

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SECRETARIA DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

*Almeida
C 31*

Distribuição Biológica de Heparina marcada com ^{51}Cr . Estudos farmacocinéticos com auxílio da análise compartimental.

Maria Aparecida Theodora Marcilio de Almeida

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor.

Área-Tecnologia Nuclear

Orientador: Dra. Constancia Pagano Gonçalves da Silva

São Paulo
1979

A B S T R A C T

~~It has been studied~~ The kinetics of heparin in normal Wistar rats using the radioactive tracer ^{51}Cr , *has been studied*

The labeled and purified ^{51}Cr -heparin was injected into rats intravenously and by intraperitoneal injection,

In measuring the radioactivity of organs it was possible to conclude that the tissues rich in mast cells, liver and spleen, were found to take up the greater amounts of heparin.

The curve that represents the logarithm of the concentration of heparin versus time is biexponential. The half-lives of the two exponential were determined.

The volume of distribution, the *rate constant* and the renal clearance were determined by the values of the plasma levels and urinary excretions.

The biological half-time, the turnover rate and the turnover time were determined by measuring the residual radioactivity of the total body and urinary excretions.

With the data obtained from the mentioned experiments a compartmental model was performed in ~~which~~ *the* plasma is the central compartment for the distribution of the drug, exchanging with another extraplasmatic compartment and finally the drug being stored in reticulo endothelial system cells. *(author)*.

CAPÍTULO I

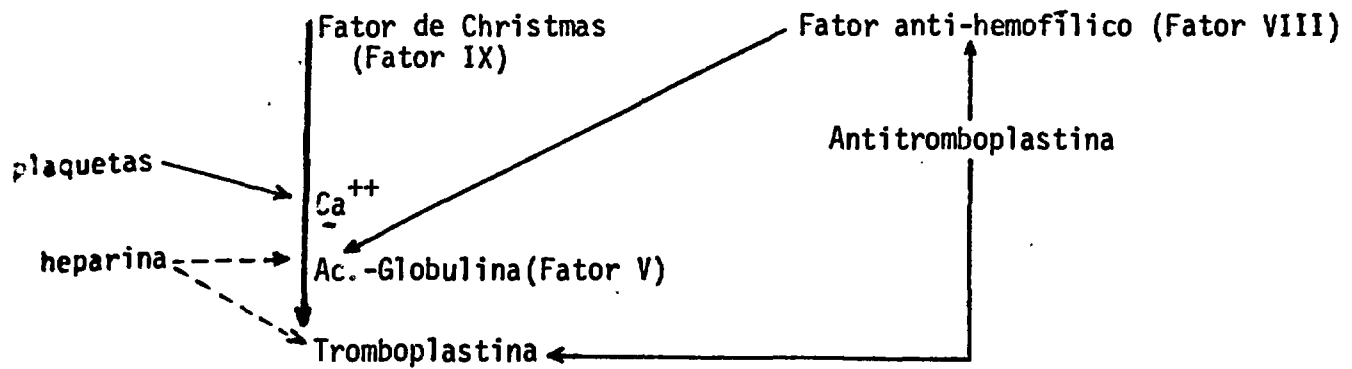
INTRODUÇÃO.

I.1 - A Heparina e sua ação farmacológica

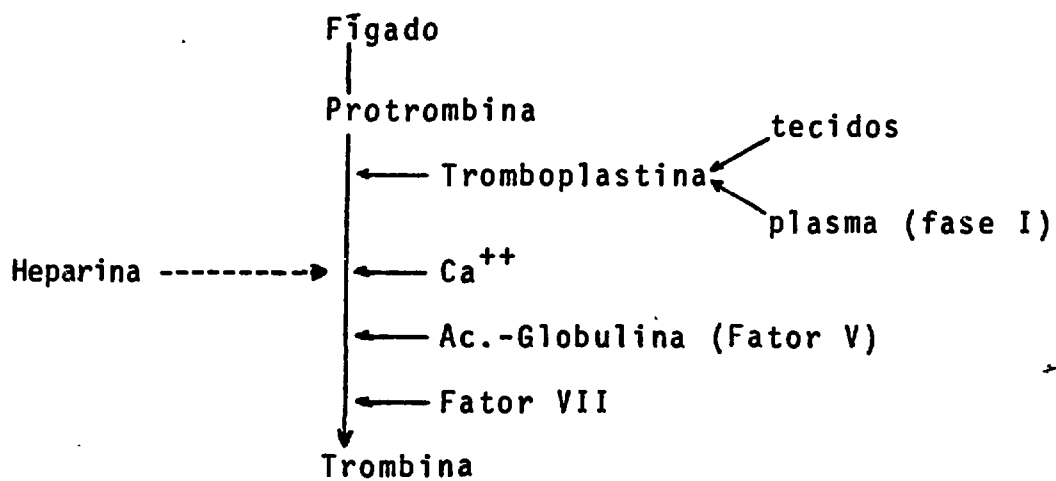
Em 1916 Mc LEAN⁽⁴¹⁾ estudando as propriedades coagulantes sanguíneas de substâncias extraídas de fígado e coração de animais, descobriu uma substância biológica que inibia a coagulação do sangue e deu-lhe o nome de heparina. Os estudos continuaram até que E. JORPES em 1935 demonstrou ser a heparina um polissacarídeo sulfatado⁽³⁵⁾ podendo ser instantaneamente neutralizada pela protamina (uma proteína altamente alcalina)⁽¹²⁾ e finalmente introduziu-a na terapia. O uso médico da heparina deriva de suas propriedades anticoagulantes sendo utilizada nos casos de trombozes em pacientes com problemas cardíacos e certos tipos de cirurgia com circulação extracorpórea.

Apesar do emprego de anticoagulantes por via oral, como no caso de derivados de cumarinas e indandionas, nada se revela tão potente em senso farmacológico como a heparina, pois seu efeito inibidor se faz sentir em quase todas as fases do esquema de coagulação sanguínea tanto "in vivo" como "in vitro"⁽³⁵⁾.

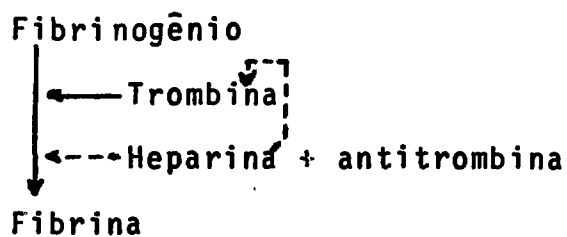
Fase I - Formação da tromboplastina plasmática



Fase II - Formação da trombina



Fase III - Conversão de fibrinogênio em fibrina



Legenda: —————> promove
 - - - - -> inibe

Conforme a representação esquematizada da coagulação sanguínea, dentro dos moldes aceitos internacionalmente, o fenômeno da coagulação envolve a ação de algumas enzimas que existem na corrente circulatória mas só são ativas quando se desencadeia o processo: quando um vaso sanguíneo é injuriado, rompe-se o endotélio, ficando exposta uma camada de colágeno. Este, por sua vez, atrai plaquetas, formando um agregado frouxo que posteriormente vai ser convertido no coágulo, pela fibrina. O mecanismo de formação da fibrina, implica numa cadeia de reações interrelacionadas (8)(23).

A série de reações pode ser provocada também "in vitro", colocando-se o sangue em contacto com superfícies úmidas carregadas negativamente, por exemplo, o vidro ou fibras de colágeno.

No esquema representado, as reações são iniciadas pelo chamado fator XII ou fator de Hageman sob o efeito de contactos superficiais. Ativam-se sucessivamente: fator XI (tromboplastina plasmática antecedente), fator IX (fator de Christmas), fator VIII (anti-hemofílico) e fator X (fator de Stuart-Prower); este, na presença de lipídeos das plaquetas, de Ca^{++} e do fator V, cataliza a conversão da protrombina em trombina. Nessa cadeia de reações interfere a presença de heparina, inibindo a formação da tromboplastina.

Na segunda fase de reações, se dá a transformação da Protrombina em trombina, em presença de íons Ca^{++} e ação do fator V (Ac-Globulina), que aumenta a formação da trombina e provavelmente grande parte dessa ação inibidora se dá na formação da tromboplastina. A trombina, uma vez formada, age

enzimaticamente convertendo o fibrinogênio solúvel em fibrina. A ação da heparina nesta fase é realizada por meio de uma associação heparina-cofator plasmático, neutralizando a trombina.

Quimicamente, a heparina pertence ao grupo dos mucopolissacarídeos; seu caráter ácido é bastante acentuado e pode ser vista como o ácido orgânico mais forte presente no organismo dos mamíferos. É bem solúvel na água, pouco solúvel no álcool e dextrorotatória. A forma química de heparina sódica é bastante utilizada em preparações farmacêuticas. Possui um caráter heteropolissacarídeo especial e alto peso molecular (6.000 a 25.000), "a heparina não se constitui num único composto químico, mas numa série de compostos de diferentes comprimentos de cadeia e peso molecular, apresentando pois unidades repetidas de sacarídeos e grupos funcionais similares" (33).

As análises de heparina purificada revelam a presença de três monossacarídeos fundamentais na cadeia: d-glicosamina, ácido d-glicurônico e ácido L-idurônico. A proporção molecular dessas hexoses é aproximadamente: 1 mol de d-glicosamina = 1 mol de (ácido d-glicurônico + ácido L-idurônico)⁽³³⁾.

Esses monossacarídeos unem-se por ligações covalentes alfa-glicosídicas, nas quais são os grupos hidroxila 1 e 4 estão envolvidos, conduzindo aos correspondentes dissacarídeos, os quais constituem as unidades repetitivas da heparina e cada um deles contém resíduos sulfato na forma de sulfonamida e, sulfatos ligados na forma éster.

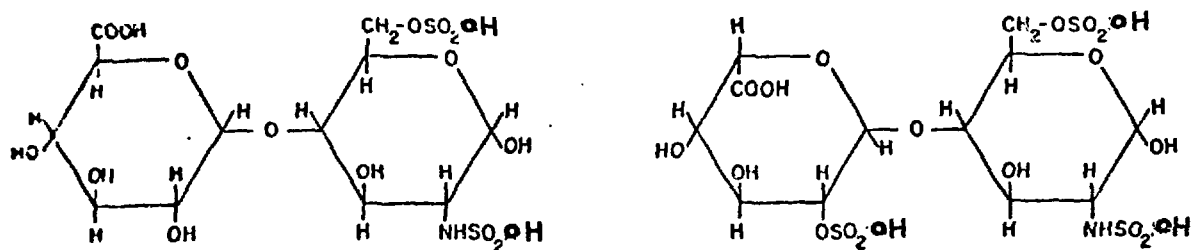


Figura 1

ácido d-glicurônico e
d-glicosamina em con-
jugação α -d(1 \rightarrow 4)

ácido L-idurônico e d-
glicosamina em conjuga-
ção α -L(1 \rightarrow 4)

Os dissacarídeos sulfatados dão origem à cadeia poli-
sacarídea da heparina por subsequente conjugação d-glicosí-
dica estereoregular (1 \rightarrow 4) de acordo com a Figura 1A.

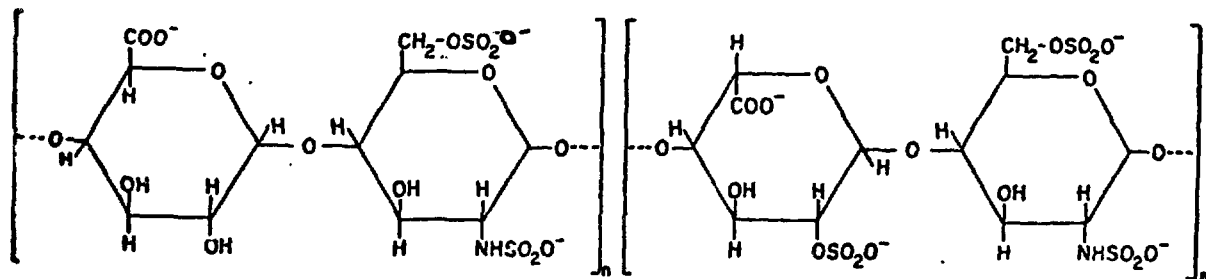


Figura 1A - Estrutura química da heparina

É importante considerar que, as heparinas possuem
uma alta especificidade ligada à fórmula estrutural. Qualquer

mudança, mesmo pequena na estrutura, por exemplo, uma conjugação β anomérica em vez de α entre as unidades resulta num material inativo fisiologicamente.

Apesar de esforços no sentido de serem obtidas heparinas por via sintética destinadas a uso clínico, resultados negativos têm sido logrados. Para uso terapêutico, utilizam-se heparinas retiradas de tecidos animais a saber: pulmões de boi, mucosa intestinal de suínos⁽³³⁾.

A heparina existente nos tecidos animais está associada covalentemente a proteínas, de modo que a extração comporta remoção das unidades protéicas seja por hidrólise alcalina ou enzimática⁽³³⁾. Além disso, a presença de heparina nos tecidos está associada à existência de outros componentes com propriedades químicas e físicas similares o que exige métodos de purificação e análise muito acurados. Mesmo assim, os produtos vendidos comercialmente não apresentam perfeita uniformidade nos resultados das determinações de C, H, N e S bem como nas percentagens de ácido urônico, hexoseamina, acetila e outros componentes analisados⁽³¹⁾⁽³⁸⁾.

Quanto à estabilidade biológica da heparina, ainda não foram encontrados exemplos característicos de enzimas nos tecidos animais, aptas a degradar a heparina⁽¹⁰⁾. A inativação conseguida, tratando-se soluções contendo heparina com extratos de fígado de mamíferos, foi atribuída à capacidade apresentada pela heparina de ligar-se a proteína e não a degradações catalizadas por alguma enzima específica do fígado.

Há contudo, microorganismos da flora intestinal capazes de produzir "heparinases" e uma bactéria do solo: "Fla-

vobacterium heparinium" possível de crescer em um meio de cultura contendo heparina, degradando-a por meio da ação de uma sulfamidase e glicosidase, dando como subprodutos, oligossacarídeos⁽¹⁰⁾.

No organismo dos mamíferos a heparina ocorre naturalmente e está contida nos grânulos de certas células chamadas mastócitos histógenos⁽⁷⁾⁽⁵⁷⁾, que são numerosas especialmente no tecido conjuntivo frouxo e ao longo da trajetória dos vasos sanguíneos. A maneira de evidenciar a heparina em tais formações celulares é a coloração rosa característica que se forma sob a ação do corante azul de toluidina; essa coloração é conhecida com o nome de metacromasia⁽¹⁰⁾. Sob condições normais o plasma humano apresenta de 0 a 15 µg/ml de heparina⁽³⁵⁾. Contudo, em casos de choque peptônico ou anafilático verificou-se aumento temporário de heparina no sangue circulante de ratos e cães⁽⁷⁾⁽³⁵⁾. Em casos de urticária pigmentosa, quando há expressivo aumento do número de mastócitos e em casos de mastocitomas, não há heparinemia.

Parece improvável que a função fisiológica da heparina seja a de manter a fluidez sanguínea, sendo que sua propriedade anticoagulante seria apenas uma característica fisiológica⁽³⁵⁾.

Outro fator importante do ponto de vista fisiológico, é o poder antilipêmico da heparina. É sabido que os plasmas de animais após refeição gordurosa, apresentam-se ricos em lipoproteínas de baixa densidade e em quilomicra. A presença de heparina clarifica essas formas lipêmicas de plasma; a heparina combinaria com lipoproteínas e facilitaria a hidrólise

enzimática⁽¹⁰⁾⁽³⁵⁾.

