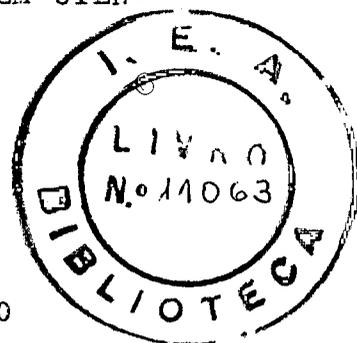


MARGO VANIA HEHL REBELO DOS SANTOS

" SÔBRE O VOLUME SANGUÍNEO DE Bufo marinus ictericus "

Tese apresentada ao Insti-
tuto de Bio-Ciências da -
Universidade de São Paulo
- Departamento de Fisiolo-
gia Geral, sob a orienta-
ção do Prof. Dr. PAULO
SAWAYA, para obtenção do
título de MESTRE EM CIÊN-
CIAS.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA - INSTITUTO DE BIO-CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA GERAL

SÃO PAULO

1970

AGRADECIMENTOS

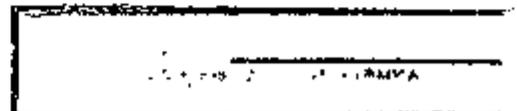
Ao Professor Doutor Romulo Ribeiro Vieroní, chefe da Divisão de Radiobiologia e Diretor do Instituto de Energia Atômica, pelo inestimável auxílio e pela permissão na utilização dos equipamentos e dependências da Divisão de Radiobiologia.

Ao Professor Doutor Paulo Sawaya, Diretor do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, o meu agradecimento pela orientação recebida e sugestões apresentadas, bem como pela boa vontade demonstrada na correção do texto.

As bibliotecárias Maria Florência Tonani Peixoto e Odília Pepper, pelo auxílio prestado no levantamento bibliográfico.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e do Instituto de Energia Atômica pelo apoio, incentivo e colaboração.

Finalmente a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



3 SÔBRE O VOLUME SANGUÍNEO DE Bufo marinus tetericus

I N D I C E

	Pag.
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODO	10
III - RESULTADO	19
IV - DISCUSSÃO	29
V - RESUMO	31
VI - CONCLUSÃO	32
VII - BIBLIOGRAFIA	34

INTRODUÇÃO

O presente trabalho visa determinar o volume sanguíneo de um dos animais que entre nós é utilizado nos laboratórios tanto clínicos como experimentais.

Na extensa bibliografia compulsada, como adiante se verá, não encontrei referência à determinação da volúmia no Anfíbio Anuro mais comum entre nós, como é o Bufo marinus lateralis.

Alguns métodos foram desenvolvidos para a determinação do volume sanguíneo, nas diversas espécies animais.

Os métodos são classificados em :

1) MÉTODOS DIRETOS

- a) Métodos da sangria, um dos métodos mais antigos, que é impossível determinar corretamente o volume sanguíneo do animal uma vez que, boa parte do sangue corporal permanece incluso nos vasos sanguíneos após a morte do animal, por hemorragia.
- b) Método da sangria e do lavado do organismo, também chamado método de WELCHER, que consiste na soma da quantidade de sangue do lavado dos vasos sanguíneos mais a quantidade de sangue recolhido na sangria.

III) MÉTODOS INDIRETOS

Nos métodos usuais indiretos se determina :

- a) o volume plasmático, injetando uma substância estranha (corante, traçador radioativo) no sangue, e estimando a diluição sofrida no plasma.
- b) o volume eritrocítico :
 - 1) injetando uma substância que se incorpore na massa eritrocítica " in vivo " ;
 - 2) injetando células vermelhas previamente marcadas " in vitro " e medindo a diluição sofrida por estas células marcadas .

Depois de medido o volume plasmático e o volume eritrocítico por um método de diluição , se calcula o volume sanguíneo utilizando a relação plasma e eritrócito tal como se determina pela leitura do hematócrito.

A quantidade total de sangue do corpo pode ser expressa como porcentagem do peso vivo do animal, dividindo o volume sanguíneo total pelo peso do animal.

Outros métodos são de difícil execução, como o método de HALDANE utilizando o monóxido de carbono, que além disso não é isento de toxicidade.

Nos trabalhos modernos o corante utilizado nas medidas do volume sanguíneo plasmático é o corante Azul de Evans também conhecido por T - 1824 .

Com o uso do corante Azul de Evans, COURTICE (1943) estimou o volume sanguíneo em uma série de cavalos, cabras, cachorros e coelhos normais, e os valores médios encontrados foram respectivamente : volumes plasmáticos de 51, 53, 54 e 50 ml/Kg do peso vivo; e volumes sanguíneos de 72, 70, 79 e 70 ml/kg.

O volume sanguíneo nestes animais que variam amplamente de tamanho, encontrou-se que era proporcional ao peso vivo e não a área superficial corporal. Este autor verificou também em cachorros da raça Galgo, que seus volumes sanguíneos tinham valores bem mais altos devido a volumes celulares maiores.

BONNYCASTLE (1947) usando este mesmo corante, determinou o volume plasmático e o volume sanguíneo em cachorros normais, porém seus resultados são um pouco mais altos que os obtidos por COURTICE.

NEWELL e SHAFFNER (1950) efetuaram determinações do volume sanguíneo em galinhas, utilizando o T - 1824 e encontraram que o volume sanguíneo das fêmeas aumentava em relação direta ao peso vivo entre 400 e 1200 gramas.

