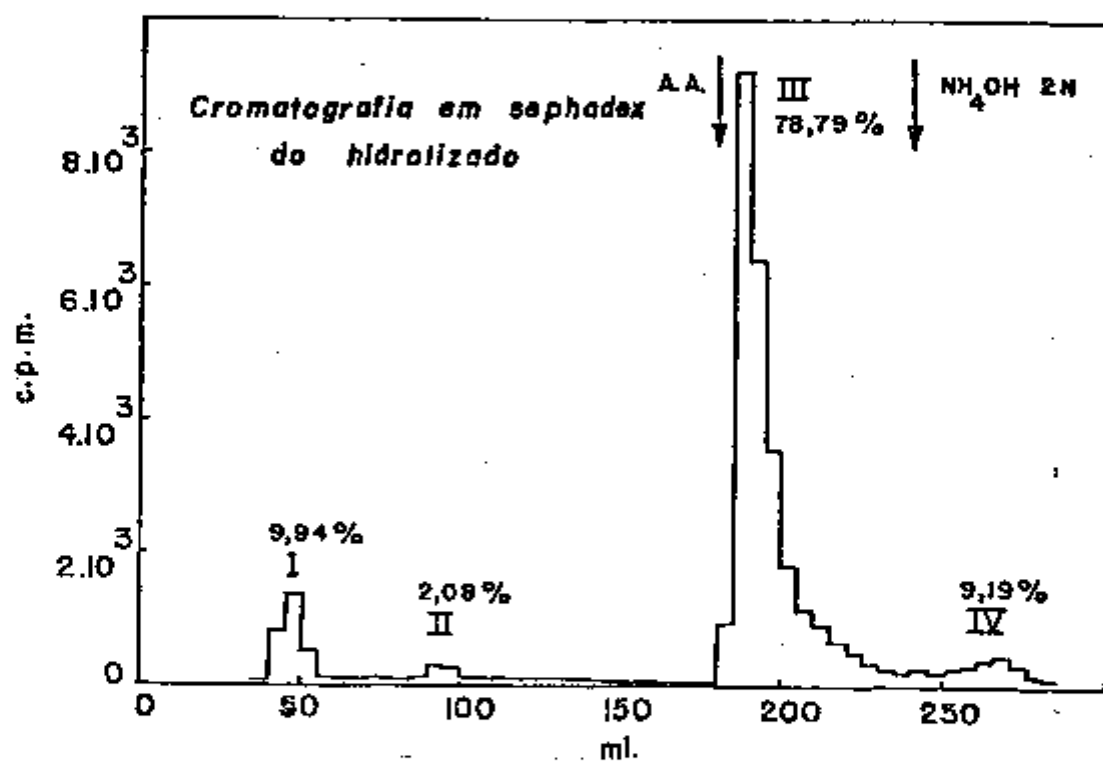


FIGURA 4 - CROMATOGRÁFIA EM SEPHADEX G-25 H DO HIDROLIZADO COM BETA-GLICURONIDASE

filtração em gel de Sephadex do hidrolizado foi submetida a cromatografia em papel. Essa fração eluída em amilol foi agitada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  2N a fim de eliminar impurezas que permanecem no solvente orgânico, enquanto  $\text{T}_3$  e  $\text{T}_4$  são extraídas pela fase aquosa. Esta última foi concentrada por aquecimento (30 a 40°C) sob corrente de nitrogênio. O extrato assim obtido foi dissolvido com 0,1 a 0,2 ml de metanol-amônia (99:1) e colocado em papel de cromatografia Whatman 3 MM. Utilizou-se o sistema monodimensional ascendente em citrato de sódio a 20%, pH 8,6. O tempo de desenvolvimento foi de 90 minutos.

Uma mistura de padrões não radioativos em volume de 40  $\mu\text{l}$  (1 mg de Na I, 4 mg de  $\text{T}_4$ , 4 mg de  $\text{T}_3$ , diluídos respectivamente em 2 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2N) foram cromatografados conjunta e paralelamente com a amostra a ser analisada.

Os padrões não radioativos foram identificados 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<sup>(19)</sup>. Após revelação química, os cromatogramas foram secados e recortados em tiras de 1 cm de largura. A radioatividade de cada fração foi determinada em contador gama automático. Construiu-se um gráfico pelos resultados obtidos ( Figura 5).

### 3.5.3. Dosagem do PBI sérico e iodo total biliar.

As amostras sanguíneas e biliares foram analisadas, para determinação da iodoproteinemia e iodo total biliar, pelo Au-

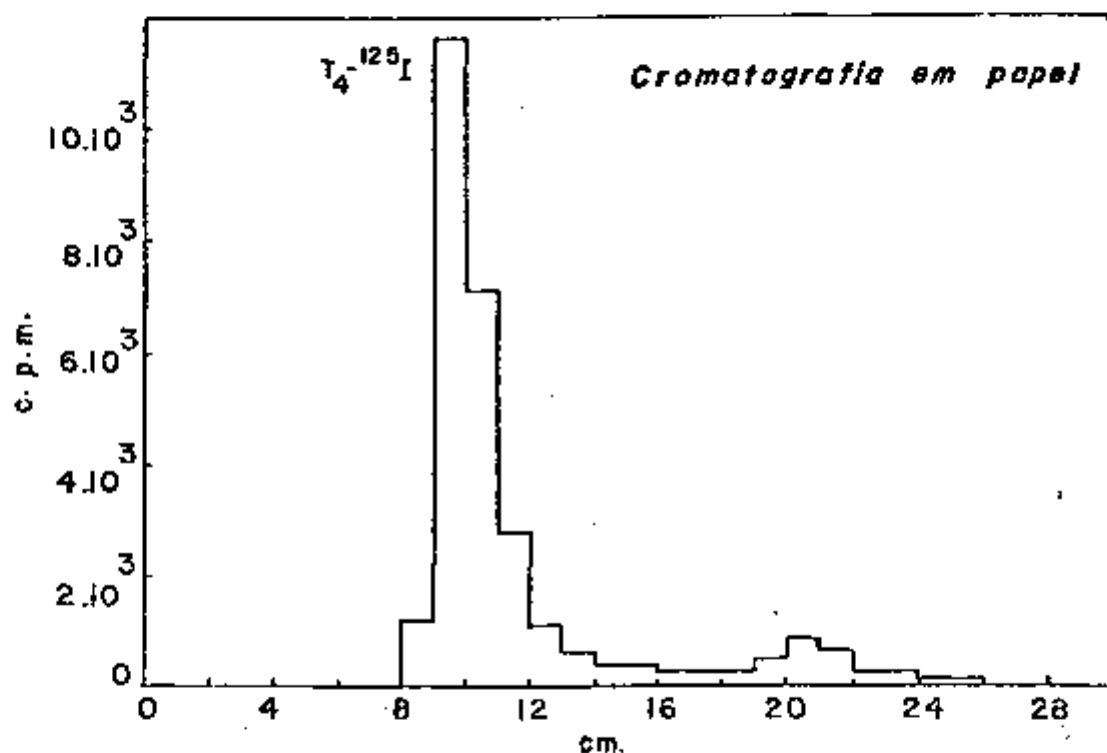


FIGURA 5 - CROMATOGRAFIA EM PAPEL NO SISTEMA MONODIMENSIONAL ASCENDENTE  
(CITRATO DE SÓDIO pH 8,6)

toAnalyser\* para PBI<sup>(11)</sup>.

