



**SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS IODADOS BILIARES E FECAIS POR
FILTRAÇÃO EM SEPHADEX G 25 M. ESTUDO DO METABOLISMO
ENTERO-HEPÁTICO DA ^{125}I -TIROXINA**

*ETSUKO IKEDA, WILIAN NICOLAU, EMIKO MURAMOTO, LÍCIO
MARQUES DE ASSIS e RÔMULO RIBEIRO PIERONI*

PUBLICAÇÃO IEA N.º 293

Maio — 1973

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11049 (Pinheiros)
CIDADE UNIVERSITÁRIA "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"
SAO PAULO — BRASIL

**SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS IODADOS BILIARES E FECAIS POR
FILTRAÇÃO EM SEPHADEX G 25 M. ESTUDO DO METABOLISMO
ENTERO-HEPÁTICO DA 125 I-TIROXINA***

**Etsuko Ikeda, Wilian Nicolau, Emiko Muramoto,
Lício Marques de Assis, Rômulo Ribeiro Pieroni**

**Departamento de Radiobiologia
Instituto de Energia Atômica
São Paulo – Brasil**

**PUBLICAÇÃO IEA Nº 293
Maio – 1973**

Instituto de Energia Atômica

Conselho Superior

Eng^o Roberto N. Jafet — Presidente
Prof.Dr.Emílio Mattar — Vice-Presidente
Prof.Dr.José Augusto Martins
Dr.Affonso Celso Pastore
Prof.Dr.Milton Campos
Eng^o Helcio Modesto da Costa

Superintendente

Rômulo Ribeiro Pieroni

SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS IODADOS BILIARES E FECALIS POR FILTRAÇÃO EM SEPHADEX G 25 M. ESTUDO DO METABOLISMO ENTERO-HEPÁTICO DA ¹²⁵I-TIROXINA *

Etsuko Ikeda¹, Wilian Nicolau², Emiko Muramoto¹,
Lício Marques de Assis³, Rômulo Ribeiro Pieroni³

SUMÁRIO

Bile "in natura" e extrato butanólico dos conteúdos intestinais do duodeno, íleo e reto foram submetidos à filtração em gel de Sephadex G 25 M. Este procedimento resultou na separação de 4 picos de radioatividade. A composição de cada pico foi analisada em cromatografia em papel. Embora o pico I pareça ser composto em parte por proteínas iodadas, sua real composição não foi determinada. Os picos II e III são devidos a iodeto e T₃ e/ou T₄, respectivamente. Os dados obtidos na cromatografia em papel do pico IV, após o tratamento com β glucuronidase, conduziu à sugestão de que esse pico pudesse ser representado, principalmente por derivados glucurônicos de T₃ e/ou T₄.

A composição biliar e fecal em relação aos compostos iodados tem sido investigada por vários autores por processos de cromatografia em papel^(1,4,7,8,9,10). A boa especificidade desse procedimento para a identificação dos compostos iodados é indiscutível. O método, entretanto, é pouco sensível, o que limita sua aplicação a materiais biológicos, tais como bile e fezes, visto que a quantidade de "impurezas" representadas por pigmentos e lípidos é bastante significativa e a atividade específica do material é baixa.

Lissitzky e cols⁽⁵⁾ demonstraram que a filtração em gel de Sephadex G 25 M possibilitava a separação de monoiodotirosina (MIT), diiodotirosina (DIT) e iodeto das iodotironinas livres ou ligadas às proteínas do soro. As tironinas iodadas livres ficavam retidas no gel e eram eluídas conjuntamente com amilol: amônia (AA) e separadas posteriormente por cromatografia em papel.

* Séparation des composés iodés biliaires et fécaux par filtration en Sephadex G 25 M. Étude du métabolisme entéro-hépatique de la ¹²⁵I-thyroxine. / Isolation of feces and bilesiodate compounds by filtration through Sephadex G 25 M. Study of the entero-hepatic metabolism of ¹²⁵I-thyroxine.

Trabalho do Departamento de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica de São Paulo e Unidade de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1. Farmac.-Biol. do Departamento de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica.
2. Méd. da Unidade de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Departamento de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica.
3. Superintendente do Instituto de Energia Atômica.

No presente trabalho, a utilização do gel de Sephadex visou testar a capacidade separadora do mesmo material para os produtos biliares e conteúdo intestinal, e a possibilidade de se trabalhar com maior quantidade de produtos biológicos e melhor identificação dos seus componentes iodados. Procurou-se também obter alguns dados sobre o metabolismo entero-hepático da ^{125}I -tiroxina (T_4). Resultados preliminares foram apresentados no *Third International Congress of Endocrinology*⁽⁶⁾. No presente trabalho é realizado estudo mais extenso da metodologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos normais, adultos, da raça Wistar, aos quais se administraram $70\ \mu\text{Ci}$ de T_4 por via intraperitoneal. A coleta da bile foi feita por cateterização do colédoco com um tubo de polietileno sob anestesia (pentobarbital sódico). A cânula foi inserida no duto biliar o mais próximo possível do fígado para não haver diluição da bile com o suco pancreático⁽¹⁰⁾. Os animais foram canulados antes da administração da T_4 e imediatamente foi iniciada a coleta contínua de 10 horas, em média. Para a coleta do conteúdo do duodeno, íleo e reto foram utilizados ratos não canulados, 24 horas após a administração da T_4 .

Tanto a bile *in natura* quanto seus extratos butanólicos foram analisados por filtração em gel de Sephadex. Para a obtenção do extrato butanólico, a bile foi acidificada com H_2SO_4 a pH 1,0 e extraída quatro vezes com igual volume de n-butanol. Os extratos foram reunidos e o pH foi ajustado entre 9 e 10, com NaOH 10%. Sob corrente de nitrogênio e aquecimento entre 35 a 40°C, o n-butanol foi evaporado até a obtenção de um resíduo seco totalmente isento do solvente. Este foi ressuspenso em água destilada e o pH foi levado a 7,4, com H_2SO_4 10%. O conteúdo de cada porção intestinal foi também submetido ao tratamento descrito acima.