Segundo BRADY (1953) o Azul de Evans uma vez injetado, confunde em parte nos interstícios dos tecidos, em parte é eliminado pelos rins e , só uma parte é que se combina com as proteínas do plasma; é exatamente esta última cota que confere estabilidade ao corante injetado no sangue, enquanto que a cota não combinada com as proteínas abandonam a circulação rapidamente.

Outra possibilidade de erro com este método se pode ter na dosagem colorimétrica por causa da Lipemia ou em determinações subsequentes e próximas por causa da taxa de fundo do

do corante presente ser muito alta na circulação, devido ao resíduo das injeções anteriores.

MC LAIN, RUHE e KRUSE (1951) efetuaram determinações do volume sanguíneo em cachorros e coelhos, aplicando ao mesmo tempo os métodos da sangria e dos corantes; pelo método dos corantes acharam resultados mais altos.

Usando o método de corantes, em bovinos, MILLER (1931) obteve um volume sanguíneo de aproximadamente 6,7 % do peso vivo. Utilizando o mesmo método em ovelhas, BAKER (1933) obteve um valor aproximado de 6,8 % .

Seguindo o método de WELCKER, REICHERT e BROWN (1909) conseguiram os seguintes resultados :

CAVALOS	9,7 %	CACHORROS	7,2 %
BOIS	7,7 %	GATOS	6,5 %
OVELHAS	8,0 %	COELHOS	6,2 %
CABRAS	6,2 %	AVES	8,0 %

O volume de sangue dos mamíferos equivale normalmente de 7 a 10 % do peso total do corpo.

GREGERSEN e RANSON (1959) verificaram em mamíferos, que o volume relativo do sangue diminui ao aumentar o tamanho do corpo do animal e, é maior nos jovens que nos adultos .

GRIFFITHS e col. (1957) encontravam que as re-

lações do volume sanguíneo em aves e anfíbios, com respeito ao tamanho são similares as dos mamíferos .

Usando o método de Welcker, MARTIN (1947) encontrou para os Elasmobrânquios um volume sanguíneo de aproximadamente 5 % do peso do corpo, enquanto para os Teleosteos achou uma proporção menor : 1,5 a 3 % . Os valores encontrados por MARTIN foram bem mais altos do que os encontrados por DERRICKSON e AMBERSON (1934) .

PROSSER e WEINSTEIN (1950) estudando animais de circulação aberta e de circulação fechada, verificou que nos animais de circulação aberta o volume de sangue é essencialmente o mesmo que o volume extracelular total dos animais com circulação fechada.

Neste mesmo trabalho, PROSSER estudando o volume sanguíneo de sapo pelos métodos do Azul de Evans e Tioocianato de Sódio, achou os seguintes valores :

<u>Peso do Animal</u>	<u>T - 1824</u>	<u>Na CNS</u>
436g	7,2 %	29,8 %
504g	8,8 %	47,9 %

CONKLIN (1930) usando o método do corante para a determinação da volemia de rã, achou a relação de 8,74 % do peso vivo.

Com o desenvolvimento das técnicas nucleares foram produzidos isótopos radioativos artificiais de quase todos

os elementos, o que possibilitou ao campo das ciências médicas uma ampliação do diagnóstico e da terapia.

A aplicação de radioisótopos na hematologia, serviu para que os métodos antigos de determinação do volume sanguíneo se aperfeiçoassem e deu lugar ao desenvolvimento de novos outros métodos.

A determinação da volemia através o uso de radioisótopos se baseia no princípio da diluição do isótopo.

Uma quantidade conhecida de radioatividade é introduzida no compartimento cujo o volume deseja-se determinar; depois de se obter uma distribuição uniforme, a concentração numa amostra permite calcular o volume total.

HANSARD e col. (1951) fizeram medidas do volume sanguíneo em suínos pelo método dos eritrócitos marcados " *in vitro* " com o ^{32}P . Os valores obtidos para os suínos, com os pesos de 4 a 180 Kg, foi de 7,4 ml por 100g de peso vivo. Os animais maiores tinham valores menores, existindo uma diminuição regular nos valores dos animais que oscilam em peso dos 5 aos 160 Kg. Provavelmente isto explica o incremento na quantidade de gordura nos corpos dos animais maiores.

BARNARD e BAXTER (1965) mediram o volume das células vermelhas de carneiro e coelho usando o ^{51}Cr .

DELWAIDE e LEGLERCQ (1964) compararam dois métodos para a determinação da volemia, um medindo o volume eritrocítico depois de marcado com ^{51}Cr , e depois medindo o volume plasmático com a Soro Albumina Humana marcada com o ^{131}I ou também chamada pela sigla RISA:

Verificaram estes autores que os valores encontrados através o método da RISA foram bem mais altos.

EICH (1965) estudando os isótopos ^{32}P , ^{51}Cr , ^{59}Fe e ^{131}I na determinação da volúmia, verificou que o ^{51}Cr era o melhor marcador de eritrócitos e o ^{131}I o melhor marcador da Sêro Albumina Humana.

HOSAIN, IQBAL e QUAZI (1969), mediram o volume plasmático usando $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e $^{113\text{m}}\text{In}$ marcando proteínas. Obtiveram valores mais altos usando estes isótopos do que quando usavam o ^{131}I marcando a Sêro Albumina Humana.

