

**DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM
CAMADA DELGADA DOS HORMÔNIOS TIREÓIDEOS
— ¹²⁵I NA TIREÓIDE DO RATO E SUA APLICAÇÃO A
UM TUNICADO UROCORDADO — *CIONA
INTESTINALIS* L.**

ARY DOMINGOS DO AMARAL *

Livre Docente do Departamento de Fisiologia Geral do
Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

RESUMO

Descrevemos um método para a separação e determinação dos hormônios tireóideos- ¹²⁵I nos homogeneizados de tireóide de ratos após a administração de Iodeto- ¹²⁵I usando a Cromatografia em Camada Delgada.

Após a padronização o mesmo método foi aplicado ao homogeneizado de um Tunicado: *Ciona intestinalis* L.

DETERMINATION OF ¹²⁵I-THYROID HORMONES IN THE RAT THYROID BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND ITS APPLICATION TO A TUNICATE, *CIONA INTESTINALIS* L.

SUMMARY

A method for the separation and determination of thyroidal hormones- ¹²⁵I with Thin-Layer Chromatography in thyroid homogenate of rats after the administration of Iodide- ¹²⁵I is described.

After the standartization the same procedure was applied to the homogenate of the Tunicate *Ciona intestinalis* L.

INTRODUÇÃO

O interesse nos efeitos biológicos da tiroxina e seus análogos cresceu enormemente após Gross e Pitt-Rivers (1951)⁽¹⁾ terem demons-

* Este trabalho foi realizado no Departamento de Zoologia da Universidade de Nottingham (serviço do Prof. E. J. W. Barrington) com o auxílio da C.N.E.N. (Comissão Nacional de Energia Nuclear do Brasil).

trado a presença de 3, 5, 3' triiodotironina na glândula tireóidea e no meio circulante humano.

Assim, vários métodos foram descritos para a separação por cromatografia em papel dos iodoaminoácidos e compostos relacionados⁽²⁾.

Entretanto, a separação por cromatografia em papel requer de 18 a 72 horas para o desenvolvimento do cromatograma no tanque o que acarreta consequentemente um aumento da desidatação dos hormônios⁽³⁾.

A cromatografia em camada delgada é um método simples e rápido de separação e passou a ser usada com muito sucesso na análise de vários tipos de compostos⁽⁴⁾.

Este trabalho teve particularmente a finalidade de investigar a aplicação da cromatografia em camada delgada na análise de cada hormônio tireóideo ** (T_3 , T_4) e seus precursores ** (MIT, DIT) nos fluidos biológicos.

Todo o método e os sistemas para cromatografia em camada delgada aqui descritos foram eficazes na separação de misturas contendo hormônios tireóideos e seus precursores. O trabalho foi realizado usando primeiramente tireóide de rato, marcada com ^{125}I , com o propósito de calibrar o sistema de varredura e seleção dos melhores solventes para cromatografia em camada delgada para, depois, ser aplicado aos homogeneizados de *Ciona intestinalis* L.

MATERIAL E MÉTODO

a. *Tireóide de ratos*: Injetou-se uma série de animais com 200 μCi de ^{125}I cada e decorridas 24 horas eles foram sacrificados, removendo-se a glândula tireóidea.

Cada glândula foi homogeneizada num homogeneizador tris-R, inicialmente com 0,2 M NaCl contendo anti-oxidante (metil-mercaptoimidazol) e depois com tris-salina pH 8,3 fria, usando o mínimo volume possível de tampão.

b. *Ciona intestinalis* L.: Incubou-se uma série de tunicados em água do mar contendo 200 μCi ^{125}I /litro, durante 5 a 10 dias, sendo a água trocada diariamente.