Volumes de 4 a 10 ml de bile ou extrato fecal foram colocados em coluna de Sephadex G 25 M (20,0 x 2,5 cm) equilibrada com tampão de TRIS-HCl, 0,05 M, pH 7,4. Iniciou-se a coleta das frações numa velocidade de 1 ml/min. Os eluentes utilizados foram: 130 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA e 80 ml de NH_4OH 2 N, sucessivamente. Frações de 4,5 a 5,0 ml foram coletadas em um coletor automático e as radioatividades determinadas em contador automático de poço dotado de cristal de NaI(Tl) de 2 x 2 polegadas.

Para a cromatografia em papel, cada pico radioativo obtido na filtração em gel Sephadex foi manipulado convenientemente. Os picos I, II e IV (fig. 1) foram concentrados sob nitrogênio e aquecidos entre 35 a 40°C. O pico III (fig. 1) foi previamente extraído com NH_4OH 2 N para a remoção dos pigmentos e lípidos. Os extratos foram retomados em 0,1 a 0,2 ml de metanol: amônia (99 : 1) e cromatografados em papel em 3 sistemas de solventes: (1) n-butanol-ácido acético-água, 4 : 1 : 5 (n-B : AcAc : H_2O); (2) 2,4,6-colidina-água, 100 : 35 em ambiente de amônia (2,4,6-col : H_2O); (3) n-butanol-amônia, 1 : 1 (n-B : Am).

O pico I foi cromatografado no sistema (1), os picos II e IV nos sistemas (1) e (2) e o pico III nos sistemas (1) e (3). Os padrões não radioativos monoiodotirosina (MIT),

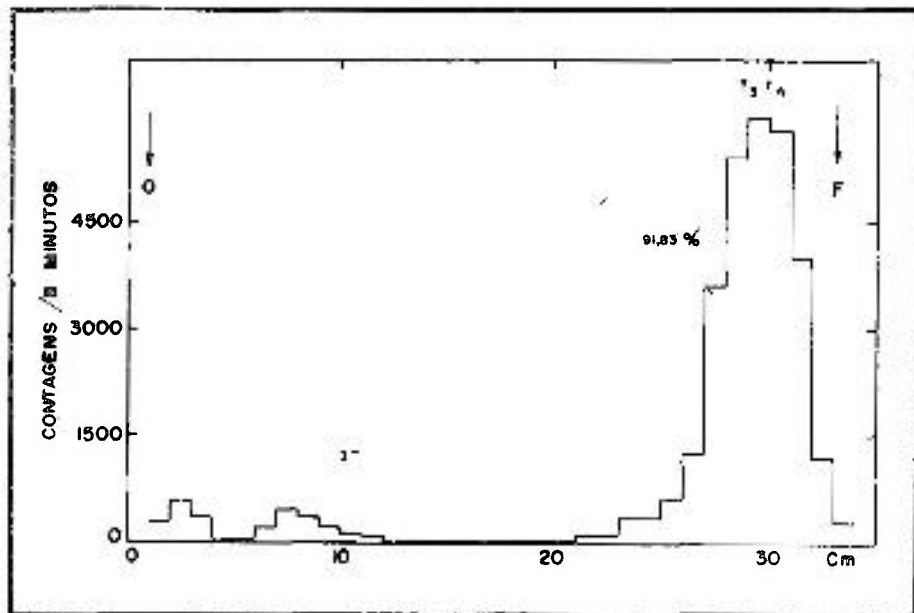


Fig. 1 — Gel filtração em Sephadex da bile (T_4 - ^{125}I). 10 ml de bile in natura eluídas com 140 ml de tampão de TRIS-HCl, 100 ml de AA e 100 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20,0 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 4,5 ml. A radioatividade de cada fração foi determinada em contador automático de "poço" dotado de cristal de cintilação de NaI(T_1).

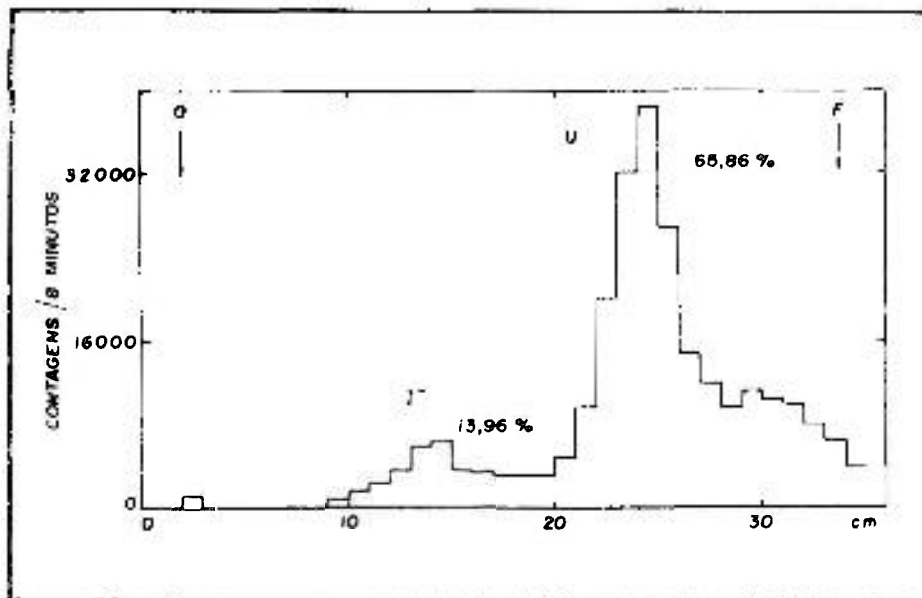


Fig. 2 — Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em n-B : AcAc : H_2O do pico I correspondente à fig. 1. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi eluído com 0,2 ml de metanol: amônia e 30 μ l foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman n o 3. Sistema de solvente: n-B : AcAc : H_2O . Tempo de desenvolvimento: 15 horas. O: origem, F: frente.

