

# Metabolismo de la Tiroxina marcada con Yodo (131-1) en el Hígado Perfundido de Rata

Heinz W. Wahner, M.D. \*

\* Profesor Asociado, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia, S.A.

\* Este trabajo es parte de un estudio hecho con los Doctores Eunice V. Flock, Charles A. Owen, Jr. and Kent Huizenga, Mayo Clinic, Rochester, Minn. U.S.A.

Presentado como trabajo de ingreso en la Sociedad Colombiana de Endocrinología Bogotá, Noviembre, 1966.

Kendal en 1919 administró 200 mgs. de tiroxina pura a un perro con fístula biliar, recobrando a los 2 días el 43% del yodo en la bilis (1). Este hecho demostró que el hígado tenía una función excretora en el metabolismo de dosis altas de la hormona. Posteriormente, tanto la tiroxina como pequeñas cantidades de yodo fueron encontradas en la bilis. Sin embargo, solo fué posible describir la existencia de un gran número de metabolitos de la tiroxina en la bilis, cuando pudo obtenerse tiroxina radioactiva de una alta actividad específica y además cuando la técnica de cromatografía de papel hizo posible la separación de compuestos yodados estrechamente relacionados entre sí. De esta manera fué posible aclarar en cierto grado un fenómeno tan complejo como el metabolismo hepático de la tiroxina.

En 1953, Briggs, Brauer, Tauer y Chaikoff, demostraron que la vía más importante en el metabolismo de la tiroxina por el hígado, involucraba la conjugación de la hormona con ácido glucurónico. (2) Roche, Michel y Tata, consideraron por primera vez que la deiodización de la tiroxina era una función metabólica del hígado. (3) Como vías menos importantes en el metabolismo hepático de la tiroxina se han descrito

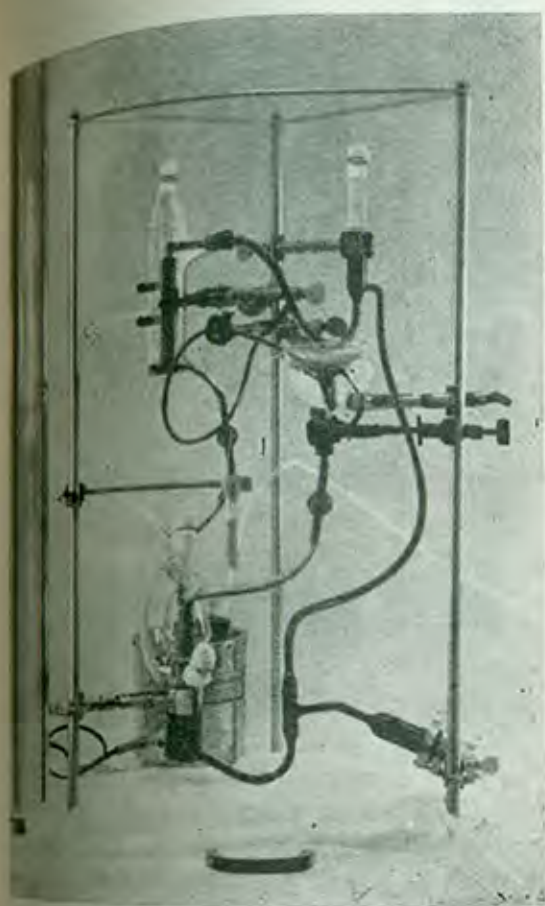
la deaminación oxidativa con formación de derivados del ácido acético (3), formación de sulfato (4) y metilación (5).

La mayoría de estos estudios han sido realizados en fragmentos de hígado, homogenizados o extractos de tejido hepático y además han sido diseñados para estudiar únicamente vías metabólicas individuales o aisladas. Sin embargo, usando una preparación que incluye la totalidad del hígado, nosotros hemos podido estudiar la relación que existe entre esas vías metabólicas y además evaluar su importancia en el metabolismo hepático de la tiroxina. Los amplios estudios del metabolismo de la tiroxina en la rata y el hígado perfundido (6-7) y la rata desvicerada (8) se han publicado recientemente.