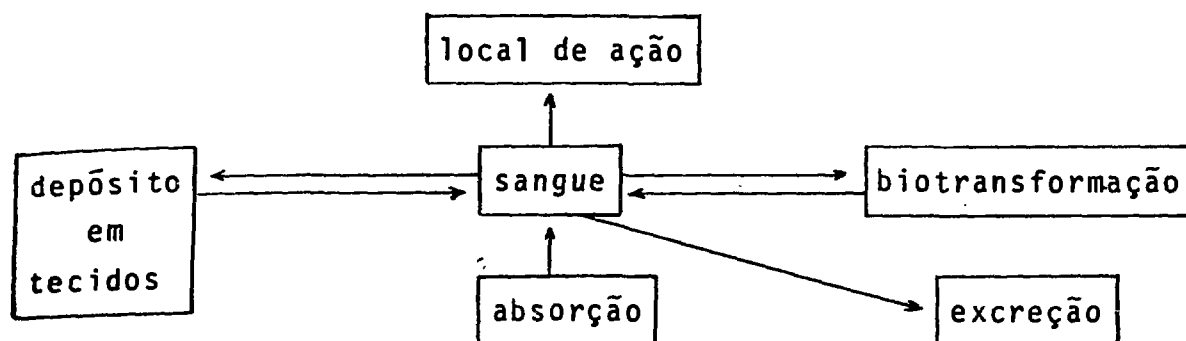
A associação de heparina com proteínas plasmáticas já foi estudada por alguns autores⁽³⁰⁾ que, por meio de técnicas eletroforéticas detectaram complexos heparínicos com α_2 , β e γ globulina e com fibrinogênio. O fator IV das plaquetas sanguíneas é considerado o maior agente anti-heparínico do sangue⁽⁶⁹⁾.

I.2 - Estudos farmacológicos com auxílio de radioisótopos

Quando se tem em mente o estudo farmacológico de uma droga, devem ser levados em conta alguns fatores essenciais relacionados com a ação da droga no animal. Um dos fatores a ser posto em relevo é a ação transportadora do sangue, primordial sob o ponto de vista fisiológico dos organismos e importante no caso de drogas que necessitam deslocar-se do ponto de entrada até o local de ação.

O sangue e a linfa se constituem no compartimento central de partida de onde as drogas são distribuídas aos tecidos, sofrendo a devida biotransformação e sendo finalmente excretadas⁽¹³⁾.

De acordo com BRODIE⁽¹³⁾ o esquema de distribuição das drogas segue a seguinte composição:



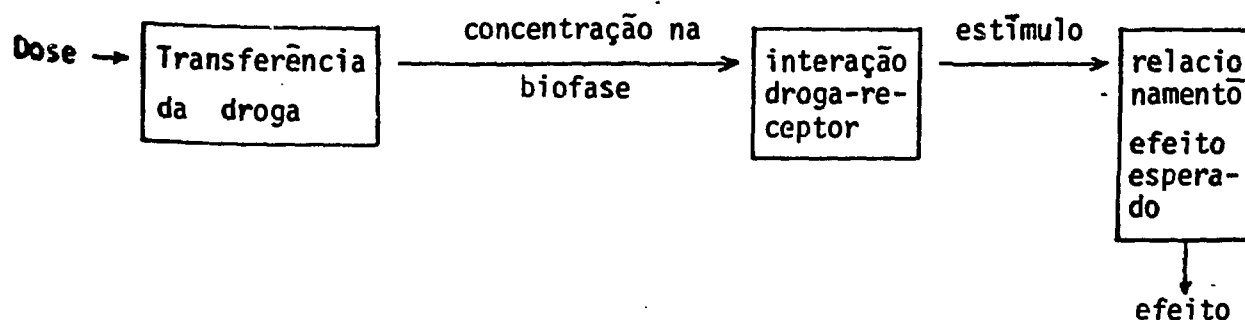
À entrada de uma droga no compartimento central, o sangue, segue uma interação droga-proteína. Considerando-se a seqüência:

Fase celular do sangue - Fase protéica - Fase aquosa— durante o fenômeno de absorção da droga, o deslocamento se daria da direita para a esquerda e, durante a difusão o processo se daria da esquerda para a direita do esquema.

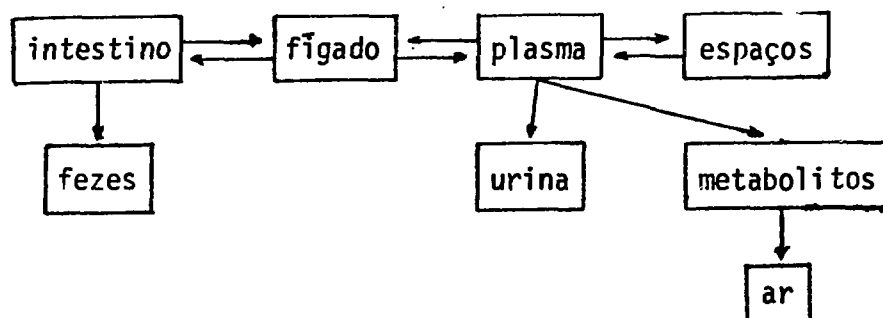
Ocorrendo a uma substância estar ligada a proteínas na corrente circulatória, há necessidade primeiramente de haver uma liberação da droga na fase aquosa para depois difundir-se fora do leito vascular⁽²⁹⁾.

A distribuição da droga vai sendo progressivamente efetuada para os espaços extracelulares até alcançar os receptores específicos.

Segundo ARIENS e SIMONIS⁽²⁾ o diagrama de transferência de uma droga seria o seguinte:



NODINE e col. (47) apresentam um esquema geral de absorção, distribuição e excreção de drogas:



Para se estudar a cinética de fármacos no organismo, é importante ser levado em conta o fato da biotransformação; os metabolitos também podem apresentar ainda algumas propriedades farmacodinâmicas e possuir uma cinética da droga inicial (13). Além disso, os métodos que empregam elementos radioativos como traçadores, não distinguem em geral o produto íntegro daquele degradado, considerando os resultados obtidos como um todo. Esse problema pode ser visto como um fator bastante importante que deve ser levado em conta com a cautela e o senso crítico necessários, antes de ser idealizado um modelo cinético.

O ponto de partida para o estudo da cinética de drogas pode ser obtido com a determinação da curva de decaimento plasmático (53) (62), tarefa essa que se torna muito facilitada com o emprego de traçadores isotópicos. Os dados obtidos são lançados em gráfico e a curva resultante deverá ser analisada, o que poderá refletir a presença de uma exponencial ou mais.

A partir dos dados possíveis extraídos da curva, poder-se-á decidir sobre o tratamento matemático apropriado além

de conduzir a outros informes, a saber: Volume de Distribuição Aparente da droga e determinação de Coeficientes de Transferência⁽¹³⁾.

1.3 -Objetivos.

A heparina, de largo uso em terapêutica, constitui-se num importante fármaco para o qual poucos estudos cinéticos são encontrados na literatura.

No intuito de se dar mais uma contribuição aos estudos farmacológicos e cinéticos dessa droga, utiliza-se neste trabalho, a heparina marcada com ⁵¹Cr, isótopo este que apresenta meia-vida suficientemente longa (27,8 dias) para permitir a realização de experimentos com esse produto de lenta metabolização.

Realizaram-se experimentos de distribuição biológica da heparina em ratos Wistar por meio da análise de captação pelos diferentes órgãos em diversos intervalos de tempo, após injeção endovenosa e intraperitoneal da droga.

O trabalho tem ainda a finalidade de obtenção de dados farmacocinéticos, a saber: Curva de Decaimento Plasmático, Volume de Distribuição Aparente, Coeficiente de Depuração Renal e Fluxo Renal. Finalmente com auxilio da análise compartmental determinam-se os Coeficientes de Transferência entre os compartimentos, Meia-vida Biológica, Taxa de Renovação, Tempo Médio de Permanência.

C A P Í T U L O I I

ANÁLISE COMPARTIMENTAL

Os organismos vivos são essencialmente constituídos por sistemas dinâmicos que se interrelacionam; os seres vivos têm necessidade de manter um constante intercâmbio com o meio exterior, absorvendo materiais, distribuindo-os convenientemente em suas células, degradando-os de forma adequada e por fim excretando o indesejável. Todos esses mecanismos estão em equilíbrio dinâmico e são responsáveis pela integridade biológica de cada indivíduo.

Um traçador pode ser entendido como sendo um elemento ou substância que, sendo ministrado a um ser vivo, entra em contacto com os constituintes desse organismo, mantendo-se identificável e indiferenciável, podendo reproduzir com fidelidade o comportamento do organismo sem contudo influenciá-lo ⁽⁵¹⁾.

O estudo farmacológico de muitas drogas tem sido possível graças ao auxílio de traçadores isotópicos representados por substâncias marcadas com átomos radioativos ⁽⁵⁸⁾.

II.1 - Farmacocinética

É definida como sendo o estudo da transferência de drogas no organismo. O uso de traçadores radioativos permite

a determinação da variação da atividade do radioisótopo na unidade de tempo nos diferentes compartimentos do sistema.

O "compartimento" pode ser entendido como constituindo uma parcela de material de um organismo que se comporta como se fosse um componente homogêneo e distinto, cineticamente. Ele pode ou não corresponder a um determinado espaço fisiológico⁽⁶²⁾.

Uma "fase" é um sistema de elementos semelhantes que estão em equilíbrio entre si; caso sejam introduzidos na fase elementos homólogos, estes tenderão com o tempo a serem distribuídos nela de modo uniforme⁽⁴⁵⁾.

O equilíbrio dinâmico da fase é mantido por alguns processos que podem ser reversíveis e irreversíveis. Os primeiros referem-se a processos que permitem a movimentação dos constituintes no interior da própria fase entre um compartimento e outro, dentro das normas de um equilíbrio de distribuição; os irreversíveis só tendem a uma direção na movimentação dos constituintes das fases.

Os estudos matemáticos da compartimentalização foram extensamente tratados por diversos autores⁽⁹⁾⁽¹¹⁾⁽²⁴⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁵³⁾⁽⁶⁶⁾.

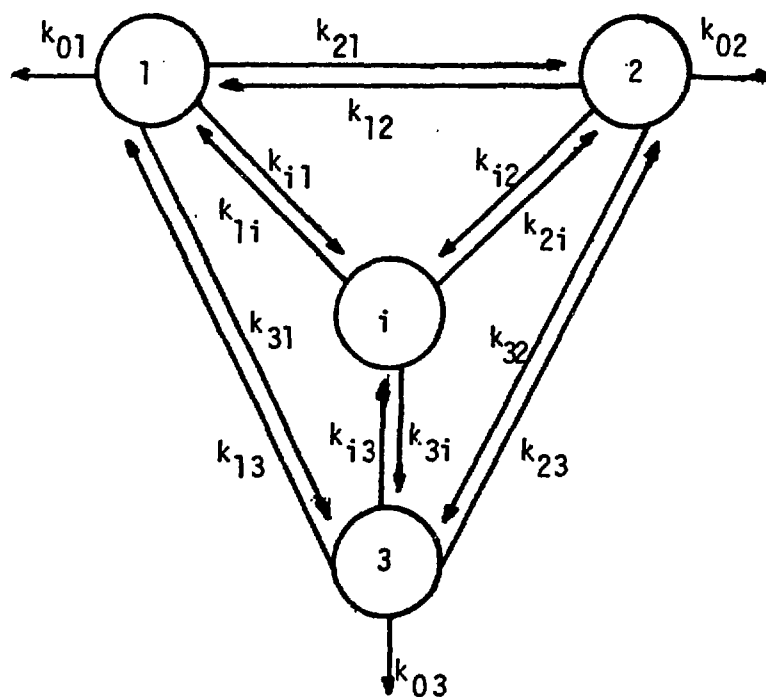
Na análise compartimental, o sistema biológico é suposto ser constituído por um número finito de compartimentos. Cada compartimento é caracterizado por duas propriedades essenciais⁽⁶⁶⁾:

- a) Homogeneidade - as partículas pertencentes a um compartimento apresentam o mesmo comportamento;

b) Linearidade - a eliminação de uma substância de um compartimento obedece a um processo de primeira ordem, isto é, a quantidade de substância que sai do compartimento na unidade de tempo é proporcional à quantidade de substância presente nele.

Estas hipóteses implicam que o modelo matemático que descreve a evolução no tempo das substâncias marcadas é um sistema de equações diferenciais lineares de primeira ordem com coeficientes constantes⁽²⁵⁾.

Seja um sistema de n compartimentos cujo esquema geral esteja assim representado:



Considerando-se o i-ésimo compartimento pode-se definir:

$f_i(t)$ - atividade ou quantidade de substância marcada existente no i-ésimo compartimento no instante t.

k_{ij} - coeficiente ou constante de transferência; repre -

representa a fração da substância marcada contida no j -ésimo compartimento que é transferida na unidade de tempo para o i -ésimo compartimento.

k_{oi} - coeficiente ou constante de eliminação; representa a fração da substância marcada contida no i -ésimo compartimento que é transferida na unidade de tempo.

$$K_{ii} = k_{oi} + k_{1i} + \dots + k_{ni} = k_{oi} + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n k_{ji}$$

A evolução no tempo da quantidade de substância marcada no i -ésimo compartimento é dada pela equação diferencial:

$$\frac{df_i(t)}{dt} = -k_{ii}f_i(t) + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n k_{ij}f_j(t)$$

com $f_i(t=0) = f_i(0)$

considerando-se um modelo n -compartimental descrito por um sistema de n equações diferenciais.

11.2 - Curva de Decaimento Plasmático

As medidas de radioatividade registradas nas amostras plasmáticas, nos tempos determinados, são representadas

em gráfico. Para a análise dos componentes exponenciais da curva traçada, pode-se lançar mão do "peeling"⁽²⁹⁾⁽⁶²⁾ ou da análise realizada por programa de computador; desse modo consegue-se a equação representativa do decaimento plasmático da droga estudada.

II.3 - Volume de Distribuição Aparente

O Volume de Distribuição Aparente representa o volume líquido no qual a fase seria distribuída se, em todos os compartimentos, a substância estivesse na concentração do compartimento no qual são feitas as medidas de radioatividade, quando se usa traçador radioativo⁽⁴⁵⁾.

O volume de Distribuição Aparente (V_d) é dado pela fórmula:

$$V_d = \frac{X_0}{x_{eq}} - V_0$$

X_0 é a atividade introduzida inicialmente

V_0 é o volume injetado

x_{eq} é a concentração do traçador por unidade de volume quando em equilíbrio

Se V_0 for muito menor que V_d a equação resulta:

$$V_d = \frac{X_0}{x_{eq}}$$

O cálculo do Volume de Distribuição Aparente da fase, como é definido, não fornece necessariamente um dado fisiológico significativo.

Vd corresponderia realmente ao volume de distribuição da fase, se a concentração x_{eq} /ml de líquido fosse a mesma em todos os compartimentos.

Sendo $x_{eq} = \alpha_{eq} C$ e sendo por definição α_{eq} idêntica em todos os compartimentos, é natural que x_{eq} varia de um compartimento a outro em função das diferenças de concentração da substância correspondente⁽⁴⁵⁾.

α_{eq} é a atividade específica da droga injetada quando em equilíbrio.