** *Abreviações usadas*: T_4 = L-tiroxina, T_3 = L, 3,5, 3'triiodotironina, DIT = 3, 5, diiodotirosina, MIT = ? Monoiodotirosina, NHCl = ácido clorídrico normal, μCi = micro Curie, NaCl = cloreto de sódio, NH_4OH = — hidróxido de amônio, B.D.H. = British Drugs House, N NaOH = hidróxido de sódio normal, U.V = lâmpada ultra-violeta.

c. *Hidrólise*: Todos os passos descritos a seguir foram os mesmos tanto para o material proveniente dos ratos como dos tunicados: hidrolizou-se os homogeneizados com Pronase tamponada (protease bacteriana adquirida do B.D.H.) na concentração de 0,5% durante 6 a 8 horas, a 37°C, em recipiente escuro e atmosfera de nitrogênio, com agitação constante ⁽³⁾.

d. *Extração dos compostos marcados (MIT, DIT, T₃ e T₄)*: Após a hidrólise o homogeneizado foi acidificado (pH \leq 2) com gotas de N-H Cl e em seguida extraído três vezes com metade do seu volume com n-butanol ⁽⁵⁾.

e. *Remoção dos precursores (MIT, DIT) hormonais do extrato butanólico*: A seguir o extrato butanólico foi alcalinizado (pH \geq 7,4) com N NaOH e lavado duas vezes com água, assim todo MIT e DIT passam para a fase aquosa deixando as iodotironinas (T₃ e T₄) na fase butanólica ⁽⁵⁾.

f. *Concentração dos extratos*: Os extratos butanólicos (T₃ e T₄) e aquoso (MIT, DIT) foram reduzidos ao menor volume possível com pressão reduzida num evaporador rotativo a vácuo (Rotavapor — R) ^(6, 7).

g. *Eluição*: Após a concentração, as amostras foram dissolvidas em 0,2 ml de etanol (95%) e NH₄OH concentrado (1:1 v/v) estando assim prontas para a análise por cromatografia em camada delgada.

h. *Chomatografia em camada delgada (C C.D.)*: Todos os reagentes usados para C.C.D foram analíticos e os melhores resultados foram obtidos equilibrando, em temperatura ambiente, os solventes relacionados na Tabela 1.

As placas para C.C.D. foram preparadas usando-se dois adsorventes diferentes de acordo com vários autores: Silica gel G e celulose microcristalina, porém todas as placas tiveram a espessura de 0,25 mm de camada adsorvente.

Usaram-se sempre padrões não radioativos das substâncias (MIT, DIT, T₃ e T₄) juntos na mesma placa em concentrações usadas por outros autores ⁽⁸⁾ e seguindo o processo recomendado por eles ^(8, 9, 10).

i. *Identificação por U V* : Após o desenvolvimento do cromatograma as placas de cromatografia em camada delgada foram secas e examinadas com luz ultra-violeta (short wave (2537) radiation lamp), fornecida pelo aparelho: Chromatolite U V Hanovia equipment.

j. *Varredura das placas de C.C.D.* : Seguindo-se a identificação pela lâmpada U V as placas foram varridas em um sistema semelhante ao descrito por Osborn e Simpson ⁽¹²⁾ e por Wayne e Chavre ⁽¹³⁾ usando um detector de cintilação para ¹²⁵I da Panax acoplado a um medidor de razão (ratemeter) e um registrador (flat-bed chart recorder SREC-2).

k. *Revelação das manchas*: Após a varredura, as placas foram vaporizadas com as diferentes misturas: 0,2% ninhidrina para revelação de amino grupo; 0,1% Pd Cl₂ para revelação de iodo e a mistura sulfato cérico, arsenito de sódio e azul de metileno para revelação de iodoaminoácidos no geral ⁽¹⁴⁾.

l. *Recuperação dos compostos marcados*: Cada região da amostra correspondente ao padrão colocado ao lado no mesmo cromatograma foi raspada da placa, dissolvida em água e medida a radioatividade num detector para radiação gama (autogamma analyser attached to a Packard n.º 3375 trichannel scintillation counter).

RESULTADOS

O resultado da determinação por C.C.D. dos iodoaminoácidos usando seis solventes diferentes, relacionados na Tabela I são apresentados nas Tabelas II e III, onde assinalamos também a percentagem de cada composto na análise total.

Com relação as Tabelas II e III, verificamos que os solventes ácidos (Tabela III) propiciaram melhor recuperação da tiroxina: 14,23%, 15,80% e 10,90% com os solventes número IV, V e VI respectivamente.

As Tabelas IV e V apresentam os resultados da varredura das placas de C.C.D. e a autorradiografia dessas placas onde temos uma ótima discriminação de cada composto pesquisado na varredura com o emprego do método ora descrito.