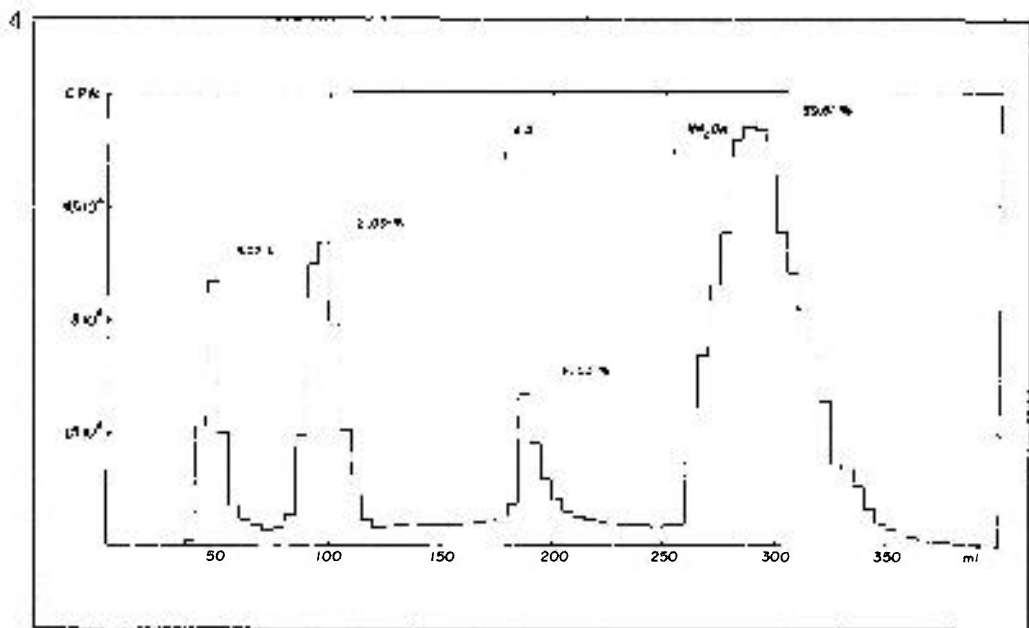


Fig. 3 — Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em $n\text{-B} : \text{AcAc} : \text{H}_2\text{O}$ do pico II correspondente à fig. 1. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi eluído com 20 ml de metanol: amônia e 30 μl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman n.º 3. Sistema de solvente: $n\text{-B} : \text{AcAc} : \text{H}_2\text{O}$. Tempo de desenvolvimento: 15 horas. O: origem, F: frente.

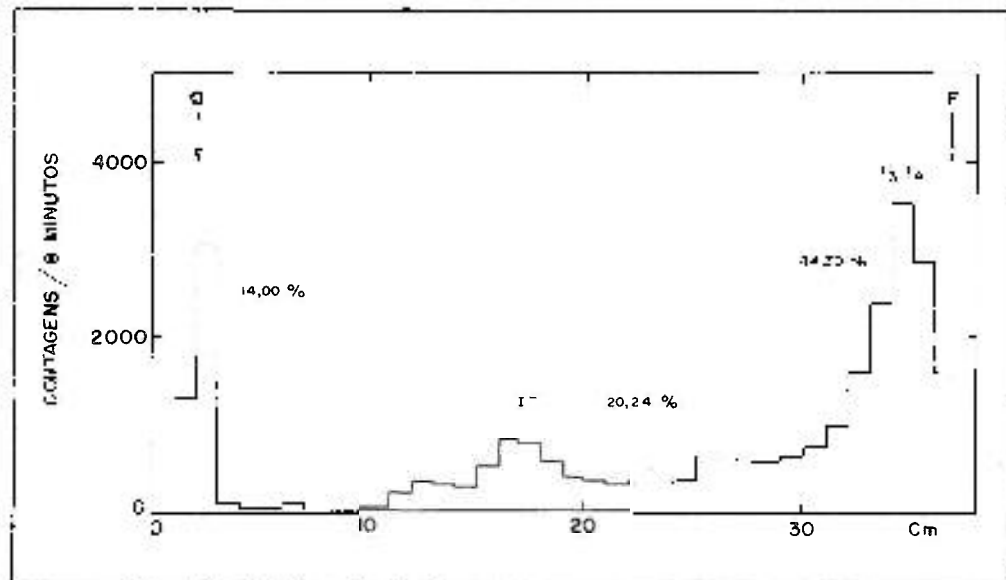


Fig. 4 — Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em $\text{col} : \text{H}_2\text{O}(\text{NH}_4\text{OH})$ do pico II correspondente à fig. 1. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi eluído com 0,2 ml de metanol: amônia e 30 μl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman n.º 3. Sistema de solvente: $\text{col} : \text{H}_2\text{O}(\text{NH}_4\text{OH})$. Tempo de desenvolvimento: 20 horas. O: origem, F: frente.

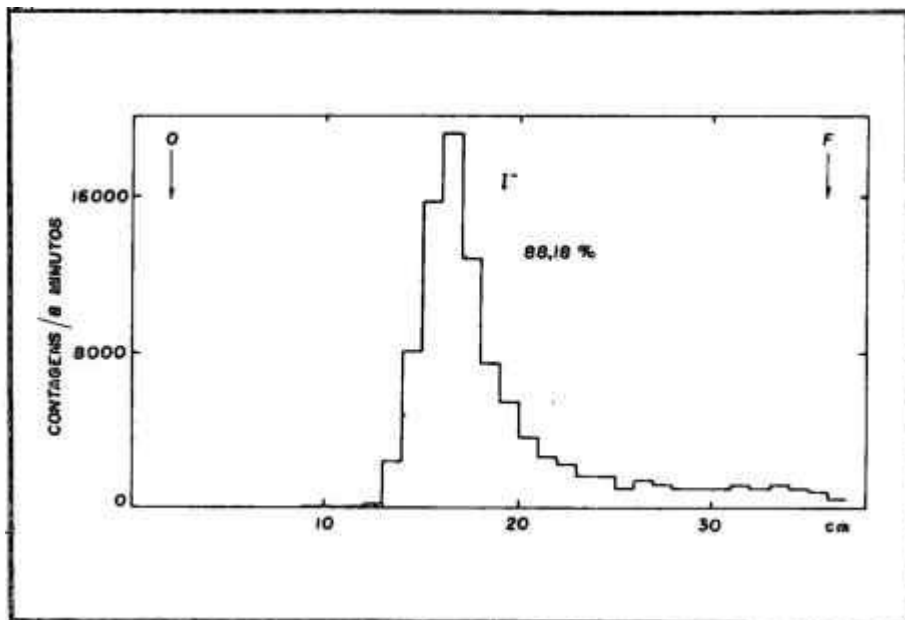


Fig. 6 — Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em $n\text{-B} : \text{AcAc} : \text{H}_2\text{O}$ do pico III correspondente à fig. 1. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi eluído com 0,2 ml de metanol: amônia e 30 μl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente: $n\text{-B} : \text{AcAc} : \text{H}_2\text{O}$. Tempo de desenvolvimento: 15 horas. O: origem, F: frente.

