

EMIKO MURAMOTO

***ESTUDO DE ALGUNS ASPECTOS DO METABOLISMO DA TIROXINA
NA OBSTRUÇÃO BILIAR EXPERIMENTAL DE RATO***

**Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários
para obtenção do Título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS na Área de Fisiologia**

**SÃO PAULO
1978**

*João
Prof. Pirroni,
meus parabéns
es de ma
E. J. B.*

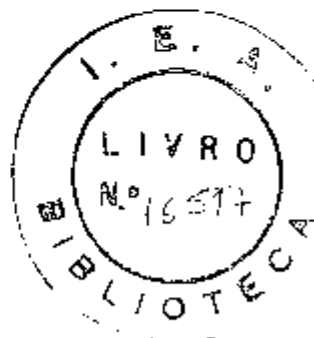
EMIKO MURAMOTO

ESTUDO DE ALGUNS ASPECTOS DO METABOLISMO DA TIROXINA NA OBSTRUÇÃO BILIAR EXPERIMENTAL DE RATO

Prof. Dr. Wilian Nicolau

Orientador

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS na Área de Fisiologia



SÃO PAULO

1978

Tese elaborada no Centro de Apli-
cações Biomédicas de Radioisóto -
pos e Radiações do Instituto de
Energia Atômica - São Paulo

AGRADECIMENTOS

Professores:

Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Dr. Lício Marques de Assis

Colegas:

Etsuko Ikeda de Carvalho

Josefa Paredes Villalobos

Irene Schwarz

Mariangela Macchione

Marycel Figols de Barboza

Paolo Bartolini

Somos profundamente agradecidos à colaboração inestimável de todos os colegas e amigos do Instituto de Energia Atômica que direta e indiretamente colaboraram neste trabalho.

Orientador:

Prof. Dr. Wilian Nicolau

ÍNDICE

	página
INTRODUÇÃO	1
PROPÓSITOS DO TRABALHO	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
1. Tratamento do material biológico	7
1.1. Soro	7
1.2. Urina	7
1.3. Fezes	7
1.4. Bile	8
2. Separação e identificação dos compostos iodados tireoidianos ...	8
2.1. Cromatografia por filtração em gel	8
2.1.1. Coluna cromatográfica	8
2.1.2. Preparo da coluna de Sephadex	9
2.1.3. Fraclonamento dos compostos iodados existentes no ma- terial biológico	9
2.2. Identificação das frações pelo método de cromatografia em pa- pel	10
ESQUEMA GERAL DA CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-25M	11
3. Identificação e determinação da pureza do glicuronidato de tiroxi	

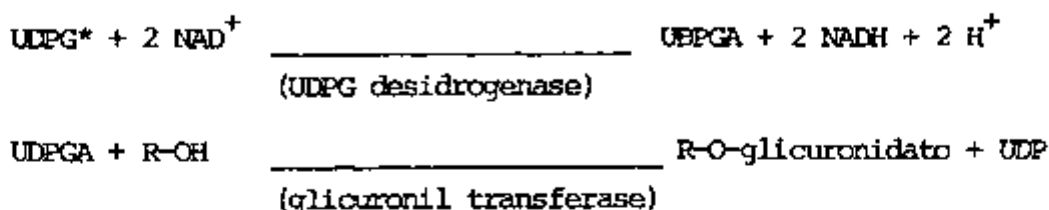
	página
na radioativo ($^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$)	12
3.1. Identificação do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$	13
3.2. Estudo da capacidade de ligação do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ às proteínas plasmáticas	13
4. Estimativa da capacidade da glândula tireóide	14
5. Estudo dinâmico do glicuronidato de tiroxina radioativo $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$	16
6. Análise estatística	18
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	48
RESUMO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

INTRODUÇÃO

O fígado influencia de várias maneiras e intensamente o metabolismo dos hormônios tireoidianos, tanto indiretamente, no seu transporte e distribuição (7,14), como nos fenômenos de conversão (2,6,9,24), conjugação, degradação e eliminação (13,20,23,24,28). É bem conhecido o papel da TBG ("Thyroxin binding globulin") no transporte hormonal (7,14,31). Produzida pelas células hepáticas, a sua concentração é influenciada pelas doenças que afetam difusamente este órgão. Embora, em última análise, nestas situações o eumetabolismo do indivíduo seja mantido por mecanismos de retro-regulação, a concentração sérica, a fração livre e alguns parâmetros da rotatividade hormonal encontram-se alterados (8,19,22,30,31). Além deste mecanismo, certas doenças hepáticas poderiam interferir também com o transporte, via aumento dos ácidos graxos que competiriam com as proteínas ligadoras dos hormônios tireoidianos (17).

A conversão hormonal, pela qual a tiroxina (T_4) é por monodesalogenação, transformada em triiodotironina (T_3), foi comprovada recentemente (6,9,16), embora este fato tenha sido aventado há muitos anos, já da descoberta deste hormônio triiodado (2,23). É nas células hepáticas que esta conversão é efetuada, podendo a T_4 seguir duas vias metabólicas: para T_3 ou para " T_3 reversa" (rT_3) seu isômero metabolicamente inativo (16,27). Distinguem-se os dois pela posição de um dos átomos de iodo na cadeia difenil-éter e o estudo mais pormenorizado deste evento foge ao escopo desta introdução. Sabe-se, no entanto, que aqui também, nas alterações hepáticas ou em algumas situações de queda de hididez, há uma maior produção de rT_3 em detrimento da T_3 (9).

A conjugação hepática representa, talvez, o mecanismo principal de metabolização dos hormônios tireoidianos. A T_4 e T_3 são submetidas, nos hepatócitos, à sulfo e à glicuroconjugação (3,13,24,25,28). Para a glicuroconjugação, que interessa ao presente trabalho, tem-se esquematicamente:



Acumulados, avidamente, pelo fígado, os hormônios tireoidianos são conjugados e eliminados através do sistema hepato-biliar, atingindo o duodeno, onde vão ser submetidos a desconjugação pela beta-glicuronidase entérica. Liberados em parte, podem ser reabsorvidos e retornar à corrente circulatória, instituindo-se então um ciclo entero-hepático (13,18,28).

Sob o ponto de vista da sua degradação hepática os hormônios tireoidianos podem ser desaminados, dando origem a derivados acéticos, propiônicos e pirúvicos, alguns dos quais têm sido estudados quanto à sua potência metabólica relativa e a sua capacidade de participar dos mecanismos de retro-regulação. Assim descrevem-se os ácidos triiodo e tetraiodoacéticos, propiônicos e pirúvicos (15,20).

Outros caminhos degradativos constituem-se na descarboxilação, desalogenação (5,20,24) e do rompimento da cadeia difenil-éter (20).

*UDPG = uridina-difosfato-glicose; NAD = nicotinamida-adenina-dinucleotídeo; UDPGA = ácido uridina difosfoglicurônico; NADH = nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido; UDP = uridina-difosfato; R-OH = composto a ser glicuronizado.

Assim os componentes biliares iodados são múltiplos e a abordagem do seu estudo complexa e descritiva.

Sob o ponto de vista fisiológico, não se sabe com segurança se alguns deles têm representação na economia do organismo.

A literatura é relativamente escassa sobre o estudo do metabolismo dos hormônios tireoidianos nas alterações hepáticas (5,23,25,26,27,31). Duas condições básicas podem ser estudadas. Uma em que existe uma alteração difusa parenquimatosa (5,30), cujo grau máximo seria a cirrose e outra condição que é estudada neste trabalho, a obstrução das vias biliares (23,25). Nesta última, nos períodos iniciais, a função deverá estar preservada pelo menos quanto à glicuroconjugação. Assim, nesta situação, os hormônios retornariam à corrente circulatória, tanto "in natura" como sob aquela forma metabolizada. Não há, pelo menos na revisão feita, nenhum trabalho da literatura que tenha estudado a composição qualitativa e quantitativa dos compostos iodados nesta situação. Sabe-se, no entanto, que os glicuroconjugados retrodifundem-se para a corrente circulatória (23) após ligadura experimental do colédoco. Assim, Roche e col., em um trabalho singular, conseguiram por técnicas de cromatografia em papel, identificar os glicuroconjugados em plasma de ratos com ligadura experimental do colédoco. Estes compostos não foram encontrados em condições normais. Os outros estudos restringem-se a dados morfológicos, à captação de ^{131}I e à avaliação da iodemia proteica nesta situação (28,32). Telkkä e col. (29) verificaram, em ratos, que a obstrução biliar levava a um aumento da substância colóide e diminuição da altura das células tireoidianas, sugerindo uma hipofunção glandular. Segundo os autores, estes dados refletiriam uma diminuição funcional devido à retenção de ácidos biliares derivados do colesterol, "cuja ação depressora sobre a tireóide seria superponível àquela dos estrógenos". Scazziga e col. (25), em 10 pacientes com

icterícia obstrutiva, verificaram aumento da iodemia protéica e conservação da normalidade de captação de ^{131}I pela tireóide.

PROPÓSITOS DO TRABALHO

De posse de técnicas mais refinadas e atuais para a separação dos compostos iodados tireoidianos por coluna de gel de Sephadex o presente trabalho se propõe a estudar:

1. A separação e identificação por cromatografia em gel de Sephadex G-25M, do glicuronidato de tiroxina radioativo ($^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$) após a administração de $^{125}\text{I-T}_4$ em ratos com obstrução biliar mecânica experimental.
2. A contribuição dos vários componentes séricos, urinários e fecais identificáveis nesta situação.
3. As alterações funcionais tireoidianas decorrentes das modificações metabólicas estabelecidas.
4. A cinética do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ injetado em ratos normais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos adultos normais, da raça Wistar, mantidos no biotério do IEA, sob dieta comum, com peso variando de 200 a 250 g.

Os animais foram anestesiados com éter, isolando-se cuidadosamente o duto biliar e fazendo-se sua ligadura com fio de nylon duplo em três regiões do colédoco: junto ao hilo do fígado, na porção média e próximo à desembocadura do mesmo no duodeno.

Após 24 horas de obstrução, os animais receberam 150 μCi de radiotiroxina ($^{125}\text{I-T}_4^*$ - atividade específica de 70 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), por via intraperitoneal. Simultaneamente um grupo de animais intactos recebeu a mesma dose. A $^{125}\text{I-T}_4$ foi injetada por esta via para que fosse absorvida pela circulação portal, entrando em contato direto com o fígado, enquanto, por via subcutânea, seria absorvida após entrar na circulação sistêmica.

Os animais, assim pré-tratados, foram isolados em gaiolas metabólicas para coleta (24 horas) de urina e fezes. Decorrido o tempo acima citado, fez-se a sangria por punção cardíaca, separando-se o soro por centrifugação.

Do grupo intacto, alguns animais foram separados, alea-

* $^{125}\text{I-T}_4$ - marcada no Centro de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e Radiações do Instituto de Energia Atômica - SP.

toriamente, para proceder-se à coleta da bile. Estes, foram anestesiados com pentobarbital sódico a 3% no volume de 0,1 ml/100g de peso e submetidos à cirurgia para inserção de tubo de polietileno de 0,5 mm de diâmetro interno, no conduto biliar, bem próximo ao fígado, a fim de evitar a diluição da bile com o suco pancreático. Os materiais biológicos coletados (soro, bile, urina e fezes) foram mantidos a 4°C.

1. Tratamento do material biológico

1.1. Soro

1.1.1. Sem tratamento

1.1.2. Submetido a proteólise enzimática com pronase*, pH de 8,5 com NaOH - IN, na proporção de 10 mg/ml, durante 18 horas a 37°C. Decorrido este período de tempo o pH foi ajustado a 7,4 com HCl - IN e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para posterior análise. Este procedimento visava liberar os compostos iodados das proteínas transportadoras e torná-los livres para serem identificados.

1.2. A urina foi utilizada sem tratamento prévio

1.3. Fezes

Foram lavadas em água corrente para eliminar possíveis contaminações com a urina. Este tratamento não deve remover atividade significativa do material ⁽³⁰⁾. Após a homogeneização, foram acidificadas a pH 2 com HCl - IN e extraídas três vezes com igual volume de n-butanol, ajustando-

*pronase - procedente do Laboratório Calbiochem - Los Angeles - Califórnia.

se o pH em cada extração. Reunidas as fases butanólicas, elevou-se o pH a 10 com NaOH 10% para evitar a desalogenação dos compostos iodados. Terminado o processamento, a amostra foi evaporada até a secagem em temperatura ambiente, sob corrente de nitrogênio. O resíduo seco foi redissolvido com 3 ml de água destilada, ajustado o pH a 7,4 com HCl - 1N e centrifugado durante 10 minutos com intuito de separar o sobrenadante.

1.4. Bile

1.4.1. Sem tratamento

1.4.2. Submetida a hidrólise enzimática com pronase, seguindo-se a mesma técnica utilizada para o soro.

2. Separação e identificação dos compostos iodados tireoidianos

2.1. Cromatografia por filtração em gel

Em todo procedimento cromatográfico utilizou-se o método descrito por Lissitzky e col. (21), modificado por Ikeda e col. (18).

2.1.1. Coluna cromatográfica

Coluna de vidro de 40 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro interno com a extremidade inferior afunilada, adaptada com tubo de latex com pinça e pipeta de Pasteur para controle do fluxo de saída do eluído. Na parte inferior da coluna colocou-se lã de vidro para a retenção do gel, a seguir, ela foi fixada em posição vertical para o processamento cromatográfico.

2.1.2. Preparo da coluna de Sephadex

Após a pesagem de 35g de Sephadex G-25M* acrescentou-se por agitação 120 ml de água destilada. Para obter um entumescimento homogêneo o gel foi mantido por 24 horas a 4°C. No momento de uso, os grãos finos que permaneceram no sobrenadante foram desprezados. O gel previamente inchado foi entornado cuidadosamente pela parede da coluna contendo água destilada até a metade da sua altura e a saída aberta em fluxo lento para conseguir boa homogeneidade e evitar a formação de bolhas. Quando a suspensão do gel atingiu 20 cm de altura, protegeu-se a superfície da coluna com um disco de papel de filtro de igual diâmetro. Esgotado o líquido em excesso, equilibrou-se a coluna percolando-se tampão TRIS-HCl** 0,05M a pH 7,4, até que o líquido de saída apresentasse o mesmo pH do tampão. O fluxo foi controlado para uma velocidade de 1 ml/min.