#### 3.5.4. Microscopia eletrônica.

O lóbulo "caudatum" do fígado foi cortado em cubos de aproximadamente 1 mm de espessura e mantidos em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1 N e pH 7,4, durante uma hora. A seguir, procedeu-se a fixação do mesmo em ácido ôsmico a 1% no tampão acima referido, durante uma hora. O material foi corado em acetato de uranila 1% por 16 horas.

Após desidratação seriada em álcool e acetona, formaram-se blocos em araldite, deixando-os em estufa a 60°C por um período de 2 a 3 dias.

Através de ultramicrotomo<sup>\*\*</sup>, obtiveram-se cortes que, após terem sido corados em acetato de uranila e citrato de chumbo, foram analisados e fotografados em microscópio eletrônico<sup>\*\*\*</sup> (figuras 7 e 8).

#### 3.5.5. Análise estatística.

Para comparação relativa dos dados obtidos nos grupos em estudo, estimou-se a variância através do teste F<sup>(40)</sup>, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

\* AutoAnalyser "Technicon"

\*\* Ultramicrotomo "Sorvall" M T 2-B

\*\*\* "Carl Zeiss", modelo Et-9S 2.

onde:

$S_1$  = desvio padrão de maior valor

$S_2$  = desvio padrão de menor valor.

Nos casos onde o F encontrado foi menor que o F crítico (variâncias iguais), estinguiu-se a significância da diferença para dos diversos parâmetros estudados, pelo teste t de "Student" correspondente<sup>(10)</sup>, dado pela fórmula:

$$t = \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad s^2 = \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$GL = n_1 + n_2 - 2.$$

onde:

$n_i$  = número de animais

$\bar{y}_i$  = valor médio

$s$  = variância do referido valor  $\bar{y}_i$

$S_i$  = desvio padrão relativo ao  $\bar{y}_i$

GL = graus de liberdade.

Nos demais casos, ou seja naqueles em que o F en-

contrado foi maior que o F crítico (variâncias desiguais), aplicou-se o teste t respectivo, dado pela fórmula:

$$t = \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

$$f = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1+1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2+1}} - 2$$

onde:

$n_i$  = número de animais

$\bar{y}_i$  = valor médio

$S_i$  = desvio padrão relativo aos  $\bar{y}_i$

f = graus de liberdade.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Peso dos animais.

Foram comparados os pesos dos animais controles e tratados com fenobarbital, antes do início do ensaio experimental. A Tabela I apresenta os resultados da análise estatística. Observa-se que as médias e os desvios padrões de ambos os grupos foram de  $151,50 \pm 30,83$  g e  $156,80 \pm 31,40$  g, respectivamente.

Evidenciou-se pelo teste t de "Student" que os pesos iniciais dos ratos dos dois grupos não diferiram significativamente entre si.

### 4.2. Peso do fígado.

Os valores individuais relativos aos pesos dos fígados nos animais normais e tratados com fenobarbital estão expressos na Tabela II, sendo as médias e os desvios padrões de  $6,33 \pm 0,83$  g para o grupo controle e  $8,93 \pm 1,48$  g para o grupo tratado. Esta diferença de peso mostrou ser estatisticamente significante ao nível de  $p \leq 0,05$ .

TABELA I\*

PESO DOS ANIMAIS (GRAMAS)

Rato nº	GRUPO CONTROLE	Rato nº	GRUPO FENOPARBITAL
1	110	11	130
2	135	12	128
3	140	13	125
4	120	14	130
5	175	15	180
6	190	16	200
7	205	17	210
8	160	18	170
9	130	19	145
10	150	20	150
$\bar{M}$	150,50	$\bar{M}$	156,80
dp	30,83	dp	31,40

F = 1,04

F\* = 2,98

t = 0,3809

t\* = 2,1009

GL = 18

\* Abreviaturas utilizadas nas tabelas:

$\bar{M}$  = média; dp = desvio padrão; F = F obtido; t = t obtido; GL = grau de liberdade; F\* = F crítico para  $p \leq 0,05$ ; t\* = t crítico para  $p \leq 0,05$

TABELA III

P E S O D O F I G A D O (GRAMAS)

Rato nº	GRUPO CONTROLE	Rato nº	GRUPO FENOBARBITAL
1	5,33	11	7,81
2	6,00	12	7,61
3	5,83	13	7,50
4	5,50	14	8,00
5	7,18	15	10,70
6	7,20	16	10,50
7	7,90	17	11,65
8	6,25	18	9,02
9	5,90	19	8,20
10	5,20	20	8,30
$\bar{n}$	6,33	$\bar{n}$	8,93
dp	0,83	dp	1,48

F = 3,18

F\* = 2,98

t = 4,845

t\* = 2,1315

GL = 15

#### 4.3. Fluxo biliar.

Os valores correspondentes ao fluxo biliar de cada grupo, expressos em mililitros de bile coletada durante 4 horas, encontram-se na Tabela III. Verificou-se que as médias e desvios padrões são de  $0,40 \pm 0,09$  ml/4 horas para o GC e  $0,75 \pm 0,19$  ml/4 horas para o GF. Constatou-se, portanto, um aumento estatisticamente significativo de fluxo biliar no GF quando comparado ao GC.

#### 4.4. Avaliação do PBI sérico e iodo total biliar.

Nas tabelas IV e V estão descritos os resultados referentes ao PBI sérico e iodo total biliar, expressos em  $\mu\text{g}$  de iodo ligado à proteínas por 100 ml de soro e em  $\mu\text{g}$  de iodo total em 100 ml de bile. Verificou-se que as médias e os desvios padrões do PBI sérico encontrados foram de  $1,57 \pm 0,35$   $\mu\text{g}/100$  ml e  $1,90 \pm 0,45$   $\mu\text{g}/100$  ml para o GC e GF, respectivamente. Através do teste t de "Student", para variâncias iguais, observou-se um  $t = 1,83$  (para 18 graus de liberdade), demonstrando não existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao nível de  $p \leq 0,05$ .