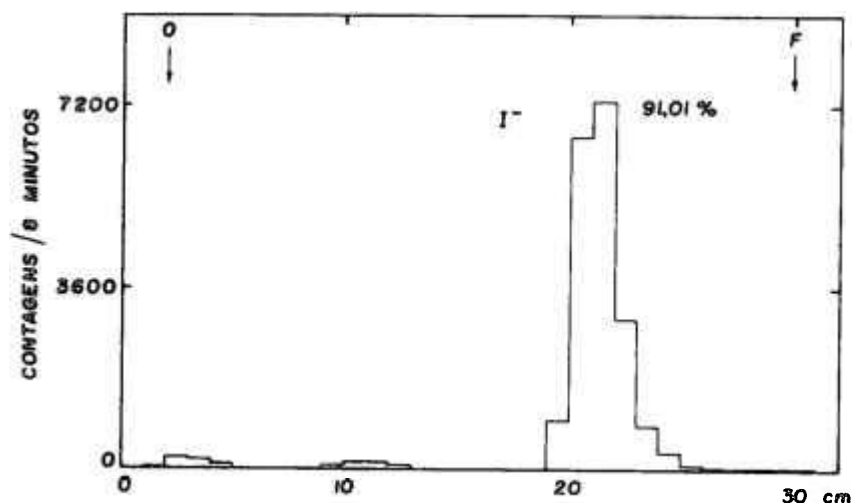


Fig. 7 — Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em $n\text{-B} : \text{AcAc} : \text{H}_2\text{O}$ do pico IV correspondente à fig. 1. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi eluído com 0,2 ml de metanol: amônia e 30 μl foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões descritas anteriormente, em papel Whatman nº 3. Sistema de solvente: $n\text{-B} : \text{AcAc} : \text{H}_2\text{O}$. Tempo de desenvolvimento: 15 horas. O: origem, F: frente.

diiodotirosina (DIT), NaI, triiodotironina (T_3) e tetraiodotironina ou tiroxina (T_4) foram utilizados para a determinação dos R_f .

Após o desenvolvimento cromatográfico os padrões não radioativos foram detectados pela reação de Pauly e cloreto de paládio. Os cromatogramas foram secados e cortados em tiras de 1 cm. As radioatividades de cada fração foram determinadas em um contador automático tipo poço.

Algumas frações foram submetidas à hidrólise enzimática com β -glucuronidase e submetida novamente à filtração em Sephadex. As condições para a hidrólise foram: 5.000 unidades de β -glucuronidase para cada 5 ml de solução. A solução foi tamponada com acetato a pH 4,5 e a hidrólise foi realizada a 37°C durante 15 horas.

RESULTADOS

Bile "in natura"

Na filtração em gel de Sephadex da bile *in natura* obtiveram-se constantemente 4 picos de radioatividade (fig. 1). As percentagens obtidas foram cerca de 9,07%, 21,09%, 10,03%, 59,81%, respectivamente para os picos I, II, III e IV.

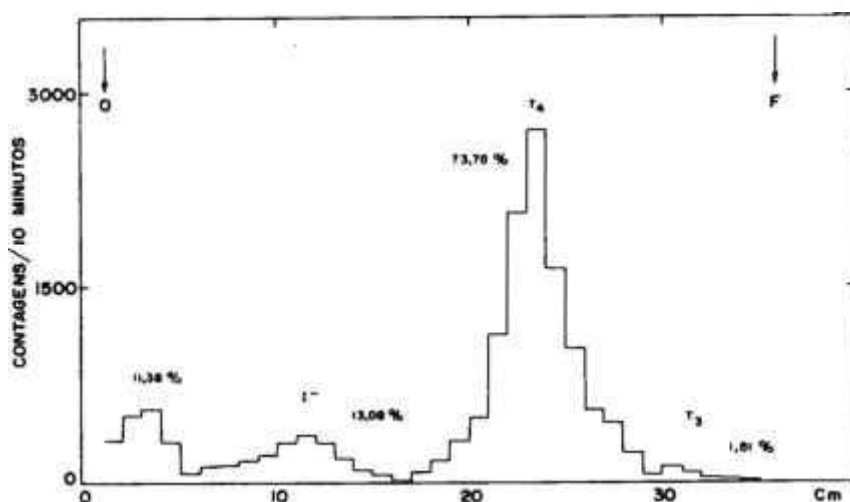


Fig. 5 — Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em n-B : Am do pico III correspondente à fig. 1. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi eluído com 0,2 ml de metanol; amônia e 30 μ l foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente em papel Whatman n° 3. Sistema de solvente: n-B : Am. Tempo de desenvolvimento: 20 horas. O: origem, F: frente.

O pico I do Sephadex analisado cromatograficamente no sistema (1) não pôde ser devidamente caracterizado. A radioatividade dispersou-se, principalmente, em 3 frações: uma que permaneceu na origem (fração I), outra que correu paralelamente com o iodeto (fração II) e uma terceira correspondente a T_3 e/ou T_4 (fração III) (fig. 2).

Na cromatografia em papel, o pico II, em ambos os sistemas de solventes (1) e (2), comportou-se como iodeto. As percentagens relativas de radioatividade encontradas foram 88,18% e 91,01% para os sistemas (1) e (2), respectivamente (figs. 3 e 4).

O pico III, na cromatografia em papel, comportou-se como T_3 e T_4 em ambos os sistemas de solventes (1) e (3) (figs. 5 e 6).

Quanto à radioatividade eluída no pico IV, cerca de 65% no sistema (1) e 88% no sistema (2) da radioatividade total permaneceram entre a MIT e DIT, isto é, presumivelmente na região dos glucuronidatos, de acordo com os trabalhos de Taurog (composto U) (62,62%)⁽¹⁹⁾. O iodeto, em ambos os sistemas de solventes, estava representado, respectivamente, por 13,96% e 10,45% nos sistemas (1) e (2) (figs. 7 e 8).