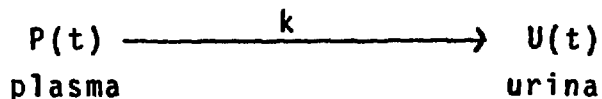
$$\alpha_{eq} = \frac{X_0}{N}$$

sendo que $N = \frac{X_0}{x_{eq}} C$

C é a concentração da substância por unidade de V_o lume de Distribuição Aparente.

II.4 - Coeficiente de Depuração Renal

Supondo o plasma o precursor direto dos rins, podemos representar o seguinte modelo:



Entende-se por Coeficiente de Depuração Renal o coeficiente de transferência entre o plasma e rins, isto é, a fração da substância marcada que é depurada pelos rins na unidade de tempo⁽⁵⁴⁾.

A evolução da quantidade de traçador no compartimento urinário é dada pela equação diferencial:

$$\frac{dU(t)}{dt} = kP(t) \quad \text{com } U(t=0)=0$$

Integrando-se a expressão anterior do instante zero ao instante t_1 tem-se:

$$U(t_1) = k \int_0^{t_1} P(t) dt$$

como $P(t) = A_1 e^{-b_1 t} + A_2 e^{-b_2 t}$ como é apresentado em V.4 , segue que:

$$\begin{aligned} \int_0^{t_1} P(t) dt &= \int_0^{t_1} A_1 e^{-b_1 t} dt + \int_0^{t_1} A_2 e^{-b_2 t} dt = \\ &= \frac{A_1}{b_1} (1 - e^{-b_1 t_1}) + \frac{A_2}{b_2} (1 - e^{-b_2 t_1}) \end{aligned}$$

e portanto,

$$k(t=t_1) = \frac{U(t_1)}{\frac{A_1}{b_1} (1 - e^{-b_1 t_1}) + \frac{A_2}{b_2} (1 - e^{-b_2 t_1})}$$

A partir dos dados experimentais de excreção urinária acumulada e da curva de decaimento plasmático ajustada é possível determinar um valor médio para os coeficientes de depuração renal:

$$\bar{k} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{U(t_i)}{\int_0^{t_i} P(t) dt}}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n k_i}{n}$$

onde n é o número de observações.

II.5 - Fluxo Renal (Clearance renal)

O transporte total de uma substância de uma região do sistema A (o sangue em geral) a outra região B (urina no caso), é expresso como sendo um volume de A contendo a quantidade transferida na unidade de tempo⁽¹¹⁾. O Fluxo Renal é calculado multiplicando-se o Volume de Distribuição Aparente Vd pelo Coeficiente de Depuração Renal \bar{k} (54).

$$Fr = \bar{k} Vd$$

II.6 - Cálculo da Meia-vida Biológica ($T_{\text{biol.}/2}$)

Considerando-se o corpo inteiro do animal como um único compartimento que elimina sua atividade por intermédio da excreção urinária, pode-se determinar que uma curva exponencial do tipo Ae^{-bt} é suficiente para reproduzir os dados experimentais de corpo inteiro.

Obtendo-se o valor de b , encontra-se o valor da Meia-vida biológica. Esta pode ser definida como sendo o intervalo de tempo necessário para que o número de partículas presentes em cada tempo num único compartimento seja reduzido à metade como resultado de um processo que não seja o decaimento radioativo isotópico⁽¹¹⁾.

$$T_{\text{biol.}/2} = \ln 2/b$$

II.7 - Taxa de Renovação (Turnover rate)

É a fração do traçador que abandona um compartimento ou sistema na unidade de tempo. Constitui-se no próprio valor da constante de troca b que também é chamada "rate constant" e é expressa em h^{-1} (11).

II.8 - Tempo Médio de Permanência ou Tempo de Renovação
("Mean time" ou "turnover time")

É o tempo médio que uma partícula permanece em alguma região do sistema. É o equivalente ao intervalo de tempo necessário para que a quantidade de substância transferida dentro ou fora da região no estado estacionário seja numericamente igual à quantidade presente na região. Para um sistema de um só compartimento obedecendo cinética de primeira ordem, o Tempo de Renovação é a recíproca da constante de troca \underline{b} ⁽¹¹⁾.

C A P Í T U L O I I I

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

III.1 - Considerações gerais

Considerando-se como base fundamental do programa de experimentações o estudo cinético de heparina com auxílio de um traçador radioativo, fazia-se necessário numa etapa inicial desenvolver estudos que permitissem a definição de parâmetros do comportamento farmacológico da heparina no animal escolhido, que no caso presente foi o rato.

A marcação da heparina com um isótopo radioativo seria o primeiro passo a ser ensaiado; a literatura descreve algumas marcações de heparina com ^3H como os trabalhos de BARLOW e col. (3); a marcação ^{35}S , feita biologicamente "in vivo" em animais, foi empregada em muitos trabalhos referentes a distribuição biológica e cinética (14)(16)(17)(27)(39)(44)(49); no entanto, os resultados desses trabalhos têm que ser revisados face às falhas apresentadas devido à labilidade "in vivo" dos grupos sulfato da heparina (14)(17)(50).

KULKARNI e col. (37) apresentaram marcação de heparina com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ com a finalidade de mapeamento do coração e ar-

térias, dando pouca atenção a problemas cinéticos. Justamente por causa da meia-vida curta do ^{99m}Tc , esse radioisótopo não é recomendado para estudos cinéticos de uma droga com as características da heparina.

Grande parte dos trabalhos publicados que se ocuparam de cinética da heparina, fazem dosagens da droga por meio de provas biológicas de coagulação sanguínea⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁵²⁾; os valores obtidos, ou seja, a curva de decaimento plasmático monoexponencial com um $T/2$, e o Volume de Distribuição Aparente deduzido, dizem respeito somente à função anticoagulante da heparina.

A literatura registra ainda um trabalho⁽⁶⁷⁾ em que a heparina é dosada em plasma humano com métodos químicos; a curva de decaimento plasmático traçada é bi-exponencial e é calculado o Volume de Distribuição Aparente.

O emprego do ^{51}Cr para marcação de heparina foi desenvolvido por VARGA e col.⁽⁵⁹⁾ resultando em um produto estável, sem perda da potência biológica, atividade anticoagulante e propriedades físico-químicas de metacromasia. As vantagens do ^{51}Cr como traçador isotópico para estudos cinéticos de heparina residem nas seguintes características:

- a) emissão gama monoenergética de 0,320 meV, de fácil detecção com elevada eficiência, possibilitando medidas "in vitro" e "in vivo";
- b) meia-vida de 27,8 dias, permitindo o estudo por longo tempo de um produto como a heparina, cuja eliminação orgânica obedece a um critério de lenta metabolização.

Além do que foi exposto, o ^{51}Cr é produzido rotineiramente no "Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares" de São Paulo.

Em nossos trabalhos experimentais procuramos coletar dados com a finalidade de escolha de um modelo cinético compatível. No início planejou-se a administração do produto marcado no compartimento plasmático e medidas de decaimento de atividade no compartimento de entrada, o plasma. Depois, a captação de radioatividade pelos diferentes órgãos do animal e finalmente o decaimento da atividade corpórea em função do tempo, complementada pela avaliação da radioatividade eliminada nas excreções urinárias e fecais.

Os procedimentos experimentais nos permitiram a apreciação de dados cinéticos, a saber: Curva de decaimento plasmático, Volume de Distribuição Aparente, Coeficiente de Depuração Renal, Fluxo Renal (Clearance), Meia-vida Biológica, Taxa de Renovação (Turnover rate), Tempo Médio de Permanência ou Tempo de Renovação e Análise Compartmental.

III.2 - Planejamento quanto à detecção da radiação do ^{51}Cr

Além das medidas efetuadas em detectores usuais para amostras de sangue, plasma e órgãos, teríamos que planejar aquelas da atividade corpórea residual. Esta precisaria ser medida de forma independente de sua distribuição no corpo inteiro do animal e em animais vivos. Fez-se necessário então recorrer a um sistema de medidas com as características dos

conhecidos contadores de corpo inteiro, desenvolvidos já há algum tempo, destinados a estudar contaminações radioativas acidentais, absorção de alimentos, fármacos, micronutrientes e finalmente para estudos cinéticos⁽²²⁾⁽⁴⁰⁾⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾⁽⁵⁶⁾.

Nosso plano experimental não se enquadrou no estabelecimento da natureza química da atividade registrada, seja nos órgãos, tecidos, corpo inteiro ou excretas, nas diferentes fases de contagens. A literatura nos aponta apenas dessulfuração comprovada da molécula⁽⁵⁰⁾ após entrada no compartimento plasmático e eliminação também de heparina íntegra na urina⁽¹⁴⁾.

III.3 - Escolha do animal para os experimentos

O rato foi escolhido por causa da facilidade de obtenção e manuseio. O número mínimo de seis ratos foi estabelecido em cada prova, porque amostras dessa magnitude são suficientes para um tratamento estatístico satisfatório.

Desde que procuramos esclarecer os principais critérios que nos levaram ao estabelecimento de um plano de trabalho, podemos discorrer sobre o desenvolvimento de cada fase realizada.

C A P Í T U L O I V

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 - Reagentes e soluções empregados

- Sal sódico de Heparina "Sigma", Estados Unidos. Extraída da mucosa intestinal de suínos. Atividade biológica 158,1 U/mg.
- Sal sódico de Heparina "Fluka", Suíça. Extraída de membros anteriores de suínos. Atividade biológica 140 U/mg.
- ^{51}Cr : solução de $^{51}\text{CrCl}_3$. Produção: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Atividade específica: 22 a 28 mCi/mg de Cr.
- ^{51}Cr : solução de $^{51}\text{CrCl}_3$. "Union Carbide", Estados Unidos. Atividade específica 50 a 109,3 mCi/mg de Cr.
- Sal sódico do ácido Etileno Diamintetracético (E.D.T.A.), p.a., Qeel, Brasil.
- Álcool Etílico absoluto, p.a., E.Merck, A.G., Alemanha.
- Sephadex G-50, fino, Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Cloreto de Crômio III, p.a., J.T.Baker, Estados Unidos.
- Cloreto de Sódio p.a., J.T.Baker, Estados Unidos.
- Hidróxido de Sódio p.a., J.T. Baker, Estados Unidos.
- Azul de Toluidina, E.Merck, A.G., Alemanha.

- Acetona p.a., E.Merck, Alemanha.
- Solução anticoagulante de oxalatos⁽²⁸⁾ consistindo numa mistura de Oxalato de amônio, p.a., J.T.Baker, Estados Unidos; Oxalato de Potássio p.a., J.T. Baker, Estados Unidos.
- Éter etílico p.a., E.Merck, Alemanha.
- Papel cromatográfico "Whatman nº 3MM", W.R. Balston, Inglaterra.

IV.2 - Material biológico

Animal utilizado: "Rattus norvegicus albinus", linhagem Wistar, machos, pesando $280g \pm 46g$; fêmeas pesando $234g \pm 34g$. Os animais receberam durante todos os experimentos, ração comercial e água "ad libitum".

IV.3 - Equipamentos

- Cintilador de poço com cristal de NaI(Tl) de 3 polegadas, Nuclear Chicago, Estados Unidos.
- Curiômetro "Mediac", Nuclear Chicago, modelo 6362, Estados Unidos.
- Centrífuga "Sorval" GLC-1, Estados Unidos.
- Contador de Corpo Inteiro: adaptação para animal de pequeno porte, do Renograma, Nucleopan 4K Siemens, Aktien

gesellschaft, Alemanha. Detectores de cristal de NaI(Tl), medindo 2x2 polegadas. Colimadores utilizados:

- a) um colimador de abertura elíptica cujos diâmetros são: 13,8x12,2 cm;
- b) um colimador de abertura circular de 13,8 cm de diâmetro. A distância do cristal à abertura de cada colimador é de 15,7 cm.

- Gaiola Metabólica: idealizada por Zucas e col.⁽⁶⁸⁾ que facilita o controle rigoroso das urinas e fezes eliminadas, apresentando um índice de confiança de 97%.

IV.4 - Técnica de marcação e purificação de heparina com ^{51}Cr

A marcação da heparina com ^{51}Cr baseou-se nos trabalhos de VARGA e col.⁽⁵⁹⁾ utilizando a capacidade do átomo de crômio em formar complexo estável com a heparina.

Colocaram-se em balão de 50 ml, 9 mg de heparina em solução de $^{51}\text{CrCl}_3$ (volume cerca de 1 ml) com 2 mCi de atividade e atividades específicas variando de 22 a 109,3 mCi/mg de Cr. Juntaram-se 5 ml de álcool absoluto e a mistura foi refluxada em banho-maria a 80°C durante 30 minutos. Ao fim desse tempo o balão foi desconectado, retirado do banho e adaptado a um tubo de vidro por onde circulou um jato de ar até a completa evaporação do álcool, operação que durou 15 minutos, aproximadamente. Adicionaram-se 4 ml de água destilada, 3 ml de solução de E.D.T.A., 0,02M e aqueceu-se novamente em banho-maria a 50°C. O pH foi elevado a valor 7 com solução de

NaOH 1N.

Após a marcação da heparina com ^{51}Cr , a remoção do ^{51}Cr não complexado ao mucopolissacarídeo foi efetuada por percolação da solução em uma coluna de vidro com as dimensões de 44 cm de altura por 1,3cm de diâmetro, contendo Sephadex G-50 fino. O gel de Sephadex foi previamente equilibrado com água destilada e a eluição da mistura percolada foi igualmente feita com água destilada.

Trinta amostras de 2 ml foram coletadas em tubos de ensaio, mantendo-se a vazão da coluna em 0,3 ml/minuto.

De cada tubo foi retirada uma alíquota e levada ao cintilômetro de poço com cristal de NaI(Tl), Nuclear Chicago.

IV.5 - Controle de pureza da heparina - ^{51}Cr

As amostras com contagens expressivas, contendo heparina marcada com ^{51}Cr , foram selecionadas para controles radioquímicos, com a finalidade de se determinar o teor de ^{51}Cr livre e posterior utilização em ensaios biológicos.

Para o controle radioquímico usou-se a técnica de cromatografia ascendente em papel cromatográfico Whatman nº3 MM e como solvente empregou-se a mistura álcool-água (60:40)⁽⁵⁹⁾. Cada fita de papel de 21x2 cm foi semeada com a solução eluída correspondente ao pico heparina - ^{51}Cr adicionando-se solução de EDTA-Cr como carregador. Este foi preparado misturando-se partes iguais de solução de EDTA 0,02M e solução de

CrCl_3 0,02M; a mistura foi deixada em banho-maria a 50°C por 5 minutos, tempo suficiente para a formação de EDTA-Cr.

Após a corrida do solvente, as fitas foram reveladas para se conhecer a posição da heparina- ^{51}Cr e a posição do EDTA ^{51}Cr .

A localização da heparina foi feita com solução acetônica de azul de toluidina⁽²⁶⁾; a posição de EDTA-Cr pode ser vista sem revelador, pois a coloração violeta característica desse produto possibilita sua visualização.

A contagem de toda a extensão da fita foi feita após dividi-la em pedaços de 1 cm. O gráfico traçado após a contagem de cada divisão da fita, revelou a presença de dois picos de maior contagem, coincidindo o primeiro com a localização da heparina revelada pelo azul de toluidina, e o segundo coincidindo com a cor apresentada pelo EDTA-Cr.

IV.6 - Preparação da solução de heparina marcada com ^{51}Cr para ser injetada nos animais.