Quanto à excreção do iodo total biliar, pode-se constatar que as médias e os desvios padrões foram de  $3,15 \pm 0,77$   $\mu\text{g}/100$  ml para o GC e  $6,11 \pm 0,60$   $\mu\text{g}/100$  ml para o GF. Ao aplicar o teste t (variâncias iguais) verificou-se que os dois grupos são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ), sendo a excreção do iodo total biliar maior no grupo tratado.

TABELA III

FLUXO BILIAR (ml DE BILE/4 HORAS)

Rato nº	GRUPO CONTROLE	Rato nº	GRUPO FENOBARBITAL
1	0,28	11	0,58
2	0,42	12	0,58
3	0,40	13	0,55
4	0,30	14	0,62
5	0,48	15	<u>0,95</u>
6	0,50	16	<u>1,03</u>
7	0,53	17	<u>1,04</u>
8	0,35	18	0,80
9	0,42	19	0,65
10	0,33	20	0,65
$\bar{M}$	0,40	$\bar{M}$	0,75
dp	0,09	dp	0,19

F = 4,457

F\* = 2,98

t = 5,2645

t\* = 2,3060

GL = 8

TABELA IV

P . B . I . ( SANGUÍNEO )      ug / 100 ml

Rato nº	GRUPO CONTROLE	Rato nº	GRUPO FENOBARBITAL
1	1,20	11	1,40
2	1,10	12	1,50
3	1,20	13	1,60
4	1,30	14	1,60
5	1,80	15	2,10
6	1,90	16	2,50
7	2,10	17	2,60
8	1,80	18	2,40
9	1,70	19	1,60
10	1,60	20	1,70
$\bar{M}$	1,57	$\bar{M}$	1,90
dp	0,35	dp	0,45

F = 1,650

F\* = 2,98

t = 1,83

t\* = 2,100

GL = 18

TABELA V

IODO TOTAL PILIAR (ug/100 ml)

Rato nº	GRUPO CONTROLE	Rato nº	GRUPO FENOBARBITAL
1	2,100	11	5,200
2	2,300	12	5,500
3	2,700	13	5,300
4	2,500	14	5,600
5	3,600	15	6,450
6	3,800	16	6,800
7	4,200	17	7,300
8	4,100	18	6,500
9	3,500	19	6,300
10	2,700	20	6,150
$\bar{M}$	3,150	$\bar{M}$	6,110
dp	0,770	dp	0,600

F = 1,245

F\* = 2,98

GL = 18

t = 9,01

t\* = 2,100

#### 4.5. Cromatografia dos compostos iodados biliares.

As tabelas VI e VII apresentam os valores percentuais referentes às frações obtidas na separação cromatográfica dos componentes iodados biliares em gel de Sephadex, dos grupos controle e tratado com fenobarbital. Das quatro frações resultantes, uma mereceu maiores cuidados para sua identificação, a fração IV, que após hidrólise enzimática e subseqüente cromatografia em Sephadex e papel, revelou ser glicuronidato de  $T_4$  (figuras 4 e 5).

Considerando-se existir um equilíbrio isotópico entre os quatro compartimentos (iodeto, proteínas iodadas,  $T_4$  e glicuronidato de  $T_4$ ), o iodo total biliar dosado distribuir-se-á igualmente em todos eles; desta maneira, pode-se calcular as quantidades relativas de iodo em cada fração percentual obtida pela cromatografia da bile em Sephadex (Figura 6). Estimando deste modo a massa de iodo total estãve em cada fração, foram obtidos resultados individuais de cada grupo, que se encontram nas tabelas VIII e IX. Nelas estão incluídas as respectivas médias e desvios padrões. A Tabela X mostra os resultados da análise estatística a que foram submetidos os dados anteriormente citados.

Aplicando o teste t de "Student" aos valores relativos das frações I e II, verificou-se que não são estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), sugerindo que em ambos os grupos, controle e tratado, não houve alteração na eliminação biliar de iodoproteínas e iodeto. Entretanto, observou-se que as médias e desvios padrões referentes aos dados da fração III (tiroxina) foram de  $0,906 \pm 0,206 \mu\text{g}$  de  $I_2/100 \text{ ml}$  e  $1,675 \pm 0,353 \mu\text{g}$  de  $I_2/100 \text{ ml}$  para o GC e GF, respectivamente. Através



T A P E L A V I

CROMATOGRAFIA DOS COMPOSTOS IODADOS BILIARES EM SEPHADEX G-25M (%)GRUPO CONTROLE

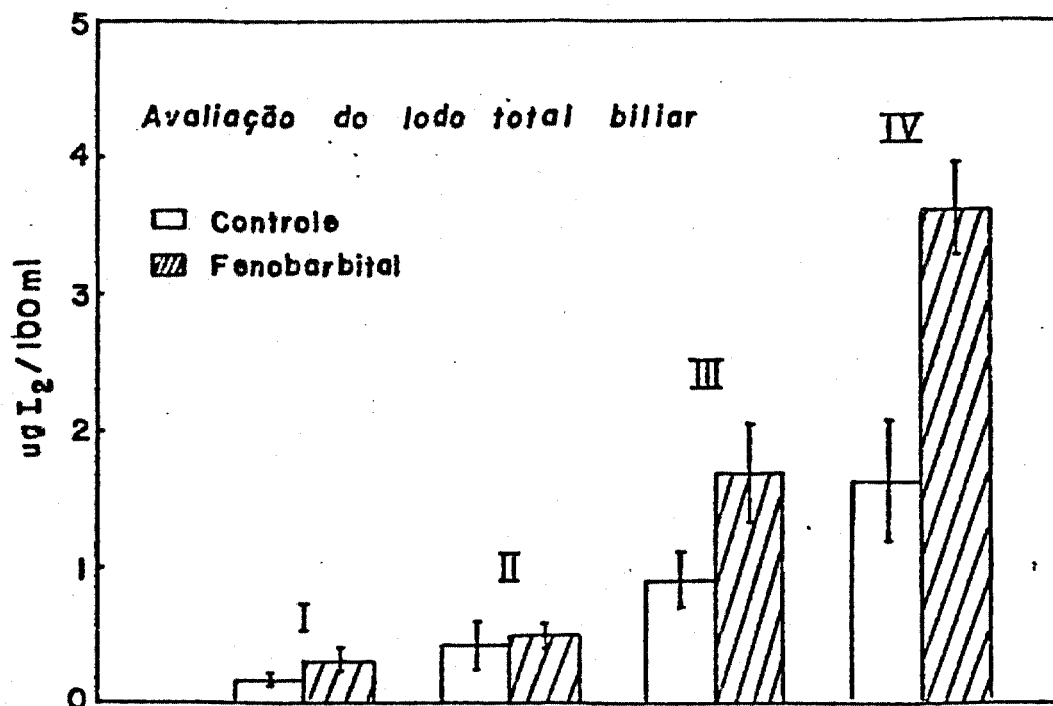
FRACÇÕES Rato nº	I	II	III	IV
1	6,87	12,98	31,84	48,31
2	6,42	11,88	30,76	50,44
3	7,20	17,27	24,87	50,66
4	7,00	13,00	32,00	48,30
5	5,42	10,88	28,76	54,94
6	6,40	12,58	27,28	53,74
7	5,20	12,58	28,98	53,24
8	3,29	20,86	24,94	50,91
9	7,10	11,80	32,50	48,60
10	5,30	11,50	28,35	53,85
$\bar{M}$	6,02	13,53	28,93	51,35
dp	1,23	3,11	2,67	2,48