## MÉTODOS:

El sistema de perfusión fue montado en un aparato similar al descrito por Brauer y Col (9) (fig. 1). Este aparato consiste en una cámara para el hígado, un oxigenador, un depósito para el líquido de perfusión y un sistema de bombeo constante a través de la cual circula la sangre. El hígado fue removido bajo anestesia con éter y posteriormen-

FIG. No. 1



se caracterizó el canal biliar y las venas hepática y porta. Después se conectó el hígado con el aparato de perfusión, de tal manera que la sangre entrara a través de la vena porta y saliera a través de la vena hepática. Las muestras de bilis se obtuvieron de una pequeña cánula colocada en el conducto biliar. Todo el sistema se mantuvo en una cabina cerrada y en condiciones constantes de temperatura y humedad. El flujo sanguíneo hepático se mantuvo alrededor de 1.5 ml. por gr. de tejido hepático. El líquido de perfusión estaba compuesto de 20 ml. de solución salina y 100 ml. de sangre, obtenida por punción cardíaca realizada en ratas. A la sangre utilizada para la perfusión se le agregó 1-tiroxina marcada con  $^{131}\text{I}$  en posición 3' o 5', con una actividad específica de más o menos 25 mc/mg

(Abbott Laboratories, Oak Ridge, Tennessee) la dosis de tiroxina varió entre 38 y 202 uc, o sea entre 1.2 y 7.2 ug respectivamente. Según pudimos establecer por electroforesis, la capacidad de enlace de la sangre no fue excedida por la cantidad de tiroxina agregada. La radioactividad total se midió en un contador de centelleo de yoduro de sodio (activado con talium). La radioactividad de la masa total del hígado fue medida en un contador del tipo del estante alto de Texas Corp. (Geiger). Las proteínas de la sangre, la bilis y los extractos de hígado fueron precipitados con 4 volúmenes de metanol-acetona (1:1). Se desarrollaron además cromatogramas bidimensionales duplicados de estos extractos, con marcas apropiadas, primero en butanol-dioxano-amonio (BDA) y luego en amyl alcohol terciario-amonio (TAA) (10). Las manchas radioactivas se localizaron por radioautografía. Las marcas fueron localizadas por atomización con cloruro de paladium para el yodo y con ácido sulfanílico diasotizado para los compuestos no conjugados de tironina. Fueron usados también marcadores no radioactivos de la tiroxina (T4), 3,5, 3'-triyodotironina (T3), ácido tetrayodotiroacético (tetrac) y 3,3'-diyotironina (T2). Las manchas radioactivas se cortaron y posteriormente se midieron en un contador de centelleo. Se desarrollaron también cromatogramas unidimensionales múltiples de los extractos en BDA. Los radioautogramas fueron hechos en papel "Linograph Ortho Film (Eastman)". En los cromatogramas unidimensionales, se realizó la elusión de las bandas radioactivas con 0.2N  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Estas bandas (G, M y F) contienen los compuestos conjugados. Se usó betaglucuronidasa bacteriana para producir la hidrólisis de los glucurónicos en la región G; para hidrolizar los sulfatos se usó arrilsulfatasa (Mylasa-P) y N-HCl para hidrolizar los sulfatos de otros conjugados ácidohidro-

lizables en la región M. Después de incubación las enzimas fueron precipitadas con 4 volúmenes de metanol-acetona y el residuo se lavó una vez más. Por lo menos el 98% de la radioactividad fue extraída con este procedimiento. Se realizaron cromatogramas bidimensionales de los productos hidrolíticos y se midió la radioactividad de cada uno de ellos. Antes de la evaporación de los extractos, se agregó tiourácilo para prevenir la degradación (11).

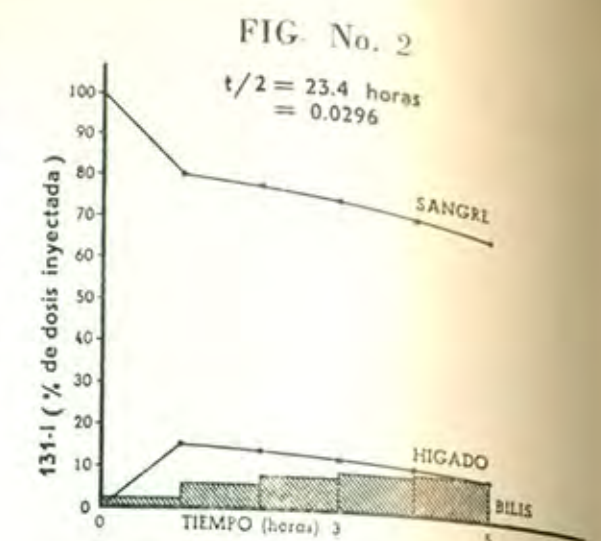
## RESULTADOS

### 1. — Yodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ) en la sangre perfundida.

Cuando el hígado aislado de rata fue perfundido con sangre que contenía tiroxina marcada con  $^{131}\text{I}$ , se observó una rápida desaparición del compuesto en esa sangre durante la primera hora de perfusión (Fig. 2) Posteriormente se observó una disminución constante y pequeña, que llegó hasta más o menos 70.1% de la dosis administrada al final de las 5 horas de perfusión. La vida media del  $^{131}\text{I}$  en la sangre se determinó gráficamente y fue de 23.4 horas. La constante desaparición calculada por la fórmula  $\frac{0.593}{t/2}$ , fue de 0.0296