TABELA I

Solventes usados nas análises de hidrolisados de tireoide de ratos e de *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden)

Solventes alcalinos tendo como absorventes:

Silica Gel G

- I. Álcool amílico terciário: acetona: 2N-NH₄ OH (25:8:7)
- II. Acetato de etila: metanol: 2N-NH₄ OH (100:40:60) usar a fase superior
- III. n-Butanol saturado com 2N-NH₄OH

Solventes ácidos tendo como absorventes:

Celulose em pó

- IV. Ácido fórmico: água (1:5) com 0,3 g/l de tiosulfato de sódio
- V. Acetona: 0,5 N ácido acético (2:8)
- VI. Butanol terciário: 2N-NH₄ OH: clorofórmio (376:70:60)

Assim, com o processo acima descrito selecionamos o solvente n.º IV, ácido fórmico e água para a análise do hidrolizado de *Ciona intestinalis* L. e a Tabela VI nos dá a radioatividade das manchas separadas por C.C.D. com especial referência à atividade da região correspondente à tiroxina encontrada nos cromatogramas de homogeneizado da túnica e do corpo dos animais.

Portanto, com o emprego da técnica descrita pudemos separar a tiroxina de seus precursores e identificar sua marcação contando com grande precisão a região do cromatograma correspondente a T₄ e usando somente 20 µl de amostra.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O problema da biossíntese tireóidea, nos vertebrados dito inferiores, principiou há muito tempo atrás. Cameron^(15, 16) demonstrou por análise bioquímica, quantidades significantes de iodo nos tunicados.

Barrington e Franchi⁽¹⁷⁾ e Barrington⁽¹⁸⁾ demonstraram a fixação de radioiodo por *Ciona intestinalis* L. e Roche et al.⁽¹⁹⁾ deram também em *Ciona* a distribuição dos compostos radioiodados no endótilo e na camada externa da túnica.

Na mesma espécie animal, ainda Roche et al.^(20, 21) demonstraram que a percentagem de tiroxina em animais sem túnica sofre uma

TABELA II
Hidrolisado de tireóide de rato (20 μ l)
Medidas radioativas das placas de cromatografia em camada delgada em detetor de cintilação
tipo poço das regiões correspondentes a cada composto

Compostos	Solvente I			Solvente II			Solvente III		
	C. P. M.	% desvio padrão	% de cada composto	C. P. M.	% desvio padrão	% de cada composto	C. P. M.	% desvio padrão	% de cada composto
M. I. T	7.220	1,0	17,52%	9.128	1,0	15,63%	36.036	0,5	77,45%
D. I. T	27.265	0,5	66,16%	42.109	0,3	72,11%			
T ₃	1.926	2,5	4,67%	2.686	1,5	4,60%	8.086	1,0	17,38%
T ₄	2.971	1,5	7,20%	3.344	1,5	5,72%			
I	1.826	2,5	4,43%	1.124	2,5	1,92%	2.205	0,7	4,74%
B. G.	149	2,5		150	2,5				

Abreviações:

M. I. T = Moniodotirosina D. I. T = Diiodotirosina
T₃ = Triiodotironina T₄ = Tiroxina
C. P. M. = Contagem por minuto B. G. = Back Ground ou radiação natural

TABELA III

Hidrolisado de tireóide de rato (20 μ l)

Medidas radioativas das placas de cromatografia em camada delgada em detetor de cintilação tipo poço das regiões correspondentes a cada composto