Foi também testado por MARTONFFY e GOTTWALD (1969) a determinação do volume sanguíneo com a Sêro Albumina Humana marcada com ^{131}I .

Segundo TASCHIERI e PURICELLI (1963) entre as substâncias empregadas na determinação da massa sanguínea, a que melhor responde as características de ser facilmente manuseada, de homogeneizar-se rapidamente na circulação, de dar uma concentração hemática uniforme em um período de tempo curto e de permitir frequentes e sucessivas determinações, é a RISA .

CRISPELL, PORTER e NIESET (1950) fizeram um estudo profundo da RISA na determinação do volume sanguíneo no homem . Tais autores demonstraram, construindo a curva de desaparecimento da RISA na circulação sanguínea, que a concentração de tal substância no sangue se mantém constante depois da injeção por um tempo suficientemente longo para se ter uma distribuição homogênea na circulação, e permitir a retirada de amostras para a determinação antes de se ter uma diminuição apreciável na circulação.

Ainda é possível repetir numerosas determinações da massa sanguínea em tempos próximos sem injetar novas dosagens que provocariam danos radiobiológicos.

BRADY (1953) e CANNAM (1956) em estudos comparativos de vários métodos de determinação da massa plasmática, afirmaram que o método baseado no emprego da RISA, fornece valores mais constantes do que os dados obtidos com outros métodos.

Todavia este método não tem larga aplicação em clínica porque a técnica requer a disponibilidade do pessoal especializado no emprego de substâncias radioativas e aparelhamento especial, além de que a técnica de diluição isotópica, comumente usada, aumenta a incerteza na determinação do traçador presente na amostra e do traçador total introduzido.

A volemia sofre variações fisiológicas, com a idade do animal, com o tamanho e o sexo.

a) Recém - nascidos : maior volemia

b) Jovens : maior volemia

c) Machos : maior volemia

d) Fêmeas : menor volemia

e) Fêmeas Gestantes : maior volemia

Após consulta à bibliografia referente a determi-

nação do volume sanguíneo das várias espécies animais, observando não haver referências quanto ao uso da Soro Albumina Humana marcada com ¹³¹I, na determinação da volêmica do Bufo marinus Latereius, justificando pois desta forma a escolha deste método, para a realização deste experimento.

IX

MATERIAL E MÉTODO

Utilizamos em nossa experiência, sapos machos e fêmeas da espécie Bufo marinus ictericus, tendo o peso dos machos variado entre 105 e 310 gramas e o das fêmeas entre 136 e 345 gramas.

Estes animais foram previamente separados em caixas metálicas individuais e deixados em repouso por sete dias antes de serem efetuadas as experiências.

O aparelho de contagem radioativa usado foi do tipo : TOBOR LARGE SAMPLE COUNTER modelo 4350 e 4351 da NUCLEAR CHICAGO (detector de centilação com cristal de Iodeto de Sódio).

MATERIAL

Seringas hipodermicas de 1 ml e 0,1 ml

Agulhas hipodermicas de 10 X 3 e 25 X 7

Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 e 20 ml

Pró - pipetas

Frascos volumétricos

IX

MATERIAL E MÉTODO

Utilizamos em nossa experiência, sapos machos e fêmeas da espécie Bufo marinus ictericus, tendo o peso dos machos variado entre 105 e 310 gramas e o das fêmeas entre 136 e 345 gramas.

Estes animais foram previamente separados em caixas metálicas individuais e deixados em repouso por sete dias antes de serem efetuadas as experiências.

O aparelho de contagem radioativa usado foi do tipo : TOBOR LARGE SAMPLE COUNTER modelo 4350 e 4351 da NUCLEAR CHICAGO (detector de centilação com cristal de Iodeto de Sódio).

MATERIAL

Seringas hipodermicas de 1 ml e 0,1 ml

Agulhas hipodermicas de 10 X 3 e 25 X 7

Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 e 20 ml

Pró - pipetas

Frascos volumétricos

Frascos de vidro com tampas de borracha
Recipientes de plástico
Material cirurgico para disseccão

SUBSTÂNCIAS

Sôro Albumina Humana
Sôro Albumina Humana - ^{131}I (RISA)
Heparina
Solução Fisiológica

A solução de Sôro Albumina Humana marcada com ^{131}I é proveniente do Instituto de Energia Atômica de São Paulo

TÉCNICA DE MARCAÇÃO DA SÔRO ALBUMINA HUMANA - ^{131}I

REAGENTES

- A) Solução ζ de Cl. I : 1 ml de solução "Stock"
27 ml Na Cl a 10 %
2,1 ml Na OH 1 N
Completar a 50 ml com água dest.
- B) Tampão ácido de Glicina : Preparar uma solução molar de glicina em solução M/4 de Na Cl.

Tomar 19 ml desta solução e adicionar 1 ml de H Cl
M pH 4 - 4,5.

- C) Tampão alcalino de Glicina: 9 ml de solução molar
de glicina mais 1 ml de Na OH 1 N pH 8,5 - 9.
- D) Solução M/100 de Iodo - Iodeto.