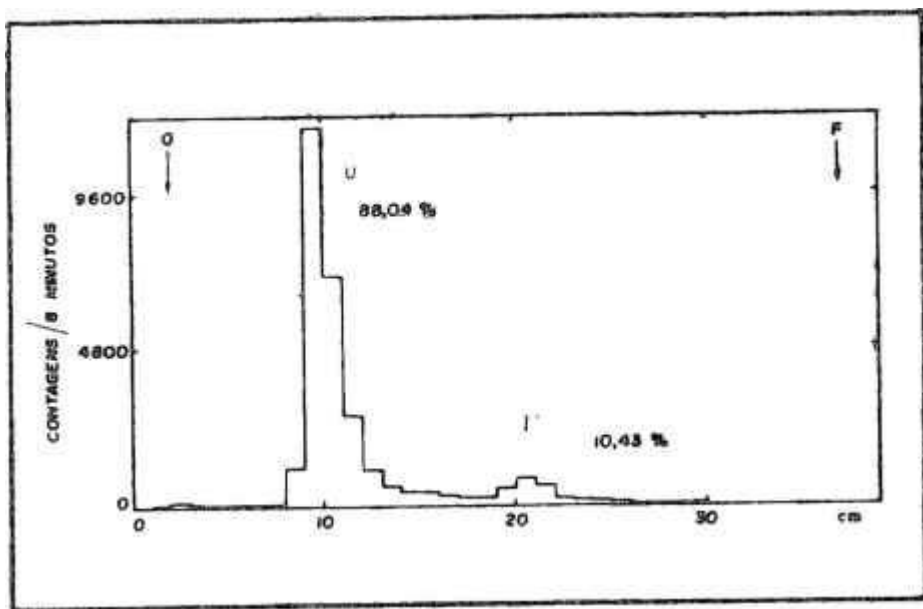


Fig. 8 — Distribuição da radioatividade na cromatografia em papel em col : $H_2O(NH_4OH)$ do pico IV correspondente à fig. 1. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi eluído com 0,2 ml de metanol: amônia e 30 μ l foram analisados conjuntamente com a mistura de padrões não radioativos (MIT, DIT, NaI, T_3 e T_4) nas proporções descritas anteriormente, em papel Whatman n.º 3. Sistema de solvente: col : $H_2O(NH_4OH)$. Tempo de desenvolvimento: 20 horas. O: origem, F: frente.

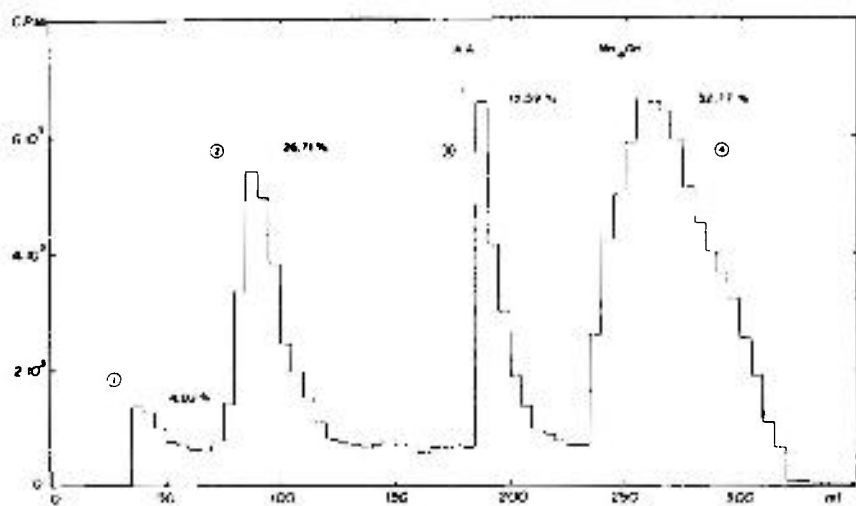


Fig. 9 — Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) da bile ($T_4^{125}I$). 4 ml de bile foram extraídas com butanol (pH 1,0) de acordo com a técnica descrita em "Materiais e Métodos". O extrato seco foi dissolvido em água e acertado o pH a 7,4 com H_2SO_4 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 140 ml de TRIS-HCl, 100 ml de AA e 100 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20,0 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Volume de cada fração: 4,5 ml.

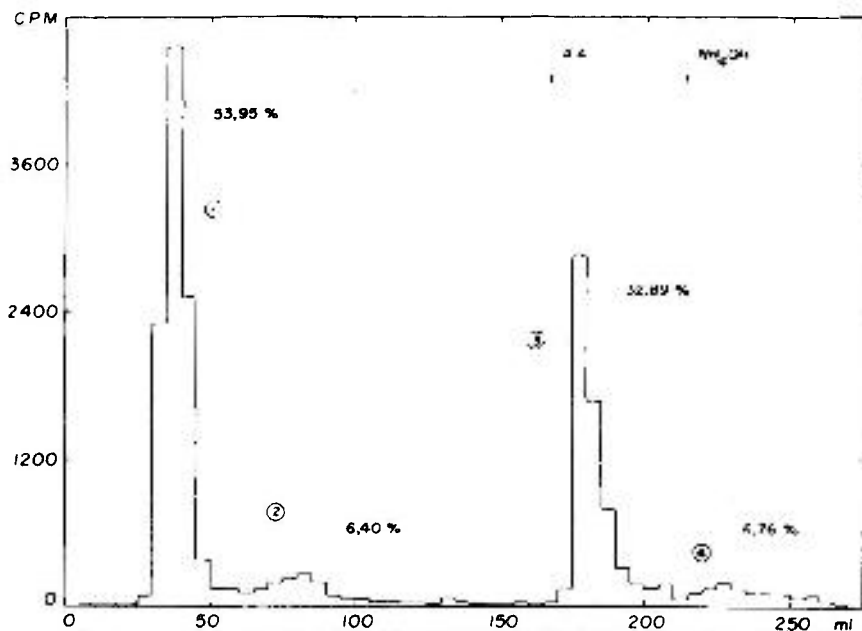


Fig. 10 — Gel filtração em Sephadex do hidrolisado enzimático do pico I correspondente à fig. 1. Em uma alíquota de 5 ml do pico I foram adicionadas 5.000 unidades de β glucuronidase, o pH acertado a 4,5 com ácido acético 10% e tamponado com acetato de pH 4,5 e colocada a $37^\circ C$ durante 15 horas. O pH elevado a 7,4 com NaOH 10%. O hidrolisado foi refiltrado em Sephadex com 140 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA e 80 ml NH_4OH 2 N, em coluna de 2,5 x 20,0 cm, com velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5 ml.