## TABELA VII

CROMATOGRAFIA DOS COMPOSTOS IODADOS BILIARES EM SEPHADEX G-25M (%)

GRUPO FENOBARBITAL

FRACÕES Rato nº	FRACÕES			
	I	II	III	IV
11	5,17	10,59	22,38	61,86
12	6,25	7,95	24,07	61,73
13	5,51	6,99	24,81	62,69
14	6,70	8,35	25,34	60,21
15	5,25	7,15	26,38	61,22
16	4,16	6,25	28,39	61,20
17	6,70	8,24	30,25	54,81
18	2,67	8,24	30,98	58,11
19	5,72	8,53	30,93	54,82
20	5,17	10,09	27,96	56,78
$\bar{M}$	5,27	8,24	27,15	59,34
dp	1,15	1,33	3,02	2,98



**FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-25 M DOS COMPOSTOS IODADOS BILIARES (ug de I<sub>2</sub>/100 ml bile)**

TABELA VIII

AVALIÇÃO QUANTITATIVA DE IODO TOTAL NAS FRAÇÕES OBTIDAS PELA  
CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-25M DA PILE (ug de I<sub>2</sub> /100 ml)

GRUPO CONTROLE

Rato nº	FRAÇÕES			
	I	II	III	IV
1	0,144 ✓	0,273	0,669	1,015
2	0,148	0,272	0,707	1,172
3	0,194	0,466	0,671	1,368
4	0,172	0,325	0,796	1,208
5	0,195	0,392	1,035	1,978
6	0,243	0,478	1,037	2,042
7	0,218	0,528	1,217	2,236
8	0,135	0,855	1,023	2,087
9	0,249	0,413	1,138	1,701
10	0,143	0,311	0,765	1,454
$\bar{M}$	0,184	0,431	0,906	1,626
dp	0,042	0,173	0,206	0,439

TABELA IX

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE IODO TOTAL NAS FRAÇÕES OBTIDAS PELA  
CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-251 DA BILE ( $\mu\text{g de I}_2/100 \text{ ml}$ )

GRUPO FENOBARBITAL

FRACÇÕES Rato nº	I	II	III	IV
	11	0,269	0,551	1,164
12	0,344	0,437	1,324	3,395
13	0,292	0,370	1,315	3,323
14	0,342	0,468	1,419	3,372
15	0,339	0,461	1,702	3,949
16	0,283	0,425	1,931	4,162
17	0,489	0,602	2,208	4,001
18	0,174	0,536	2,014	3,777
19	0,360	0,537	1,949	3,454
20	0,318	0,621	1,720	3,492
$\bar{N}$	0,321	0,501	<u>1,675</u>	<u>3,614</u>
dp	0,080	0,087	0,353	0,330

## TABELA X

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTES A AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE IODO TOTAL NAS FRAÇÕES OBTIDAS PELA CROMATOGRAFIA BILIAR EM SEPHADEX G-25M, ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS (REFERENTE TABELAS VIII E IX)

ESTATÍSTICA \ FRAÇÕES	FRAÇÕES			
	I	II	III	IV
F	3,61	4,562	2,938	1,769
t	1,057	0,716	5,949**	11,445***
GL	15	14	18	18
t*	2,1315	2,1448	2,100	2,100

t\* = t crítico para  $p = 0,05$       F\* = F crítico para  $p = 0,05$   
 \*\* = significante entre  $0,05 > p > 0,001$   
 \*\*\* = significante ao nível de  $p \leq 0,001$

do teste t de "Student" evidenciou-se existir diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos, havendo maior excreção biliar de  $T_4$  nos animais tratados com fenobarbital.

Constatou-se que as médias e desvios padrões dos valores referentes a fração IV (glicuronidato de  $T_4$ ) foram de  $1,626 \pm 0,439$   $\mu\text{g}$  de  $I_2/100$  ml para o grupo controle e  $3,614 \pm 0,330$   $\mu\text{g}$  de  $I_2/100$  ml para o grupo tratado. Verificou-se pelo teste t de "Student" para variâncias iguais que os dois grupos diferiam estatisticamente entre si ( $p \leq 0,0001$ ), ficando patente o incremento de 122% na eliminação biliar de  $T_4$ -G.

#### 4.6. Microscopia eletrônica.

Observando-se as fotografias, obtidas pela microscopia eletrônica na análise dos tecidos hepáticos, visualizam-se as estruturas celulares indicadas pelas setas (aumento de 36.000 x).

Nos tecidos dos animais do GCM, verifica-se a presença de cisternas achatadas de retículo endoplasmático rugoso (RER) e presença de retículo endoplasmático liso (REL) como é usual nos hepatócitos (Figura 7). Nos tecidos retirados dos animais do GFM, as mesmas estruturas apresentam-se mais desenvolvidas (Figura 8) o que indicaria proliferação do RER e REL.