A série de amostras de heparina- ^{51}Cr eluídas e analisadas cromatograficamente foram selecionadas para serem injetadas. Utilizaram-se apenas amostras contendo no máximo 1% de ^{51}Cr não combinado à heparina.

Estas amostras foram reunidas, medidas em Curiômetro para avaliação da atividade em milicuries e a solução resultante foi tornada fisiológica com adição de NaCl.

Colocou-se em seguida heparina não marcada para per fazer o total de atividade biológica a ser injetada: 94 U/rato nas injeções endovenosas e 110 U/rato nas injeções intraperitoneais.

IV.7 - Níveis plasmáticos e distribuição biológica

IV.7.1 - Injeção endovenosa de heparina-⁵¹Cr

Destinaram-se 16 grupos de 6 ratos machos para os experimentos de dosagem de níveis plasmáticos e captação de heparina marcada com ⁵¹Cr pelos órgãos e tecidos. Primeiramente, os animais foram pesados e anestesiados com éter em máscara aberta; 0,25 ml de solução de heparina marcada com ⁵¹Cr (10 μ Ci - 15 μ Ci) com atividade de 0,11 a 0,16 μ Ci / Unidade, foi injetada na artéria dorsal do pênis de cada rato. Colheram-se amostras de sangue, por punção cardíaca, nos seguintes tempos após injeção endovenosa: 3-5-10-20-30-40-50-60-90 minutos e 2-3-5-17-24 horas. Cerca de 2 ml de sangue foram coletados de cada animal e colocados imediatamente em vidros contendo 0,2 ml de solução de oxalatos⁽²⁸⁾ previamente evaporada; 1 ml do sangue oxalatado foi introduzido em tubo específico para avaliação do respectivo hematócrito e posterior avaliação do volume plasmático de cada rato.

Um volume exatamente medido do sangue oxalatado foi levado ao contador de cristal de NaI(Tl) para medida de radioatividade; em seguida foi centrifugado a 2000 rotações por mi

nuto para separar o plasma. Este por sua vez foi também levado ao contador para medida de radioatividade, sendo anotado seu exato volume.

Terminada a coleta de sangue, os animais foram sacrificados para retirada dos seguintes órgãos: fígado, coração, rins, estômago, pulmões, baço, parte do intestino grosso, parte do intestino delgado, pâncreas e uma porção do músculo das patas trazeiras. Os órgãos após a extração, foram lavados, esvaziaram-se os conteúdos gástrico e intestinal e finalmente foram secos em papel de filtro, pesados e medidas às atividades em tubos de plástico nos contadores de cristal de NaI(Tl). As contagens de sangue, plasma, órgãos e tecidos foram acompanhadas de um padrão constando da mesma dose injetada nos animais. Manteve-se a mesma geometria para as contagens do padrão e amostras.

As atividades dos órgãos foram medidas nos tempos acima citados e ainda após 48 e 168 horas.

IV.7.2 - Injeção intraperitoneal de heparina-⁵¹Cr

Nove grupos de seis ratos fêmeas foram utilizados para dosagem de níveis plasmáticos e captação de radioatividade de nos órgãos e tecidos, após injeção intraperitoneal de heparina marcada com ⁵¹Cr. Da mesma forma que para injeção endovenosa, os ratos foram primeiramente pesados, mas não foram anestesiados para a injeção, tendo sido contidos manualmente.

A solução de heparina-⁵¹Cr com atividade específica de 0,09 a 0,14 μ Ci por Unidade, foi injetada intraperitonealmente em cada animal, num volume de 0,5 ml e atividade de 10 a 15 μ Ci/rato.

Após injeção intraperitoneal, os animais foram anestesiados com éter em máscara aberta para coleta de sangue nos tempos determinados, sendo essa coleta feita por punção cardíaca. Os tempos decorridos entre a injeção e a coleta de sangue, órgãos e tecidos foram: 15 e 30 minutos; 1-2-4-6 e 24 horas. O sangue (cerca de 2 ml) colhido, foi igualmente oxalatado e parte colocado em tubo próprio para medida do hematócrito. A amostra de sangue de volume exatamente avaliado, foi levada ao cintilador de poço com cristal de NaI(Tl) para medida de radioatividade e em seguida centrifugado da mesma forma como feito anteriormente para separação do plasma. Este também foi contado para medida de radioatividade e anotado exatamente seu volume.

Os órgãos foram igualmente retirados para avaliação das medidas de radioatividade, tendo sido tratados como no caso de injeção endovenosa. Utilizou-se um padrão de contagem nos mesmos moldes já descritos em IV.7.1.

Os órgãos e tecidos ainda foram retirados para contagem após decorridas 48 e 120 horas da injeção por via intraperitoneal.

IV.8 - Medidas de volume sanguíneo e plasmático

A volemia de cada rato foi determinada aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volemia} = \text{Peso do animal} \times 0,0528$$

A fórmula assinalada bem como o fator a ser multiplicado ao peso de cada animal estão contidos em obra especializada (1) que abrange dados hematológicos sobre ratos.

O volume plasmático foi calculado pela seguinte fórmula⁽⁶⁰⁾:

$$\text{Volume plasmático} = \frac{\text{Volemia(ml)} \times (100 - \text{hematócrito real})}{100}$$

$$\text{Hematócrito real} = \text{Hematócrito lido no tubo} \times 0,91 \times 0,96 \text{ (60).}$$

IV.9 - Medidas de corpo inteiro

Sete ratos machos foram injetados endovenosamente, conforme descrito em IV.7, com 0,6 ml de solução de heparina-⁵¹Cr com atividade específica de 0,11 a 0,16 μCi / Unidade, perfazendo uma quantidade total de 73 Unidades por rato.

Cada rato foi mantido, individualmente, em gaiola metabólica durante um período de até 432 horas após a injeção.

Cada rato após a injeção era imediatamente levado ao contador de corpo inteiro para se ter um padrão de contagem igual a 100% da atividade injetada. Os animais continuavam a ser contados a cada 24 horas. Os dois detectores registravam separadamente a série de contagens efetuadas, permitindo a obtenção de duas séries de medidas de radioatividade, independentemente.

Os colimadores, munidos de sistema de movimentação multidirecional, foram colocados bem junto às paredes da gaiola e sempre no mesmo local. Através das grades da gaiola foram introduzidas placas de papelão, de forma a limitarem a posição do animal bem em frente aos detectores sem molestar em tempo algum, os ratos que estavam sendo contados.

Após terem sido feitas as medidas de radioatividade dos animais, contava-se também um padrão, que consistia em um frasco de vidro, de volume e forma aproximada ao de um rato de 280 g, preenchido com água e contendo a mesma dose injetada. As contagens desse padrão eram feitas em diversas posições para simular os locais que os ratos ocupavam eventualmente ao se movimentarem nas gaiolas. Esse padrão também representava 100% da atividade injetada.

IV.10 - Coleta das fezes e urinas. Medidas de atividade

As fezes e urinas foram separadas quantitativamente no sistema da gaiola metabólica. A cada 24 horas recolhiam-se as urinas e fezes, mediam-se os volumes das urinas, que por sua vez eram levadas a um cintilador de poço com cristal

de NaI(Tl) para medidas de radioatividade.

As fezes eram secas em estufa a 40°C, moidas em gral e pesadas, introduzidas nos tubos de plástico para contagens e levadas ao cintilador para medidas de radioatividade.

O padrão de medida para os excretas constituiu-se em um tubo de contagem com a mesma dose injetada nos ratos.

IV.11 - Programas de Computador empregados nos cálculos matemáticos

IV.11.1 - "Statistical Analysis System SAS-76"⁽⁴⁾

Em computador IBM/370-155 foi utilizado o programa SAS-76 para os cálculos estatísticos relativos aos dados experimentais obtidos quanto à distribuição biológica de heparina-⁵¹Cr em ratos.

A curva de decaimento plasmático da heparina-⁵¹Cr injetada por via endovenosa foi ajustada pelo emprego do método iterativo Gauss-Newton de mínimos quadrados não linear, disponível no programa SAS-76. É apresentado ainda um quadro de análise de variância aplicado aos parâmetros de um modelo não linear.

O cálculo da Meia-vida biológica da heparina marcada com ⁵¹Cr a partir da equação apresentada em II.6, teve seu ajuste numérico obtido pelo General Linear Model - GLM disponível no programa SAS-76. Foi feita a análise da variância

empregando-se o teste F (Fischer) e a estimativa dos parâmetros em que foi aplicado o teste t (Student).

IV.11.2 - "Simulation Analysis and Modeling". Código SAAM 25⁽⁶⁾.

O programa foi desenvolvido por BERMAN e WEISS e foi empregado para a determinação do valor numérico dos coeficientes de transferência a partir do conhecimento da evolução da substância marcada, a heparina-⁵¹Cr, em determinados pontos do sistema biológico, considerando o modelo compartimental escolhido.

C A P Í T U L O V

RESULTADOS

V.1 - Marcação e purificação de heparina com ^{51}Cr

As marcações de heparina com ^{51}Cr , seguindo-se o método descrito por VARGA e col. (59) foram satisfatórias, com rendimentos em torno de 70%, o que foi confirmado por análises cromatográficas antes da purificação.

A purificação da heparina- ^{51}Cr em colunas de Sephadex G-50 fino, é representada pela curva de eluição, na Figura 2, onde se nota a presença de dois picos de radioatividade: o primeiro, com níveis de atividade mais altos, refere-se à heparina- ^{51}Cr e o outro pico corresponde ao ^{51}Cr sob forma de EDTA- ^{51}Cr .

V.2 - Distribuição biológica de heparina- ^{51}Cr , após injeção endovenosa e intraperitoneal.

A distribuição biológica, correspondente à captação por órgãos totais e por grama de órgãos e tecidos, de heparina ^{51}Cr está apresentada nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 em que são

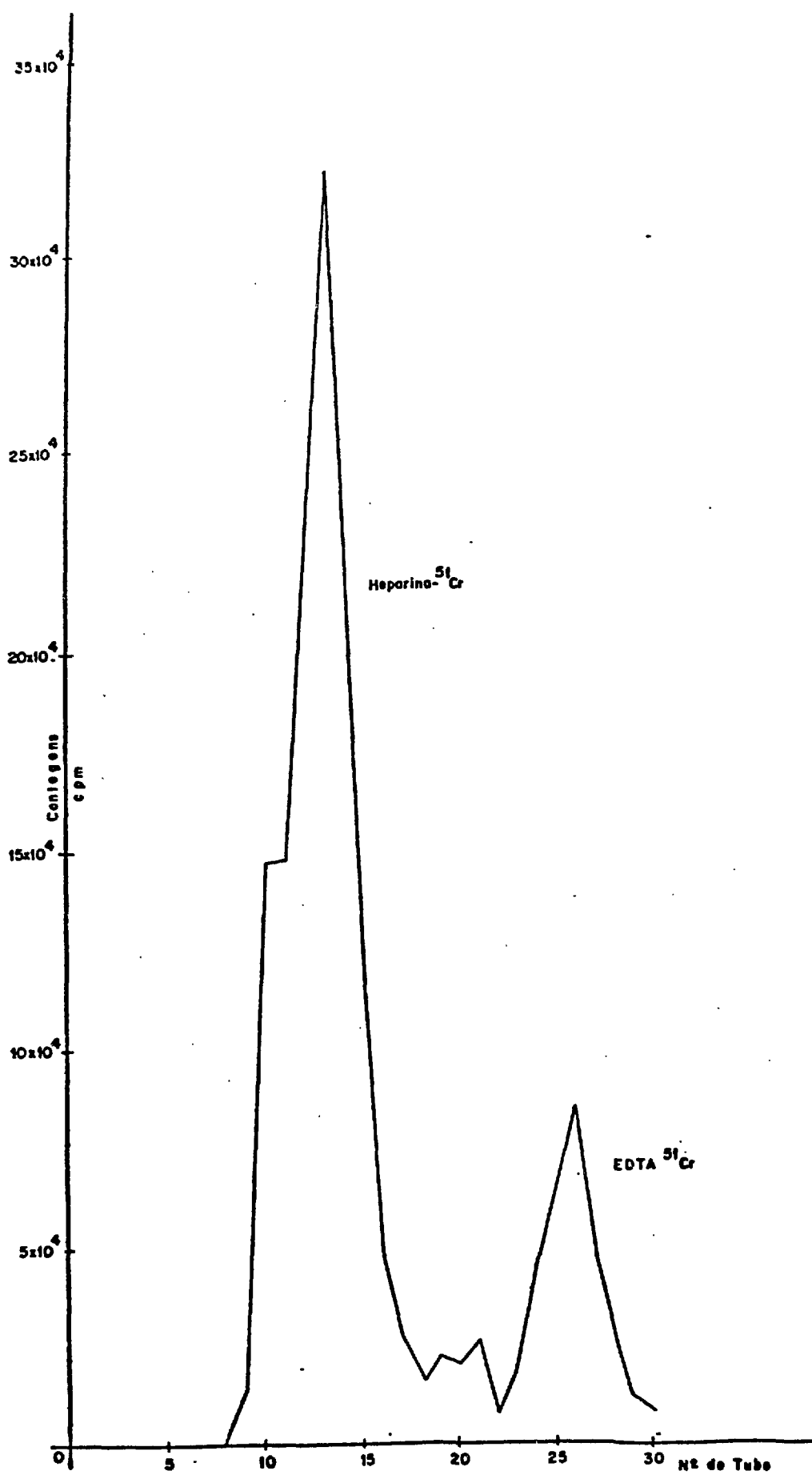


Figura 2 - Curva de eluição de heparina - ⁵¹Cr adsorvida em Saphedex G-50 fino, eluente: água destilada.

discriminadas as distribuições após injeção endovenosa e intraperitoneal.

V.3 - Níveis sanguíneos e plasmáticos de heparina-⁵¹Cr após injeção endovenosa e intraperitoneal

A radioatividade no sangue e plasma, conforme está apresentada nas Tabelas 5 a 8, após injeção endovenosa e intraperitoneal de heparina-⁵¹Cr, é dada em porcentagem por mililitro, tendo como referência o padrão (item IV.7.1) que é contado simultaneamente. Para o cálculo da radioatividade no sangue total determinou-se a volemia de cada animal e, para o cálculo da porcentagem de radioatividade no plasma total utilizou-se o volume plasmático de cada rato.