Extratos butanólicos biliares

Em quatro extrações sucessivas, cerca de 93% da radioatividade total contida na bile foram extraídas com butanol acidificado. A fração extraível pelo butanol foi filtrada em Sephadex. O comportamento durante a eluição foi o mesmo da bile *in natura*, isto é, a eluição de 4 picos de radioatividade (fig. 9).

A percentagem relativa de radioatividade devida ao pico I foi menor que a obtida na bile *in natura* (fig. 1). A extração com butanol do pico I da bile *in natura* mostrou que cerca de 15% permaneceram insolúveis. Tal comportamento levou a postular que talvez o pico I fosse formado de proteínas iodadas e metabólitos originados da T_3 e/ou T_4 .

A refiltração em Sephadex dos picos I e IV, após o tratamento com β -glucuronidase, mostrou a presença de duas subfrações, uma que permanecia inalterada (pico I) e outra com as mesmas propriedades da T_3 e/ou T_4 livres (pico III). A maioria da radioatividade do pico IV era recuperada com T_3 e/ou T_4 livres após o tratamento com β -glucuronidase, enquanto que somente uma fração comparativamente menor àqueles hormônios foi obtida do pico I nas mesmas condições (figs. 10 e 11).

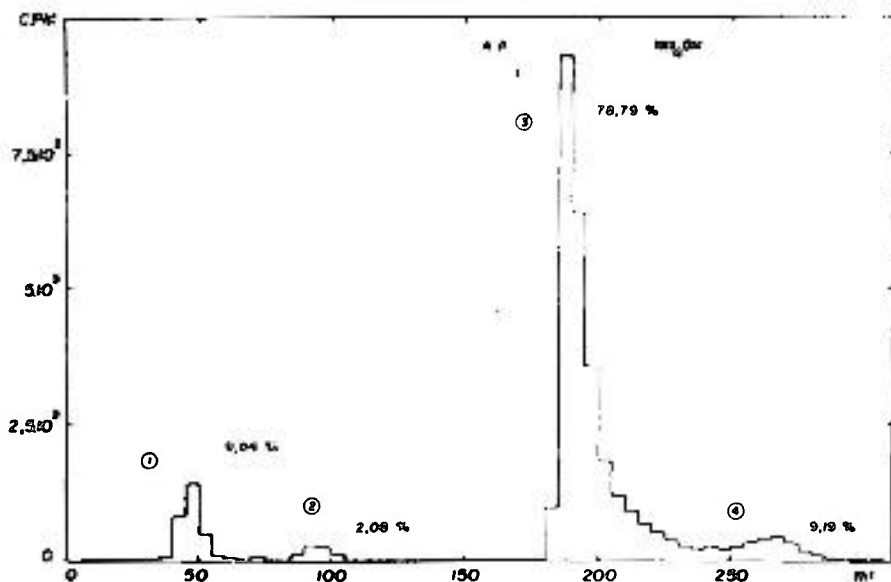


Fig. 11 — Gel filtração em Sephadex do hidrolisado enzimático do pico IV correspondente à fig. 1. Em uma alíquota de 5 ml do pico IV, após evaporação do NH_4OH , foram adicionadas 5.000 unidades de β -glucuronidase, o pH acertado a 4,5 com ácido acético 10% e tamponado com acetato de pH 4,5 e colocada a 37°C durante 15 horas. O pH foi elevado a 7,4 com NaOH 10%. O hidrolisado foi refiltrado em Sephadex com 140 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA e 80 ml de NH_4OH 2 N, em coluna de 2,5 x 20,0 cm, com velocidade de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

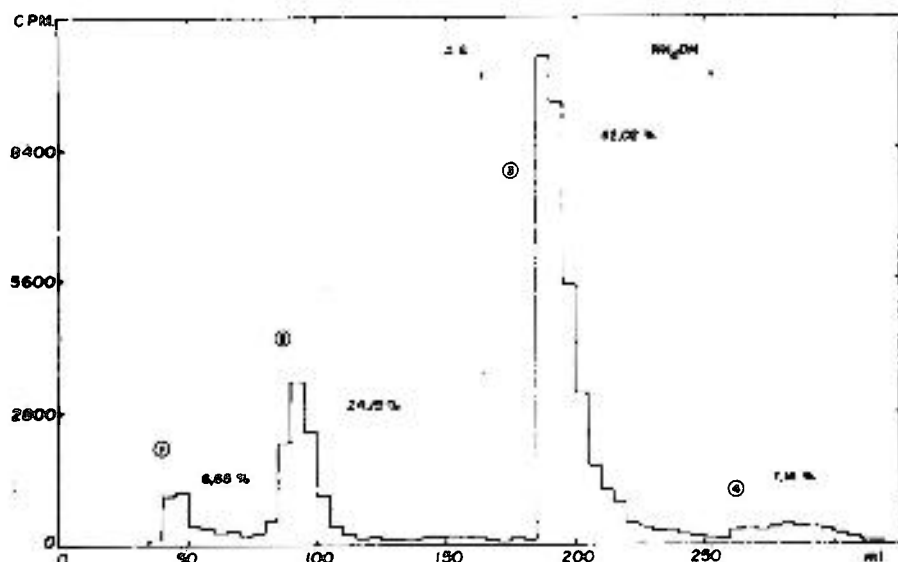


Fig. 12 — Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) do conteúdo intestinal do reto. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi dissolvido em água e acertado o pH a 7,4 com H_2SO_4 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 80 ml de AA e 100 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20,0 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