2.1.3. Fracionamento dos compostos iodados existentes no material biológico

Um volume adequado da amostra (soro, urina, bile ou extrato fecal) foi depositada sobre o leito do gel. As quantidades aplicadas foram sempre menores que 5 ml. O fracionamento foi iniciado após a penetração total da amostra, sendo a parede da coluna lavada por três vezes com 2 ml de tampão de eluição TRIS-HCl a pH 7,4. Durante a percolação, no total de 80 a 120 ml, o fluxo foi controlado às custas da pressão exercida pelo líquido sobre o gel. Esgotado o tampão, introduziu-se 100 ml de amilol (previamente equilibrado com igual volume de $\text{NH}_4\text{OH} - 2\text{N}$). Efetuou-se o

*Sephadex G-25M - procedente de Pharmacia-Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden.

**TRIS = TRIS (hidroximetil) aminometano - Merck.

mesmo processamento com 120 ml de $\text{NH}_4\text{OH} - 2\text{N}$. Terminada a eluição, a radioatividade de cada tubo (contendo 5 ml) foi detectada em cintilador automático tipo "poço" dotado de cristal de NaI(Tl) *. Construiu-se o gráfico em papel milimetrado, tendo no eixo das abscissas os números das frações coletadas e no das ordenadas as contagens respectivas, expressando-se a proporção relativa de cada pico em termos de porcentagem da contagem total.

2.2. Identificação das frações pelo método de cromatografia em papel

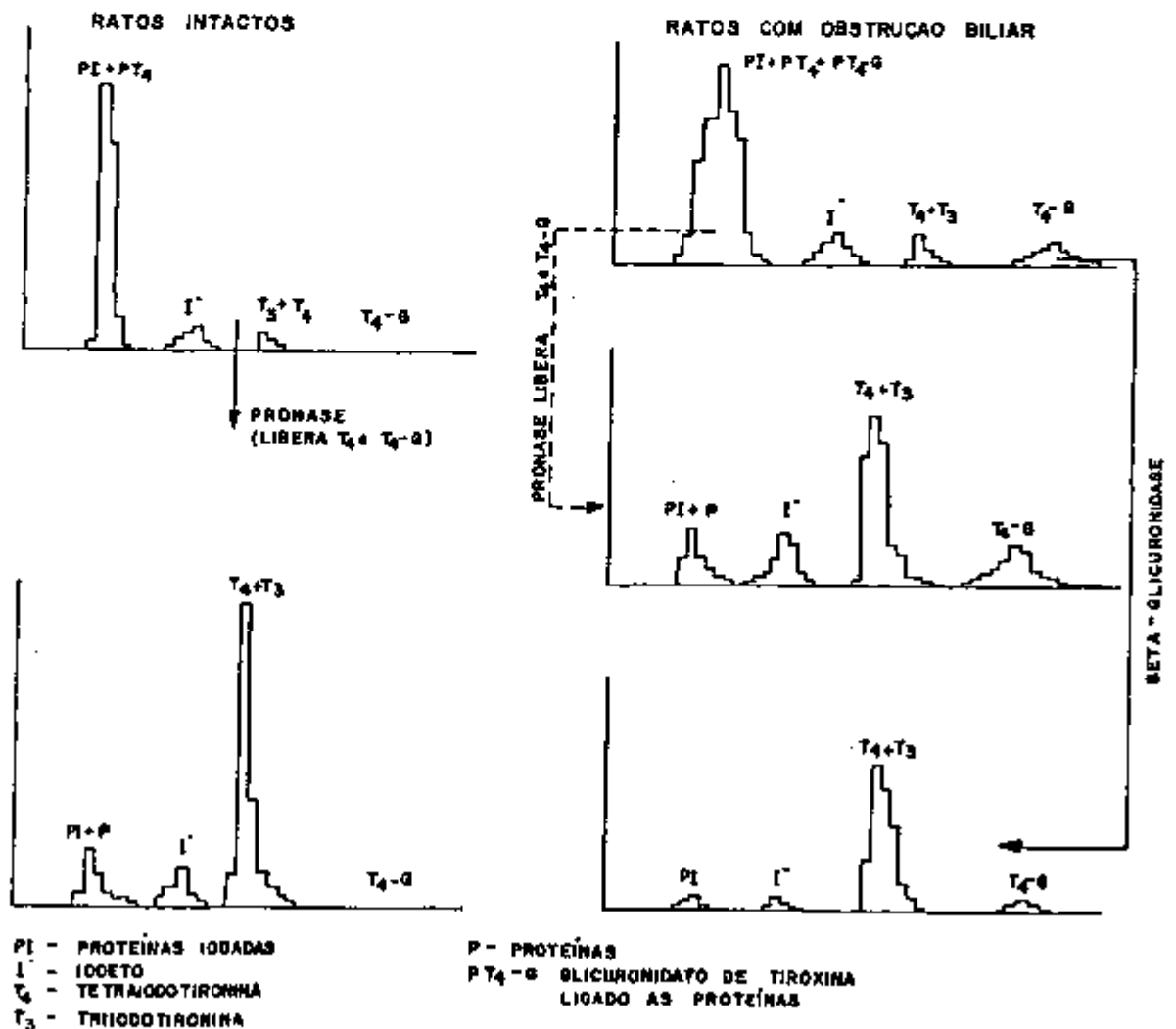
A identificação das frações, previamente obtidas por filtração em gel de Sephadex, foi realizada pela análise cromatográfica por partição. Utilizou-se papel Whatman 3 MM** em três sistemas de solventes: n-butanol- $\text{NH}_4\text{OH} - 2\text{N}$ (1:1); n-butanol-ácido acético-água (4:1:5) e 2,4,6-colidina-água (35:100) em ambiente de NH_4OH .

Para cada sistema, os componentes foram colocados na proporção acima citada, em funil de separação e após a saturação do solvente orgânico com solução aquosa, foram deixados em repouso para estabilização. A fração butanólica serviu como fase móvel e a aquosa como estacionária. No sistema em que foram utilizadas colidina e água, estas serviram de fase móvel e o NH_4OH , colocado na parte inferior da cuba, serviu de fase estacionária.

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

**Papel Whatman - Whatman England by W. & R. Balston Ltda.

ESQUEMA GERAL DA CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-25M
(SORO, URINA & BILE)



Os amino-ácidos* não radioativos, MIT, DIT, T₃ e T₄, assim como o iodeto de sódio, foram utilizados para identificação e localização dos picos obtidos por filtração em gel nos respectivos sistemas de solventes. Uma amostra de cada fração, num volume de 0,1 a 0,2 ml foi cromatografada em conjunto e paralelamente com os padrões.

Na cuba cromatográfica, contendo a fase estacionária, colocou-se o cromatograma, a fim de saturá-lo com o meio. Através de um orifício existente na parte superior, acrescentou-se o solvente, evitando desta forma, o rompimento do equilíbrio previamente estabelecido com a fase estacionária. Após o desenvolvimento, que variou de 20 a 24 horas, o cromatograma foi retirado e secado em temperatura ambiente.

Fez-se a revelação por meio de reações químicas, com cloreto de paládio a 10%, para identificação e localização do iodeto e reativo de Pauly (18) para amino-ácidos iodados. Com auxílio de jato de ar frio, procedeu-se à secagem dos cromatogramas, que foram cortados em tiras de 1 cm de largura, para estimar-se a radioatividade em contador automático tipo "pogo". Os gráficos foram traçados em papel milimetrado, sendo lançados no eixo das abcissas os segmentos (cm) e no eixo das ordenadas as contagens. Os resultados de cada pico foram expressos em termos de porcentagem da contagem total.

3. Identificação e determinação da pureza do glicuronidato de tiroxina radioativo (¹²⁵I-T₄-G).

*MIT (moniodotirosina) e DIT (diiodotirosina) - Nutritional Biochemicals Corporation - Cleveland - Ohio. T₄ e T₃ - Sigma Chemical Company - USA.

Com o intuito de se estudar o comportamento biológico do T_4G^* , fez-se a sua identificação por hidrólise enzimática e determinação da pureza por métodos cromatográficos.

3.1. Identificação do $^{125}I-T_4-G$

3.1.1. Uma fração atribuída ao $^{125}I-T_4-G$, proveniente do soro de rato com obstrução biliar, foi submetida a proteólise enzimática, visando a desconjugação do ácido glicurônico. Uma alíquota de 3 ml foi incubada com 5.000 U.I. de beta-glicuronidase bovina** a pH 4,5 tampoadada com acetato de sódio pH 4,5 a 37°C por 18 horas. A seguir, ajustou-se o pH a 7,6 com NaOH - 1N e por centrifugação, separou-se o sobrenadante, que foi cromatografado por filtração em gel de Sephadex G-25M, conforme descrito no item 2.1.

3.1.2. Identificação pelo método de cromatografia em papel

A fração de $^{125}I-T_4-G$ foi analisada pelo método cromatográfico em papel, utilizando-se a mesma técnica descrita no item 2.2. Na falta de padrão de T_4-G , a sua localização no cromatograma foi estimada de acordo com aquela citada na literatura.

3.2. Estudo da capacidade de ligação do $^{125}I-T_4-G$ às proteínas plasmáticas

*Embora se saiba que a $^{125}I-T_4$ possa ser desalogenada e o produto resultante (T_3), conjugado ao ácido glicurônico (T_3-G), usaremos neste trabalho somente a sigla T_4-G , para nos referirmos ao IV pico.

**Beta-glicuronidase bovina - procedente da General Diagnostic Division, W. Chilcott Division - Morris Plain, New Jersey, USA.

A fim de se determinar a afinidade ligadora do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ às proteí-
nas séricas, realizaram-se os seguintes experimentos:

3.2.1. Acrescentaram-se a 1 ml de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, marcado endogenamente,
2 ml de soro de rato normal. A mistura foi incubada a 37°C
por 18 horas. Passado este período pré-estabelecido, percolou-se o materi-
al através da coluna de Sephadex G-25M, equilibrada com tampão TRIS-HCl a
pH 7,4, seguindo-se a mesma metodologia descrita anteriormente no item
2.1.

3.2.2. Para estabelecer uma proporcionalidade entre as concentra-
ções dos constituintes iodados tireoidianos livres e liga-
dos às proteínas transportadoras, houve necessidade de liberá-los destas,
submetendo-as à ação proteolítica para poder quantificá-los. Com este in-
tuito, fez-se uma incubação a 37°C (com pronase, na proporção de 10mg/ml,
ajustando-se o pH a 8,5 com NaOH - 1N durante 18 horas) dos soros e do pi-
co I (figura 1) provenientes de ratos normais e com obstrução biliar. Ter-
minada a hidrólise, o pH do material foi ajustado a 7,4 e submetido a cen-
trifugação. Posteriormente, fez-se a separação dos compostos iodados exis-
tentes no sobrenadante pela filtração em Sephadex G-25M, assegurando as
mesmas condições experimentais anteriores (item 2.1.)

4. Estimativa da atividade da glândula tireóide

A atividade glandular na obstrução biliar pôde ser determinada através
da sua capacidade de concentração e de organificação do radioiodo circulan-
te. Administrou-se em cada animal, 1 μCi de $^{125}\text{I}^*$ por via intraperitoneal,
tanto no grupo controle, como naquele com obstrução biliar. Estes animais

* ^{125}I - procedente da New England Nuclear, Boston.

foram divididos em dois subgrupos:

4.1. O primeiro subgrupo foi sacrificado, após 24 horas. A glândula tireóide foi removida, fazendo-se uma incisão na altura do pescoço, isolando-a cuidadosamente e cortando a traquéia onde se encontra aderida à tireóide. Evitou-se qualquer contaminação que pudesse interferir posteriormente na detecção da sua radioatividade. Cada glândula foi colocada, imediatamente, em tubo especial contendo 1 ml. de solução fisiológica e a atividade do radioiodo determinada no cintilador gama tipo "poço". Concomitantemente, fez-se a leitura do padrão preparado de uma alíquota da dose administrada, obedecendo-se sempre às mesmas características geométricas de contagem. Os resultados foram expressos em por cento da dose administrada.

4.2. Determinação do radioiodo ligado a proteínas séricas ($PB^{125}I$)

Após 48 horas da administração do ^{125}I , os animais do segundo subgrupo foram anestesiados com éter, para a coleta da amostra sanguínea por punção cardíaca e o soro separado por centrifugação. Estes foram destinados a avaliar a concentração isotópica dos componentes iodados circulantes. A fração hormonal, marcada pelo radioiodo, depois de organificada e secretada na circulação pela tireóide, foi detectada utilizando-se o método cromatográfico de troca iônica.

A estimativa do $PB^{125}I$ é preferivelmente executada após 48 horas, tempo no qual 70 a 90% da radioatividade encontra-se ligada à fração proteica.

Utilizou-se uma coluna de polietileno de 1,2 cm de diâmetro interno por 6,5 cm de altura, tendo a parte inferior afunilada, com um orifício

de 1 mm de diâmetro na extremidade. No terminal, colocou-se lã de vidro a fim de se evitar o escoamento do Amberlite* (resina trocadora aniônica, na forma clorídrica), que foi colocada até a altura de 2 cm e lavada por duas vezes com 5 ml de solução fisiológica. A separação foi feita pela afinidade com os grupos iônicos, que são parte integrante da resina. Percolaram-se através da coluna 2 ml de soro; após seu esgotamento, lavou-se duas vezes com 1,5 ml de solução fisiológica. O eluido foi recolhido em tubo especial e o volume completado a 5 ml com água destilada. A atividade foi determinada e comparada com o padrão, preparado de uma alíquota da dose administrada. O resultado foi expresso em por cento por litro em relação à dose.

5. Estudo dinâmico do glicuronidato de tiroxina radioativa - $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$

5.1. Obteve-se o glicuronidato de tiroxina, utilizando-se o método de marcação por síntese biológica do soro de ratos com icterícia obstrutiva experimental, provocada pela ligadura do conduto biliar. A estes animais administraram-se 150 μCi de $^{125}\text{I-T}_4$ por via intraperitoneal. Após submeter o soro a uma hidrólise enzimática com pronase, a fração de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ foi isolada por filtração em gel de Sephadex G-25M.