por hora, o sea alrededor del 3% por hora. La cromatografía del papel en dos dimensiones, realizada con extractos del líquido de perfusión mostró que el porcentaje de tiroxina disminuía y que el yodo aumentaba durante las 5 horas de perfusión hepática y además no aparecieron cantidades significativas de otros compuestos radioactivos. En 8 perfusiones, el porcentaje promedio de  $^{131}\text{I}$  plasmático encontrado en la tiroxina fue de 77.2, más o menos 1.4 SEM. al comienzo del experimento y disminuyó hasta 54.4, más o menos 2.5 SEM. durante las 5 horas de perfusión. El por-

centaje del yodo aumentó desde 8 a 34.4, más o menos 2.5 SEM.



centaje del yodo aumentó desde 8 a 34.4, más o menos 2.5 SEM.

### 2.—Captación de $^{131}\text{I}$ por el hígado perfundido:

Se encontró una captación rápida inicial de  $^{131}\text{I}$ , con un valor máximo de 18%, más o menos 2.1 SEM. de la dosis de  $^{131}\text{I}$  en la primera hora, seguida por una disminución graduable hasta 13.4%, más o menos 1.8 SEM., al final de las 5 horas (Fig. 2). La tiroxina fue el principal compuesto obtenido en el hígado, como que correspondió al 81.5% de la radioactividad total presente (Fig. 3). El siguiente compuesto fue el yodo y además el T3, glucuronidos y finalmente se encontraron algunas huellas de radioactividad en una región denominada el área M. en los cromatogramas. La tiroxina fue el principal glucuronido conjugado del tejido hepático (Tabla 1).

### 3.—Excreción biliar de $^{131}\text{I}$ .

Durante 5 horas de perfusión hepática con sangre que contenía tiroxina marcada con  $^{131}\text{I}$  la salida promedio de  $^{131}\text{I}$  en la bilis fue de 11.3%, más o menos 4.4 SEM., de la dosis inyectada. La excreción horaria de  $^{131}\text{I}$  mostró una disminución gradual de más o menos 50% del valor máximo al final de