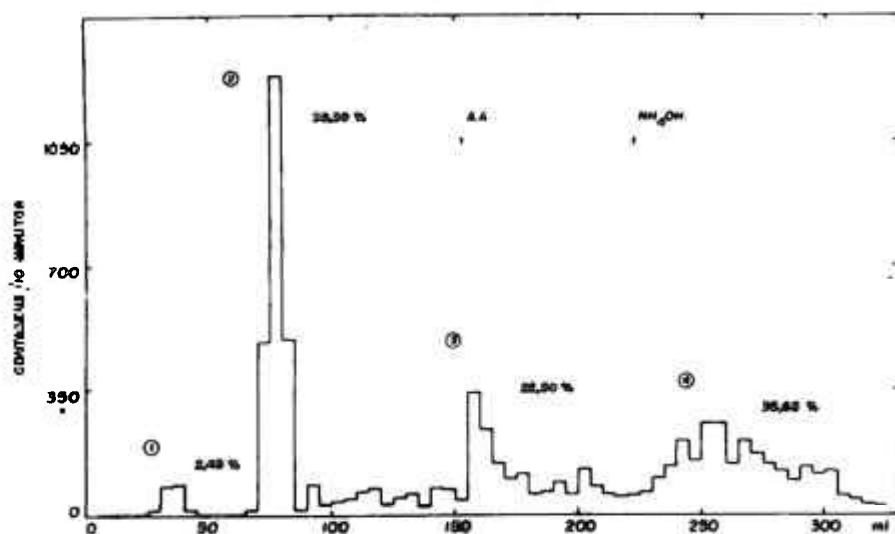


Fig. 13 — Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) do conteúdo intestinal do duodeno. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi dissolvido em água e acertado o pH a 7,4 com H_2SO_4 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 70 ml de AA e 100 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20,0 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

Extratos butanólicos dos conteúdos intestinais

O butanol acidificado extraiu 72% da radioatividade total em 4 extrações sucessivas. Em todas as filtrações em gel de Sephadex dos extratos butanólicos foram obtidos 4 picos de radioatividade. As percentagens relativas dos diversos picos variaram, dependendo da porção intestinal analisada. Foi verificado que houve evidente diminuição da radioatividade eluída no pico IV (7,14%) (fig. 12), quando da filtração do material obtido da porção retal, indicando que os compostos iodados excretados na bile, na forma conjugada, seriam desconjugados durante o trânsito intestinal. Quanto ao pico III, o de hormônios livres, verificou-se que houve incremento de radioatividade, quando comparado com os resultados obtidos na bile. No duodeno, o pico III era representado por 33,59% da radioatividade total; esta percentagem aumentou para cerca de 64,66% no conteúdo do íleo, enquanto que a radioatividade do pico IV diminuiu para cerca de 5,26% (figs. 13 e 14).

DISCUSSÃO

Os métodos comumente utilizados para a separação dos compostos radioiodados da bile e das fezes são muito trabalhosos e pouco sensíveis, visto que esses materiais, particularmente as

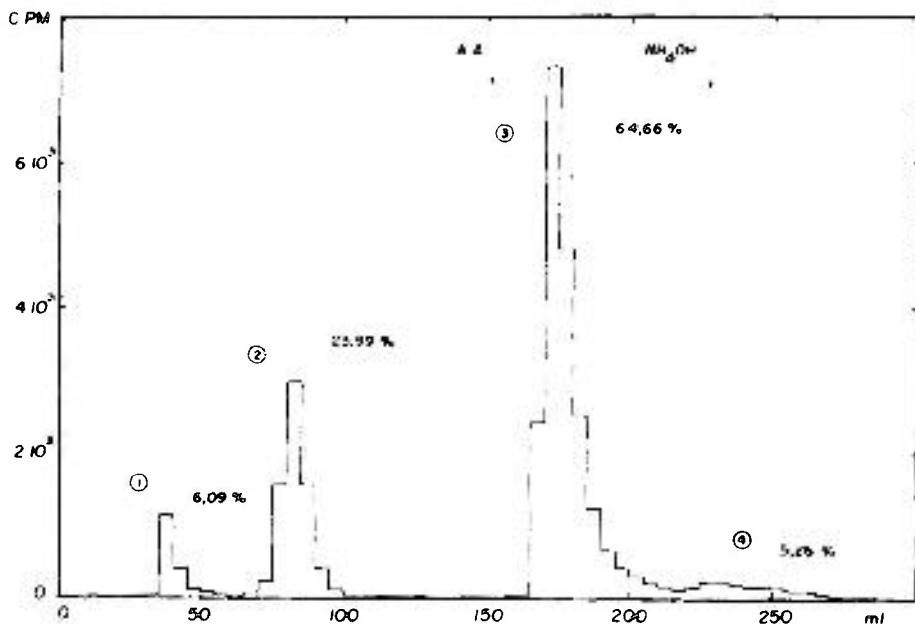


Fig. 14 — Gel filtração em Sephadex da fração butanol extraível (pH 1,0) do conteúdo intestinal do íleo. O extrato seco, preparado como descrito em "Materiais e Métodos", foi dissolvido em água e ajustado o pH a 7,4 com H_2SO_4 10% e filtrado em Sephadex. Foram utilizados 120 ml de TRIS-HCl, 60 ml de AA e 70 ml de NH_4OH 2 N. Coluna de 2,5 x 20,0 cm. Velocidade de eluição de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 5,0 ml.

fezes, possuem baixa atividade específica sob condições normais. Na cromatografia em papel somente uma pequena quantidade (cerca de 250 μ l) de extrato biliar ou fecal pôde ser analisado convenientemente. Esta pequena quantidade é normalmente proveniente de 1 ou 2 g de material original. Isto tem restringido a aplicação do método ao estudo do metabolismo entero-hepático dos hormônios tireoidianos.

A introdução do Sephadex por Lissitzky na separação dos compostos iodados séricos permitiu a aplicação desta metodologia à análise da bile e das fezes. Além das dificuldades na caracterização precisa de alguns picos eluídos do Sephadex devido à falta de padrões convenientes, o método parece ser muito promissor. Assim, a principal vantagem desse método está relacionada com a quantidade de material que pode ser manipulada, desde que até cerca de 40 g de fezes podem ser utilizados conduzindo a uma melhor sensibilidade.