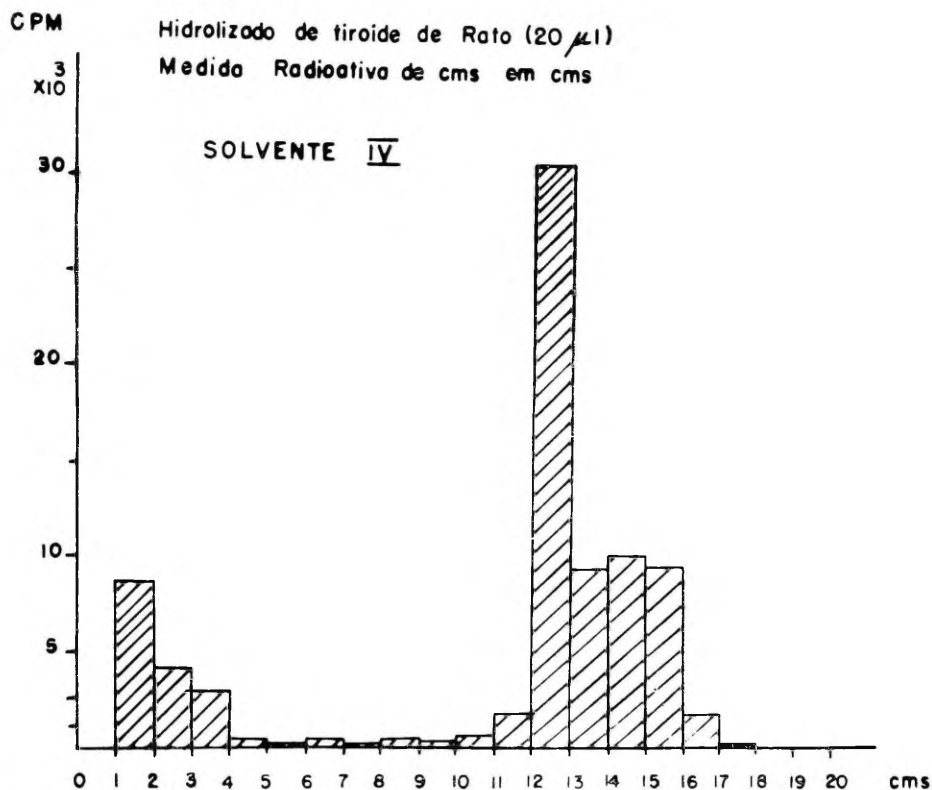
Compostos	Solvente IV			Solvente V			Solvente VI		
	C. P. M.	% Desvio padrão	% de cada composto	C. P. M.	% desvio padrão	% de cada composto	C. P. M.	% desvio padrão	% de cada composto
M. I. T.	19.723	0,7	21,50%	11.648	0,7	15,60%	17.156	0,7	30,17%
D. I. T.	52.046	0,2	56,80%	47.587	0,3	63,73%	31.220	0,5	54,90%
T ₃	2.451	1,5	2,67%	2.230	1,5	2,97%	1.623	0,7	2,85%
T ₄	13.040	0,5	14,23%	11.811	0,7	15,80%	6.201	1,0	10,90%
I	4.337	1,5	4,73%	1.389	2,5	1,99%	662	2,5	11,16%
B. G.	149	2,5		150	2,5		140	2,5	

Abreviações:

M. I. T. = Monoiodotirosina D. I. T. = Diiodotirosina

T₃ = Triiodotironina T₄ = Tiroxina

C. P. M. = Contagem por minuto B. G. = Back Ground ou radiação natural



grande redução bem como a captação do iodo também é reduzida em animais nessas condições.

Barrington e Thorpe ^(22, 23, 24) demonstraram a presença de iodo ligado na região do endóstilo e faringe de *Ciona intestinalis* L. e ainda a presença de MIT, DIT e tiroxina nos extratos do mesmo animal ⁽²⁵⁾.

Concluindo, a biossíntese tireóidea neste tunicado *Ciona intestinalis* L. está bem estabelecida e com o nosso trabalho selecionamos uma técnica muito boa para separar e identificar a tiroxina; usando a análise por cromatografia em camada delgada, aliada à autorradiografia e varredura dos radiocromatogramas obtivemos uma ótima recuperação das frações hormonais e precursoras usando pequena quantidade de amostra.

O presente método pode ainda ser empregado em qualquer tipo de homogeneizado tireóideo e em particular ao de tunicado.

Com este trabalho confirmamos os de Barrington e Roche no mesmo campo e introduzimos a cromatografia em camada delgada na endocrinologia comparada, usando principalmente material oriundo de tunicados.