TÉCNICA DE MARCAÇÃO

1. Tomar 1 ml da solução a 15% de proteína e colocar
em um tubo de ensaio.
2. Juntar 1 ml de tampão ácido de glicina e verificar
o pH (4 - 4,5).
3. Juntar a solução de Iodo - Iodeto M/100, até cor
característica persistente (amarelo palha).
4. Passar por uma coluna de resina para remover o ex
cesso de iodo.
5. Receber esta solução em outro tubo de ensaio e le
var o pH a 9,0 com Na OH 1N (solução A).
6. Em outro tubo colocar a solução de Na¹³¹I, 9 gotas
de solução tampão alcalina de glicina, 0,5 ml de
solução ζ e agitar (solução B).

7. Rápida^{mente}, por meio de uma pipeta Pasteur, com forte jato, misturar a solução A e B e deixar em contacto por 2 minutos.

8. Passar por uma segunda coluna de resina, lavar com solução fisiológica e adicionar 4 ml de solução de albumina estável, filtrar em MILLIPORE e diluir a 15 ml com solução fisiológica.

MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO VOLUME SANGUÍNEO

O método que usaremos para a determinação do volume sanguíneo será o da diluição da RISA no plasma, método este simples e de boa eficiência.

A maioria das proteínas podem ser iodadas; a adição até 1% de iodo às proteínas séricas, não altera significativamente as propriedades bioquímicas das mesmas.

Por autoradiolises e por hidrolises a ligação do iodo, que é uma ligação frágil, se destrói no fim de algum tempo, e boa fração do metaloide se apresenta livre nas preparações de Sôro Albumina Humana.

Por esta razão não se deve utilizar nas provas, RISA Preparada a mais de 2 semanas; uma vez diluída em solução fisiológica, deve ser imediatamente utilizada.

TÉCNICA DE APLICAÇÃO NO SAPÊ

1. Verificar a data de expiração do material marcada no rótulo do recipiente de chumbo que contém o vidro de RISA (utilize o material se ainda não transcorreu o seu prazo de expiração). Por meio de uma tabela de decaimento, calcule a atividade atual por mililitro, partindo da atividade marcada no rótulo.
2. Anestesiá-lo o animal com éter etílico.

3. Com uma tesoura fazer uma incisão no animal na região dorsal inferior para o isolamento da artéria ilíaca direita e esquerda.
4. Com uma seringa hipodérmica de 0,1 ml e agulha de 10 X 3, retirar cerca de 10 μ Ci/0,05 ml de RISA do frasco. É conveniente lavar previamente a seringa com solução fisiológica contendo alguns miligramas de albumina estável; com este processo se reduz a probabilidade de que parte do material fique aderido nas paredes da seringa.
5. Em seguida canulamos a artéria ilíaca esquerda e injetamos rapidamente a solução de RISA. A injeção deve ser mais ou menos rápida, pois com isso estaremos seguros de que não permaneceu material radioativo na seringa, em quantidade significativa. Após a injeção fazemos o ligamento da artéria para não haver hemorragia e perda do material injetado.
6. Após 5 minutos da injeção de RISA, com uma seringa de 1 ml, heparinizada, colhemos através da artéria ilíaca direita, 1 ml da amostra de sangue e colocamos num frasco de contagem com tampa de borracha, para ser contado no contador TOBOR.
7. Preparação do Padrão: Com a mesma seringa hipo-

dermica de 0,1 ml, colhemos 0,05 ml da solução de R.C. SA com a mesma atividade que foi anteriormente injetada no sapo, diluímos em 20 ml de solução de Soro Albumina Humana estável a 1% em solução fisiológica, e em seguida homogeneizamos.

8. Após a homogeneização do padrão, colhemos 1 ml deste e colocamos no frasco de contagem para ser contado.
9. A contagem de fundo do aparelho de contagem é feita com 1 ml de solução fisiológica.

CÁLCULO DA VOLEMIA

A fórmula para o cálculo da volemia é dada por:

$$V = \frac{S \times D}{S'}$$

S = Radioatividade do Padrão (c/min/ml)

S' = Radioatividade da Amostra de Sangue (c/min/ml)

D = Fator de Diluição do Padrão

EXEMPLO

Espécie Animal: SAPO

Sexo: FEMEA

Peso: 161 gramas

Diluição do Padrão: 0,05 ml RISA / 11 uCi, diluído em 20 ml de Soro Albumina-Humana a 1% em solução fisiológica.

S'	{	386066 cpm	X = 347083
(1 ml da amostra de sangue)		327258 cpm	S' = 347083 - 1372
		327925 cpm	S' = 345711 cpm
S	{	218082 cpm	X = 217774
(1 ml do padrão)		216616 cpm	S = 217774 - 1372
		218523 cpm	S = 216402 cpm

Contagem de	{	1356	X = 1372 cpm
fundo		1402	
(8g)		1358	

$$S' = 345711 \text{ cpm}$$

$$S = 216402 \text{ cpm}$$

$$D = 20$$

Substituindo estes valores na formula:

$$V = \frac{216402 \text{ cpm} \times 20 \text{ ml}}{345711 \text{ cpm}}$$

$$V = 12,51 \text{ ml}$$

A relação entre o volume sanguíneo e o peso corporeo é dado ~~por a relação do volume sanguíneo e o peso do animal.~~

$$\frac{\text{Volume Sanguineo (ml)}}{\text{Peso do Animal (g)}} = \frac{12,51 \text{ ml}}{161 \text{ g}}$$

$$\frac{V}{P} = 7,7\% \text{ do Peso Corporeo.}$$

RESULTADOS

Nas tabelas I e II temos os resultados do volume sanguíneo expresso em mililitros e a relação do volume sanguíneo com o peso corpóreo dos animais expresso em porcentagem.