Após a medida da atividade, os tubos contendo eluidos, referente a glicuronidato de tiroxina (fração IV), foram reunidos em um só frasco, desprezando-se as frações iniciais e finais de atividade radioisotópica menor. Em seguida, o material foi liofilizado e o resíduo redissolvido em volume de 1 ml, com solução salina a 0,9%. Do liofilizado, retirou-se uma alíquota para confirmar a sua pureza, utilizando-se os métodos cromatográficos convencionais.

*Amberlite IRA 410 - Procedência Geel

A substância foi considerada quimicamente pura, após o fracionamento, identificação e determinação quantitativa pelos métodos cromatográficos aqui citados.

5.2. Determinação da curva de decaimento biológico do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$

Para este propósito, utilizaram-se ratos machos intactos, pesando cerca de 250 a 300 g, mantidos sob dieta comum.

Os animais anestesiados com pentobarbital sódico a 3%, num volume de 0,1ml/100g de peso, foram submetidos à cirurgia, para cateterização do duto biliar, fazendo-se um pequeno corte na região média do colédoco e inserindo por esta via um tubo de polietileno de 0,5 mm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento. A cânula foi introduzida, cuidadosamente, bem próxima ao fígado e presa com linha de algodão em três regiões, a fim de evitar o seu deslocamento. Fez-se a sutura da parede abdominal dos animais, deixando externamente uma parte do tubo para a coleta da bile, que deveria fluir normalmente através da cânula.

Aos animais, assim preparados, administrou-se intraperitonealmente 0,5ml de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, anteriormente obtido. Imediata e simultaneamente iniciou-se a coleta das amostras de bile e sangue (este em tubo heparinizado), em intervalo de tempo pré-determinado, de 15 em 15 minutos, até completar três horas. Foram determinadas as radioatividades nas amostras (100 μl) do plasma e da bile, de diversos tempos, no contador automático tipo "poço".

As curvas de decaimento radioativo do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ da bile e do plasma foram obtidas, lançando em papel semilogarítmico, no eixo da ordenada, as contagens das amostras e no da abscissa, o tempo em que estas foram coletadas.

A análise das curvas foi feita com auxílio do computador, utilizando sistema de programa SAAM-23.

5.3. Com intuito de se aquilatar o grau de desconjugação do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, injetado em ratos intactos, realizaram-se análises cromatográficas em papel da bile (coletada a cada 15 minutos) e por filtração em gel de Sephadex (amostra biliar de 2:30 horas). A separação dos componentes iodados, foi feita de acordo com as técnicas anteriormente mencionadas (2.1. e 2.2.).

6. Análise estatística

6.1. Cálculo da variância

A correlação dos dados obtidos nos grupos em estudo, foi feita através do cálculo de variância do teste $F^{(10)}$, aplicando-se a seguinte fórmula:

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

onde:

S_1 = desvio padrão de maior valor

S_2 = desvio padrão de menor valor

Quando o F encontrado foi menor que o F crítico (variâncias iguais), estimou-se a significância da diferença pelo teste t de "Student"⁽¹⁰⁾, representado pela fórmula:

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

$$GL = n_1 + n_2 - 2$$

onde:

n_i = números de animais

\bar{Y}_i = valor médio

s = variância referente ao valor \bar{Y}_i

S_i = desvio padrão relativo ao Y_i

GL = graus de liberdade

Quando o F encontrado foi maior que o F crítico (variâncias desiguais), aplicou-se o teste respectivo, utilizando-se a fórmula:

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

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

onde:

n_i = número de animais

\bar{Y}_i = valor médio

S_i = desvio padrão relativo dos \bar{Y}_i

f = graus de liberdade

6.2. Análise da curva de decaimento do glicuronidato de tiroxina radioativa - $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$

O estudo foi realizado com auxílio do computador, utilizando-se o programa SAAM-23⁽⁴⁾, modelo dirigido para análise cinética que permite a integração das informações avaliáveis dos dados experimentais, obtidos em aplicações biomédicas. A estimativa inicial foi feita correlacionando as contagens das frações radioativas removidas do sistema (presente no plasma e bile) por unidade de tempo.

RESULTADOS

Separação cromatográfica por filtração em gel de Sephadex G-25M, realizada no soro, urina e fezes de ratos com icterícia experimental por obstrução das vias biliares e em animais controle, após 24 horas da administração intraperitoneal de $^{125}\text{I-T}_4$

Os picos resultantes da eluição, foram identificados por análise cromatográfica de partição em papel, em conjunto e paralelamente com aminoácidos iodados não radioativos. Pela ordem cronológica da eluição, como estão demonstrados nas figuras 1, 2, 3 e 4 os picos foram caracterizados como sendo:

1. Proteínas iodadas (pico I) - iodeto (pico II) e tirosinas, se existentes, eluídos sucessivamente em tampão TRIS-HCl - pH 7,4.
2. Tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) (pico III), eluídas com amilol saturado com $\text{NH}_4\text{OH} - 2\text{N}$.
3. Glicuronidato de T_4 (pico IV), eluído com $\text{NH}_4\text{OH} - 2\text{N}$.

Pelos dados obtidos, pode-se verificar que, diferentemente dos normais, os animais icterícos apresentam em soro proteolizado com pronase (figura 2B), uma quantidade de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ de $15,88 \pm 3,81\%$ (tabela I). Concomitantemente (tabela II, figura 3B) houve, nestes animais, eliminações por vias urinárias, de proporções grandes de $^{125}\text{I-T}_4$ ($8,26 \pm 2,96\%$)

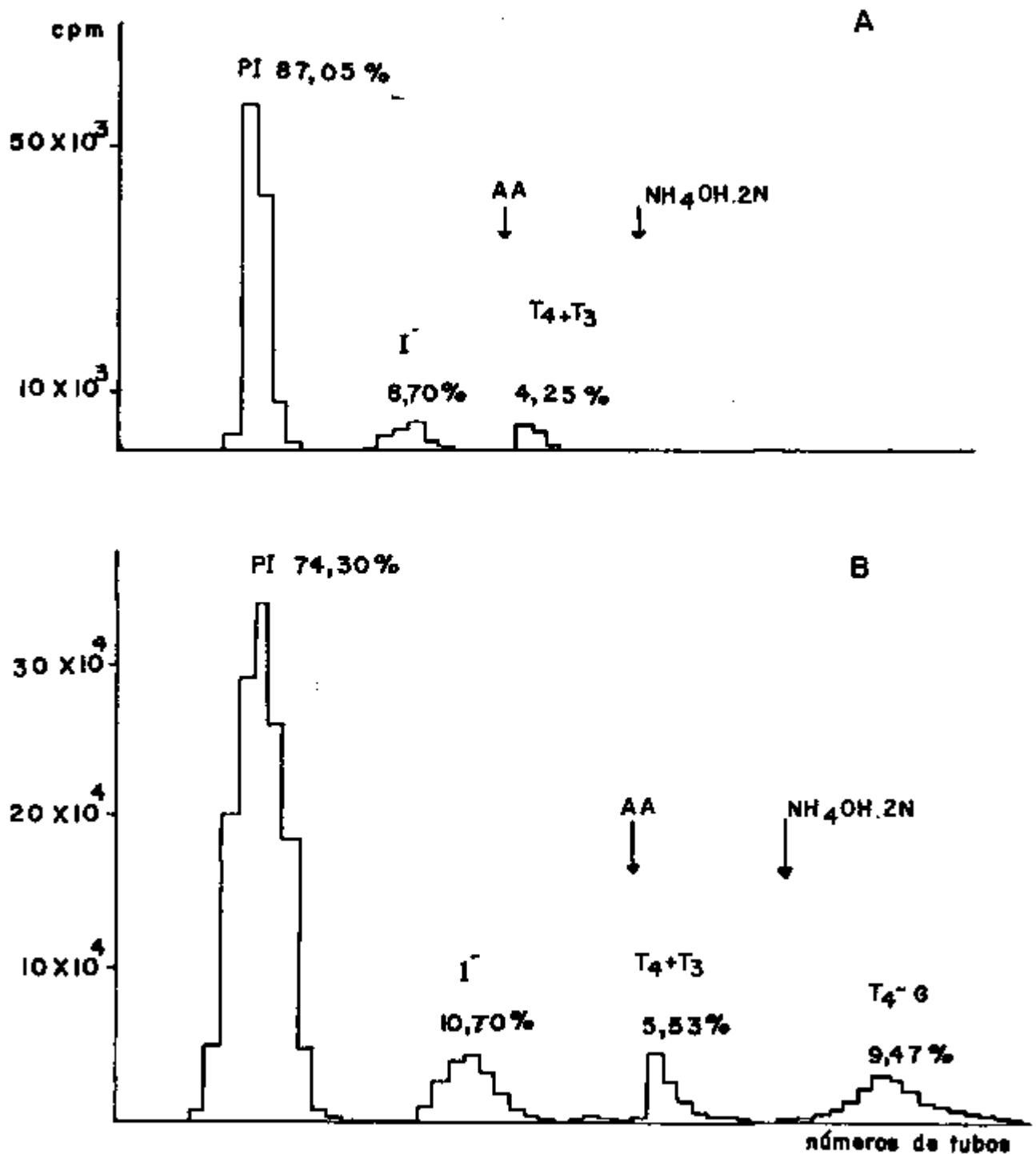


FIGURA 1. Comparação da distribuição da radioatividade dos componentes iodados, obtidos por filtração em gel de Sephadex G-25M dos soros (não proteolizados com pronase) de rato normal (A) e com icterícia obstrutiva (B). No grupo (B), observa-se a região do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, após a eluição com $\text{NH}_4\text{OH} - 2\text{N}$.

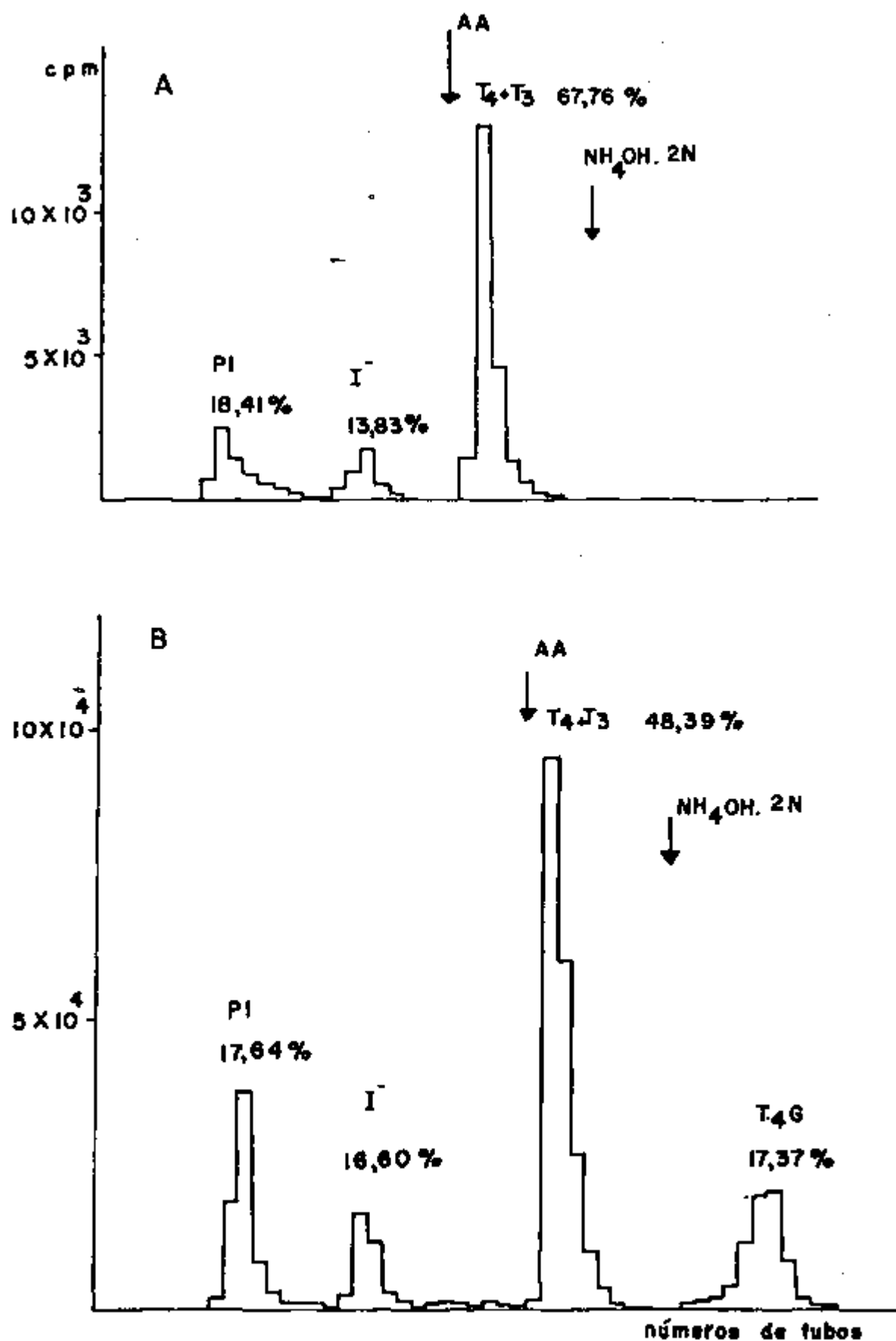


FIGURA 2. Comparação da distribuição da radioatividade dos componentes iodados, obtidos por filtração em gel de Sephadex G-25M, dos soros (proteolizados com pronase) de rato normal (A) e com icterícia obstrutiva (B). No grupo (B), observa-se a região do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, após a eluição com $\text{NH}_4\text{OH} - 2\text{N}$.