FIG. No. 3

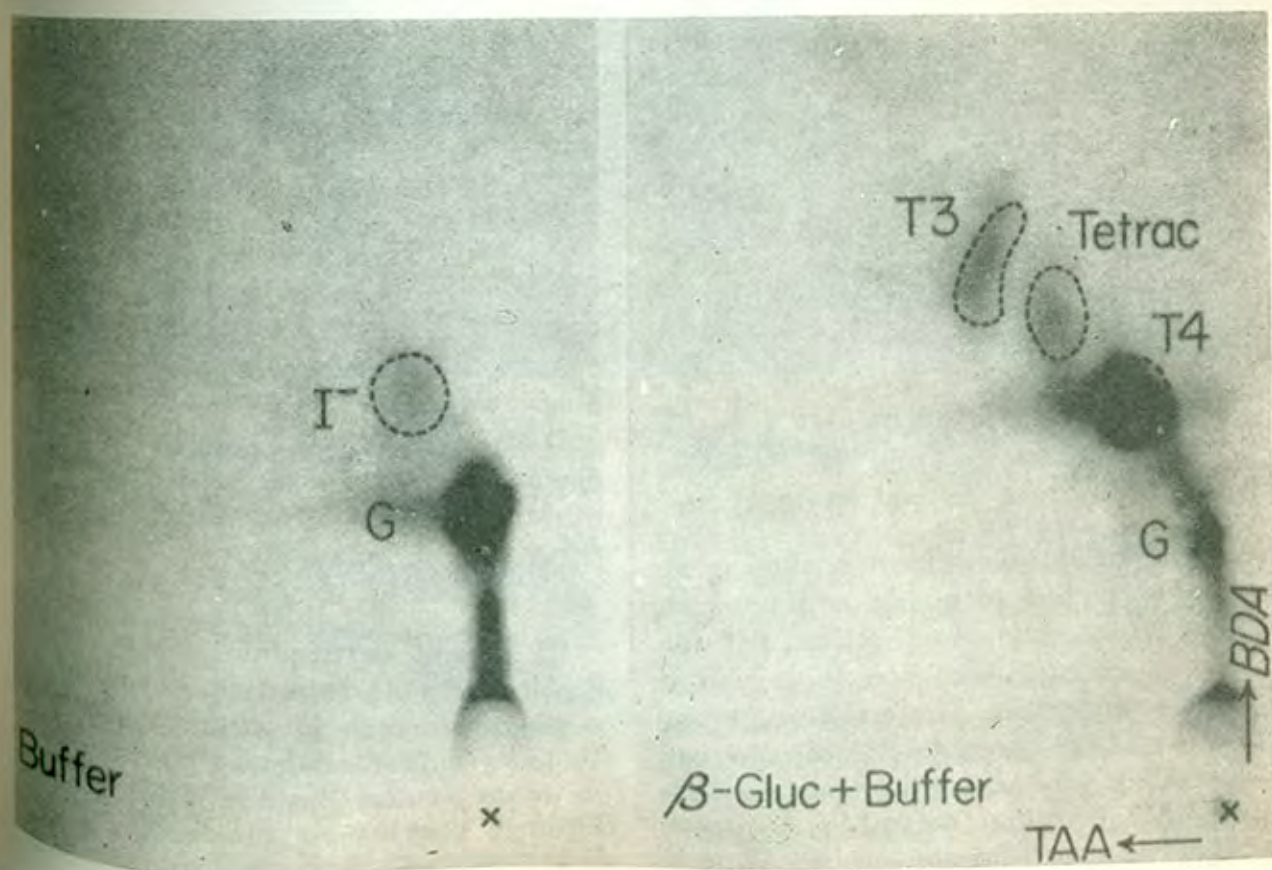


las 5 horas. Los cromatogramas bidimensionales de bilis obtenidos del hígado aislado mostraron cantidades grandes de radioactividad en la región de glucuronidos (G) y pequeñas cantidades en la región F, en la región (M), en yodo, en tiroxina y solo huellas en Tetrac (Tabla 1). La tiroxina fue el principal producto de hidrólisis de los glucuronidos por la betaglucuronidasa seguida por yodo y Tetrac (Fig. 4).

4.—La región de sulfato (M) de los cromatogramas de bilis:

En los cromatogramas unidimensionales de bilis se aceptaron como correspondientes a la región M, 2 bandas muy próximas. Una de estas bandas coincidió con el marcador de yodo y por lo