Utilizando-se dos valores contidos nas tabelas III e IV, foram calculados a Média e o Desvio Padrão e os resultados encontrados foram:

Machos

$$\bar{X} = 6,87\%$$

$$s = 0,869$$

$$(6,87 \pm 0,87) \%$$

Fêmeas

$$\bar{X} = 6,63\%$$

$$s = 0,825$$

$$(6,63 \pm 0,82) \%$$

Nas tabelas V e VI temos os valores para o Cálculo da Correlação entre o Volume Sanguíneo e o Peso Corpóreo.

$$Y = A_0 + A_1 X$$

Machos

$$A_0 = 3,02$$

$$A_1 = 0,0853$$

$$V = 0,0853 P - 3,02$$

Fêmeas

$$A_0 = 3,57$$

$$A_1 = 0,0899$$

$$V = 0,0899 P - 3,57$$

Nas figuras I e II temos o gráfico da correlação entre o Volume Sanguíneo e o Pêso Corpóreo.

FABELA I

VALORES DO VOLUME SANGUÍNEO ENCONTRADOS
 PARA SAPOS MACHOS (Bufo marinus icteric-
cus).

PÊSO (g)	VOLUME SANGUÍNEO (ml)	V/ P (%)
105	5,51	5,25
123	7,70	6,26
155	11,39	7,35
156	10,07	6,50
189	14,54	7,69
204	13,06	6,40
259	17,61	6,79
275	18,29	6,65
297	23,16	7,80
318	25,84	8,13

TABELA II

VALORES DO VOLUME SANGUÍNEO ENCONTRADOS
PARA SAPOS FÊMEAS (*Bufo marinus latexia*
SUS).

PESO (g)	VOLUME SANGUÍNEO (ml)	V, P (%)
116	6,47	5,58
120	6,76	5,63
137	8,54	6,23
142	9,62	6,77
147	10,55	7,18
152	10,91	7,18
153	8,69	5,68
168	12,51	7,45
170	11,34	6,67
345	27,31	7,92

TABELA III

VALORES PARA O CÁLCULO DA MÉDIA E DO DES-
 VIO PADRÃO - SAPOS MACHOS (Bufo marinus-
ictericus).

x ($\frac{ml}{g}$)	x^2
5,25	27,56
6,26	39,19
7,35	54,02
6,50	42,25
7,69	59,14
6,40	40,96
6,70	44,89
6,65	44,22
7,80	60,84
8,13	66,10
68,73	479,17

TABELA IV

VALORES PARA O CÁLCULO DA MÉDIA E DO DES-
VIO PADRÃO - SAPOS FÊMEAS (Bufo marinus-
ictericus).

$x \left(\frac{\text{ml}}{\text{g}} \right)$	x^2
5,58	31,14
5,63	31,70
6,23	38,81
6,77	45,83
7,18	51,55
7,18	51,55
5,68	32,26
7,45	55,50
6,67	44,49
7,92	62,73
66,29	445,56

TABELA V

CORRELAÇÃO ENTRE VOLUME SANGUÍNEO E PÊSO CORPÓREO - SA-

POS MACHOS (Bufo marinus-fereticus).

PÊSO	PÊSO ²	VOLUME	PÊSO X VOLUME
105	11 025	5,51	578,55
123	15 129	7,70	947,10
155	24 025	11,39	1 765,45
156	24 336	10,07	1 570,92
189	35 721	14,54	2 748,06
204	41 616	13,06	2 664,24
259	67 081	17,61	4 560,99
275	75 625	18,29	5 029,75
297	88 209	23,16	6 878,52
318	101 124	25,84	8 217,12
2 081	483 891	147,17	34 960,70

TABELA VI

CORRELAÇÃO ENTRE VOLUME SANGUÍNEO E PÊSO CORPÓREO -- SA-
POS FÊMEAS (Bufo marinus ictericus).

PÊSO	PÊSO ²	VOLUME	PÊSO X VOLUME
116	13 456	6,47	750,52
120	14 400	6,76	811,20
137	18 769	8,54	1 169,98
142	20 164	9,62	1 366,04
147	21 609	10,55	1 550,85
152	23 104	10,91	1 658,32
153	23 409	8,69	1 329,57
168	28 224	12,51	2 101,68
170	28 900	11,34	1 927,80
345	119 025	27,31	9 421,95
1 650	311 060	112,70	22 087,91

GRÁFICO I

Correlação entre o volume sanguíneo e o Pêso Corpóreo -
Sapos Machos (Bufo marinus ictericus).