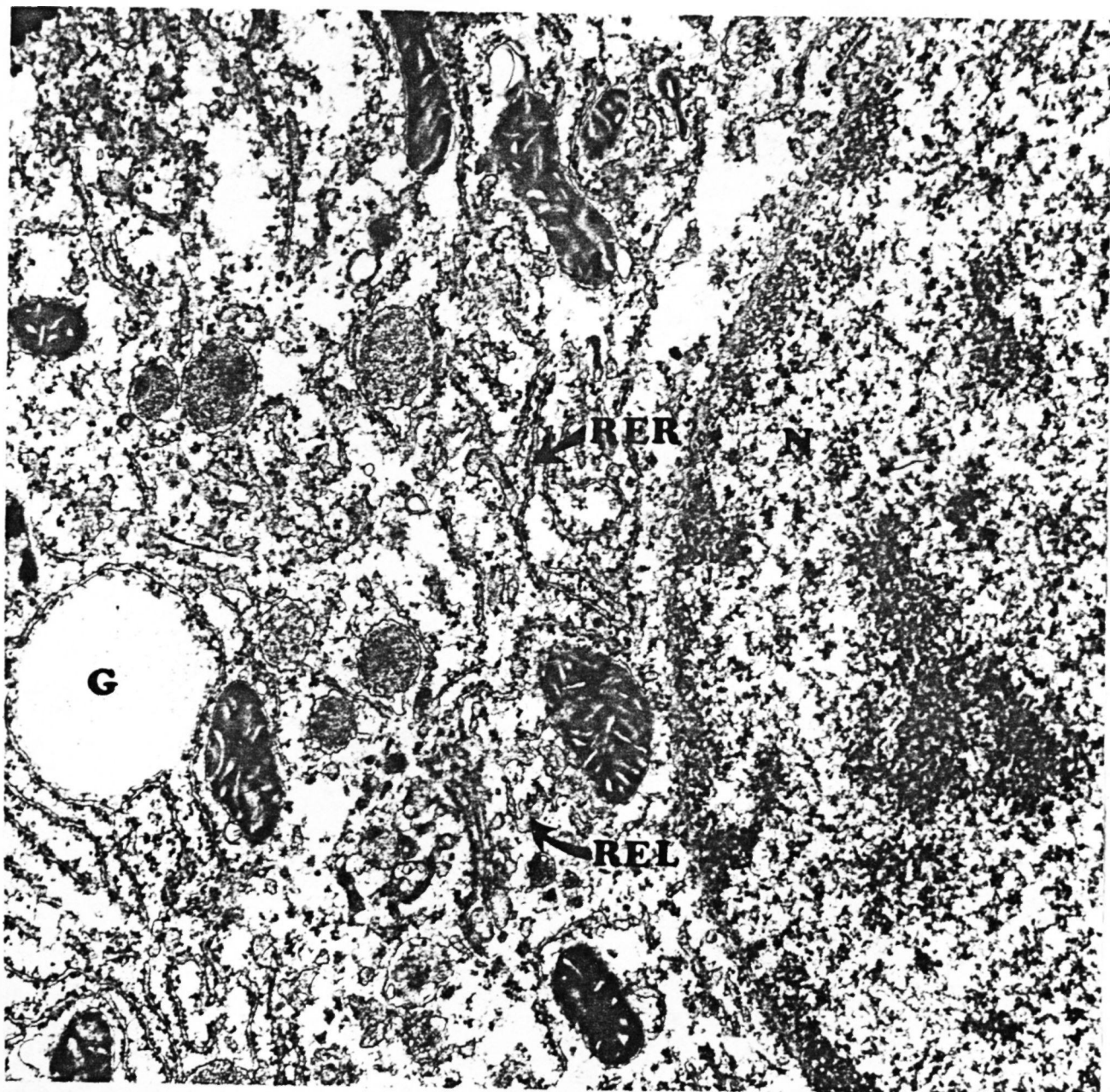


FIGURA 7 - ELETRON-MICROGRAFIA DE FÍGADO DE RATOS NORMAIS (GCM)

Visualizam-se as seguintes estruturas: N = núcleo; M = mitocôndria; G = gotícula de gordura; REL = retículo endoplasmático liso; RER = retículo endoplasmático rugoso.

Aumento = 36.000 x



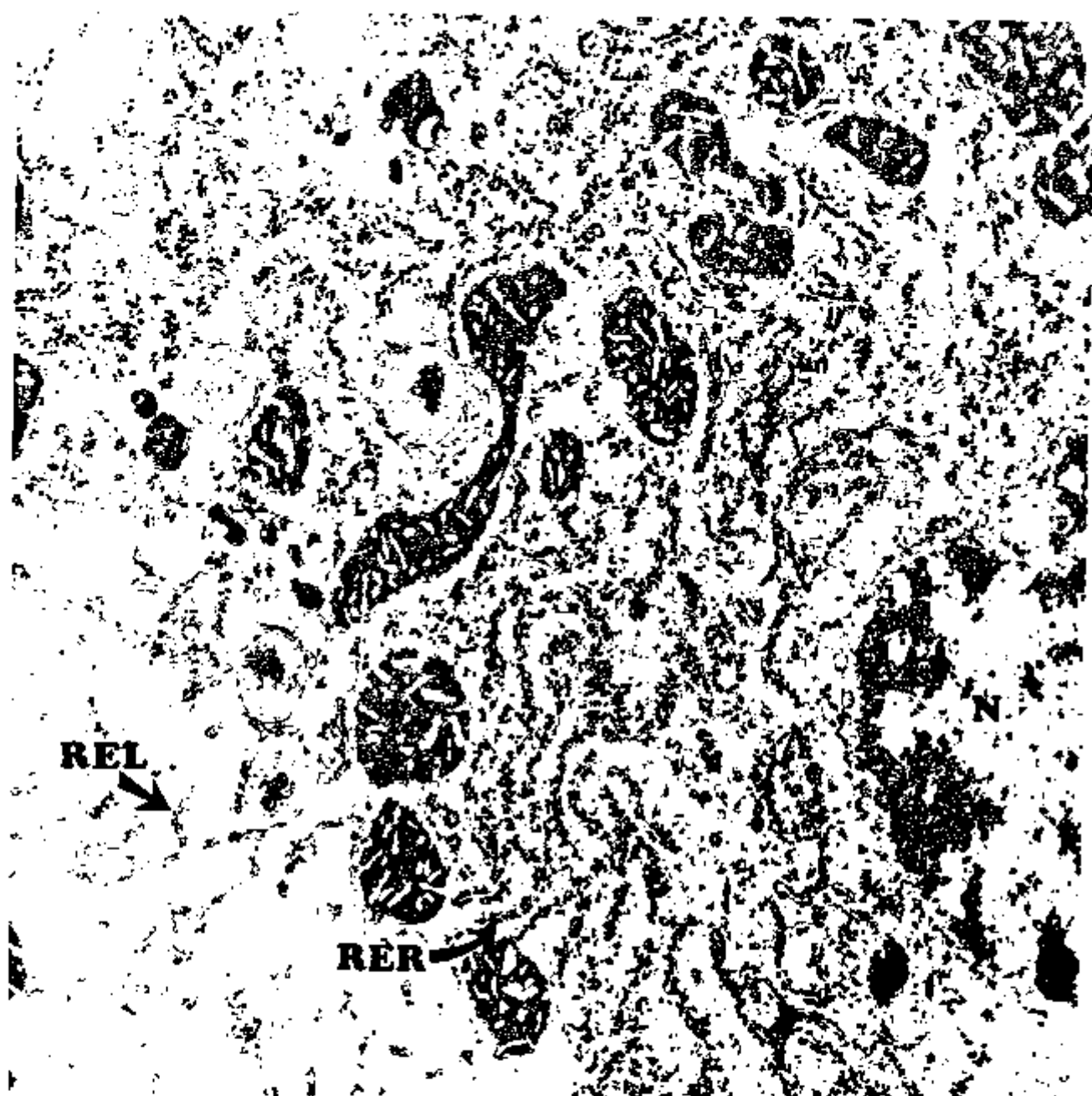


FIGURA 8 - ELETRON-MICROGRAFIA DE FIGADO DE RATOS TRATADOS COM FENOBARBITAL DURANTE CINCO DIAS (GFM)