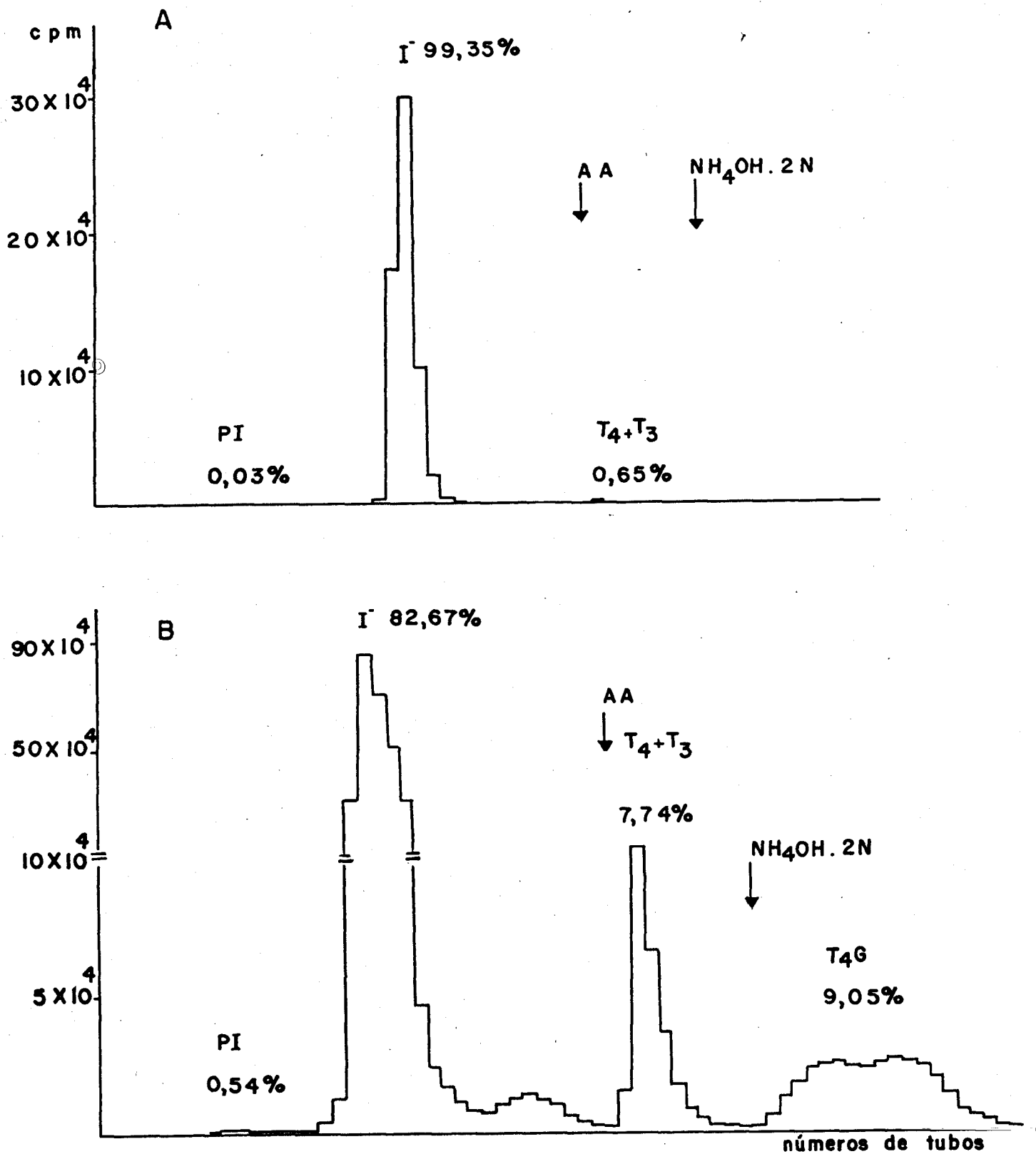


FIGURA 3. Comparação da distribuição da radioatividade dos componentes iodados, obtidos por filtração em gel de Sephadex G-25M, das urinas de rato normal (A) e com icterícia obstrutiva (B). Observa-se um incremento significativo do pico III ($T_4 + T_3$) e presença do pico IV ($^{125}I-T_4-G$) na representação gráfica (B).

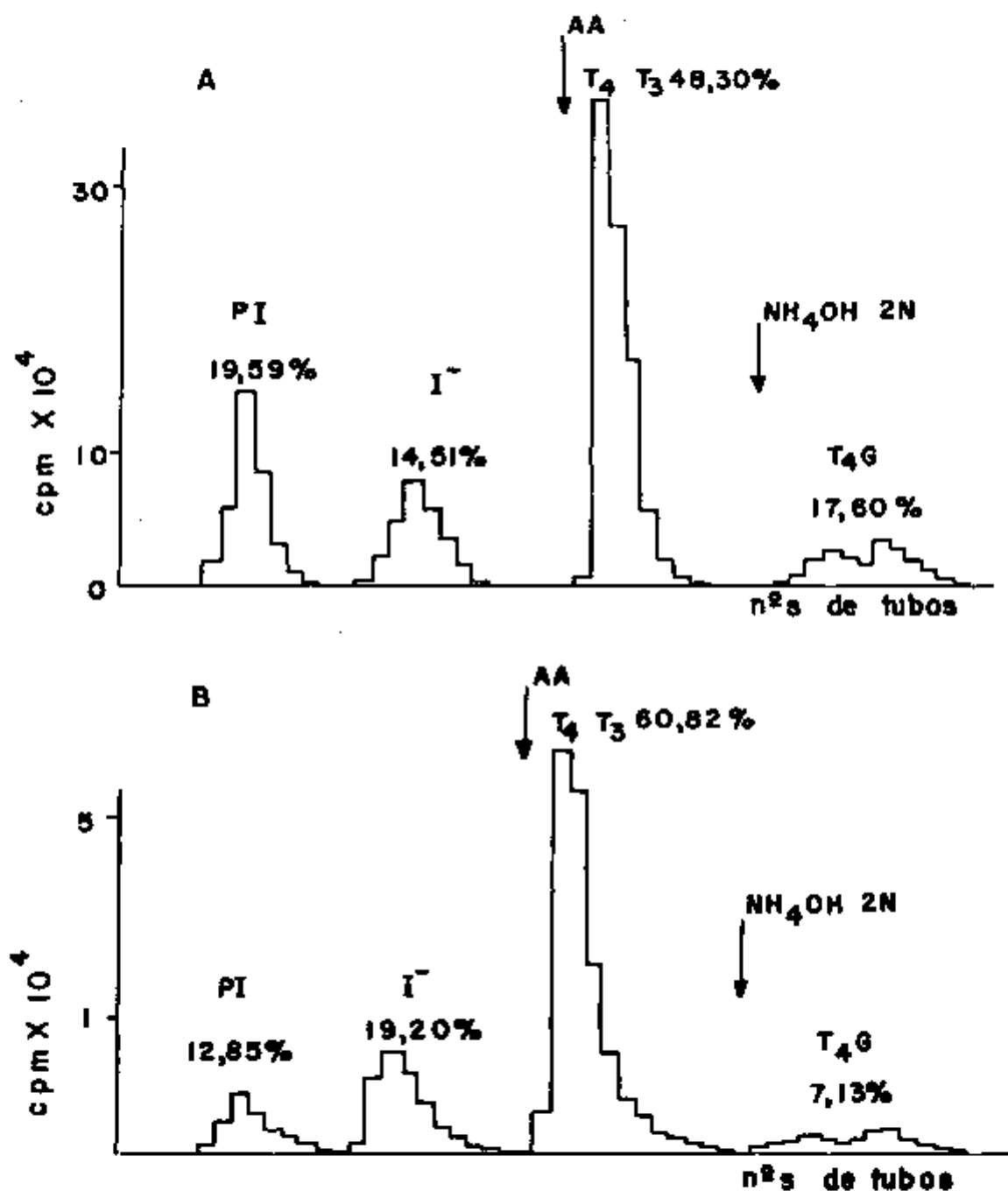


FIGURA 4. Comparação da distribuição da radioatividade dos componentes iodados, obtidos por filtração em gel de Sephadex G-25M, dos extratos butanólicos fecais de rato normal (A) e com icterícia obstrutiva (B). Observa-se na representação gráfica (B), um incremento do pico III (T₄ + T₃) e uma redução significativa do pico IV (¹²⁵I-T₄-G).

Tabela I

Cromatografia por filtração em gel de Sephadex G-25M do
soro proteolizado de ratos, após a administração da $^{125}\text{I-T}_4$

Ratos intactos

Picos λ Ratos n ^{os}	P I		I ⁻	T ₄ e/ou T ₃	T ₄ - G
	I	-	II	III	IV
1	23,05		10,25	66,70	
2	21,85		16,40	61,75	
3	15,34		10,61	74,05	
4	20,65		15,37	63,98	
5	18,41		13,83	67,76	
6	22,97		12,43	64,60	
\bar{M}	20,38		13,15	66,47	
σ_p	3,01		2,50	4,27	

Ratos com obstrução biliar

1	25,63		12,37	47,86	14,14
2	17,64		16,60	48,39	17,37
3	16,67		17,89	51,60	13,84
4	11,56		15,72	52,49	20,23
5	12,73		13,95	61,41	11,91
6	5,64		23,51	46,21	24,64
7	10,56		25,26	49,78	14,40
8	11,62		16,59	52,87	18,22
9	8,17		16,78	61,34	13,71
10	18,21		16,91	50,12	14,76
11	13,25		13,79	53,35	19,61
12	12,45		18,72	57,85	10,98
13	12,37		15,63	58,89	13,11
14	15,63		13,52	56,18	14,67
\bar{M}	13,72		16,94	53,43	15,88
σ_p	4,88		3,63	4,80	3,81

$$F_{0,05}^* = 3,96$$

$$F = 2,63$$

$$F = 2,11$$

$$F = 1,26$$

$$t = 3,07$$

$$t = 2,32$$

$$t = 5,74$$

$$GL = 18$$

$$GL = 18$$

$$GL = 18$$

$$t^* = 2,1009$$

$$t^* = 2,1009$$

$$t^* = 2,1009$$

Tabela II
 Cromatografia por filtração em gel de Sephadex
 G-25M da urina de ratos, após a administração da $^{125}\text{I-T}_4$
 Ratos intactos

Picos \dagger Ratos nºs	P I I	I $\bar{}$ II	T $_4$ e/ou T $_3$ III	T $_4$ - G IV
1	0,03	99,32	0,65	
2	0,10	98,57	1,33	
3	0,06	98,32	1,62	
4	0,04	98,44	1,52	
5	0,05	98,77	1,18	
6	0,14	98,02	1,84	
7	0,06	99,07	0,87	
8	0,03	98,25	1,72	
9	0,07	97,74	2,19	
10	0,11	98,35	1,54	
11	0,04	97,95	2,01	
12	0,10	97,37	2,53	
13	0,05	98,53	1,42	
M	0,069	98,38	1,57	
dp	0,034	0,53	0,51	
Ratos com obstrução biliar				
1	1,00	76,50	17,98	4,52
2	0,47	82,90	8,91	7,72
3	0,61	84,67	7,68	7,04
4	0,20	89,23	3,19	7,38
5	0,39	86,87	6,92	5,82
6	0,53	86,51	5,43	7,53
7	0,51	81,53	4,75	13,21
8	0,48	83,79	8,12	7,61
9	0,54	82,67	7,74	9,05
10	0,57	83,89	7,84	7,70
11	0,96	82,96	9,03	7,05
12	0,46	87,17	6,49	5,88
13	0,43	82,69	11,21	5,67
14	0,58	83,60	9,08	6,74
15	0,36	82,15	7,89	9,60
16	0,47	84,84	7,76	6,93
17	0,59	82,93	10,80	5,68
18	0,41	84,16	7,18	8,25
19	0,47	84,69	9,25	5,59
20	0,46	82,62	8,04	8,88
M	0,52	83,82	8,26	7,38
dp	0,19	4,00	2,96	1,92
F* _{0,05} = 2,46	F = 31,23	F = 56,96	F = 33,69	
	t = 10,386	t = 16,064	t = 9,885	
	GL = 21	GL = 20	GL = 21	
	t* = 2,0796	t* = 2,0860	t* = 2,0796	

e de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ ($7,38 \pm 1,92\%$). No grupo controle não se encontrou $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, no soro ou na urina; normalmente ele é excretado pela bile, metabolizado no intestino e apenas uma pequena quantidade eliminada pelas fezes (figura 4). Note-se também que, nos ratos intactos, a proporção de $^{125}\text{I-T}_4$ na urina é relativamente pequena ($1,57 \pm 0,51\%$) (tabela II).

Os soros provenientes de ratos com obstrução, que não sofreram ação proteolítica, apresentaram níveis de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ livre $8,80 \pm 1,85\%$ (tabela III). Esta fração incubada com soro de rato normal, ligou-se às proteínas séricas numa proporção de 34,30% (figura 5).

A obstrução das vias biliares não impediu que, nas fezes destes animais, fossem encontrados, tanto a $^{125}\text{I-T}_4$ como o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, indicando uma possível eliminação destes compostos pelas paredes intestinais. Nas fezes (tabela IV) a $^{125}\text{I-T}_4$ apresentou-se em proporção elevada ($58,68 \pm 7,34\%$) e o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ diminuído ($7,33 \pm 2,83\%$). Em ratos normais, o resultado foi respectivamente de $46,22 \pm 4,08\%$ e de $18,33 \pm 1,87\%$.