V.4 - Curva de decaimento plasmático da heparina-⁵¹Cr injetada via endovenosa

Os dados obtidos em porcentagens de radioatividade no plasma, nos tempos fixados após a injeção endovenosa de heparina marcada com ⁵¹Cr, ajustados pelo programa citado em IV.11.1 foram esquematizados em um gráfico e a curva da Figura 3, corresponde à soma de duas exponenciais cuja fórmula pode ser assim representada:

$$P(t) = A_1 e^{-b_1 t} + A_2 e^{-b_2 t} \quad (\S)$$

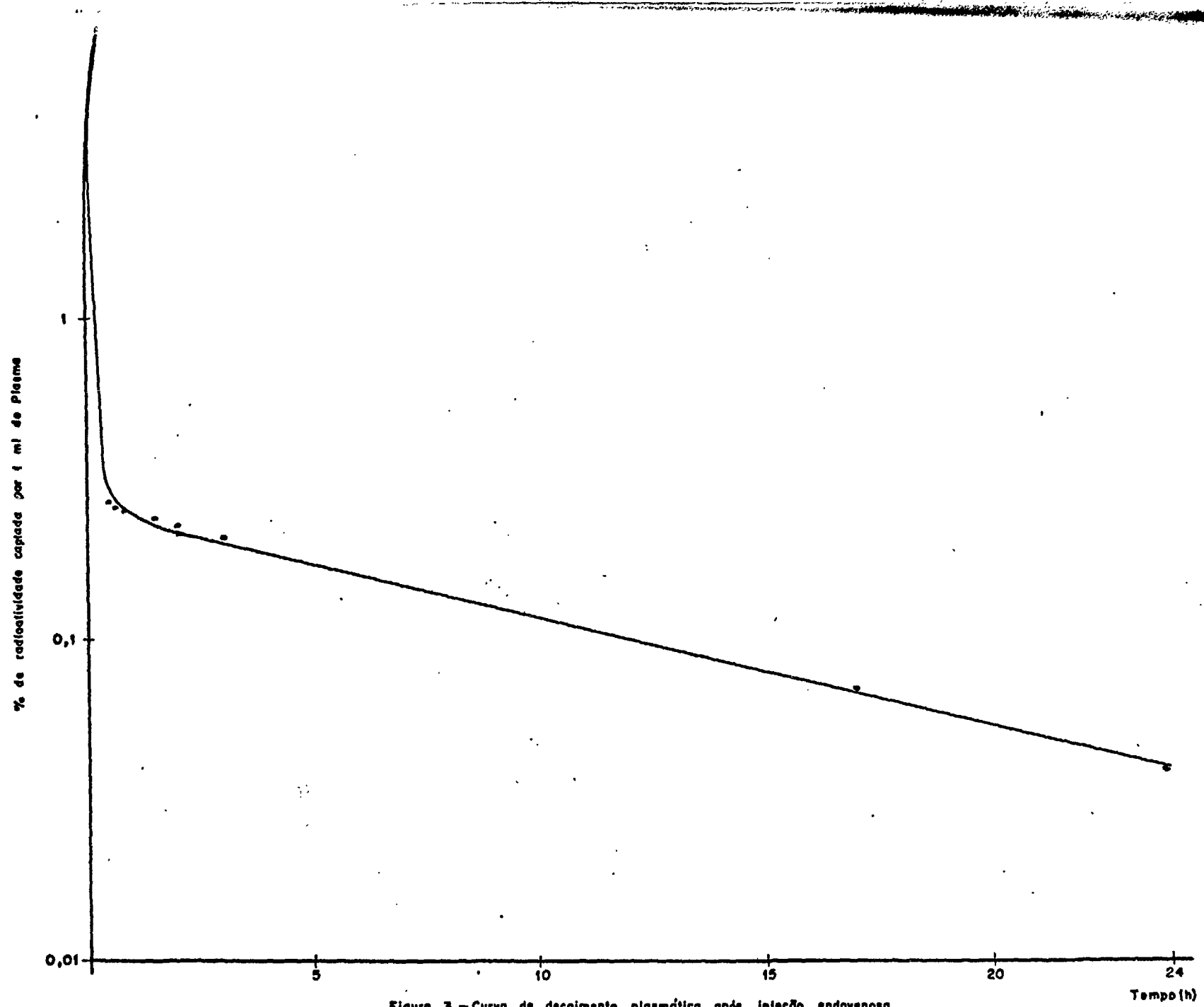


Figura 3 - Curva de decaimento plasmática, após injeção endovenosa de heparina - ^{51}Cr .

TABELA 1 - Porcentagem de Radioatividade nos órgãos totais de ratos Wistar: injeção endovenosa de heparina-⁵¹Cr

Tempos(h)	Fígado	Coração	Pulmões	Baço	Rins	Pâncreas	Estômago
0,05	20,55 ± 2,62	0,19 ± 0,05	0,58 ± 0,10	0,79 ± 0,36	1,72 ± 0,79	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,05
0,08	47,65 ± 6,36	0,15 ± 0,08	0,48 ± 0,09	1,20 ± 0,20	1,77 ± 0,32	0,13 ± 0,02	0,27 ± 0,05
0,16	64,77 ± 6,00	0,06 ± 0,01	0,39 ± 0,11	1,20 ± 0,33	0,58 ± 0,08	0,06 ± 0,02	0,11 ± 0,06
0,33	66,66 ± 9,88	0,05 ± 0,01	0,32 ± 0,07	1,17 ± 0,18	0,43 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01
0,50	73,84 ± 7,53	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,04	0,84 ± 0,20	0,31 ± 0,01	0,02 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,04 ± 0,01
0,66	84,53 ± 6,38	0,03 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,24 ± 0,05	1,24 ± 0,30	0,29 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
0,83	82,47 ± 6,06	0,02 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,36 ± 0,14	0,82 ± 0,34	0,20 ± 0,02	0,01 ± 1 x 10 ^{-3*}	0,03 ± 2 x 10 ^{-3*}
1,00	69,54 ± 9,47	0,03 ± 6 x 10 ^{-3*}	0,20 ± 0,06	1,04 ± 0,44	0,27 ± 0,05	0,02 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,04 ± 0,01
1,50	58,27 ± 6,19	0,06 ± 0,01	0,27 ± 0,05	2,23 ± 0,21	0,85 ± 0,16	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,01
2,00	60,65 ± 6,01	0,06 ± 0,01	0,34 ± 0,09	2,21 ± 0,30	1,04 ± 0,17	0,06 ± 0,01	0,18 ± 0,10
3,00	60,53 ± 6,43	0,06 ± 0,01	0,34 ± 0,14	2,10 ± 0,41	0,92 ± 0,16	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,03
6,00	65,45 ± 6,18	0,07 ± 0,01	0,25 ± 0,07	2,24 ± 0,34	1,12 ± 0,18	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02
17,00	59,43 ± 6,84	0,05 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,20 ± 0,03	2,35 ± 0,30	0,88 ± 0,09	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,02
24,00	58,49 ± 3,57	0,05 ± 0,01	0,19 ± 0,06	1,32 ± 0,24	1,26 ± 0,08	0,02 ± 0,02	0,12 ± 0,01
48,00	58,73 ± 6,19	0,03 ± 3 x 10 ^{-3*}	0,21 ± 0,04	1,36 ± 0,16	0,74 ± 0,08	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01
168,00	84,19 ± 8,94	0,02 ± 3 x 10 ^{-3*}	0,18 ± 0,07	2,02 ± 0,33	0,41 ± 0,11	0,07 ± 0,03	0,03 ± 3 x 10 ^{-3*}

* Os dados apresentados nessa forma visam dar maior precisão nos resultados numéricos

TABELA 2 - Porcentagem de Radioatividade por g de órgãos e tecidos de ratos Wistar: injeção endovenosa de heparina ^{51}Cr .

Tempo(h)	Fígado	Coração	Pulmões	Baço	Rins	Intestino grosso	Intestino delgado	Pâncreas	Estômago	Músculo
0,05	1,82 ± 0,33	0,21 ± 0,06	0,36 ± 0,07	1,21 ± 0,36	1,03 ± 0,25	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,12
0,08	4,72 ± 0,90	0,17 ± 0,14	0,40 ± 0,10	1,55 ± 0,56	1,13 ± 0,23	0,10 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,06 ± 0,02
0,16	6,59 ± 0,69	0,08 ± 0,01	0,31 ± 0,07	1,78 ± 0,35	0,35 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,04	0,01 ± 1 x 10 ⁻³
0,33	7,04 ± 1,61	0,06 ± 0,01	0,22 ± 0,06	1,46 ± 0,33	0,26 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,01 ± 3 x 10 ⁻³
0,50	9,18 ± 1,25	0,05 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,18	0,21 ± 0,03	0,02 ± 4 x 10 ⁻³	0,04 ± 0,01	0,03 ± 5 x 10 ⁻³	0,03 ± 5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³ ± 2 x 10 ⁻³
0,66	10,95 ± 0,59	0,04 ± 0,01	0,20 ± 0,02	1,94 ± 0,59	0,20 ± 0,03	0,02 ± 2 x 10 ⁻³	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	5 x 10 ⁻³ ± 3 x 10 ⁻³
0,83	8,64 ± 0,92	0,03 ± 0,01	0,27 ± 0,11	1,13 ± 0,49	0,12 ± 0,02	0,01 ± 1 x 10 ⁻³	0,02 ± 6 x 10 ⁻³	0,02 ± 5 x 10 ⁻³	0,02 ± 2 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³ ± 2 x 10 ⁻³
1,00	7,81 ± 1,43	0,04 ± 0,01	0,15 ± 0,05	1,60 ± 0,69	0,18 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 4 x 10 ⁻³	0,01 ± 0,01
1,50	5,57 ± 1,31	0,07 ± 0,02	0,16 ± 0,04	2,85 ± 0,22	0,26 ± 0,15	0,04 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,05 ± 4 x 10 ⁻³	0,01 ± 0,01
2,00	6,16 ± 0,61	0,07 ± 0,01	0,21 ± 0,04	3,07 ± 0,45	0,57 ± 0,08	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,06	0,01 ± 4 x 10 ⁻³
3,00	6,37 ± 1,31	0,08 ± 0,03	0,22 ± 0,03	2,84 ± 0,57	0,56 ± 0,14	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,01 ± 6 x 10 ⁻³
6,00	8,68 ± 1,70	0,09 ± 0,02	0,18 ± 0,07	3,49 ± 0,98	0,71 ± 0,17	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,05	0,07 ± 0,02	0,02 ± 5 x 10 ⁻³
17,00	5,49 ± 1,29	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,01	3,03 ± 0,98	0,49 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,07 ± 0,02	0,01 ± 6 x 10 ⁻³
24,00	6,34 ± 0,80	0,08 ± 0,02	0,16 ± 0,06	1,69 ± 0,46	0,95 ± 0,27	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,01 ± 6 x 10 ⁻³
48,00	5,32 ± 0,82	0,02 ± 0,01	0,14 ± 0,04	1,67 ± 0,50	0,38 ± 0,04	0,03 ± 4 x 10 ⁻³	0,04 ± 3 x 10 ⁻³	0,09 ± 0,02	0,03 ± 5 x 10 ⁻³	0,01 ± 2 x 10 ⁻³
168,00	8,95 ± 1,59	0,03 ± 4 x 10 ⁻³	0,12 ± 0,05	2,62 ± 0,52	0,24 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,02 ± 1 x 10 ⁻³	0,01 ± 4 x 10 ⁻³

TABELA 3 - Porcentagem de Radioatividade nos órgãos totais de ratos Wistar: injeção intraperitoneal de heparina ^{51}Cr

Tempos (h)	Fígado	Coração	Pulmões	Baço	Rins	Pâncreas	Estômago
0,25	0,16 ± 0,06	0,02 ± 0,03	0,02 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,01 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,01 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,02 ± 0,01
0,50	0,50 ± 0,09	0,03 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,08 ± 0,01	0,03 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,37 ± 0,06	0,02 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,02 ± 0,01
1,00	4,90 ± 3,24	0,11 ± 0,04	0,33 ± 0,11	0,40 ± 0,21	1,16 ± 0,33	4,88 ± 2,56	0,49 ± 0,29
2,00	16,29 ± 4,54	0,11 ± 0,03	0,36 ± 0,20	1,05 ± 0,17	0,96 ± 0,28	6,80 ± 2,92	0,65 ± 0,19
4,00	19,81 ± 3,67	0,08 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,29 ± 0,15	1,39 ± 0,44	1,02 ± 0,18	4,87 ± 1,57	0,83 ± 0,17
6,00	4,82 ± 5,19	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,07	0,28 ± 0,41	0,36 ± 0,14	0,03 ± 0,01	0,04 ± 5 x 10 ^{-3*}
24,00	4,17 ± 0,57	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,87 ± 0,26	0,18 ± 0,20	0,08 ± 0,01
48,00	2,05 ± 0,23	0,01 ± 3 x 10 ^{-3*}	0,05 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 5 x 10 ^{-3*}
120,00	2,01 ± 0,31	0,01 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,04 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,49 ± 0,10	0,04 ± 0,01	0,03 ± 4 x 10 ^{-3*}

*Os dados apresentados nessa forma visam dar maior precisão nos resultados numéricos

TABELA 4 - Porcentagem de Radioatividade por g de órgãos e tecidos de ratos Wistar: injeção intraperitoneal de heparina ^{51}Cr

Tempos (h)	Fígado	Coração	Pulmões	Baço	Rins	Intestino Grosso	Intestino Delgado	Pâncreas	Estômago	Músculo
0.25	0,02 ± 0,01	0,01 ± 3 x 10 ^{-3*}	0,01 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 7 x 10 ^{-3*}	0,01 ± 0,01	0,01 ± 4 x 10 ^{-3*}
0.50	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,19	0,24 ± 0,03	0,03 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
1.00	0,77 ± 0,56	0,14 ± 0,05	0,20 ± 0,08	0,69 ± 0,39	0,73 ± 0,20	0,21 ± 0,10	0,17 ± 0,09	5,82 ± 1,47	0,32 ± 0,18	0,18 ± 0,24
2.00	2,43 ± 0,78	0,16 ± 0,04	0,30 ± 0,14	2,12 ± 0,72	0,69 ± 0,19	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,06	8,86 ± 4,70	0,52 ± 0,12	0,09 ± 0,04
4.00	2,88 ± 0,67	0,13 ± 0,02	0,33 ± 0,27	1,97 ± 0,49	0,69 ± 0,18	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,03	5,95 ± 1,59	0,53 ± 0,13	0,03 ± 5 x 10 ^{-3*}
6.00	0,67 ± 0,71	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,24 ± 0,08	0,05 ± 0,05	0,11 ± 0,11	0,04 ± 0,01	0,03 ± 3 x 10 ^{-3*}	0,04 ± 0,03
24.00	0,51 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,60 ± 0,22	0,04 ± 6 x 10 ^{-3*}	0,06 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,19 ± 0,20	0,05 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,08 ± 0,06
48.00	0,31 ± 0,05	0,02 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,03 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,26 ± 0,03	0,03 ± 2 x 10 ^{-3*}	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,02 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,08 ± 0,02
120.00	0,26 ± 0,03	0,07 ± 0,12	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,07	0,33 ± 0,06	0,02 ± 4 x 10 ^{-3*}	0,03 ± 5 x 10 ^{-3*}	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01

TABELA 5 - Porcentagem de Radioatividade no sangue de ratos Wistar: injeção endovenosa de heparina-⁵¹Cr.

Tempo (h)	Porcentagem/ml
0,05	1,60 ± 0,33
0,08	1,71 ± 0,33
0,16	0,66 ± 0,07
0,33	0,44 ± 0,06
0,50	0,24 ± 0,05
0,66	0,21 ± 0,02
0,83	0,11 ± 0,02
1,00	0,18 ± 0,05
1,50	0,22 ± 0,05
2,00	0,21 ± 0,03
3,00	0,15 ± 0,05
6,00	0,09 ± 0,02
17,00	0,03 ± 5,15 x 10 ⁻³ (*)
24,00	0,06 ± 0,01

(*) Os dados apresentados nessa forma visam dar maior precisão nos resultados numéricos.

TABELA 6 - Porcentagem de Radioatividade no sangue de ratos Wistar: injeção intraperitoneal de heparina-⁵¹Cr.