Verifica-se maior desenvolvimento dos retículos liso e rugoso em comparação com as mesmas estruturas visualizadas na Figura 7. (N = núcleo; ! = mitocôndria; REL = retículo endoplasmático liso; RER = retículo endoplasmático rugoso)

Aumento = 35.000 x

## 5. DISCUSSÃO

São conhecidas várias publicações referentes à ação do fenobarbital sobre o tecido hepático e na excreção biliar dos hormônios tireoideanos. A maioria dos autores<sup>(3,6,15,30,32,42)</sup> submetem ratos fêmeas ou machos durante cinco dias a injeções intraperitoneais de fenobarbital sódico na dose de 100 mg/kg de peso. Esta metodologia, foi utilizada para induzir e verificar as alterações do sistema hepático pela referida droga. Os animais pertencentes ao grupo controle receberam, paralelamente, injeções i.p. de solução fisiológica, a fim de manter os dois grupos nas mesmas condições de "stress".

O acesso cirúrgico escolhido permitiu manter o animal vivo sob ótimas condições. Durante todo o decorrer da experiência, o abdômen permaneceu suturado expondo-se apenas uma cânula, que foi inserida no ducto biliar, o mais próximo possível do fígado para que não houvesse diluição da bile pelo suco pancreático<sup>(19,43)</sup>.

### 5.1. Peso dos animais e peso do fígado.

Visto que os dois grupos de animais, controle e tratado, não diferiram entre si quanto ao peso inicial, foram considerados como

pertencentes a um grupo homogêneo, a fim de poder se avaliar os parâmetros em estudo.

GOLDSTEIN<sup>(15)</sup> e PERTHELOT<sup>(4)</sup> encontraram em suas experiências, um acrêscimo de 15% de massa hepática em ratos que receberam fenobarbital durante cinco dias; entretanto, KLAASSEN<sup>(21)</sup> e HART<sup>(17)</sup>, submetendo animais ao mesmo tipo de tratamento, durante sete dias, verificaram um incremento de 25%. De acordo com BARKA<sup>(2)</sup> isto seria devido ao fenômeno de hipertrofia e não hiperplasia parenquimatosa.

CONNERY<sup>(9)</sup> vincula o aumento do peso do fígado à maior atividade enzimática microsomal, constatando um incremento de 35% no peso desse órgão.

Os dados experimentais do presente trabalho concordam com os da literatura, havendo aumento de 14% do peso de massa hepática nos ratos tratados com a citada droga.

## 5.2. Fluxo biliar.

O fluxo biliar é um importante parâmetro para determinação da velocidade de excreção de compostos na bile<sup>(5,16,22, 23,24,25, 29)</sup>. Nos ensaios com fenobarbital evidenciou-se um aumento tanto de fluxo biliar como de excreção de numerosos componentes biliares<sup>(15,17, 23,39)</sup>. ROBERTS E PLAA<sup>(39)</sup> sugerem que esse incremento seria paralelo a uma hipertrofia hepática, porém, KLAASSEN<sup>(23)</sup> verificou que esses acrêscimos não mantinham uma proporcionalidade, demonstrando um fluxo significativamente aumentado (50%) 24 horas após uma única dose de fenobarbital e, alcançando equilíbrio entre o segundo e sétimo dias de ad-

ministração; no entanto, o peso do fígado não se alterou significativamente nos primeiros dias, aumentando apenas 15 a 20% após o sétimo dia de tratamento.

Pelos resultados aqui apresentados, pode-se verificar um notável aumento do fluxo biliar (87%). Este dado, apesar de consideravelmente elevado, está em concordância com vários autores<sup>(4,15,39)</sup>.

### 5.3. Iodo ligado às proteínas séricas (PBI).

OPPENHEIMER<sup>(30,33)</sup> e BERNSTEIN<sup>(3)</sup> nas suas experiências em ratos, utilizando doses de fenobarbital de 100 mg/kg de peso durante cinco dias, não constatarem modificações significativas do PBI sérico; dados que concordam com os resultados obtidos no presente trabalho.

*Colarinho*  
Embora a iodoproteinemia não esteja alterada, a velocidade de secreção de T<sub>4</sub> encontra-se aumentada como foi verificado nas experiências de GILLESPIE<sup>(13)</sup>.

### 5.4. Iodo biliar total.

*25 mg - 500 g  
50 mg - 1500 g*

GOLDSTEIN e TAUROG<sup>(15)</sup> observaram em ratos tratados, durante cinco dias, com dose de fenobarbital de 50 mg/kg, um aumento na excreção biliar de <sup>131</sup>I acompanhado de incremento proporcional de fluxo, embora a concentração do radioisótopo permanecesse inalterada.

Nos resultados aqui apresentados, há um aumento do iodo total biliar e do fluxo, não existindo porém a proporcionalidade citada

por GOLDSTEIN e TAUROG (15). A provável causa desta diferença estaria na dose administrada, se fosse considerada a observação de KLAASSEN (21) sobre a resposta em função da dose.

#### 5.5. Cromatografia biliar em coluna de Sephadex G-25 M.

A filtração em gel de Sephadex, juntamente com a técnica dos traçadores radioativos, permite a separação dos compostos iodados numa só etapa, possibilitando assim, obtê-los num alto grau de pureza. Apesar dos problemas de decomposição e retenção da  $T_4$  no gel de Sephadex, esta técnica ainda apresenta maiores vantagens em relação aos métodos de LISSITZKY (26,27), CLARK (7) e HOCHMAN (18).

Quanto à composição da bile em relação aos compostos iodados, após administração de  $T_4$ - $^{125}I$ , foram obtidas quatro frações, sendo a quarta identificada como glicuronidato de tiroxina, concordando com os dados encontrados por IKEDA e col. (19).