A análise das representações gráficas do pico IV, leva a crer que o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ sofre processo de metabolização, apresentando-se na urina dos animais ictericos (figura 3B) e nas fezes (ambos os grupos) (figura 4), provavelmente com outros glicuronídeos, além do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$. Estudando-se o composto oriundo da bile de ratos normais, pelos métodos cromatográficos por filtração em gel e, posteriormente, em papel, verificou-se que uma quantidade quase insignificante estava localizada na região de iodotirosinas (MIT e DIT) e uma maior nas de tironinas (T_4 e T_3). A análise da figura 6 mostra a presença de picos correspondentes a T_4 e T_3 na proporção de aproximadamente 2:1, sendo este último proveniente da desalogenação hepática da tiroxina. Traços de tirosina foram também encontrados no soro e urina destes animais. Na estimativa da panorâmica dos componentes iodados,

Tabela III
Cromatografia por filtração em gel de Sephadex G-25M
do soro não proteolizado de ratos

Ratos intactos

Picos % Ratos nºs	P I	I ⁻	T ₄ e/ou T ₃	T ₄ - G
	I	II	III	IV
1	86,53	6,39	7,08	
2	87,05	8,70	4,25	
3	86,02	8,89	5,09	
4	84,94	6,40	8,66	
5	88,12	6,32	5,56	
6	86,39	9,36	4,25	
7	85,66	7,45	6,89	
8	88,30	5,06	5,64	
9	87,24	7,61	5,15	
10	87,68	7,20	5,12	
11	87,05	7,18	5,77	
12	87,62	6,73	5,65	
13	86,80	5,72	7,48	
14	87,01	6,35	6,64	
15	88,11	6,21	5,68	
16	81,29	10,59	8,12	
\bar{M}	86,61	7,32	6,06	
σ_p	1,69	1,38	1,29	

Ratos com obstrução biliar

1	73,22	13,58	6,80	6,40
2	73,83	14,14	6,95	7,08
3	64,64	13,24	12,21	9,91
4	73,82	15,94	5,25	4,99
5	75,33	9,36	7,81	7,50
6	65,25	12,78	9,55	12,42
7	71,49	11,27	9,11	8,14
8	74,30	10,70	9,53	9,47
9	72,05	8,04	9,52	10,39
10	75,82	8,07	8,95	7,16
11	71,68	11,01	9,14	8,17
12	74,04	8,25	7,73	9,98
13	62,14	9,47	17,82	10,57
14	73,10	8,89	6,68	9,33
15	72,24	9,54	9,24	8,98
16	74,01	9,63	8,98	7,38
17	72,50	7,66	11,36	8,48
18	73,21	9,42	7,78	9,59
19	69,89	6,48	11,53	12,10
20	73,81	9,26	8,92	8,01
\bar{M}	71,82	10,24	9,14	8,80
σ_p	3,66	2,35	2,72	1,85

$F_{0,05}^* = 2,28$

$F = 4,69$

$F = 2,90$

$F = 4,45$

$t = 16,059$

$t = 4,645$

$t = 4,474$

$GL = 29$

$GL = 33$

$GL = 29$

$t^* = 2,0452$

$t^* = 2,0345$

$t^* = 2,0452$

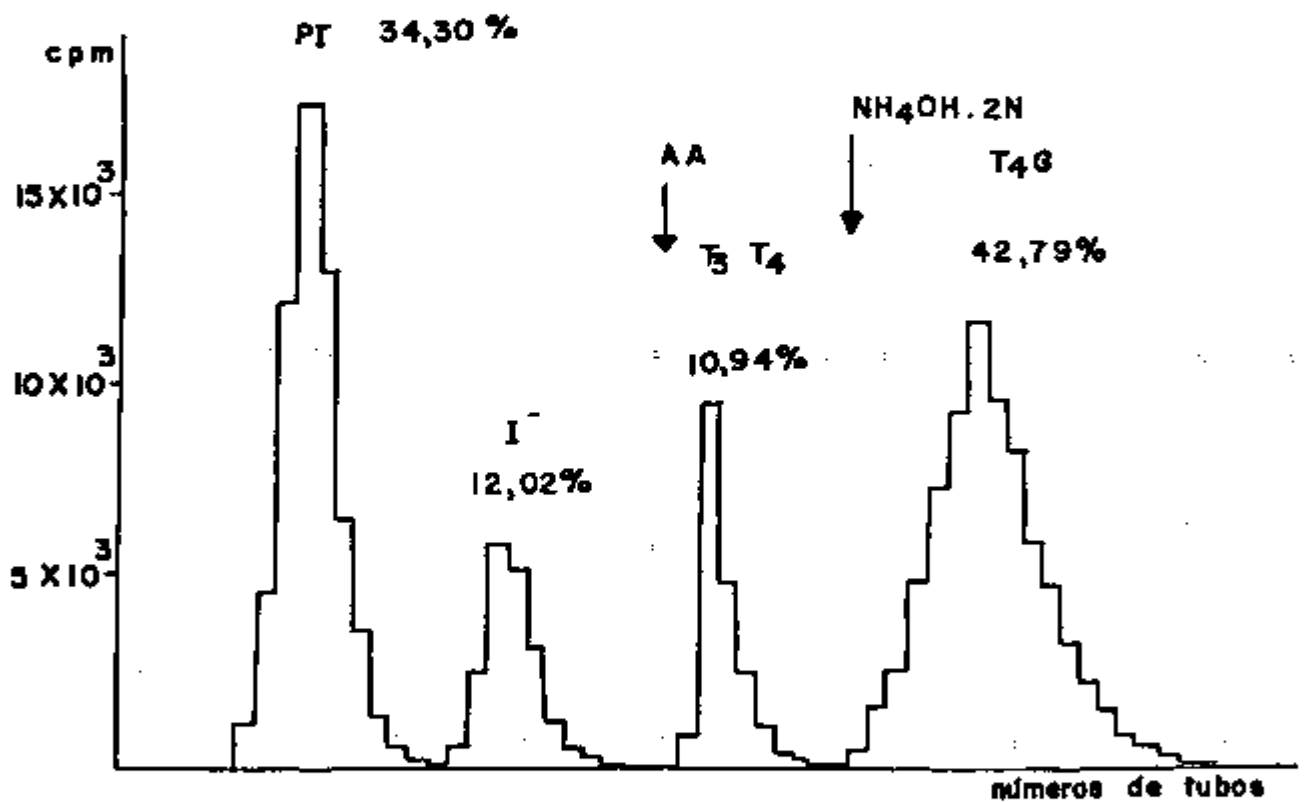


FIGURA 5. Cromatografia por filtração em gel de Sephadex G-25M do soro não radioativo de rato intacto, incubado a 37°C por 18 horas com $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ (pico IV da figura 2B). Observa-se que, a maior parte deste composto permanece livre enquanto cerca de 34% liga-se às proteínas plasmáticas. Uma pequena fração é desconjugada e eluída como $^{125}\text{I-T}_4$ livre.

Tabela IV
 Cromatografia por filtração em gel de Sephadex G-25M do
 extrato fecal de ratos, após a administração de $^{125}\text{I-T}_4$
 Ratos intactos

Picos \downarrow Ratos nºs	P I I	I ⁻ II	T ₄ e/ou T ₃ III	T ₄ - G IV
1	19,33	13,57	46,75	20,35
2	17,64	16,60	48,39	17,37
3	24,62	12,75	44,27	18,36
4	22,27	13,37	46,65	17,71
5	19,74	16,17	45,24	18,85
6	27,25	13,34	38,63	20,78
7	16,51	14,18	52,29	17,02
8	22,76	12,14	50,38	14,72
9	21,65	16,47	41,32	20,56
10	19,59	14,51	48,30	17,60
\bar{M}	21,13	14,31	46,22	18,33
dp	3,25	1,59	4,08	1,87
Ratos com obstrução biliar				
1	16,67	27,49	42,00	13,84
2	21,09	10,51	61,17	7,23
3	11,54	18,98	63,61	5,87
4	13,74	25,11	50,95	10,20
5	11,69	12,44	68,64	7,23
6	12,18	22,01	61,82	3,99
7	10,68	24,52	60,08	4,72
8	12,85	19,20	60,82	7,13
9	14,52	20,68	58,21	6,59
10	8,13	25,90	59,50	6,47
\bar{M}	13,11	20,68	58,68	7,33
dp	3,56	5,64	7,34	2,83
$F_{0,05}^*$ = 2,98	F = 1,20 t = 5,128 GL = 18 t* = 2,1009	F = 12,58 t = 3,438 GL = 11 t* = 2,2010	F = 3,24 t = 4,692 GL = 15 2,1315	F = 2,29 t = 10,255 GL = 18 t* = 2,1009

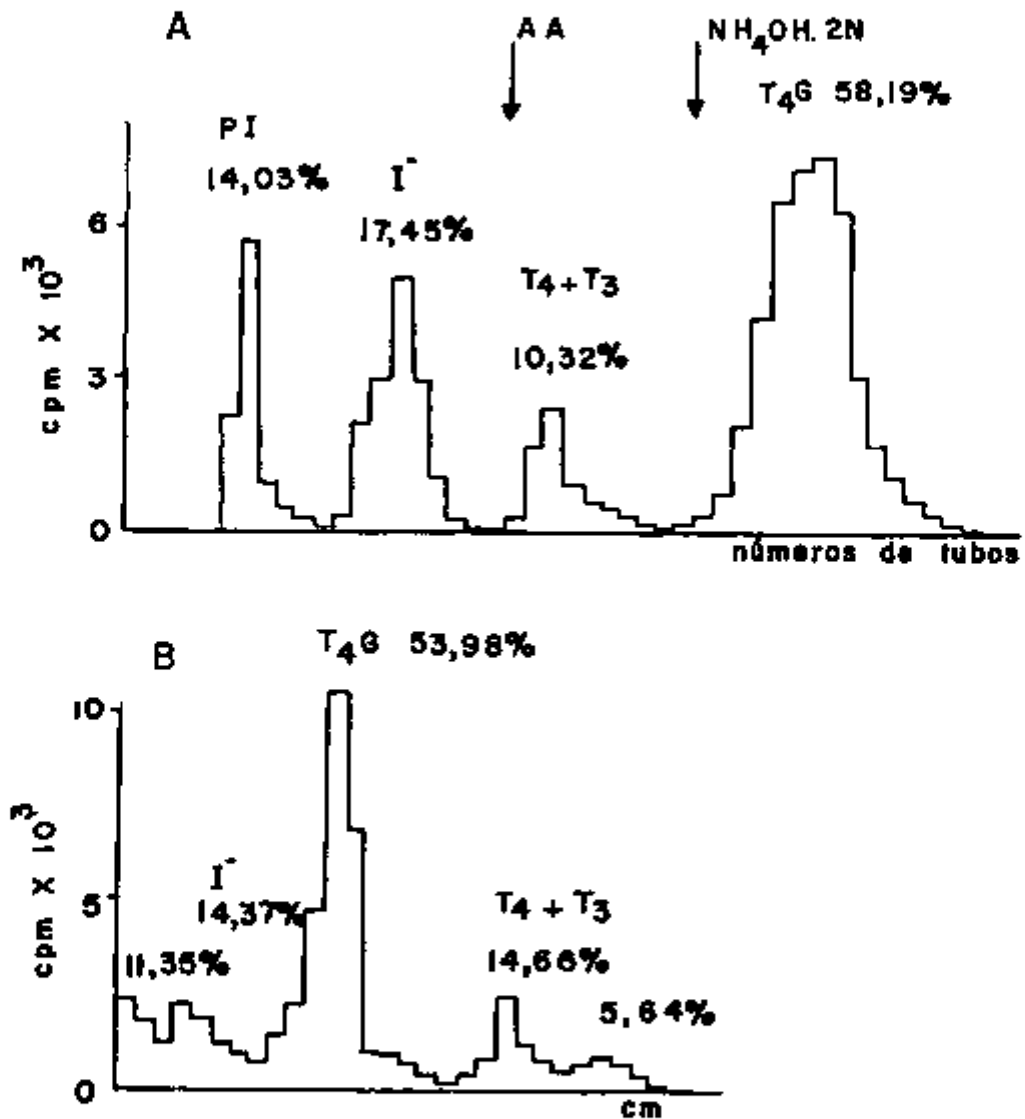


FIGURA 6. Distribuição da radioatividade dos componentes iodados obtidos por cromatografias de filtração em gel de Sephadex G-25M (A) e em papel (B) - sistema n-butanol - NH₄OH - 2N (1:1) - da bile de rato normal.

agregados às proteínas transportadoras séricas (pico I da figura 1B), verificou-se que, ao submeter uma alíquota do pico I a ação proteolítica, cerca de 11,73% da radioatividade permaneceram como proteínas iodadas, sendo o restante distribuído entre os demais picos (figura 7).

Para o estudo dinâmico do glicuronidato de tiroxina radioativa ($^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$), com a finalidade de comprovar que o pico IV era constituído de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, submeteu-se uma alíquota à ação da beta-glicuronidase e realizou-se a separação por filtração em gel de Sephadex e em papel da amostra com e sem tratamento enzimático. Constatou-se a desconjugação da $^{125}\text{I-T}_4$ do ácido glicurônico, com cerca de 85% da radioatividade concentrada no pico III, como T_4 livre (figura 8A). Na amostra que não sofreu tratamento, cerca de 90% permaneceram inalterados como pico IV (figura 8B, 10). Estas determinações serviram também para avaliar a pureza do material obtido.

Para estimar as alterações da função tireoidiana provocadas pela icterícia obstrutiva experimental, procedeu-se à captação do radioiodo pela glândula tireoide, que foi de $45,44 \pm 2,49\%$; nos animais controle os valores foram de $28,04 \pm 1,39\%$ (tabela V). Detectou-se também um aumento na fração do ^{125}I ligado às proteínas séricas (PB^{125}I), cuja média e desvio padrão foram de $0,79 \pm 0,11\%/1$, estando os valores normais entre $0,42 \pm 0,04\%/1$ (tabela VI).

A análise compartimental do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, isolado do soro de animais ictericos, foi realizada em ratos com cânula inserida no colédoco, administrando-se intravenosamente o composto radioativo. O estudo da curva de decaimento (figura 9) mostra duas exponenciais. No início a radioatividade decai, no plasma, com $t_{1/2}$ de $6,86 \pm 2,64$ minutos. Na bile o processo ocorre um pouco mais lentamente com $t_{1/2}$ de $9,42 \pm 2,55$ minutos. A segunda

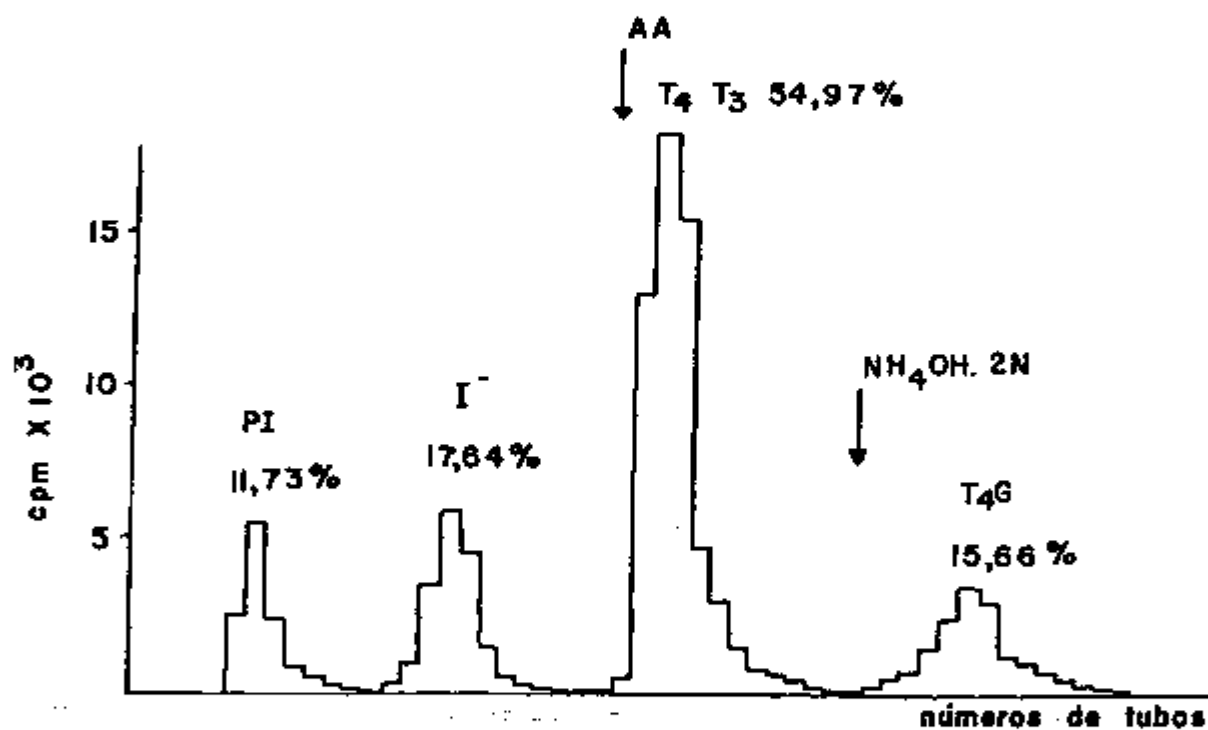


FIGURA 7. Separação cromatográfica dos componentes iodados liberados das proteínas transportadoras, provenientes da proteólise com pronase do pico I da figura 1B.