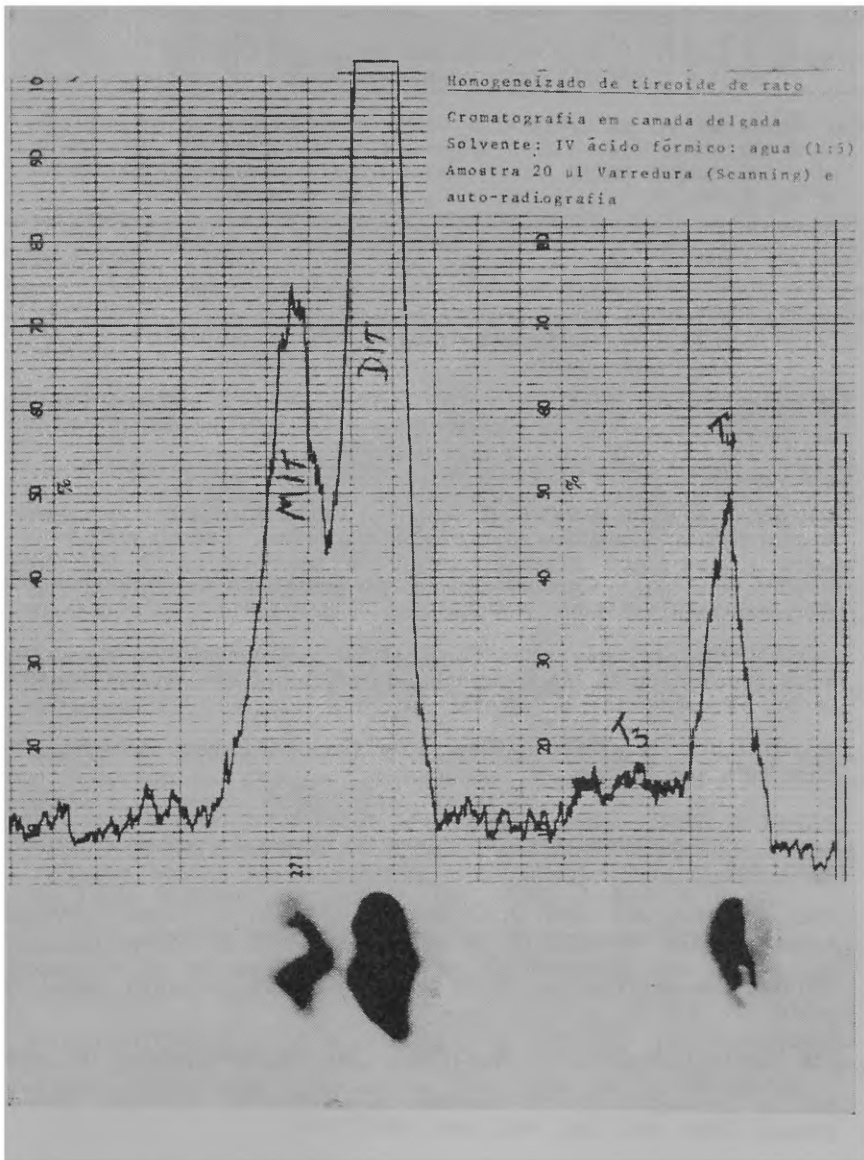


TABELA VI

Ciona intestinalis L.: Determinação da radioatividade nas manchas de cromatografia em camada delgada de tiroxina, e 3 moniodotirosina mais 3-5 diiodotirosina

Média das medidas de 10 animais (20 μ l cada)

	Tiroxina		MIT + DIT	
	C.P.M.	D.P.	C.P.M.	D.P.
Tunica	4.668	\pm 19	6.062	\pm 38
	4.717	\pm 15	6.133	\pm 12
	4.699	\pm 3	6.152	\pm 25
M =	4.695		M =	6.116
Corpo	2.097	\pm 13	4.814	\pm 16
	2.082	\pm 24	4.849	\pm 8
	2.168	\pm 36	4.848	\pm 7
M =	2.116		M =	4.837
R.D.F =	150	\pm 3	153	\pm 2