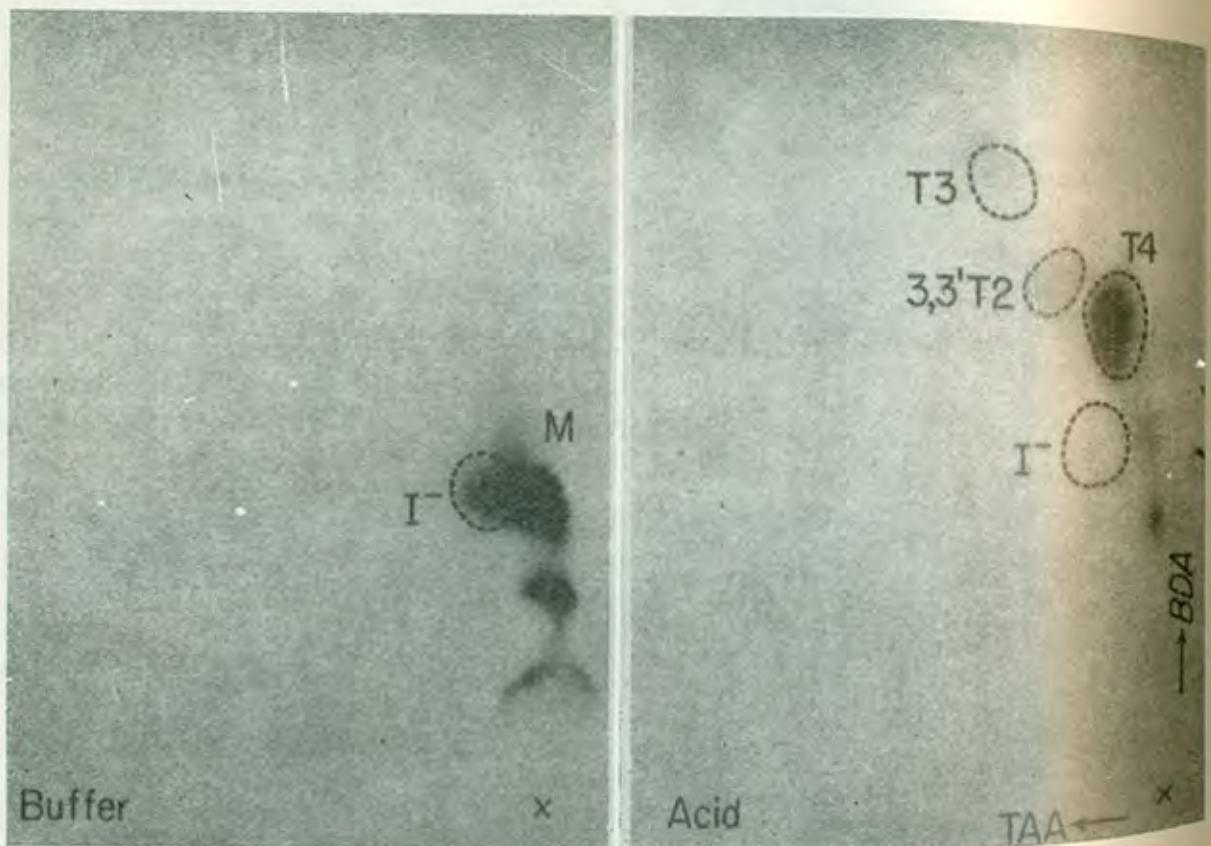
FIG. No. 4



tanto representó al yodo. La otra banda, de 10 a 15% de la región, solo pudo ser separada de la banda de yodo usando cromatografía bidimensional. En la bilis del hígado perfundido, la banda M de yodo libre presentó el 4.6, más o menos 0.3% SEM de la radioactividad biliar total. La hidrólisis ácida liberó principalmente tiroxina con pequeñas

cantidades de T3 y huellas de 3,3' diyodotironina (T2), (Fig. 5). No hubo hidrólisis cuando se incubaron alicuotas de la región M con pancreatina arrilsulfatasa o con glucuronidasa. Esto demuestra que la banda M de yodo libre no corresponde a sulfato, glucuronido, o unión peptídica conjugada con pancreatina hidrolizable.

FIG. No. 5



5.—La región F de los cromatogramas de bilis:

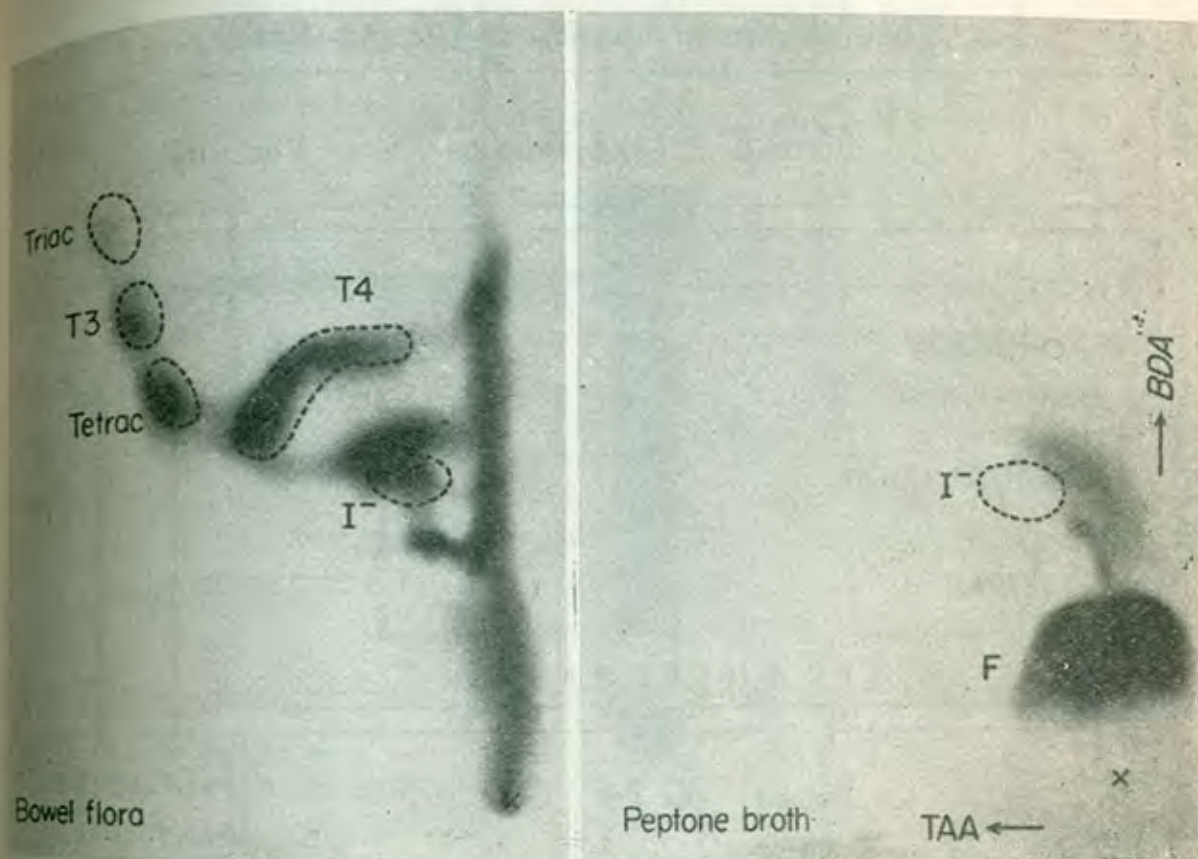
El material obtenido por elusión de la región F fue incubado con amilasa, beta glucuronidasa, pancreatina, tripsina y fue también hervido con ácido. No se encontró hidrólisis. Sin embargo, cuando el material obtenido por elusión con suspensión de bacterias preparadas con contenido intestinal en caldo de peptona a 37°C por 6 horas, se observó la li-