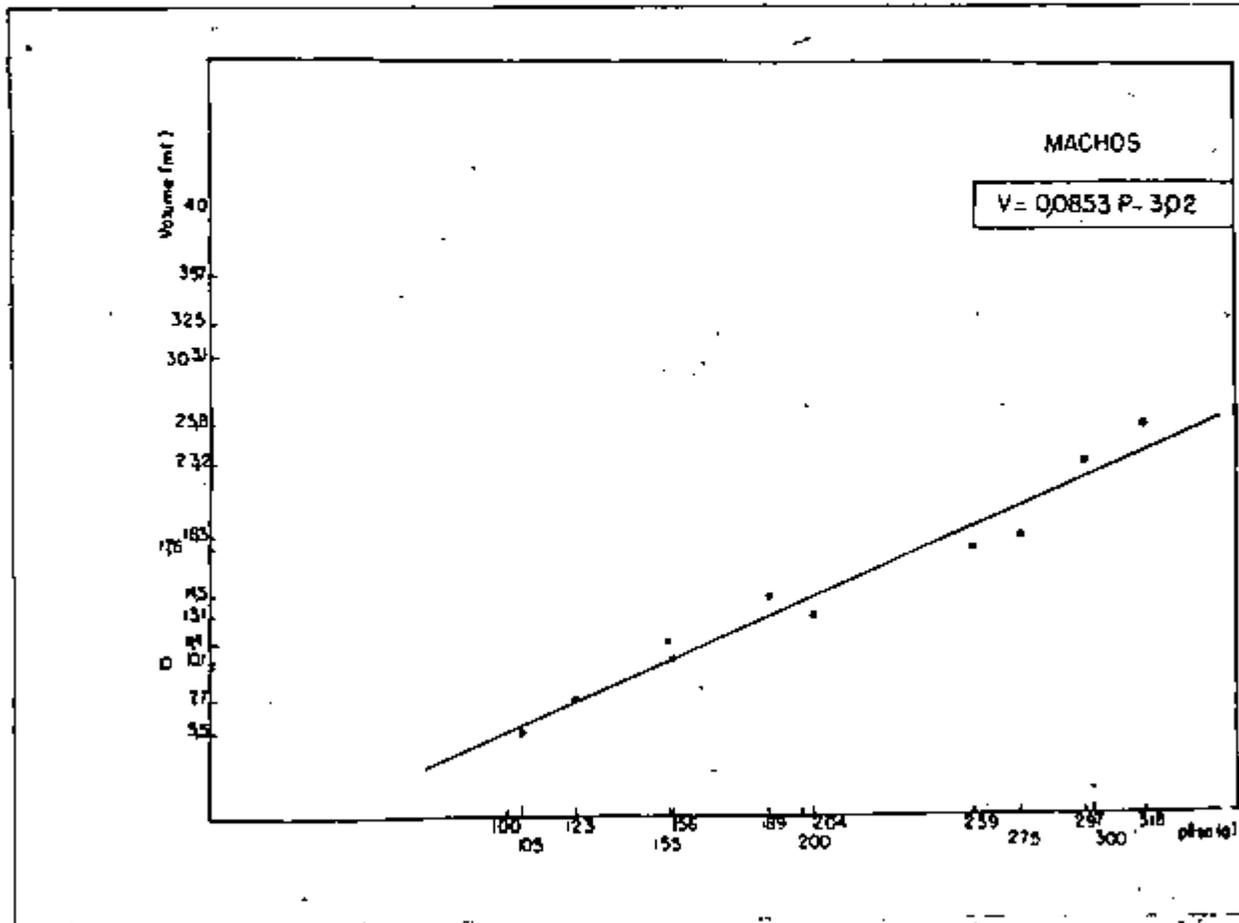
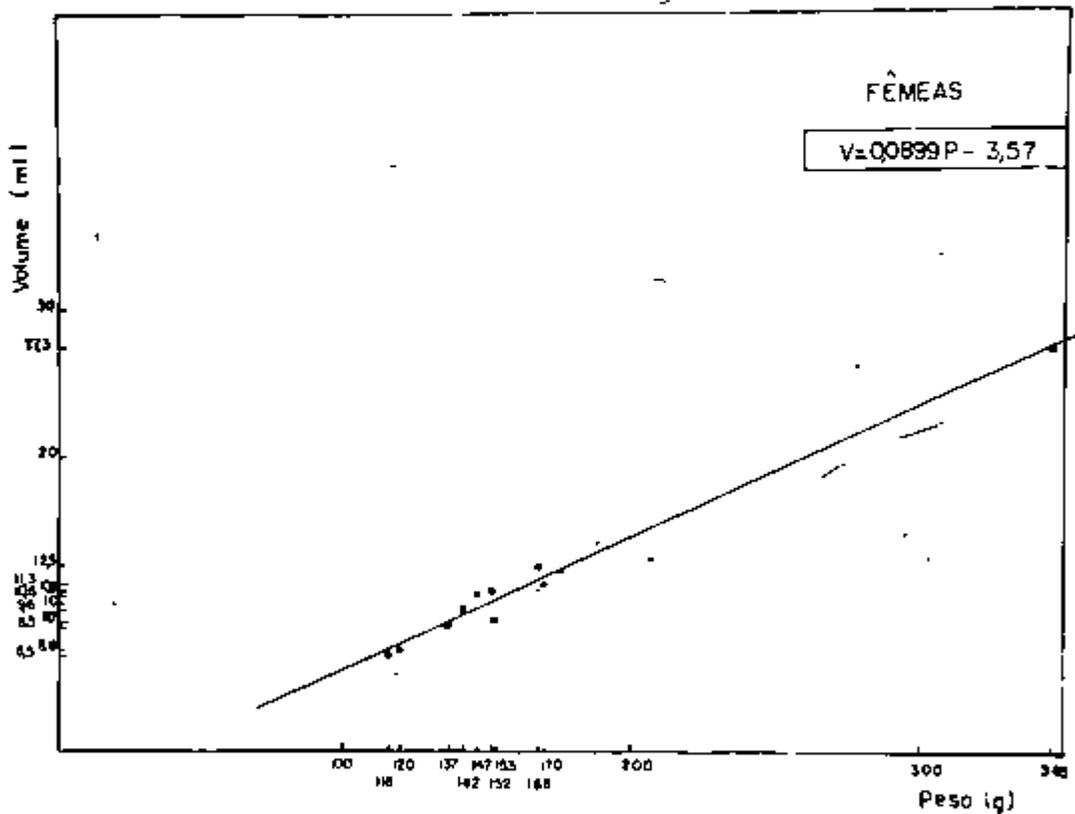