Abreviações: C.P.M. = contagem por minuto
 R.D.F = radiação de fundo
 M. = média

B I B L I O G R A F I A

- GROSS, J. & PITT RIVERS, R. (1951) — Unidentified iodine compounds in human plasma in addition to thyroxine and iodine. *Lancet*, 2:766-767.
- SMITH, I. (1960) — Chromatographic and Electrophoretic, Techniques. London, William Heinemann Book Ltd., p. 166.
- ROSEMBERG, L. L. & LaROCHE, G. (1964) — Determination of Iodoamino acids composition of rat thyroidal iodoproteins: Some sources of serious error. *Endocrinology*, 75:776-786.
- RANDERATH, K. (1953) — Thin Layer Chromatography. Academic Press, New York and London.
- ZAPPI, E. (1967) — Group separation of an aqueous solution of some iodinated amino acids and derivatives by means of solvent extraction. *J. Chromat.*, 30:611-613.
- CRAIG, L. C.; GREGORY, J. D. and HAUSMANN, W. (1950) — Versatile Laboratory Concentration device. *Anal. Chemistry*, 22:1462.
- MURRAY, E. V. (1955) — An all-glass rotary film evaporator. *Anal. Chemistry*, 27:1207.
- SHAPIRO, O. & GORDON, A. (1966) — An improved method for separation of radioactive thyroid hormone metabolites by thin-layer chromatography. *Proc. Soc. Exp. biol. med.*, 121:577-579.

9. OSBORN, R. H. & SIMPSON, T. H. (1969) — The characterisation of iodo-amino acids and their derivates by thin-layer chromatography. *J. Chromat.*, **40**:219-224.
10. PATTERSON, S. T. & CLEMENTS, R. L. (1964) — The application of paper and thin-layer chromatography to the identification of thyroxine in a feeding stuff additive. *Analyst*, **89**:328-331.
11. Hanovia technical handbook "Rapid testing by fluorescence".
12. OSBORN, R. H. & SIMPSON, T. H. (1968) — Quantitative scanning of ¹²⁵I on thin-layer chromatograms. *J. Chromat.*, **35**:436-440.
13. WEST, C. D.; WAYNE, A. W. and CHAVRE, V. J. (1965) — Thin-layer chromatography for thyroid hormones. *Anal. Biochem.*, **12**:41-48.
14. MANDL, R. H. & BLOCK, R. (1959) — Methods for the qualitative, semi-quantitative determination of iodoamino acids and of inorganic iodide in iodoprotein digest and in human serum. *Arch. Bioch. Biophys.*, **81**:25-35.
15. CAMERON, A. T. (1914) — Contribution to the biochemistry of iodine. I. The distribution of iodine in plant and animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **18**:335-380.
16. CAMERON, A. T. (1915) — Contribution to the biochemistry of iodine. II. The distribution of iodine in plant and animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **23**:1-39.
17. BARRINGTON, E. J. W. & FRANCHI, L. L. (1956) — Organic binding of iodine in the endostyle of *Ciona intestinalis* L. *Nature*, **177**:432.
18. BARRINGTON, E. J. W. (1957) — The distribution and significance of organically bound iodine in the ascidian *Ciona intestinalis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **36**:1-16.
19. ROCHE, J.; SALVATORE, G.; RAMETTA, G. & VARRONE, S. (1959) — Sur la présence d'hormone thyroïdiennes (3:5:3' triiodothyronine et thyroxine) chez un Tunicien (*Ciona intestinalis* L.). *C. R. Soc. Biol.*, **153**:1751-1757.
20. ROCHE, J.; SALVATORE, R.; RAMETTA, G. & VARRONE, S. (1961) — Iodoprotéines et biosynthèse d'hormone thyroïdiennes chez un Tunicien *Ciona intestinalis* L. *C. R. Soc. Biol.*, **155**:1494-1501.
21. ROCHE, J.; SALVATORE, G. & RAMETTA, G. (1962) — Sur la présence et la biosynthèse d'hormone thyroïdiennes chez un Tunicien, *Ciona intestinalis* L. *Biochim. Biophys. Acta*, **63**:154-165.
22. BARRINGTON, E. J. W. & THORPE, A. (1963) — Comparative observations on iodine binding by *Saccoglossus horsti* Brambell and Goodhart and by the Tunic of *Ciona intestinalis* L. *Gen. Comp. Endocr.*, **3**:166-175.
23. BARRINGTON, E. J. W. and THORPE, A. (1965) — An autoradiographic study of the Binding of Iodine¹²⁵ in the Endostyle and Pharynx of the Ascidian, *Ciona intestinalis* L. *Gen. Comp. Endocr.*, **5**:373-385.
24. BARRINGTON, E. J. W. & THORPE, A. (1965) — The identification of monoiodotyrosine, diiodotyrosine and thyroxine in extracts of the endostyle of the ascidian *Ciona intestinalis* L. *Proc. Roy. Soc. B*, **163**:136-149.