#### 5.6. Tiroxina e glicuronidato de tiroxina.

OPPENHEIMER e col. (30,31,32,33,34), SCHWARTZ (41, 42) e BERNSTEIN (3) verificaram em suas experiências que o fenobarbital induz em ratos um aumento acentuado no compartimento de  $T_4$  hepático, resultante da proliferação do retículo endoplasmático liso. Para estes autores a eliminação acelerada do hormônio seria devida ao incremento de secreção biliar. Sugerem existir, também, um aumento no "turnover" de triiodotironina sérica, acompanhado de diminuição na concentração deste hor-

mônio, provocando um estímulo na secreção de TSH pela pituitária. Como consequência desse fenômeno, haveria um impulso na produção tireoideana de maior quantidade de hormônio com intuito de manter a disponibilidade periférica.

Calcula-se que esse impulso duplique a secreção glandular e estimule sua captacão de iodeto, estabelecendo um novo estado de equilíbrio, no qual, tanto a concentração hormonal sérica como aquela extra-hepática permaneceriam normais.

Desde que se postule que o fenobarbital aumenta a quantidade de sítios de ligação na fração microsomal, a relação concentração de  $T_4$ /sítios de ligação permaneceria inalterada, embora o compartimento hepático se encontre aumentado<sup>(34)</sup>.

A maior excreção biliar de  $T_4$  leva, possivelmente, a um incremento também fecal deste hormônio, como sugerem os dados de CAVALIERI<sup>(6)</sup>.

Na presente experiência, verificou-se que o grupo submetido ao fenobarbital apresentou maior desenvolvimento dos retículos endoplasmáticos liso e rugoso das células hepáticas, e um aumento de tiroxina biliar, o que concorda com a maioria dos autores supracitados. Estes dados mostram ainda, a existência de elevada conjugação hepática de  $T_4$ , fato não observado "in vivo" ou "in vitro" por GOLDSTEIN e TAUROG<sup>(15)</sup>.

A maior conjugação poderá ser explicada pelas alterações enzimáticas encontradas por SCHWARTZ<sup>(42)</sup> e CONNEY<sup>(9)</sup> em homogeneizados de fígados de ratos submetidos a ação do fenobarbital. Vários autores verificaram em experiências similares proliferação de REL e RER com pre

dominância deste último<sup>(12,38)</sup>, o que levaria a uma elevação dos níveis hepáticos da UDPGA-desidrogenase e glicuronil-transferase, responsáveis pela conjugação de T<sub>4</sub> com conseqüente aumento de glicuronidato de tiroxina.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados de nossas experiências permitem as seguintes conclusões:

1. Sob a ação do fenobarbital houve incremento significativo do <sup>peso</sup> fígado e do fluxo biliar.
2. Este incremento foi acompanhado de maior excreção de tiroxina-<sup>125</sup>I e de seu glicuronidato quando os animais recebiam este hormônio por via intraperitoneal. Não houve alteração da iodoproteinemia.
3. Contrastando com a literatura, o aumento na excreção hormonal e de seu metabolito foi devido, não só ao incremento do fluxo mas também à maior concentração destes compostos na bile.
4. A microscopia eletrônica das células hepáticas dos animais submetidos ao farmaco em questão mostrou aumento dos retículos endoplasmáticos liso e rugoso.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

apresentado, de acordo com o FNB <sup>66</sup>  
 vi da Associação Brasileira de Normas Técnicas  
 (World list of Scientific Periodical (1963)).

1. ALBERT, A. & KEATING JR., R.R. The role of the gastrointestinal tract, including the liver, in the metabolism of radiothyroxine. Endocrinology, Glendale, 51:427-43, 1952.
2. BARKA, T. & POPPER, H. Liver enlargement and drug toxicity. Medicine, Baltimore, 46:103-17, 1957.
3. BERNSTEIN, G.; ARTZ, S.A.; HASEN, J. & OPPENHEIMER, J.H. Hepatic accumulation of <sup>125</sup>I-thyroxine in the rat: augmentation by phenobarbital and chlordane. Endocrinology, Glendale, 82:406-9, 1968.
4. BERTHELOT, P.; ERLINGER, S.; CHUMEAUX, D. & PREAUX, A.M. Mechanism of phenobarbital-induced hyperchloresis in the rat. Am. J. Physiol., Boston, 219:809-13, 1970.
5. CALLAHAN, E.W. & SCHMID, R. Factors enhancing the biliary excretion of unconjugated bilirubin. Gastroenterology, Baltimore, 56:399, 1969.

6. CAVALIERI, R.R.; SUNG, L.C. & BECKER, C.E. Effects of phenobarbital on thyroxine and triiodothyronine kinetics in Graves'disease. J. Clin. Endocr. Metab., Springfield, 37:308-16, 1973.
7. CLARK, F.; GOLDSTEIN, G. & CRISPEL, K.R. Factors influencing dex-tran-gel filtration of serum and iodine-131 labeled L-thyroxine . J. nucl. Med., Chicago, 7:464-9, 1966.
8. CLAYTON, J.C.; FREE, A.A.; PAGE, J.E.; SOMERS, G.F. & WOOLLETT, E.A. Absorption and excretion of the mono-sodium salt of thyroxine labeled with radioactive iodine. Biochem. J., Liverpool, 46:598-4 , 1950.
9. CONNEY, A.H. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmac. Rev., Baltimore, 19:317-66, 1967.
10. DIXON, W.J. & MASSEY, F.J. Introduction to statistical analysis , New York, McGraw-Hill book Company, 3<sup>th</sup>, 1966.
11. FARRELL, L.P. & RICHMOND, M.H. A rapid method for the estimation of serum protein-bound iodine. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 6:620-3, 1961.
12. FOUTS, J.R. & ROGEPS, L.A. Morphological changes in the liver accom<sub>p</sub>panying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activi-

- ty by phenobarbital, chlordane, benzhyrene or methylcholanthrene in rats. J. Pharmac. exp. ther., Baltimore, 147:112-9, 1965.
13. GILLESPIE, F.C.; HARLAND, H.A. & ORR, J.S. A new technique for thyroxine secretion rate demonstrating the effect of phenobarbitone in rats. J. Physiol., London, 211(Suppl.):45P-47P, 1970.
14. GILLETTE, J.R. Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms in: E. Jucker, Progress in Drug Research. Basel and Stuttgart, Birkhauser, 6:11-73, 1963.
15. GOLDSTEIN, J.A. & TAUROG, A. Enhanced biliary excretion of thyroxine glucuronide in rats pretreated with benzyrene. Biochem. Pharmac., London, 17:1049-65, 1968.
16. GORESKY, C.A. & KLUGER, S.V. The relation between bile flow and the transport maximum for bilirubin in the dog. Gastroenterology, Baltimore, 56:398, 1969.
17. HART, L.G.; GUARINO, A.M. & ADAMSON, R.H. Effects of phenobarbital on biliary excretion of organic acids in male and female rats. Am. J. Physiol., Boston, 217:46-52, 1969.
18. HOCMAN, G. The use of Sephadex in the chromatography of thyroxine-containing compounds: a critique. J. Chromat., Amsterdam, 21:413-18, 1966.