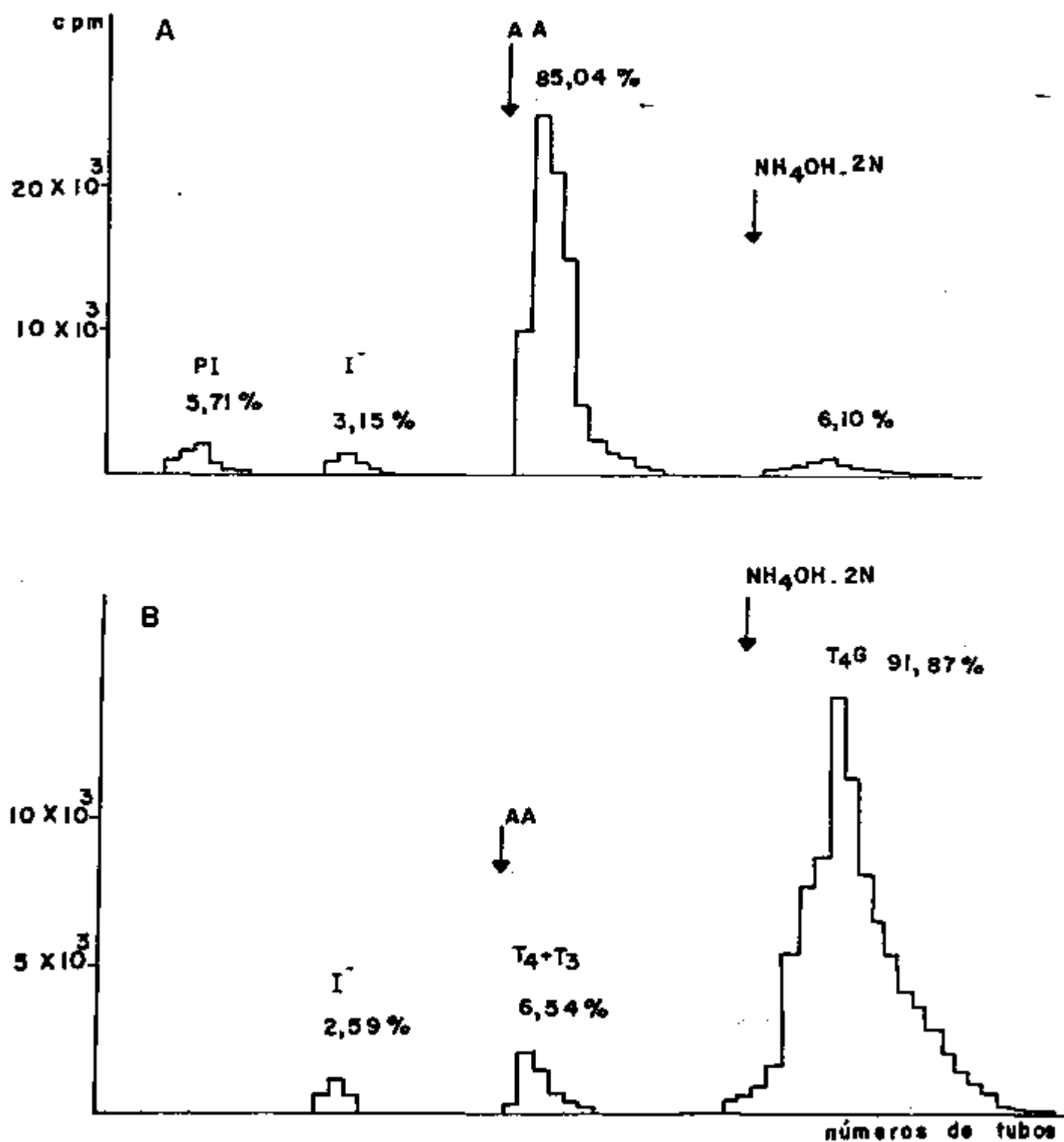


FIGURA 8. Separação cromatográfica por filtração em gel de Sephadex G-25M do pico IV ($^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$) da figura 2B, submetido a proteólise enzimática com beta-glicuronidase (A) e sem proteólise (B). Verifica-se que quase a totalidade do composto é proteolizado e eluído como $^{125}\text{I-T}_4$ livre.

TABELA V

Captação do radioiodo pela glândula
tireóide, após a administração de ^{125}I

RAIO (Nº)	NORMAL %	OBSTRUÍDO %
1	25,89	46,34
2	27,92	44,16
3	29,10	42,43
4	29,49	43,06
5	27,27	48,33
6	30,10	42,80
7	26,16	45,87
8	28,88	50,04
9	27,50	44,71
10	28,15	46,62
\bar{M}	28,04	45,55
σ_p	1,39	2,49

$$F_{0,05}^* = 2,98$$

$$F = 3,218$$

$$t = 19,299$$

$$GL = 15$$

$$t^* = 2,131$$

TABELA VI

Determinação do ^{125}I ligado às proteínas séricas
(PB ^{125}I) utilizando-se o método de troca iônica

RATO (Nº)	NORMAL %/l	OBSTRUIDO %/l
1	0,46	0,77
2	0,32	0,97
3	0,46	0,86
4	0,46	0,93
5	0,40	0,70
6	0,42	0,86
7	0,41	0,70
8	0,43	0,66
9	0,41	0,69
10	0,39	0,74
\bar{M}	0,415	0,788
dp	0,041	0,109

$$F_{0,05}^* = 2,98$$

$$F = 6,974$$

$$t = 10,081$$

$$GL = 12$$

$$t^* = 2,1788$$

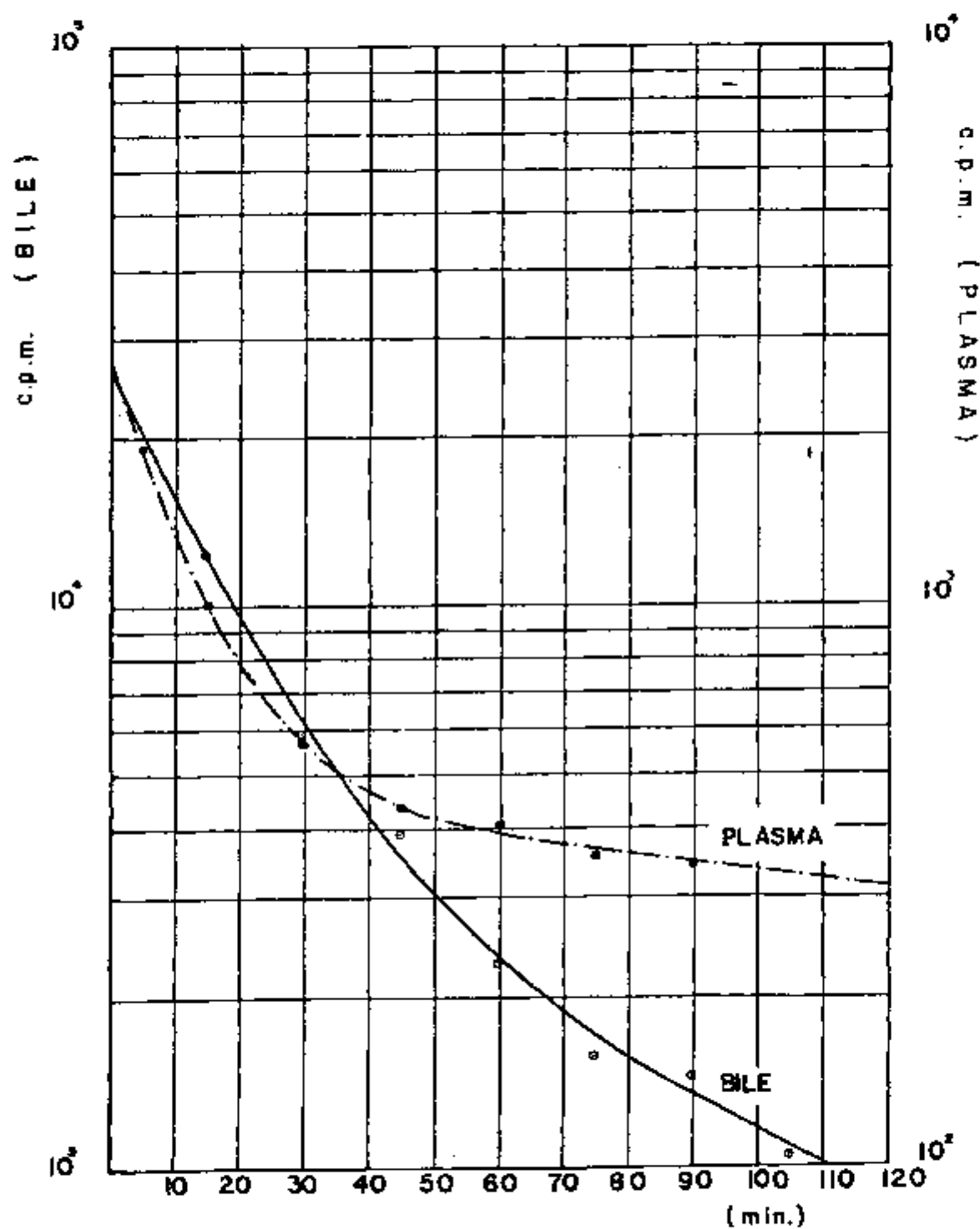


FIGURA 9. Curva de decaimento do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ em plasma e bile de ratos intactos.

exponencial apresenta um $t_{1/2}$ biológico de $174,65 \pm 51,76$ minutos no plasma, porém na bile é mais rápida com $t_{1/2}$ de $68,26 \pm 23,19$ minutos (tabela VII).

Na bile, nos primeiros 15 minutos, a fração do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ foi eliminada na sua forma quase original (cerca de 86%); entretanto, no momento em que chega ao fígado, inicia-se o processo de desiodação, apresentando pico que parece ser constituído de mais de um glicuronidato radioativo. No decorrer do tempo, os picos das proteínas iodadas, iodeto e tirosina vão aumentando em proporção que diminui o do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$.

A tabela VIII mostra as variações percentuais da eliminação biliar dos diversos compostos iodados identificáveis por cromatografia em papel. Note-se também, pelas figuras 11 e 12, que 75 minutos após a administração do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, houve o aparecimento de um novo componente iodado, na proporção de 6,05%, na região de tirosinas.

Após 150 minutos fez-se a análise da bile, por coluna de gel de Sephadex G-25M, observando-se uma redução marcante do pico IV, havendo apenas 1/3 da radioatividade correspondendo aos glicuronidatos (figura 13).

TABELA VII

Determinação da meia-vida biológica ($t_{1/2}$) do
 $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ no plasma e bile de rato

	NO. RAIOS	K*	$t_{1/2}$ (min)	K	$t_{1/2}$ (min)
P L A S M A	1	0,694	9,99	0,0029	239,02
	2	0,2353	2,95	0,0059	117,48
	3	0,0946	7,33	0,0035	198,04
	4	0,0915	7,58	0,0032	216,61
	5	0,1529	4,53	0,0060	115,57
	6	0,789	8,79	0,0043	161,20
	\bar{M}		6,86		174,65
	σ_p		2,64		51,76
B I L E	1	0,0600	11,56	0,0108	64,19
	2	0,0904	7,67	0,0151	45,90
	3	0,0695	9,97	0,0086	80,60
	4	0,0590	11,75	0,0101	68,63
	5	0,0576	12,03	0,0090	77,02
	6	0,0573	12,10	0,0107	64,78
	7	0,1013	6,84	0,0146	47,48
	8	0,1088	6,37	0,0058	119,51
	9	0,1074	6,45	0,0150	46,21
	\bar{M}		9,42		68,26
	σ_p		2,55		23,19

K* = coeficiente de transferência

TABELA VIII

Análise cromatográfica* dos componentes
iodados da bile de ratos normais após a
administração de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$

TEMPO (min)	P.I (%)	$^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ (%)	I^- (%)	T_4 (%)
15	6,94	86,21	3,11	3,74
30	7,43	84,35	3,28	4,94
60	14,19	73,26	4,81	7,74
75	8,94	66,17	7,65	11,19
90	12,60	58,27	8,75	13,81
105	10,66	50,0	13,67	18,43
120	10,65	44,44	15,65	21,76

* Cromatografia descendente em papel Whatman 3 MM - sistema colidina -
água (35:100), ambiente saturado com amônia.