GRAFICO II

Correlação entre o Volume Sanguíneo e o Pêso Corpóreo - Sapos fêmeas (Bufo marinus ictericus)



DISCUSSÃO

Comparando os resultados agora obtidos com os de PROSSER e WEINSTEIN (1950) verifica-se serem menores. Deve-se lembrar, porém, que os referidos autores usaram o método do Azul de Evans e do Tiocianato de Sódio em Rãs e nas experiências que fizemos empregamos sapos e o método usado foi o do Soro Albumina Humana marcada com ^{131}I (RISA).

A média do volume sanguíneo dos sapos machos foi de 6,87% do peso corpóreo e a das fêmeas de 6,63%.

A correlação entre o volume sanguíneo e o peso corpóreo está indicada nos gráficos I e II.

Sabe-se da literatura que os valores do volume sanguíneo em relação ao peso corpóreo são maiores para os machos do que para as fêmeas, porém fêmeas em ovulação possuem esta relação significativamente maior que a dos machos.

Comparando os valores aqui encontrados para os machos e as fêmeas e efetuando-se o teste de hipóteses sobre médias, notou-se não haver diferença significativa entre os valores encontrados para machos e fêmeas.

Como o interesse deste trabalho era tão somente determinar o volume sanguíneo utilizando o método do Soro Albumina Humana - ^{131}I , não houve preocupação em selecionar fêmeas e nem levar em conta o ciclo de ovulação. Talvez seja esta a razão de não se encontrar diferença significativa dos resultados-

obtidos em machos e fêmeas.

Procurou-se aplicar a técnica de PROSSER e WEINSTEIN (l.c.) que manda injetar a substância traçadora no coração do animal. Os resultados foram precários em virtude da drenagem do material injetado pela hemorragia não estancável de imediato. Tendo em conta este fato, foi então utilizada a técnica da injeção da RISA na artéria ilíaca e seguida de ligadura como que se evitou a hemorragia. Este pormenor parece importante visto o método aqui utilizado exigir apenas volumes da ordem de microlitros e, compreende-se claramente que, qualquer perda de material acarretaria erros de grandes proporções.

Tendo-se ainda em conta os resultados conseguidos, poder-se-à dizer que o método da Sêro Albumina Humana marcada com ^{131}I (RISA) pode ser aplicado para determinação da volemia nos Anfíbios Anuros. Fato importante vem a ser a tolerância dos animais (Sapos) à referida albumina, pois, tanto quanto se pôde observar, os Sapos após a injeção da albumina, não apresentavam alterações dignas de nota.

Na bibliografia compulsada não se encontraram informações sobre a volemia de Anfíbios Anuros das regiões tropicais e subtropicais. Parece ser esta a primeira contribuição a este respeito.

RESUMO

Fez-se o estudo experimental da determinação do volume sanguíneo do Anfíbio Anuro mais comum na região da neogéa, o Sapo, Bufo marinus ictericus, pelo método da Soro Albumina Humana marcada com ^{131}I .

A técnica consistiu na injeção de RISA na artéria ilíaca esquerda previamente canulada retirada do sangue - 5 minutos após, utilizando-se, então, a artéria ilíaca direita.

A amostra sanguínea levada ao aparelho de contagem (TOBOR LARGE SAMPLE modelo 4350 e 4351, detector de cintilação com cristal de Iodeto de Sódio) e comparada com uma amostra padrão.

A fórmula utilizada nos cálculos foi a seguinte:

$$V = \frac{S \times D}{S'}$$

V = Volume Sanguíneo

S = Radioatividade do Padrão

D = Fator de Diluição do Padrão

S' = Radioatividade da Amostra de Sangue

Os valores obtidos na experiência foi de 6,87% - do peso corpóreo para os Sapos machos e de 6,63% para as fêmeas.

CONCLUSÕES

1. Várias substâncias já foram usadas na determinação do volume sanguíneo, entre as quais poderão citar-se: Vermelho Trypan, Vermelho Congo, Vermelho Vital, Tiocianato de Sódio, Monóxido de Carbono, Azul de Evans. Algumas são de difícil manuseio, outras produzem toxicidade, outras possuem vários fatores que ocasionam erros.

Em condições favoráveis, para os Anfíbios Anuros, o Azul de Evans T-1824, permite obter estimativas muito satisfatórias do volume sanguíneo, porém não pouco são os fatores que limitam o seu emprego. A determinação espectrofotométrica do corante pode conduzir a vários erros nas repetidas determinações, devido à existência de uma coloração residual. Por outro lado, resultados obtidos com plasma lipêmico e ou com plasma hemolizado, são insatisfatórios.