Além disso, o método possibilita trabalhar-se com as frações obtidas da filtração em Sephadex com relativa facilidade, quando for necessário, desde que uma quantidade razoável de material é disponível em grau razoável de pureza para posteriores manipulações.

Dos 4 picos obtidos na filtração em gel, dois (picos II e III) são devidos ao iodeto e T_3 e/ou T_4 , respectivamente. Estas conclusões são derivadas da cromatografia em papel e correspondem aos achados de Lissitzky⁽⁵⁾ em sua análise em Sephadex do soro. Para os outros picos (I e IV) permanecem dúvidas quanto à sua constituição.

Uma pequena parte do pico I (cerca de 15%) não é butanol-extraível e permaneceu na origem da cromatografia em papel, quando a bile *in natura* foi utilizada. Esta fração do pico I, provavelmente, corresponde a proteínas iodadas. A fração solúvel em butanol do pico I não foi identificada. O tratamento com β -glucuronidase resultou em dois outros picos, quando da análise em Sephadex: um que permaneceu na origem (53,95%) e outro eluído como T_3 e/ou T_4 (32,89%) (fig. 10). Entretanto, não podemos afirmar que o pico I contém derivados glucurônicos de T_3 e/ou T_4 , porque a análise prévia em cromatografia em papel não mostrou qualquer zona que pudesse ser relacionada com aqueles derivados; além disso, o pico IV pode ser melhor relacionado com os mesmos (fig. 11).

As experiências mostraram que, em 4 extrações sucessivas dos conteúdos intestinais do reto, o butanol acidificado extraiu 72% da radioatividade total. Este valor está muito próximo dos encontrados por Taurog (76%)⁽¹⁹⁾ e Furth e cols. (80%)⁽²⁾, mas superiores aos relatados por Heninger (30 a 60%)⁽³⁾.

Embora a análise da bile e fezes em Sephadex tenha mostrado igual número de picos, a percentagem relativa foi diferente. Na bile, os derivados glucurônicos estavam representados por cerca de 60% da radioatividade total, enquanto nas fezes somente cerca de 5% foram encontradas no pico IV; enquanto o pico III (T_3 e/ou T_4) foi mais representativo na análise das fezes. Possivelmente estes resultados são devidos à ação da β -glucuronidase bacteriana intestinal que liberaria a T_3 e/ou T_4 dos glucuronídeos.

A análise em gel de Sephadex não mostrou a presença de tirosinas iodadas.

SUMMARY

Isolation of feces and bile iodate compounds by filtration through Sephadex G 25 M. Study of the entero-hepatic metabolism of ^{125}I -thyroxine.

Bile "in natura" and butanolic extract from duodenum, ileum and rectum contents were submitted to filtration through Sephadex G 25 M gel. This procedure resulted in the separation of 4 radioactive peaks. The composition of each peak has been analysed by paper chromatography. Although peak I seems to be partially composed of iodinated proteins, its actual composition has not been determined. Peaks II and III are due, respectively to iodide and T_3 and/or T_4 . The data obtained by means of paper chromatography of peak IV, after treatment with β -glucuronidase led to the assumption that it might be mainly glucuronic derivatives of T_3 and/or T_4 .

RÉSUMÉ

Séparation des composés iodés biliaries et fécaux par filtration en Sephadex G 25 M. Étude du métabolisme entéro-hépatique de la ^{125}I -thyroxine

La bile "in natura" et l'extrait butanolique des contenus intestinaux du duodéne, de l'iléon et du rectum furent soumis à la filtration en gel de Sephadex G 25 M. Ce procédé déclancha une séparation de 4 pics de radioactivité. La composition de chaque pic fut analysée par moyen de la chromatographie en papier.

Quoique le pic I paraisse être composé, en partie, par des protéines iodées, sa composition réelle ne fut pas déterminée. Les pics II et III sont une conséquence d'iodure et de T_3 et/ou T_4 , respectivement. Les données obtenues à travers la chromatographie en papier sur le pic IV, après un traitement avec β -glucuronidase, amena la suggestion ce pic puisse se représenter surtout par des dérivés glucuroniques de T_3 et/ou T_4 .

REFERÊNCIAS

1. Blomsted, B. & Neujahr, H.Y.: Chromatographic studies on iodine-131 compounds in feces and bile, *Acta Endocrinol.* 47 : 343, 1964.
2. Furth, E.D., Becker, D.V., Nunes, E.A. & Reid, E.C.: Thyroxine metabolism in the dog, *Endocrinol.* 82 : 976, 1968.
3. Heninger, R.W., Larson, F.C. & Albright, E.C.: Iodine containing compounds of extrathyroidal tissues, *J. Clin. Invest.* 42 : 1.761, 1963.
4. Kendal, E.C.: The physiologic action of Thyroxine, *Endocrinol.* 3 : 156, 1919.
5. Lissitzky, S., Bismuth, J. & Rolland, M.: Séparation des composés iodés du sérum et de la thyroïde par filtration sur gel de dextran (Sephadex), *Clin. Chim. Acta* 7 : 183, 1962.
6. Nicolau, W., Ikeda, E., Gonzales, H., Marques de Assis, L. & Pieroni, R.R.: Faecal excretion of ^{131}I in methimazole and propyl thiouracil-treated thyrotoxic patients, *Excerpta Medica* 157 : 168, 1968.

7. Roche, J., Michel, O., Michel, R. & Tata, J.: Biliary elimination of 3,3',5-triiodothyronine and thyroxine and their conjugation with glucuronic acid in the liver in thyroidectomized rats, *Compt. Rend. Soc. Biol.* 147 : 1.243, 1953.
8. Taurog, A., Briggs, F.N. & Chaikoff, I.L.: ^{131}I -labeled-L-thyroxine. I. An unidentified excretion products in bile, *J. Biol. Chem.* 191 : 29, 1951.
9. Taurog, A., Briggs, F.N. & Chaikoff, I.L.: ^{131}I -labeled-L-thyroxine. II. Nature of the excretion products in bile, *J. Biol. Chem.* 194 : 655, 1952.
10. Taurog, A.: Conjugation and excretion of the thyroid hormone, *Brookhaven Symp. Biol.* 7 : 111, 1955.