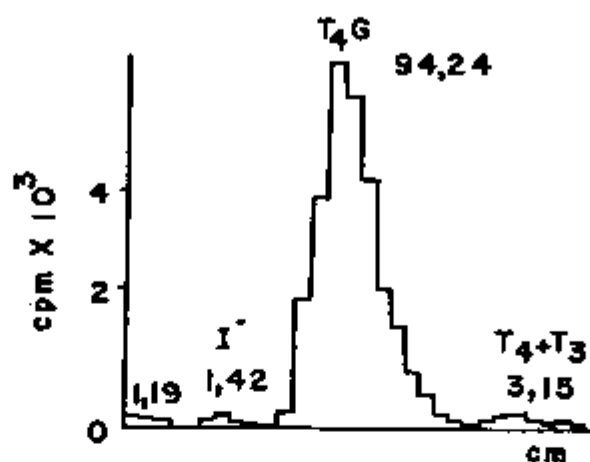


FIGURA 10. Cromatografia descendente em papel Whatman 3 MM do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ sistema n-butanol-amônia (1:1). Resultados expressos em por cento da contagem total.

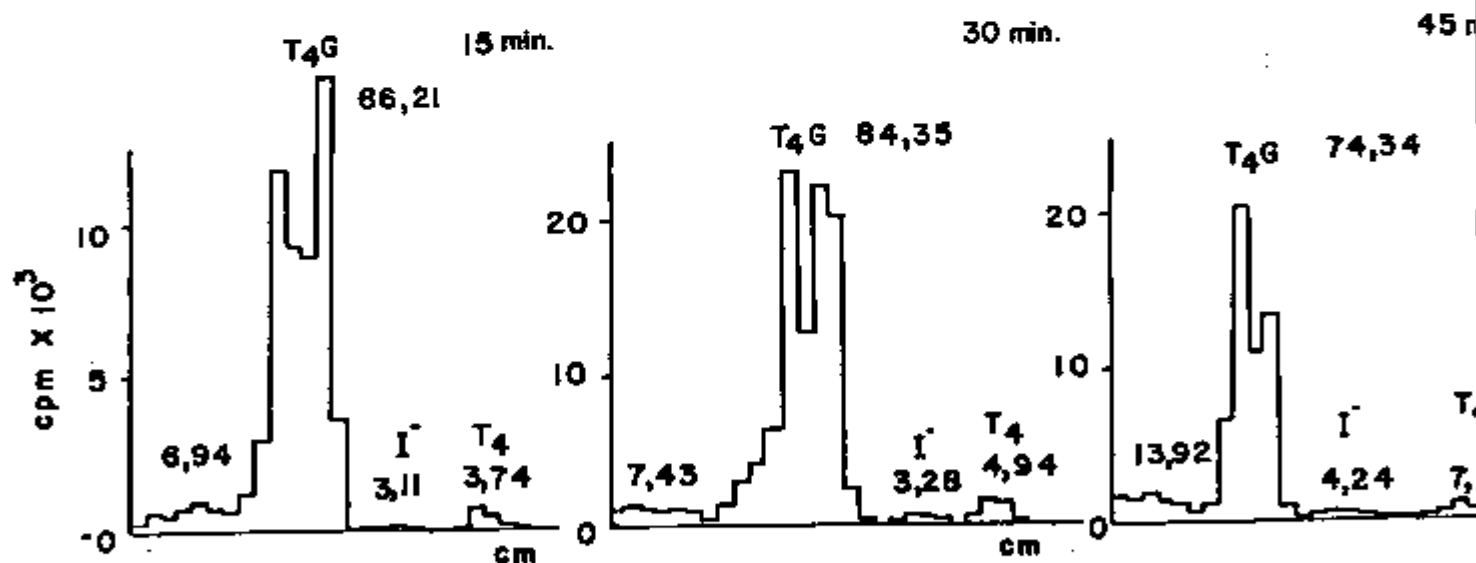


FIGURA 11. Cromatografias descendentes em papel Whatman 3MM da bile (coletada a cada 15'), após injeção de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, em sistema colidina-água (35:100). Resultados expressos em por cento da contagem total.

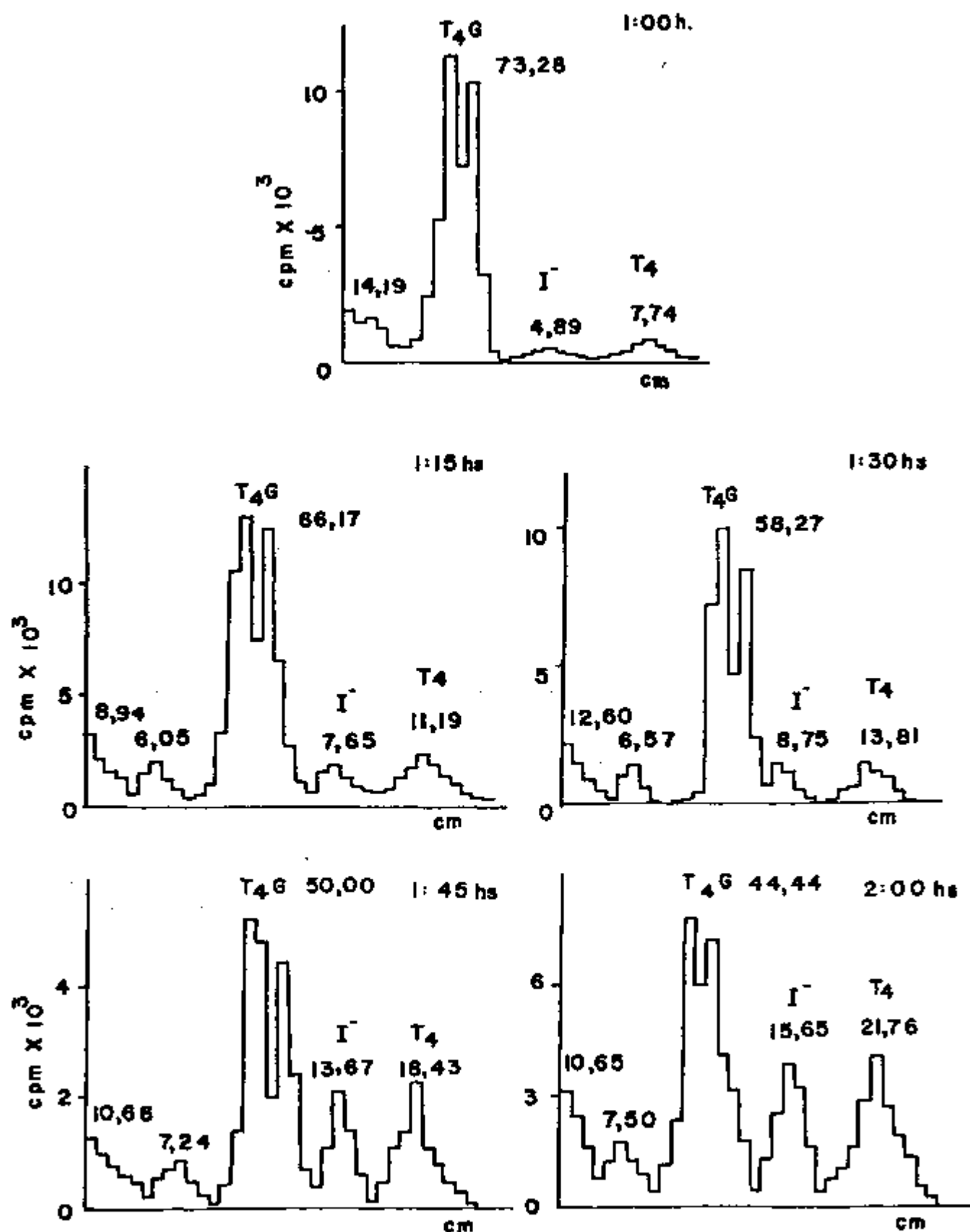


FIGURA 12. Cromatografias descendentes em papel Whatman 3MM da bile (coletada a cada 15'), após injeção de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ em sistema colidina-água (35:100). Resultados expressos em por cento da contagem total.

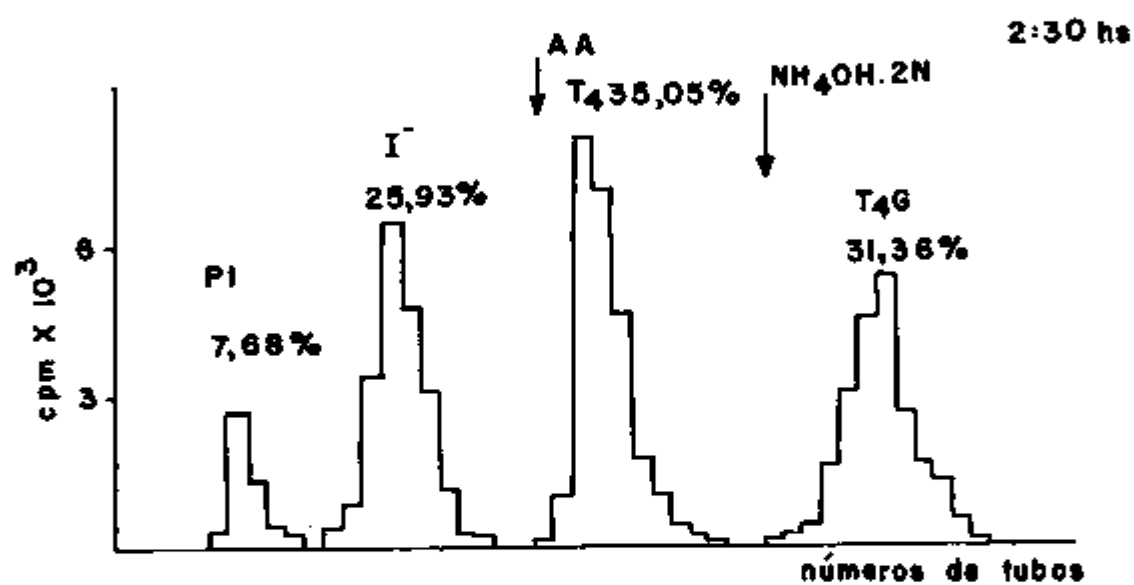


FIGURA 13. Cromatografia por filtração em gel de Sephadex G-25M da bile coletada após 2 hs e 30 min. da administração de ¹²⁵I-T₄-G.

DISCUSSÃO

O estudo realizado no presente trabalho só foi possível graças aos métodos cromatográficos desenvolvidos nos laboratórios do IEA (11, 18), baseados no trabalho original de Lissitzky e col. (21). Esta técnica tem a vantagem de permitir a separação do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ em coluna de gel de Sephadex G-25M, além de ser aplicável a diversos materiais biológicos. Este composto foi separado e identificado por cromatografias de filtração em gel e papel.

A comprovação de que a substância referida era $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, foi alcançada, submetendo-o à hidrólise enzimática pela beta-glicuronidase, identificando-se o produto por cromatografia em papel. Os dados aqui apresentados, mostraram que o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ tem a capacidade de se ligar às proteínas transportadoras plasmáticas (figura 5). Não foram realizados estudos para identificação destas proteínas, constatou-se apenas que o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ liga-se numa proporção de cerca de 34%. Comparando-se as quantidades de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ de soros proteolizados e "in natura", submetidos a cromatografia em coluna de Sephadex (tabela I e III), verificou-se que a fração que se liga às proteínas é cerca de 45%, valor relativamente próximo do obtido por incubação direta de soro normal e $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$. A figura 1B que mostra os resultados de uma cromatografia em gel de Sephadex G-25M do soro de rato icterico, sem tratamento, revela que uma fração de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ encontra-se livre. Quando o pico correspondente às proteínas iodadas é submetido a proteólise com pronase (que libera os aminoácidos de suas proteínas transportadoras), uma grande parte da radioatividade migra na região do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ (figura 7). O fato deste composto ligar-se às proteínas plasmáticas, deve impedir a sua

eliminação mais rápida por via renal e hepática.

Note-se também, para discussão ulterior, que quando se incuba a fração de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ com soro de rato normal, uma parte deste é liberado do ácido glicurônico, dando como resultado a $^{125}\text{I-T}_4$ (figura 5).

A retenção do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ deve ser responsável pelo aumento do PBI citado na literatura (26,30). Este composto, provavelmente, é metabolicamente inativo, visto que os animais com icterícia obstrutiva estudados apresentaram uma hipercaptação tireoidiana de ^{125}I e uma alta rotatividade de radioiodo, verificada pelo aumento do PB^{125}I . Estes parâmetros, classicamente, refletem diretamente a função tireoidiana. Estes fatos revelaram a falta de um mecanismo de retro-regulação para com este composto. Os achados conflitam com aqueles de Telkkä e col. (29), que postularam uma hipofunção tireoidiana na obstrução biliar. No entanto, esta conclusão foi baseada em dados indiretos, derivados da morfologia da tireóide, não tendo estes autores aquilatado diretamente a função glandular com emprego de testes dinâmicos. Por outro lado, Scazziga e col. (25) mostraram em 10 pacientes com obstrução biliar, a inalterabilidade dos níveis de captação. É possível que, sendo o presente trabalho experimental, as alterações fisiopatológicas sejam mais evidenciáveis que no modelo humano, onde aleatoriamente, poderiam existir obstruções não completas.

Parte do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ acumulado no soro é eliminado por via renal, como se verifica na figura 3B. Tem sido descrita a presença do glicuroconjugado renal (12), entretanto os métodos aqui empregados, não parecem ser suficientemente sensíveis para detectar nos ratos intactos, estas pequenas porções de $\text{T}_4\text{-G}$ eliminadas por esta via. A análise da figura 3B, mostra que nos animais com obstrução, além do glicuroconjugado, há também um incremento muito grande da proporção de $^{125}\text{I-T}_4$ livre. Supõe-se

que esta poderia provir da desconjugação do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, após a filtração renal. Não seria cabível a eliminação de proporções tão grandes de hormônio circulante, a não ser que o acúmulo de sais biliares ⁽¹⁾ e ácidos graxos ⁽¹⁷⁾ na corrente sanguínea, durante a obstrução, levasse a menor afinidade deste pelas proteínas transportadoras que normalmente não atravessam a barreira glomerular em quantidades apreciáveis.