Tempo (h)	Porcentagem/ml
0,25	0,06 ± 0,04
0,50	0,11 ± 0,02
1,00	0,46 ± 0,24
2,00	0,92 ± 0,46
4,00	0,43 ± 0,06
6,00	0,06 ± 0,04
24,00	0,07 ± 0,02

TABELA 7 - Porcentagem de Radioatividade no plasma de ratos Wistar: injeção endovenosa de heparina-⁵¹Cr

Tempo (h)	Porcentagem/ml
0,05	3,65 ± 0,43
0,08	2,87 ± 0,45
0,16	1,21 ± 0,14
0,33	0,79 ± 0,12
0,50	0,42 ± 0,08
0,66	0,36 ± 0,03
0,83	0,16 ± 0,02
1,00	0,25 ± 0,07
1,50	0,36 ± 0,06
2,00	0,35 ± 0,05
3,00	0,22 ± 0,07
6,00	0,16 ± 0,05
17,00	0,05 ± 0,01
24,00	0,10 ± 0,01

TABELA 8 - Porcentagem de Radioatividade no plasma de ratos Wistar: injeção intraperitoneal de heparina-⁵¹Cr

Tempo (h)	Porcentagem/ml
0,25	0,11 ± 0,06
0,50	0,18 ± 0,03
1,00	1,35 ± 0,60
2,00	0,83 ± 0,55
4,00	1,13 ± 0,61
6,00	0,12 ± 0,07
24,00	0,13 ± 0,04

V.4.1 - Estimativa dos parâmetros

O programa empregado no computador nos permitiu conhecer os valores de A_1 e A_2 , (termos exponenciais para $t=0$) e os valores dos coeficientes exponenciais b_1 e b_2 ; a estatística descritiva correspondente, apresenta o valor do desvio padrão e intervalos de confiança:

Parâmetros	Valor estimado	Desvio Padrão	Intervalo de confiança 95%	
			limite inferior	limite superior
A_1	0,39	0,05	0,29	0,49
A_2	5,68	0,28	5,12	6,24
b_1	0,14	0,06	0,01	0,26
b_2	11,00	0,78	9,45	12,54

Substituindo-se os valores descritos acima na equação (§) temos:

$$P(t) = 0,39 e^{-0,14t} + 5,68 e^{-11,00t}$$

V.4.2 - Análise da Variância:

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio
Modelo	4	143,07	35,77
Resíduo	80	3,10	0,04
Total não corrigido	84	146,17	
Total corrigido	83	95,33	

V.4.3 - Cálculo do T/2 de cada exponencial

Com os dados obtidos na equação (§) podemos calcular o T/2 de cada exponencial ou seja, o tempo necessário para que a porcentagem da radioatividade contida no plasma seja reduzido à metade.

$$\begin{aligned} T/2 &= \ln 2 / b_1 \\ T/2 &= 0,693 / 0,14 = 5,09 \text{ horas} \\ T'/2 &= \ln 2 / b_2 \\ T'/2 &= 0,693 / 11,00 = 0,06 \text{ horas} \end{aligned}$$

V.4.4 - Cálculo do Volume de Distribuição Aparente

Na equação (§) fazendo-se t igual a zero obtem-se a concentração no instante inicial $P(0) = A_1 + A_2$.

$$P(0) = 0,39 + 5,68 = 6,07\% / \text{ml de plasma.}$$

Se a quantidade injetada correspondeu a 100% da dose temos:

$$V_d = \frac{100}{6,07} = 16,47 \text{ ml}^{(45)}$$

V.5 - Cálculo do Coeficiente de Depuração Renal

O coeficiente médio de depuração renal, calculado conforme foi exposto em II.4, a partir dos dados experimentais da excreção urinária acumulada (Tabela 10) e os dados da curva plasmática ajustada (Tabela 9), é representado pela fórmula:

$$\bar{k} = \frac{\sum_{i=1}^n k_i}{n}$$

Coeficiente médio de Depuração Renal $\bar{k} = 0,12 \pm 0,02h^{-1}$

TABELA 9 - Dados da curva plasmática ajustada pelo programa SAS-76

Tempo (h)	% de radioatividade/ml de plasma	
	observado	calculado
0,05	3,65	3,48
0,08	2,87	2,52
0,16	1,21	1,14
0,33	0,79	0,38
0,50	0,42	0,27
0,66	0,36	0,26
0,83	0,16	0,25
1,00	0,25	0,25
1,50	0,36	0,24
2,00	0,35	0,23
3,00	0,22	0,21
6,00	0,16	0,17
17,00	0,05	0,07
24,00	0,10	0,04

TABELA 10 - Coeficientes de depuração renal calculados

Tempo (h)	% de dose na excreção urinária acumulada	coeficiente de depuração renal k_j (h^{-1})
18	3,95	0,08
42	4,57	0,08
66	5,04	0,09
90	5,39	0,10
162	6,06	0,11
186	6,33	0,11
210	6,64	0,12
234	6,84	0,12
258	7,03	0,13
330	7,42	0,13
354	7,59	0,14
378	7,72	0,14
402	7,93	0,14
450	8,13	0,15

V.6 - Cálculo do Fluxo Renal ("Clearance" renal) Fr .

Conhecendo-se o Coeficiente Médio de Depuração Renal e o Volume de Distribuição Aparente podemos calcular o Fluxo Renal Fr .

$$Fr = k \times V_d$$

$$Fr = 0,12 \text{ h}^{-1} \times 16,50 \text{ ml} = 1,93 \text{ ml/h}$$

V.7 - Cálculo da Meia-vida biológica $T_{biol./2}$

Com dados obtidos nas medidas de radioatividade no corpo inteiro e excreções urinárias (Tabelas 11 e 12) calcula-se a Meia-vida biológica.

$$T_{biol./2} = \ln 2 / b$$

b foi calculada conforme indicado no item II.6, obtendo-se:

a) Estimativa dos parâmetros

Parâmetro	Valor estimado	Desvio Padrão	t para H_0 parâmetro = 0	PR > t
$\ln A$	4,55	4×10^{-3}	1130,35	0,0001
b	$1,45 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-5}$	9,15	0,0001

b) Análise da Variância

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PR > F
modelo	1	0,02856	0,0286	83,78	0,001
resíduo	81	0,02762	0,0003		
total (corrigido)	82	0,05620			

Coeficiente de correlação múltipla: $R^2 = 0,508$

Para a Meia-vida biológica teremos:

$$T_{\text{biol.}/2} = \ln 2/b$$

$$T_{\text{biol.}/2} = 0,693/1,45 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$$

$$T_{\text{biol.}/2} = 4779 \text{ h} \sim 199 \text{ dias}$$

V.8 - Cálculo da Taxa de Renovação ("turnover rate") Tr

$$Tr = b = 1,45 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$$

V.9 - Cálculo do Tempo Médio de Permanência ou Tempo de Renovação Tm ("Mean time" ou "turnover time")

$$Tm = 1/b = 1/1,45 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$$

$$Tm = 6895,5 \text{ h} \sim 287 \text{ dias}$$

V.10 - Modelo Compartimental da heparina-⁵¹Cr após injeção endovenosa em ratos Wistar

A partir dos dados da amostragem plasmática, urinária e contagens de corpo inteiro, bem como de órgãos de importância no metabolismo da heparina, por exemplo o baço e o fígado, pudemos esquematizar um modelo compartimental (Figura 4) que se adequou aos dados biológicos e numéricos correlatos.

TABELA 11 - Porcentagem de Radioatividade nas urinas e fezes de ratos Wistar após injeção endovenosa de heparina-⁵¹Cr.

Tempo(h)	Urina total	Urina/ml	Fezes totais	Fezes/g
18	3,71 ± 1,08	0,58 ± 0,32	0,64 ± 0,47	0,27 ± 0,28
42	0,54 ± 0,15	0,08 ± 0,03	0,34 ± 0,22	0,10 ± 0,09
66	0,42 ± 0,30	0,05 ± 0,02	0,25 ± 0,13	0,05 ± 0,03
90	0,27 ± 0,13	0,04 ± 0,04	0,19 ± 0,13	0,03 ± 0,02
162	0,55 ± 0,15	0,03 ± 0,03	0,31 ± 0,12	0,03 ± 0,01
186	0,22 ± 0,11	0,03 ± 0,02	0,19 ± 0,14	0,03 ± 0,01
210	0,27 ± 0,18	0,03 ± 0,02	0,17 ± 0,10	0,02 ± 0,01
234	0,31 ± 0,36	0,06 ± 0,09	0,15 ± 0,06	0,02 ± 0,01
258	0,14 ± 0,08	0,05 ± 0,08	0,21 ± 0,20	0,02 ± 0,02
330	0,39 ± 0,11	0,02 ± 0,01	0,59 ± 0,77	0,05 ± 0,06
354	0,17 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,09	0,02 ± 0,01
378	0,18 ± 0,10	0,03 ± 0,02	0,29 ± 0,33	0,02 ± 0,01
402	0,15 ± 0,13	0,03 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,01 ± 5,58 x 10 ⁻³ *
426	0,13 ± 0,11	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,01 ± 6,26 x 10 ⁻³ *

* Os dados apresentados nessa forma visam dar maior precisão nos resultados numéricos.

TABELA 12 - Porcentagem de Radioatividade no corpo inteiro de ratos Wistar após injeção endovenosa de hepari - na-⁵¹Cr.

Tempo (h)	Porcentagem
24	95,26 ± 1,51
48	94,05 ± 0,80
72	93,31 ± 1,43
168	92,84 ± 1,93
192	91,95 ± 1,62
216	92,24 ± 1,70
240	91,93 ± 2,82
264	91,08 ± 1,74
336	90,70 ± 1,62
360	89,36 ± 1,55
384	89,96 ± 1,27
408	89,50 ± 1,79
432	88,69 ± 2,39

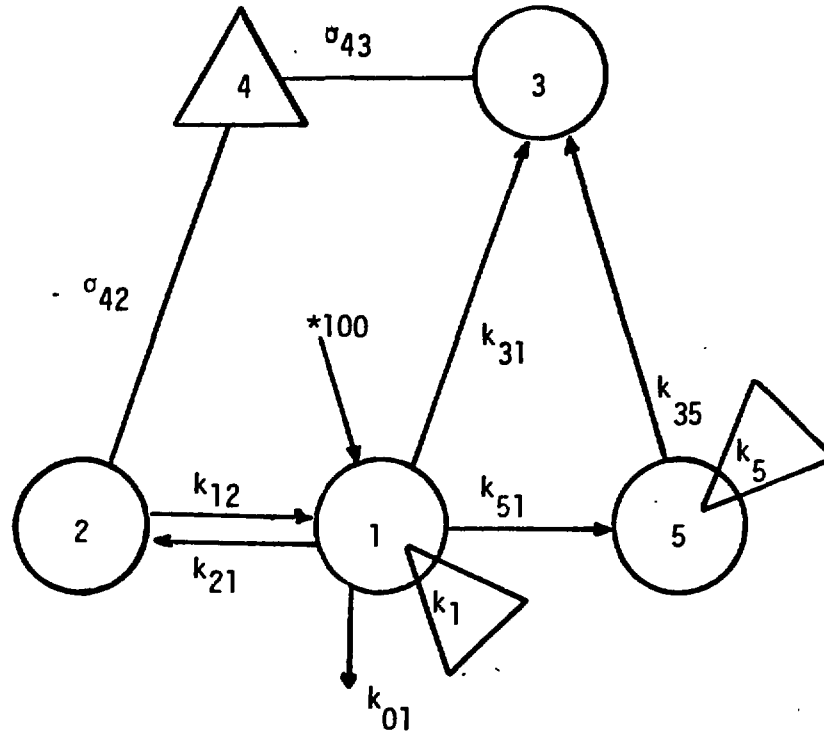


Figura 4 - Esquema do modelo compartimental escolhido

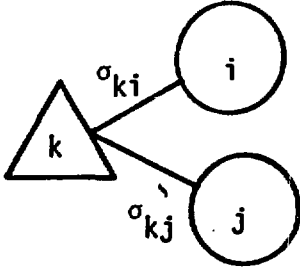
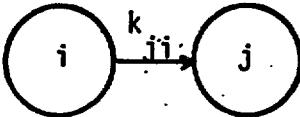
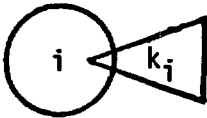
Descrição dos símbolos

<u>Elemento</u>	<u>Descrição</u>	<u>Símbolos</u>
$f_i(t)$	atividade ou quantidade de substância marcada no i -ésimo compartimento	
$f_i(0)$	valor inicial da atividade	
σ_{ki}	coeficiente de soma	

-continua-

-continuação-

Descrição dos símbolos

<u>Elemento</u>	<u>Descrição</u>	<u>Símbolos</u>
$q_k(t) = \sigma_{kj} f_j + \sigma_{ki} f_i$	somador: função de um ou mais f_i	
k_{ji}	coeficiente de transferência	
k_i	coeficiente de proporcionalidade $q_i(t) = k_i f_i(t)$	

Círculo 1 - compartimento plasmático

Círculo 2 e 3 - compartimentos extraplasmáticos

Círculo 5 - heparina contida no baço

Triângulo 1 - dados experimentais da heparina contida no plasma, expressos em porcentagem de dose por mililitro.

$$q_1(t) = k_1 f_1(t) \text{ com } q_1 = (\% \text{ de dose/ml})$$

$$f_1 = (\% \text{ de dose})$$

$$k_1 = 0,06067 \text{ ml}^{-1}$$

Triângulo 4 - dados experimentais de heparina contida no plasma e expressos em porcentagens de dose aplicada e obtidos pela subtração entre a curva ajustada para o corpo inteiro e os dados do plasma e baço.

$$q_4(t) = \sigma_{42}f_2(t) + \sigma_{43}f_3(t)$$

Triângulo 5 - dados experimentais da heparina contida no baço e expressos em porcentagem de dose.

$$q_5(t) = k_5f_5(t) \quad \text{com } k_5 = 1$$

Com o emprego do código SAAM 25 determinamos o valor numérico dos coeficientes de transferência, tendo sido escolhido um modelo baseado no conhecimento da evolução da heparina- ^{51}Cr em determinados pontos do sistema biológico.

$$\begin{aligned} k_{12} &= 0,60 \pm 0,10 \text{ h}^{-1} \\ k_{21} &= 9,74 \pm 1,51 \text{ h}^{-1} \\ k_{31} &= 1,33 \pm 0,20 \text{ h}^{-1} \\ k_{51} &= 0,11 \pm 0,01 \text{ h}^{-1} \\ k_{35} &= 0,10 \pm 0,03 \text{ h}^{-1} \end{aligned}$$

Na Tabela 13 representamos a porcentagem de radioatividade nos compartimentos 1; 4 e 5 nos tempos em que se mediu o decréscimo da atividade de heparina- ^{51}Cr no plasma, até 24 horas.