beración de tiroxina, tetrac, T3 y triac (Fig. 6).

#### COMENTARIOS:

El hígado perfundido capta tiroxina rápidamente de la sangre, deyodiza una cierta cantidad de la misma y agrega yodo a la sangre. Además conjuga una parte de la tiroxina con ácido glucoró de la tiroxina en la bilis. Estos estudios confirman las observaciones inicia-

FIG. No. 6



les de Briggs, Brauer, Taurog y Chaikoff (2) que demostraron que la conjugación de la tiroxina con ácido glucurónico es la vía principal en el metabolismo de esta hormona.

Aproximadamente el 10% del I-131 biliar fué excretado en forma de un compuesto que demostró una baja polaridad en el sistema de solventes usados (región F). Este compuesto ha sido observado por otros autores, pero no ha sido identificado. Nosotros hemos demostrado que este compuesto es un conjugado de la tiroxina, que es hidrolizable por la flora bacteriana intestinal.

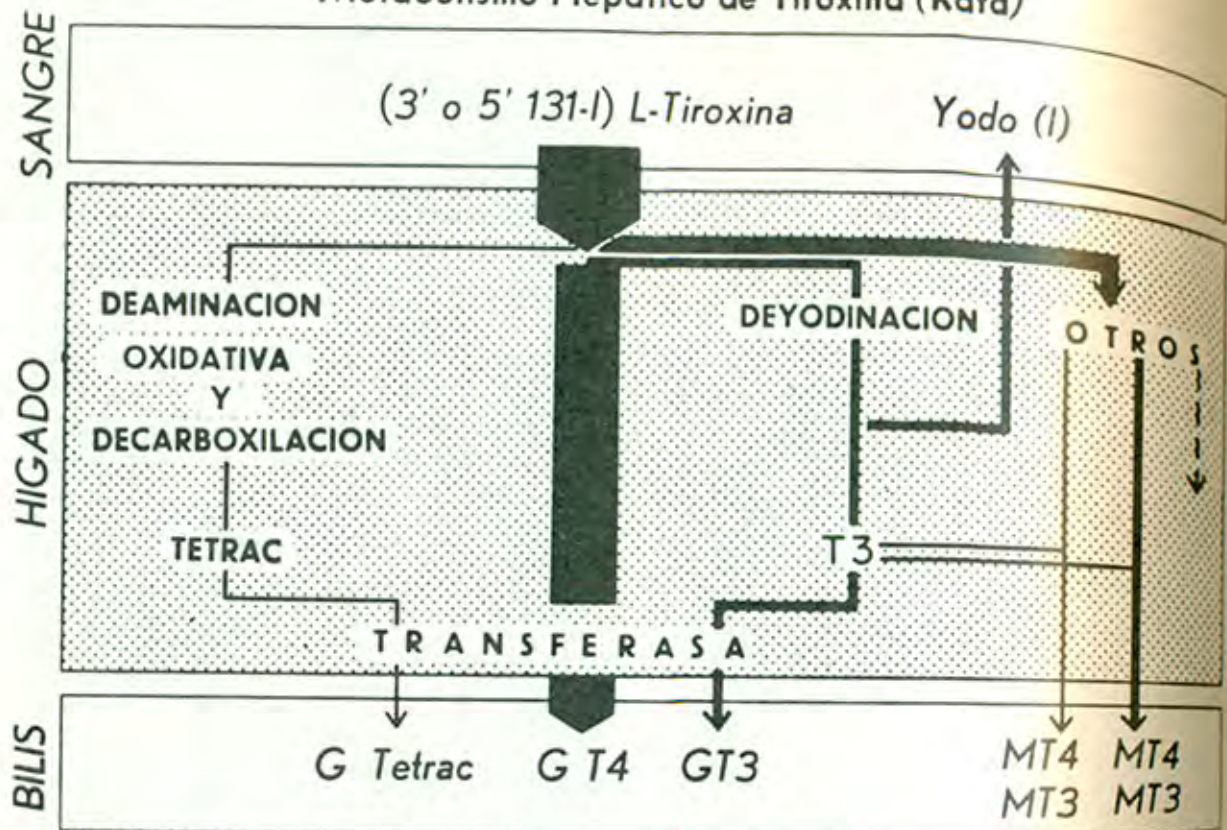
El hígado perfundido no hidroliza la tiroxina con sulfato. Sin embargo, se han encontrado algunos sulfatos en ratas con fistula biliar (6). Este hecho sugiere que el sulfato de tiroxina se forma fuera del hígado y es transportado pos-