2. Comparando o método da RISA com os acima citados, verifica-se ser essa substância facilmente manuseável e homogenizando-se rapidamente na circulação. Estas propriedades facilitam a imediata execução da prova.

3. A concentração de Soro Albumina Humana marcada com ^{131}I no sangue se mantém constante após a injeção, por um tempo suficientemente longo para se ter uma distribuição homogênea na circulação, e, portanto, torna possível fazer várias determinações da massa sanguínea em tempos próximos, sem emprega

gar novas quantidades que poderiam provocar danos radiobiológicos.

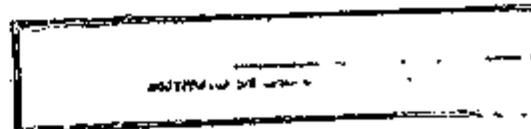
4. Com o emprego de RISA conseguem-se resultados mais constantes do que os obtidos com outros métodos.

5. Na aplicação deste método, a técnica requer pessoal especializado no emprego de substâncias radioativas e aparelhagem especial, o que de certo modo limita o seu uso.

BIBLIOGRAFIA

- BAKER, D.W. -1933- 'The blood of sheep . Tesis, Universidad of - Cornell.
- BARNARD, D.J. and BAXTER - 1965 - The Use of ^{51}Cr in the Determination of Red Cell Volumes in Experimental Animals. Army Med. - Corps., 111 : 53 - 60
- BONNYCASTLE, D.D. - 1947 - Repeated Determinations of Plasma Volume, Blood Volume and Total available Fluid in a Group of Normal - Trained Dogs. Amer.Journ.Physiol., 151: 504.
- BRADY, L.W. - 1953 - Blood Volume Studies in Normal Humans. Surg. Gynec.Obst., 97: 25.
- CANHAM, R.G.; MOSES, H.; HENDERSON, W.J.; POULAS, A. - 1956 -Plasma Volume Determination in Evaluation of Surgical Patient. A.M.A. Arch.Surg., 73: 353.
- CONKLIN, R.E. - 1930 - The Formation and Circulation of Lymph in - the Frog II. Blood Volume and Pressure. Amer.Journ.Physiol., - 95: 91 - 97.
- COURTICE, F.C. - 1943 - Blood Volumes Studies. Journ.Physiol.,102: 290.
- CRISPELL, K.R.; PORTER, B.; NIESET, R.T. - 1950 - Studies of Plasma Volume Using Human Serum Albumin Tagged with Radioactive Iodine J.Clin.Invest. 29: 513.
- DELWAIDE, P.; LECLERCQ, I. - 1964 - Comparison of Two Isotope Technique for Assessment of the Blood Volume. Rev.Med.Liège., 19:201-9.
- DERRECKISON, M.B. and AMBERSON, W.R. - 1934 - Determination of - Blood Volume in the Lower Vertebrates by the Direct Method. - Biol.Bull., 67:329.
- EICH, G.B. - 1955 - Isotopic Methods for the Determination of Blood Volume.. Radiol.Technol., 36: 361 - 20
- GREGERSEN, M.I. and RANSON, R.A. - 1959 - Blood Volume. Physiol.Rev. 39: 307 - 42.
- GRIFFITHS, D.E. e col. - 1957 - Phosphagens in Echnoids. Biochim.J., 65: 612 - 17.
- HANSARD, S.L. et al. - 1951 - Blood Volume of Swine. Proc.Soc.Exp. Biol.and Med.; 78: 544.
- HOSAIN, P.; IQBAL and QUAZI, M. - 1969 - Measurements of Plasma - Volume Using ^{99}Tc and $^{113\text{m}}\text{In}$ Labelled Proteins. Brit.J.Radiol., 42: 627 - 30.

- MARTIN, A.W. - 1947 - The Blood Volume of Some Elasmobranchs and Teleosts., Fed.Proc., 6: 164.
- MARTONFFY, K. and GOTTWALD, G. - 1969 - Blood and Plasma Volume Determinations in the Rat Performed with Double Isotope Labeling - after Supralethal Irradiation of the Whole Body. Magy.Radiol, 21: 306 - 11.
- MC LAIN, P.L.; RUHE, C.H. and KRUSE, T.K. - 1951 - Concurrent Estimates of Blood Volume in Animals by Bleeding and dye Methods. - Amer.Journ.Physiol., 164: 611.
- MILLER, W.T. - 1931 - The Blood Picture in Healthy Cattle and Cattle Affected with Johne's disease. Tesis, Universidad of Cornell.
- NEWELL, G.W. and SHAFFNER, C.S. - 1950 - Blood Volume Determination in Chickens. Poultry Sci., 29: 78.
- PROSSER, C.L. and WEINSTEIN, S.J. - 1950 - Blood Volume in Frog, - Catfish, Crayfish and Mussel. Physiol.Zool., 23: 113-124.
- REICHERT, E.T. and BROWN, A.P. - 1909 - The differentiation and Specificity of Corresponding Proteins and Other Vital Substances in Relation to Biological Classification and Organic Evolution. Pub. Carnegie Inst. Washington., 116: 1 - 338.
- TASHIERI, A.M. and PURICELLI, C. - 1963 - Use of Semi-automatic - Apparatus for Evaluation, by Means of Radioisotopes of the Blood Volume. Menerva Nucl., 7: 318 - 21.



RECEBIDO DE ESTE INVENTARIO

RECIBIDO

JUL 1971



BIBLIOTECA