TABELA 13 - Análise compartimental - Programa SAAM 25

legenda: c - calculado; o - observado

Tempo (h)	Porcentagem de Radioatividade		
	Compartimento 1	Compartimento 4	Compartimento 5
0,05	c - 3,48 o - 3,65	c - 45,39 o - 68,06	c - 0,43 o - 0,79
0,08	c - 2,52 o - 2,87	c - 62,19 o - 79,35	c - 0,59 o - 1,19
0,16	c - 1,14 o - 1,21	c - 86,29 o - 89,08	c - 0,84 o - 1,20
0,33	c - 0,38 o - 0,79	c - 99,38 o - 91,11	c - 1,02 o - 1,17
0,50	c - 0,27 o - 0,42	c - 100,96 o - 95,47	c - 1,10 o - 0,84
0,66	c - 0,26 o - 0,36	c - 101,00 o - 95,71	c - 1,16 o - 1,24
0,83	c - 0,25 o - 0,16	c - 100,85 o - 97,55	c - 1,22 o - 0,82
1,00	c - 0,25 o - 0,25	c - 100,67 o - 96,74	c - 1,28 o - 1,04
1,50	c - 0,24 o - 0,36	c - 100,16 o - 94,23	c - 1,44 o - 2,23
2,00	c - 0,23 o - 0,35	c - 99,67 o - 94,56	c - 1,58 o - 2,20
3,00	c - 0,21 o - 0,22	c - 98,79 o - 95,70	c - 1,82 o - 2,09
6,00	c - 0,17 o - 0,16	c - 96,70 o - 95,86	c - 2,24 o - 2,24
17,00	c - 0,07 o - 0,05	c - 93,36 o - 95,00	c - 2,00 o - 2,35
24,00	c - 0,04 o - 0,10	c - 92,80 o - 95,01	c - 1,46 o - 1,31

C A P Í T U L O VI

DISCUSSÃO

A marcação de heparina com ^{51}Cr na forma de $^{51}\text{CrCl}_3$ foi procedida em meio alcoólico, no qual ambos os produtos são pouco solúveis, com a finalidade de manter a integridade da molécula marcada. Em solução aquosa, haveria a probabilidade de degradação da heparina, uma vez que a marcação é feita em pH ácido e temperatura de 80°C , condições que favorecem a perda de grupos sulfatos⁽¹⁰⁾.

VARGA e col.⁽⁵⁹⁾ admitem a possibilidade de complexação do crômio com a heparina devido aos grupos $-\text{OH}$ do mucopolissacarídeo.

A percolação do produto marcado por coluna de Sephadex G-50 fino (peneira molecular), apresentou uma boa separação, eliminando a presença de possíveis degradações de cadeia polissacarídea sob forma de subprodutos de cadeia menor, além de retirar satisfatoriamente o crômio não complexado à molécula de heparina. A necessidade da eliminação do crômio livre sob forma de $\text{EDTA-}^{51}\text{Cr}$ se prende ao fato de que o CrCl_3 se liga fortemente ao Sephadex durante a eluição, o que impossibilitaria futuras utilizações do material filtrante⁽⁵⁹⁾.

VARGA e col. afirmam não haver diminuição da potência anticoagulante nem degradações até quatro semanas após a marcação da heparina, quando o produto é mantido em temperatu

ra ambiente. Para efeito de maior segurança na utilização do produto marcado, procuramos conservar a heparina-⁵¹Cr em geladeira a 5°C e em pH 7. Em nossos experimentos o tempo máximo de emprego da heparina-⁵¹Cr foi de 15 dias a partir da data de preparação. As provas cromatográficas nesse período, não apresentaram níveis de degradação de forma a tornar o produto impróprio para os ensaios biológicos.

Várias amostras de ⁵¹CrCl₃ com atividade específica de 23 a 109,3 mCi/mgCr foram usadas para as preparações de heparina-⁵¹Cr. O rendimento de marcação da heparina ficou em redor de 70% em todos os casos.

As doses escolhidas neste trabalho (≈100 Unidades), para serem injetadas nos animais, foram altas quando comparadas às doses terapêuticas usuais⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾; entretanto, outros pesquisadores usaram doses bem superiores àquelas por nós utilizadas⁽²⁷⁾. Finalmente nenhum animal injetado demonstrou sinais de intoxicação ou efeitos indesejáveis com as doses administradas em nossos experimentos.

A distribuição biológica da heparina-⁵¹Cr nos diferentes órgãos e tecidos apresentou o seguinte quadro:

1) Via endovenosa:

Os níveis de heparina observados no sangue e plasma demonstram que o plasma é o responsável pela maior captação e transporte do fármaco.

Quanto aos órgãos, aqueles com maior número de células mastocitárias, mostram captar mais heparina, o que já foi

previsto por diversos autores (7)(32)(46)(55).

O baço e o fígado são órgãos representativos na captação de heparina, o segundo contendo maior parte da droga 168 horas após sua introdução no organismo. Esse fato é explicável, pois o sangue que sai do baço vai diretamente ao fígado e os processos catabólicos que começam no baço, frequentemente vão terminar no fígado ~~(56)~~ (56A) SCHURRER observou que os mastócitos aumentavam de tamanho e número após administração parenteral de heparina (32); WILSON provou que os macrófagos do baço podem alcançar o fígado e lá permanecerem (65).

A heparina, passível de formar associações com proteínas plasmáticas é vista por diversos autores como uma molécula de tamanho grande nessa forma associada e aparentando uma partícula coloidal; por isso, as associações moleculares dessa natureza seriam fagocitadas pelas células do sistema retículo endotelial (18)(19)(21).

As tabelas de captação de heparina-⁵¹Cr mostram que os diversos órgãos e tecidos têm no princípio uma captação mais alta que cai gradativamente até os 90 minutos, para começar a subir lentamente. No começo, a radioatividade dos órgãos e tecidos estaria acrescida da heparina plasmática existente no material contado, caindo quando os níveis plasmáticos diminuem e mais adiante sendo armazenadas pelas células dos tecidos orgânicos.

Quanto ao efeito deletério que eventualmente poderia causar a radiação gama do ⁵¹Cr nas células dos órgãos que armazenam heparina, temos a ressaltar que as células de KUPFER e os mastócitos são unidades mais resistentes à radiação do que outras do tecido conectivo (5)(32).

2) Via intraperitoneal

Após a injeção de heparina por via intraperitoneal, há naturalmente um período de absorção local com aumento gradativo de níveis de heparina no sangue e plasma; após esse período (2 horas) há tendência normal em ser distribuída pelos órgãos e tecidos.

Uma observação a ser feita é a grande porcentagem de radioatividade captada pelo pâncreas dos ratos injetados via intraperitoneal, quando comparada com a captação em ratos injetados por via endovenosa. Esse fato se explica em termos de captação pelas membranas mesentéricas, ricas em mastócitos e que acompanham o pâncreas na retirada deste. A vizinhança do local de aplicação da heparina (intraperitoneal) facilita essa captação mesentérica⁽³²⁾.

Os níveis de heparina do plasma até 24 horas após injeção endovenosa, e representados pela curva de decaimento plasmático, dão como resultado a soma de duas exponenciais, o que nos permite supor a existência de dois compartimentos⁽⁵³⁾: o plasmático e extraplasmático. No início, a heparina sai do plasma com velocidade maior e portanto $T/2$ bastante curto (0,06h) para depois abandonar o plasma mais lentamente ($T/2$ de 5,09h).

Na análise da variância em V.4.2, observamos que a soma dos quadrados do modelo e a soma dos quadrados do resíduo são nitidamente diferentes o que indica ajuste satisfatório da curva representada na Figura 3⁽¹⁵⁾.

Com os dados da curva de decaimento plasmático, cal

culou-se outro parâmetro farmacocinético de importância: o Volume de Distribuição Aparente, cujo valor de 16,50 ml, considerado para a dose de heparina injetada via endovenosa, é superior ao volume plasmático de um rato normal de 280 g (cerca de 8,5 ml); isso significa que já no instante zero a heparina passa para um compartimento extraplasmático. Esse dado está de acordo com os trabalhos de alguns autores que mostram a habilidade da heparina em atravessar membranas endoteliais e ganhar acesso ao compartimento extravascular⁽¹⁸⁾.

Autores afirmam que o T/2 de decaimento plasmático para a heparina injetada endovenosamente depende da dose administrada⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽⁴⁸⁾. Nos nossos experimentos de determinação de níveis plasmáticos de heparina, mantivemos uma dose determinada e os dados referem-se a essa dose apenas.

As medidas de radioatividade observadas nas excreções urinárias e fecais, mostram que nas primeiras 24 horas após a injeção endovenosa de heparina em ratos, a eliminação é maior por via urinária mantendo-se depois em níveis baixos até 426 horas. Estes resultados concordam com aqueles de PIPER⁽⁵²⁾ em urinas de coelhos injetados com heparina, em que o método de avaliação foi o biológico de coagulação sanguínea. EIBER e col.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾ e DANIEFSKY⁽¹⁴⁾ detectaram também heparina em urinas de animais (cães) e de pacientes, afirmando tratar-se de produto não degradado. As provas histológicas realizadas por WILANDER⁽⁶⁴⁾ em rins de ratos, mostraram que parte da heparina é eliminada por esse órgão, que se apresenta com muitas granulações contendo heparina, após injeção endovenosa da droga.

A suposição de que a saída da heparina seja feita

a partir do compartimento plasmático é fisiologicamente razoável e permite a determinação de uma constante de eliminação a partir da curva experimental de decaimento plasmático e dados de eliminação urinária. Com isso, tem-se um coeficiente médio de depuração, que no caso da heparina em ratos apresenta um valor pequeno; a "clearance" renal também, calculada com esses valores obtidos, é pequena. Quanto ao tipo de excreção verificada, acreditam alguns autores⁽¹⁸⁾⁽⁵²⁾ tratar-se de uma droga com eliminação tubular e filtração glomerular combinadas.

As fezes apresentaram pouca radioatividade, mas nas primeiras 24 horas a porcentagem eliminada é maior que em tempos posteriores. KULKARNI e col.⁽³⁷⁾ detectaram heparina em bile de cães.

Os dados referentes à medida de radioatividade no corpo inteiro dos animais até 432 horas após injeção endovenosa de heparina-⁵¹Cr, permitiram informações sobre a radioatividade em todo o organismo animal, mesmo nos tecidos de sistema retículo endotelial que não puderam ser avaliados individualmente, como o caso da medula óssea.

Os resíduos de corpo inteiro após 168 horas da injeção endovenosa de heparina-⁵¹Cr revelaram 92,84% da droga presente no organismo animal, sendo que o fígado, nesse instante, captou 84,19%.

As contagens de radioatividade no corpo inteiro foram submetidas a análise estatística para verificação da validade dos dados obtidos.

O gráfico nº5 representando os resíduos versus tem-

po, nos dá idéia de que não há necessidade de inclusão de termos de maior grau que T (tempo).

O gráfico da Figura 6 representando logite dos resíduos versus resíduos, é praticamente uma reta, demonstrando que existe normalidade na distribuição dos resíduos. Resíduo = Normalidade $(0, \sigma^2)$ (15).

A homocedasticidade dos resíduos foi verificada no gráfico de resíduos versus valor calculado do logarítmo (Figura 7), sendo que por esse meio pudemos eliminar valores discrepantes (um dos ratos).

Finalmente, no gráfico representado na Figura 8 em que aparece o logarítmo da radioatividade no corpo inteiro, versus tempo, existe uma reta média passando entre as medidas verificadas.

A hipótese de que o corpo do animal seria considerado como um único compartimento biológico, havendo excreção por via urinária (as fezes contribuem muito pouco e podem ser desprezadas para efeito de cálculo), nos permite calcular a Meia-vida biológica, Taxa de Renovação e Tempo Médio de permanência no organismo. Os resultados obtidos com a aplicação do modelo Ae^{-bt} mostraram que a Meia-vida biológica é longa (199 dias) o que de certa forma é explicável pela considerada ausência de enzimas degradantes da heparina nas células animais e o conseqüente armazenamento no sistema retículo endotelial. Desse modo, observamos valores grandes para o Tempo Médio de permanência no organismo (287 dias).

A estatística descritiva referente à captação de he

parina por órgãos e tecidos, mostra que os desvios padrão das diversas médias dos dados obtidos após injeção por via endovenosa são menores que os respectivos desvios padrão da série injetada via intraperitoneal; esta via é considerada mais lenta e irregular⁽⁴⁹⁾.

A análise da Variância (item V.7) com referência ao modelo Ae^{-bt} foi feita pela aplicação do teste de Fischer (teste F) e deu como resultado que a probabilidade de um valor maior que F é de 0,0001 o que comprova ser o modelo significativo. O coeficiente de correlação múltipla $R^2 = 0,508$ significa que o modelo explica 50% dos dados⁽¹⁵⁾.

Na estimativa dos parâmetros, foi aplicado o teste t (Student).

t para H_0 , parâmetro = 0, significa o valor de t para o teste da hipótese da nulidade do parâmetro. Os valores encontrados na coluna referente a $PR > |t|$ representam a probabilidade de se obter um valor (em módulo) maior que t , ou seja, rejeitar a hipótese da nulidade do parâmetro. Valores muito pequenos para esta probabilidade indicam que os parâmetros são diferentes de zero e portanto contribuem significativamente para o modelo escolhido.

A escolha de um modelo compartimental foi baseada em estudos referentes ao comportamento biológico da heparina⁽¹⁰⁾⁽²¹⁾⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽⁶³⁾, nos dados obtidos nas captações de órgãos e medidas de corpo inteiro.

O compartimento de entrada da heparina-⁵¹Cr foi o plasma e considerando-se um período de tempo de até 24 horas, observa-se a tendência da droga em difundir-se para outro com

partimento extravascular; deste compartimento a heparina é retirada também pelo baço, que tende a encaminhá-la ao fígado (Figura nº9) onde permanece. O fígado, na representação do modelo compartimental, corresponde ao triângulo 4, conforme a Figura 4; neste triângulo foram incluídos os dados de corpo inteiro menos a soma dos dados do compartimento plasmático e do baço. Este artifício foi a forma encontrada para a obtenção de um bom ajuste nas curvas representativas (Figuras 10 e 11).

O resultado numérico dos coeficientes de transferência, nos permite a determinação de dois valores de trocas rápidas: compartimento 1 para 2 e compartimento 1 para 3. Eles representam o desaparecimento rápido da heparina do leito vascular dentro de 24 horas.

A estabilidade do ^{51}Cr do complexo heparina- ^{51}Cr "in vivo" parece condizer com os dados experimentais "in vitro" de VARGA e col. (59). Contudo, o metabolismo do crômio iônico Cr^{+6} ou Cr^{+3} foi estudado quantitativamente por KRAINZ e col. (36) e por VESEK e col. (61) resultando um quadro de captação orgânica e excreção urinária bem diferente daquele por nós apresentado com a heparina- ^{51}Cr . Isso nos deu argumentos para crer que a detecção da radiação emitida nas diversas etapas da pesquisa não poderia ser procedente do crômio iônico e sim de um complexo de crômio com a molécula polissacarídea.

A rápida excreção urinária e captações diferentes pelos órgãos e tecidos, do crômio inorgânico estão em desacordo com a longa permanência biológica do material marcado injetado nos ratos constituído por heparina- ^{51}Cr . Esta perma

nência demorada no organismo foi verificada também por PIPER⁽⁵²⁾ com métodos histológicos à base de colorações celulares (metacromasia).

Tendo sido nossa meta prioritária no programa experimental a realização de estudos farmacocinéticos de heparina, acreditamos ter dado uma contribuição no esclarecimento da metabolização da droga, considerando sua importância em terapêutica.

Pelo uso de um traçador radioativo, representado pelo ⁵¹Cr, de Meia-vida suficientemente longa, pudemos estabelecer, em parte, o esquema biológico de transformações metabólicas, necessário para que se chegue a esclarecer a totalidade dessas transformações para se alcançar o conhecimento dos mecanismos definitivos do comportamento da heparina nos organismos vivos.