teriormente por la sangre hasta el hígado, en donde es excretado por la bilis. El compuesto conjugado hidrolizable de tiroxina, no identificado, (MT4) es producido en el hígado y excretado en la bilis.

En la figura 7 se desarrolla un concepto del metabolismo hepático de la (3' o 5' 131-I) L-tiroxina, que corresponde a los resultados obtenidos en este estudio y al trabajo realizado por otros investigadores en el mismo campo. La tiroxina llega hasta el hígado a través de la sangre. Una buena cantidad de esta tiroxina se conjuga con ácido glucurónico y se excreta en la bilis. La deiodización de la tiroxina puede ocurrir en las posiciones 3' o 5' y el yodo radioactivo pasa a la sangre, desde donde se acumula en el sistema de perfusión, o es eliminado a través del riñón en el animal intacto. La deiodización de la tiroxina

FIG. No. 7

## Metabolismo Hepatico de Tiroxina (Rata)



puede ocurrir también en las posiciones 3 y 5 no marcadas. Se forman entonces compuestos radioactivos parcialmente deiodizados que son excretados en forma conjugada en la bilis. Una vía menos importante en el metabolismo de la tiroxina por el hígado es la deaminación oxidativa y la decarboxilación con la formación de ácido tetrayodotiroacético (etrac), el cual es excretado en la bilis en pequeñas cantidades, como un glucurónico. Tanto la tiroxina (T4) como la 3,5,3' triyodotironina, formadas por el hígado por deiodización parcial, pueden ser excretadas en pequeñas cantidades como compuestos conjugados ácido-labiles no identificados (MT4 - MT3). Ambas hormonas pueden ser excretadas en grandes cantidades en conjugados hidrolizables por flora intestinal bacteriana inespecífica, (FT4 - FT3). La flecha de línea interrumpida en el diagrama indica que otros metabolitos de la tiro-

xina pueden encontrarse en el hígado. Las vías por las cuales se forman estos metabolitos son desconocidas.

## RESUMEN:

El hígado es uno de los sitios principales en el metabolismo periférico de la tiroxina y tiene un importante papel en la regulación del "pool" de hormona tiroidea. El metabolismo hepático de la tiroxina fué estudiado usando una preparación de hígado aislado, que permite el análisis continuo de los líquidos de perfusión y de la bilis y del hígado mismo al final del experimento. Se encontró que la deiodización y la conjugación con ácido glucurónico son las vías más importantes en el metabolismo de la tiroxina. Se observaron vías metabólicas menos importantes. Se describe además un compuesto biliar de la tiroxina, el cual no se conocía previamente.