Nas fezes dos animais com icterícia obstrutiva, ainda são identificados os compostos iodados, tanto a $^{125}\text{I-T}_4$ como o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ (figura 4). Pressupondo-se que a obstrução das vias biliares tenha sido total, estes compostos só poderiam ter origem através das suas passagens pela parede intestinal, devido a um gradiente de secreção: corrente circulatória-lumen intestinal. Note-se que os dados aqui obtidos, quanto a magnitude deste fenômeno, são relativos e não absolutos, porque em nenhum dos materiais examinados foi determinada a quantidade de ^{127}I . Esta eliminação de $^{125}\text{I-T}_4$ e $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ pela parede intestinal está de acordo com as observações de Galton e Nisula ⁽¹³⁾, os quais demonstraram que a quantidade de hormônio eliminado pelas fezes era maior que aquela excretada pela bile, sugerindo que, pelo menos em ratos, não deve haver uma absorção intestinal da T_4 endógena. Trabalho realizado no IEA, por Ikeda e col. ⁽¹⁸⁾, mostrou que após a administração de $^{125}\text{I-T}_4$, ocorre uma diminuição gradativa de radioatividade nas porções intestinais isoladas de ratos. Esta constatação, leva a crer que possa existir um estado de equilíbrio de absorção e secreção de hormônios tireoídianos pelas paredes intestinais.

A administração do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ a animais intactos, mostra que esta substância é depurada do compartimento sanguíneo com duas meias vidas totalmente distintas (figura 9). Uma de $6,86 \pm 51,76$ minutos e outra de $174,65 \pm 51,76$ minutos. Analisando-se as curvas de eliminação biliar da radioatividade nestes ratos, verifica-se que o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ é rapidamente de-

purado por esta via. Note-se também, a presença da $^{125}\text{I-T}_4$, cuja proporção vai crescendo com o decorrer do tempo. Estes eventos tomados em conjunto com a curva de eliminação sanguínea, leva à conclusão de que o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ é desconjugado na circulação a $^{125}\text{I-T}_4$ livre, a qual se incorpora ao "pool" endógeno e segue as vias naturais de metabolização. Este fato pôde ser antecipado pelas experiências que mostraram que uma parte do $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ era desconjugado "in vitro", quando incubado com soro de rato intacto (figura 5). Assim, o primeiro componente da curva de decaimento sanguíneo corresponderia ao $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ e o segundo, mais lento, à $^{125}\text{I-T}_4$.

Este fenômeno poderia estar ocorrendo em condições normais, porém em pequena magnitude, o suficiente para não refletir num acúmulo apreciável de $\text{T}_4\text{-G}$ sanguínea.

CONCLUSÕES

1. O método empregado da cromatografia em gel de Sephadex G-25M é eficaz na separação de T_4 -G de soros, urina, bile e fezes de ratos tornados ictericos por obstrução mecânica experimental.
2. O ^{125}I - T_4 -G acumula-se no soro destes animais e liga-se às proteínas plasmáticas numa proporção de cerca de 34%.
3. O T_4 -G é eliminado por via urinária e, provavelmente, é em parte desconjugado durante este processo.
4. Ao que tudo indica existe um gradiente de secreção hormonal (T_4) e de T_4 -G pela parede intestinal.
5. A cinética do T_4 -G injetado em animais apresenta um decaimento com duas exponenciais distintas que corresponderiam à eliminação do composto "in natura", mais rápida, e ao metabolismo da T_4 proveniente de sua desconjugação, mais lenta.
6. Há nestes animais um incremento da função tireoideia na verificado pelos testes de captação do radioiodo e do $PB^{125}I$, devido, provavelmente, a uma diminuição dos hormônios tireoideanos circulantes e a um aumento dos seus conjugados.

RESUMO

Estudou-se o comportamento da $^{125}\text{I-T}_4$ administrada na dose de 150 μCi em ratos ictericos por obstrução mecânica experimental (Ligadura do colédoco). Utilizaram-se os métodos de cromatografia em gel de Sephadex G-25M e em papel para a separação dos compostos iodados do soro, urina, bile e fezes. Separou-se e identificou-se o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ nestes materiais. Foi verificado que o glicuronidato liga-se às proteínas plasmáticas numa proporção de 34,30%.

A análise cromatográfica mostrou que o $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, na situação de obstrução, corresponde a $15,88 \pm 3,81\%$ da radioatividade sanguínea. Constatou-se o aparecimento em proporção de $7,38 \pm 1,92\%$ deste derivado, nas análises urinárias dos ratos, acompanhada de um incremento na eliminação de $^{125}\text{I-T}_4$. Este provavelmente deve ter origem intra e/ou pós renal, visto que, em condições normais a T_4 circula ligada às proteínas plasmáticas em sua quase totalidade, o que a impede de transpor a barreira glomerular com facilidade.

Mesmo com obstrução comprovada e eficiente, as fezes destes animais apresentaram $^{125}\text{I-T}_4$ e $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ presentes. Postulou-se, em vista deste fato, a existência de um gradiente secretório circulação-lumen intestinal, para explicar este achado.

A medida de captação de ^{125}I e do PB^{125}I mostraram que a tireóide destes animais encontrava-se hiperativa, o que poderia ser devido à diminuição de hormônios intactos e acúmulo de seus conjugados, segura

mente, não hábeis em realizar o mecanismo de retroregulação.

O $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ foi separado cromatograficamente do soro dos animais de experimentação com obstrução e reinjetado em animais intac_{tos}. Soro e bile destes animais foram coletados a cada 15 minutos e sua radioatividade medida. Analisou-se, cromatograficamente, a bile de cada uma das frações.

A curva de decaimento da radioatividade sérica mostrou duas exponenciais. Uma que apresentava um $t_{1/2}$ mais rápido de $6,86 \pm 2,64$ minutos e outra mais lenta com $t_{1/2}$ de $174,65 \pm 51,76$ minutos. Anali_{sando}-se em conjunto, esta curva e aquela obtida da bile com os cromato_{gramas} da secreção biliar, conclui-se que a primeira exponencial corres_{ponde} à eliminação de $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ e a segunda à $^{125}\text{I-T}_4$ proveniente da des_{conjugação}.

ABSTRACT

The effects of $^{125}\text{I-T}_4$ administered in 150 μCi dose in icteric rats, after mechanic obstruction of the biliar duct, was studied. For the separation of the iodinated components of the serum, urine, bile and feces, the technique of gel filtration in Sephadex G-25 medium and paper chromatography were used. $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ was separated and identified in these materials. It was found that 34.3% of the glucuronidate binds to plasma proteins.

Chromatographic analysis has shown that in condition of obstructed duct, $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ represents $15.88 \pm 3.81\%$ of the serum radioactivity. In rat urine analysis the presence of $7.38 \pm 1.92\%$ of this component was observed, together with an increased $^{125}\text{I-T}_4$ elimination. This fact has probably an intra and/or a post-renal origin, since in normal conditions, T_4 circulates practically all bound to plasma proteins, not being allowed therefore to pass through the glomerular barrier.

Even with confirmed efficient obstruction, the feces of these animals showed the presence of $^{125}\text{I-T}_4$ and $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$. To explain these findings it was admitted the existence of a secretory gradient circulation-intestinal lumen.

Uptake measurements of ^{125}I and PB^{125}I showed that the thyroid of these animals was hyperactive. This can be due to a decrease in intact hormones and an increase in the conjugated forms, which are unable to determine the feedback mechanism.

$^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$ was separated by chromatography of the serum of animals with obstructed duct and re-injected in intact animals. Samples from serum and bile of these animals were collected each 15 minutes and counted. The bile of each fraction was analyzed by paper chromatography.

The decay curve of serum radioactivity followed two exponential functions. The first presented a lower value of $t_{1/2}$ (6.86 ± 2.64 minutes), while the second a higher value (174.65 ± 51.76 minutes). Comparing this curve to that obtained from secreted bile chromatography, it is concluded that the first exponential relation refers to $^{125}\text{I-T}_4\text{-G}$, while the second to deconjugated $^{125}\text{I-T}_4$ elimination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. ACCOCELLA, G., TENCONI, L.T., ARMAS MERINO, R., RAIA, R. & BILLING, B.H. Does deconjugation of bilirubin glucuronide occur in obstructive jaundice? Lancet, 1:68-9, 1968.
2. ALBRICHT, E.C., LARSON, F.C. & TUST, R.H. In vitro conversion of thyroxine to triiodothyronine by kidney slices. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 86:137-40, 1954.
3. BASTOMSKY, C.H. The biliary excretion of thyroxine and its glucuronic acid conjugate in normal and Gunn rats. Endocrinology, 92:34-9, 1973.
4. BERMAN, J. & WEISS, M.F. SAAM manual. Bethesda, National Institutes of Health, 1972.
5. BÉRAUD, Th. & VANNOITI, A. Liaison de la thyroxine aux protéines plasmatiques dans l'hépatique. Schweiz. med. Wschr., 30:996-8, 1957.
6. BRAVERMAN, L.E., INGBAR, S.H. & STERLING, K. Conversion of thyroxine to triiodothyronine in athyretic human subjects. J. Clin. Invest., 49:885-64, 1970.

*De acordo com "Norma Brasileira de Referências Bibliográficas", PNB 66 da A.B.N.T.

As abreviaturas dos títulos de periódicos foram feitas com o "World List of Scientific Periodicals", 1963.

7. CAVALIERI, R.R. & SEARLE, G.L. The kinetics of distribution between plasma and liver of ^{131}I -labeled L-thyroxine in man: observations of subjects with normal and decreased serum thyroxine-binding globulin. J. Clin. Invest., 45:939-49, 1966.
8. CHOPRA, I.J., SOLOMON, D.H., CHOPRA, U., YOUNG, R.F. & TECO, G.N.C. Alterations in circulating thyroid hormones and thyrotropin in hepatic cirrhosis: evidence for euthyroidism, despite subnormal serum triiodothyronine. J. clin. Endocr. Metab., 39:501-11, 1974.
9. CHOPRA, I.J., CHOPRA, U., SMITH, S.R., ROA, M. & SOLOMON, D.H. Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3) and 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) in systemic illness. J. clin. Endocr. Metab., 41:1043-49, 1975.
10. DIEM, K. Tables Scientifiques. In: DOCUMENTA Geigy; Basle, Switzerland, J.R. Geigy, 1963.
11. DE BARBOZA, M.R.F.F. Ação do fenobarbital sobre alguns aspectos do metabolismo hepático da tiroxina. 1977. (Dissertação de Mestrado)
12. GALTON, V.A. & PITT-RIVERS, R. Thyroid hormone metabolism in the kidney. Biochem. J., 72:314, 1959.
13. GALTON, V.A. & NISULA, B.C. The enterohepatic circulation of thyroxine. J. Endocr., 54:187-93, 1972.
14. HANSEN, J., BERNSTEIN, G., VOLPET, E.M. & OPPENHEIMER, J.H. Analysis of the rapid interchange of thyroxine between plasma and liver and kidney in the intact rat. Endocrinology, 82:37-46, 1968.

15. HERZ, R. Jr., TAPLEY, D.F. & FOSS, J.E. Glucuronide formation in the transport of thyroxine analogues by rat intestine. Biochim. biophys. Acta, 53:273-84, 1961.
16. HESCH, R.D., BRUNNER, G. & SOLING, D.H. Conversion of thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3) and the subcellular localization of the converting enzyme. Clin. chim. Acta, 59:209-13, 1975.
17. HOLLANDER, C.S., SCOTT, R.L., MCKERRON, C.G. & ASPER, S.P. Plasma free fatty acids; a possible regulation of free thyroid hormone level in man. Clin. Res., 15:259, 1967.
18. IKEDA, E., NICOLAU, W., MURAMOTO, E., ASSIS, L.M. & PIERONI, R.R. Separação de compostos iodados biliares e fecais por filtração em Sephadex G-25M. Estudo do metabolismo entero-hepático da 125 I-tiroxina. Revta. Ass. med. bras., 19:131-6, 1973.
19. INADA, M. & STERLING, K. Thyroxine turnover and transport in Laennec's cirrhosis of the liver. J. clin. Invest., 46:1275-82, 1967.
20. LISSITZKY, S. & BOUCHILLOUX, S. Enzymatic aspects of thyroxine metabolism and its iodinated derivatives. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. & MILLAR, E.C.P. Ciba Foundation colloquia of endocrinology. London, J. & A. Churchill, 1975. v.10, p. 135-55.
21. LISSITZKY, S., BISMUTH, J. & ROLLAND, M. Separation des composés iodés du sérum et de la thyroïde par filtration sur gel de dextran (Sephadex). Clin. chim. Acta, 7:183-9, 1962.
22. MCCONNON, J., ROW, V.V. & VOLPÉ, R. The influence of liver damage in

- man on the distribution and disposal rates of thyronine and triiodothyronine. J. clin. Endocr. Metab., 34:144-50, 1972 .
23. ROCHE, J., MICHEL, R. & TATA, J. Sur l'élimination biliaire de triiodothyronine et de la thyroxine et sur leur glycuconjugaison hépatique. Biochim. Biophys. Acta, 13:471-9, 1954.
24. ROCHE, J., MICHEL, R., CLOSEN, J. & MICHEL, O. Sur la sulfoconjugaison hépatique de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine et la présence d'un ester sulfurique de cette hormone dans le bile et la plasma. Biochim. Biophys. Acta, 33:461, 1959.
25. SCAZZIGA, B.R., BÉRAUD, Th. & VANNOTTI, A. La fonction thyroïdienne dans l'ictère par obstruction. Schweizerische Med. Wochenschrift, 31:875-9, 1956.
26. SHIPLEY, R.A. & CHUDZIK, E.B. Thyroidal uptake and plasma clearance of ¹²⁷I in cirrhosis of the liver. J. clin. Endocr. Metab., 17:1229-36, 1957.
27. STERLING, K., BRENNER, M.A. & SALDANHA, V.F. Conversion of thyroxine to triiodothyronine by cultured human cells. Science, 179:1000-1, 1973.
28. TALROG, A. Conjugation and excretion of the hormone. Brookhaven Symp. Biol., 7:111-36, 1954.
29. TELKKÄ, A., KUUSIHO, A.N. & MUSTAKALLIO, K.K. Histochemically demonstrable succinic dehydrogenase and sulfhydryl groups in tissues adrenalectomized rats. Acta Endocrinol. (Kbh), 16:315-22, 1954.

30. VANNOITI, A. & BÉRAUD, Th. Functional relationships between the liver, the thyroxine-binding protein of serum, and the thyroid. J. clin. Endocr. Metab., 19:466-77, 1959.
31. ZANINOVICH, A.A., VOLPÉ, R., SOTO, R.J. & EZRIN, C. Accumulation and release of thyroid hormones by the normal and diseased human liver. Acta endocr., 60:412-22, 1969.