19. IKEDA, E. Separação de compostos iodados biliares e fecais por filtração em Sephadex G-25M. Estudo do metabolismo entero-hepático da  $^{125}\text{I}$ -tiroxina. Rev. Ass. Med. Brasil., São Paulo, 19:131, 1973.
20. KENDALL, J.C. The physiologic action of thyroxine. Endocrinology, Glendale, 3:156, 1919.
21. KLAASSEN, C.D. Biliary flow after microsomal enzyme induction. J. Pharmac. exp. Ther., Baltimore, 168:218-23, 1969.
22. \_\_\_\_\_ & PLAA, G.L. Species variation in the metabolism, storage and excretion sulphobromophtalein. Am. J. Physiol., Boston, 213:1322-6, 1967.
23. \_\_\_\_\_ & PLAA, G.L. Hepatic disposition of phenoldibromphtalein disulfonate and sulfobromophtalein. Am. J. Physiol., Boston, 215:971-6, 1968.
24. \_\_\_\_\_ & PLAA, G.L. Studies on the mechanism of phenobarbital-enhanced sulphobromophtalein disappearance. J. Pharmac.exp.Ther. Baltimore, 161:361-66, 1968.
25. \_\_\_\_\_ & PLAA, G.L. Effect of carbon tetrachloride on the metabolism, storage and excretion of sulphobromophtalein. Toxic. appl. Pharmac., New York, 12:132-9, 1968.

26. LISSITZKY, S. & BISMUTH, J. Quantitative determination of the concentration of  $^{131}\text{I}$ -thyroxine and  $^{131}\text{I}$ -triiodothyronine in the serum by filtration on dextran gel (Sephadex). Clin. chim. Acta, Amsterdam, 8:269-76, 1963.
27. \_\_\_\_\_; BISMUTH, J. & ROLLAND, M. Séparation des composés iodés du sérum et de la thyroïde par filtration sur gel de dextrane (Sephadex). Clin. chim. Acta, Amsterdam, 7:183-9, 1962.
28. LUCIER, G.V. & McDANIEL, O.S. Alterations in rat liver microsomal and lysosomal  $\beta$ -glucuronidase by compounds which induce hepatic drug-metabolizing enzymes. Biochim. biophys. Acta, New York, 261:168-76, 1972.
29. O'MAILLE, E.R.L.; RICHARDS, T.G. & SHORT, A.H. Factors determining the maximal rate of organic anion secretion by the liver and further evidence on the hepatic site of action of the hormone secretion. J. Physiol., London, 186:424-38, 1966.
30. OPPENHEIMER, J.H. Interaction of drugs with thyroid hormone binding sites. Ann. N.Y. Acad. Sci., 226:333-40, 1973.
31. \_\_\_\_\_; BERNSTEIN, G. & SURKS, M.I. Increased thyroxine turnover and thyroidal function after stimulation of hepatocellular binding of thyroxine by phenobarbital. J. clin. Invest., Baltimore, 47:1399-406, 1968.

32. OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H.L.; SHAPIRO, H. C.; BERNSTEIN, G. & SURKS, M.I. Differences in primary cellular factors influencing the metabolism and distribution of 3,5,3'-L-triiodothyronine and L-thyroxine. J. clin. Invest., Baltimore, 49:1016-24, 1970.
33. \_\_\_\_\_; SHAPIRO, H.C.; SCHWARTZ, H.L. & SURKS, M.I. Dissociation between thyroxine metabolism and hormonal action in phenobarbital-treated rats. Endocrinology, Glendale, 88:115-9, 1971.
34. \_\_\_\_\_; SURKS, M.I. & SCHWARTZ, H.L. The metabolic significance of exchangeable cellular thyroxine. Recent Prog. Horm. Res., New York, 25:381-422, 1969.
35. ORRENIUS, S. & ERICSON, J.L.E. Enzyme-membrane relationship in phenobarbital induction of synthesis of drug-metabolizing enzyme system and proliferation of endoplasmic membranes. J. Cell. Biol., 28:181-98, 1966, Baltimore.
36. PAULINI, K.; GRIMMEL, K. & BENEKE, G. The relationship between phenobarbital-induced liver enlargement and "critical mass" hypothesis. Beitr. Path., Berlin, 142:129-36, 1971.
37. PLATT, V.D. & KATZENMEIER, U. Untersuchungen zur Frage der Induzierbarkeit lysosomaler Enzyme der Rattenleber durch Phenobarbital. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.), Aulendorf, 20:258-61, 1970.

38. REMMER, H. & MERKER, H.J. Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum: association with drug-metabolizing enzymes. Science, New York, 142:1657-8, 1963.
39. ROBERTS, R.J. & PLAA, G.L. Effect of phenobarbital on the excretion of an exogenous bilirubin load. Biochem. Pharmac., London, 16: 827-35, 1967.
40. SCHEFFÉ, H. Analysis of variance, New York, John Wiley and sons incorporated, 1959.
41. SCHWARTZ, H.L.; BERNSTEIN, G. & OPPENHEIMER, J.H. Effect of phenobarbital administration on the subcellular distribution of  $^{125}\text{I}$ -thyroxine in rat liver: importance of microsomal binding. Endocrinology, Glendale, 84:270-6, 1969.
42. \_\_\_\_\_; KOZYREFF, V.; SUPKS, M.I. & OPPENHEIMER, J.H. Increased deiodination of L-thyroxine and L-triiodothyronine by liver microsomes from rats treated with phenobarbital. Nature, London, 221: 1262-3, 1969.
43. TAUROG, A. Conjugation and excretion of the hormone. Brookhaven Symp. Biol., Upton, 7:111-36, 1954.
44. \_\_\_\_\_; BRIGGS, F.N. & CHAIKOFF, I.L.  $^{131}\text{I}$ -labeled L-thyroxine.

- I. An unidentified excretion product in bile. J. Biol. Chem., Baltimore, 191:29-34, 1951.
45. TAUROG, A.; BRIGGS, F.N. & CHAIKOFF, I.L. <sup>131</sup>I-labeled L-thyroxine  
II. Nature of the excretion products in bile. J. Biol. Chem., Baltimore, 194:655-68, 1952.
46. ZEIDENBERG, P.; ORRENIUS, S. & ERNSTER, L. Increase in levels of glucuronylating enzymes and associated rise in activities of mitochondrial oxidative enzymes upon phenobarbital administration in the rat. J. Cell. Biol., Baltimore, 32:528-31, 1967.