	Area F	Area G	Area M	T-4	Yodo	T-3
Higado	.....	3.1—0.3	1.6—0.8	81.5—1.0	6.4—0.3	5.9—0.7
Bilis	16.7—0.5	69.7—0.8	4.6—0.3	3.0—1.2	3.8—0.2	.....
Plasma	.....	.....	.....	72.1—5.1	15.0—1.9	.....

TABLA 1: *Compuestos radioactivos en higado, bilis y plasma al fin de 5 horas de perfusión con 131-I-Tiroxina. Valores en % de radioactividad total en higado, plasma o bilis al final de las 5 horas. Promedio y error standard. Area G: Glucuronidos; Area M: Sulfatos y compuestos semejantes: para explicación ver figura 3.*

Manchas en los Cromatogramas	Número de Experimentos	T-4	T-3	Teirac.	Triac.	I	T-2
Area F	3	50.7 +3.5	19.2 +2.8	6.9 +2.0	4.6 +0.9	—	—
Area G	8	61.9	—	3.6	—	3.4 +0.8	—
Area M	8	72.2 +9.1	Traza	—	—	—	10.2 +3.1

TABLA 2 *Compuestos radiactivos biliares obtenidos después de hidrólisis con bacterias intestinales de rata (F), beta glucuronidasa (G) y ácido hidrocólico (M).*

*(Los valores son promedio y error standard).*

FIGURA 1. Sistema de perfusión del higado aislado.

FIGURA 2. Distribución de 1-131 en sangre, higado y bilis durante 5 horas de perfusión con tiroxina marcada con 1-131.

FIGURA 3. Autorradiografía de un cromatograma bidimensional de extracto del tejido hepático perfundido por 5 horas con 1-131-tiroxina. Para mayor explicación ver el texto.

Figura 4. Cromatogramas bidimensionales de los glucuronidatos biliares (G).



Izquierdo: antes de hidrólisis. Derecho:  
Después de hidrólisis con beta glucoro-  
nidasas.

FIGURA 5. Cromatogramas bidimensionales de los compuestos ácidos solubles en la región M de la bilis.

Izquierdo: antes de la hidrólisis con ácido hidrocólico. Derecho: Después de hidrólisis.

FIGURA 6. Cromatogramas bidimensionales de los compuestos biliares en la región F antes y después de la hidrólisis por bacterias intestinales.

FIGURA 7. Esquema del metabolismo de tiroxina en el hígado de la rata.

## BIBLIOGRAFIA

1. KENDALL, E. C.: The physiologic action of thyroxine. *Endocrinology*. 3:136, 1919.
2. BRIGGS, F. N., BRAUER, R. W. TAUROG, A. and CHAIKOFF, I. N.: Metabolism of 131-1 labeled thyroxine. Studies with isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 172:56, 1953.
3. ROCHE, J., MICHEL, R. and TATA, J.: Sur le métabolisme hépatique de la D-thyroxine. *C. R. Soc. Biol., Paris* 148:1545, 1954.
4. ROCHE, J., MICHEL, R., CLOSON, J., and MICHEL, O.: Sur la sulfaconjugaison hépatique de la 3, 5, 3' triiodo-L-thyronine et la présence d'un ester sulfurique de cette hormone dans le bile la plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* 33:461, 1959.
5. ROCHE, J. MICHEL, R. and GREGORIO, P.: Caracterization de l'O-methylthyroxine (MeT<sub>4</sub>) dans l'urine de Rat. *C. R. Soc. Biol.* 154:1148, 1960.
6. FLOCK, E. V., BOLLMAN, J. L., GRINDLEY, J. H. and MCKENZIE, B. F.: Metabolites of radioactive L-thyroxine and L-triiodothyronine. *Endocrinology*. 61:461, 1957
7. FLOCK, E. V. and OWEN, C. A., Jr.: Metabolism of thyroid hormones and some derivatives in isolated perfused rat liver. *Am. Physiol.* 209:1039, 1965.
8. FLOCK, E. V. and BOLLMAN, J. L.: The metabolism of thyroxine and triiodothyronine in the eviscerated rat. *J. Biol. Chem.* 215:709, 1955.
9. BRAUER, R. W., PESOTTI, R. L. and PIZZOLATI, P.: Isolated rat liver preparations. Bile production and other basic properties, *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 78:174, 1951.
11. TAUROG, A., WHEAT, J. D. and I. L. CHAIKOFF.: Nature of the 131-1 compounds appearing in the thyroid vein after injection of iodide 131-1. *Endocrinology*. 58:121, 1956.