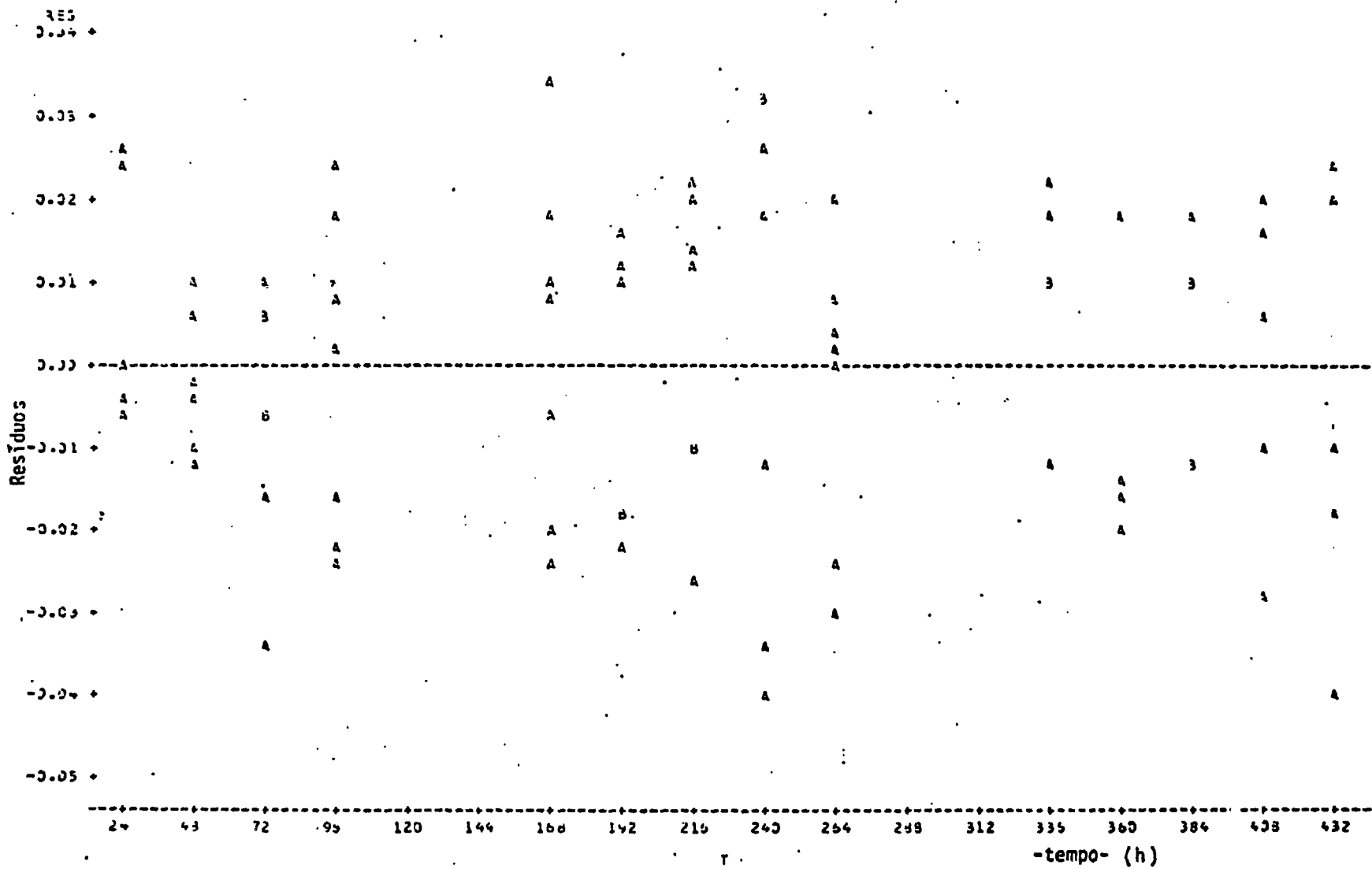


FIGURA 5 - Medidas de Radioatividade no Corpo inteiro de Ratos Wistar
Análise estatística, Resíduos x Tempo

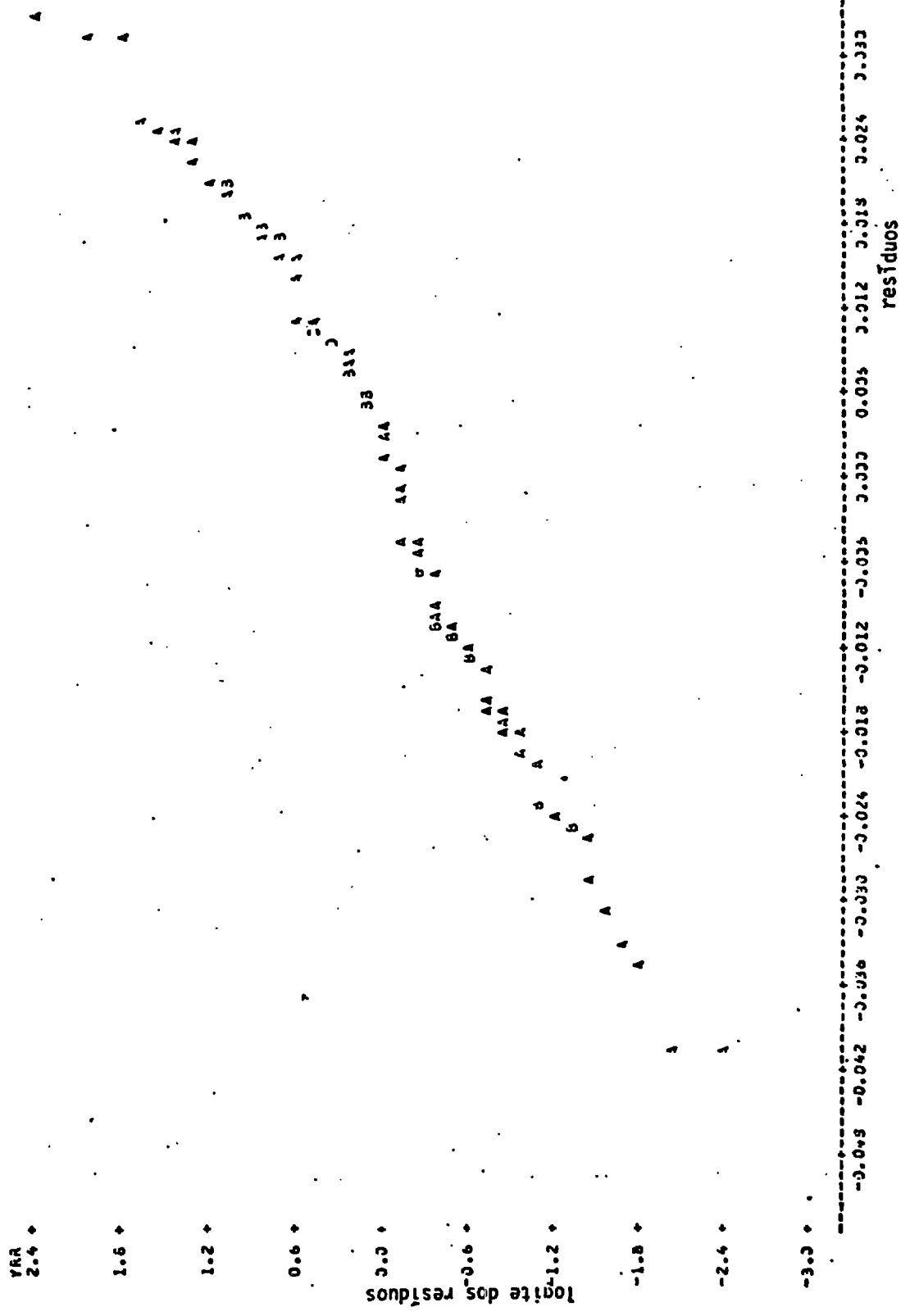


FIGURA 6 - Medidas de Radioatividade no corpo inteiro de ratos Wistar.
Análise estatística

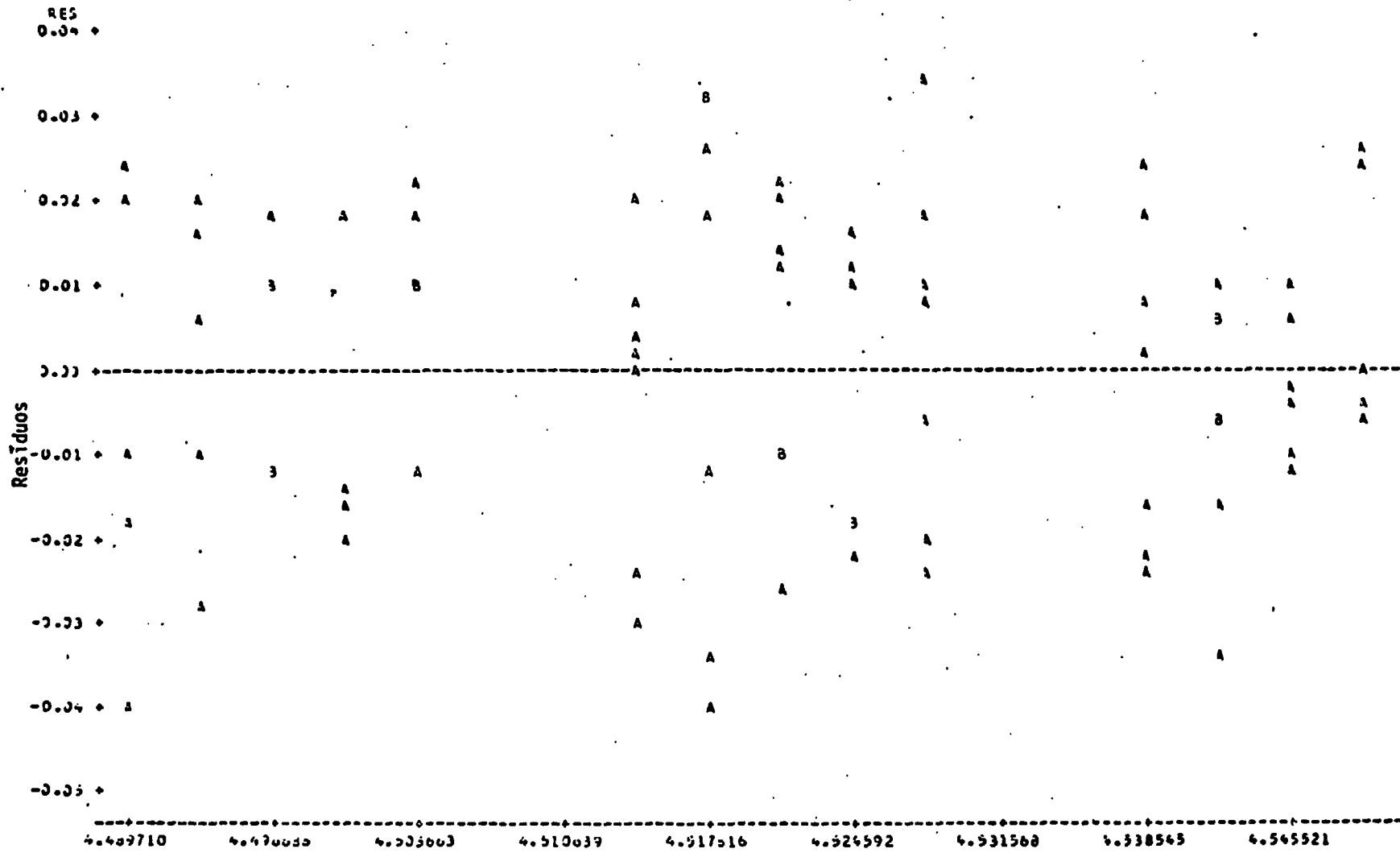


FIGURA 7 - Medidas de Radioatividade no Corpo Inteiro de ratos Wistar
 Análise estatística, Resíduos X valor calculado do log. de Corpo Inteiro

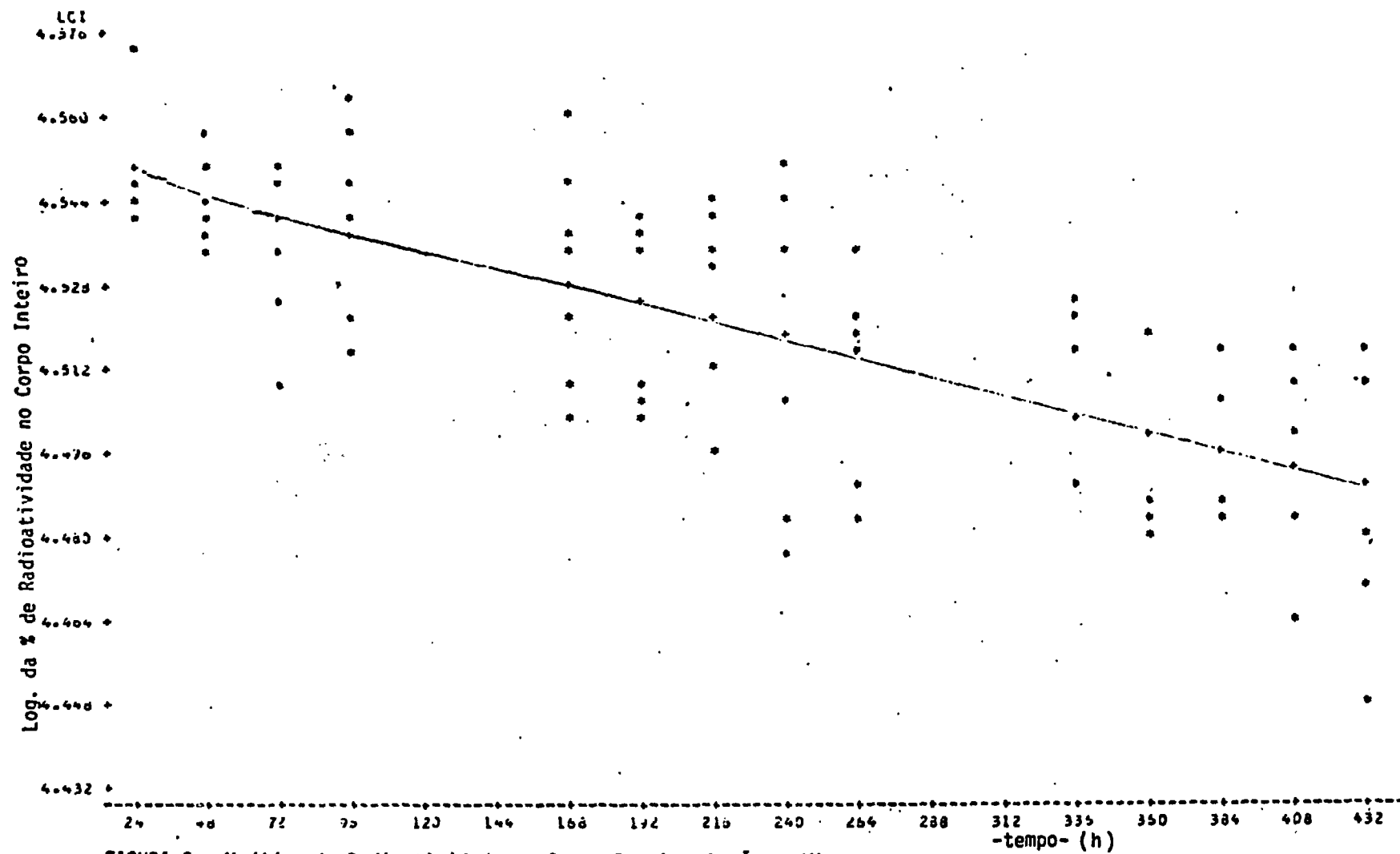


FIGURA 8 - Medidas de Radioatividade no Corpo Inteiro de ratos Wistar.
Análise estatística.

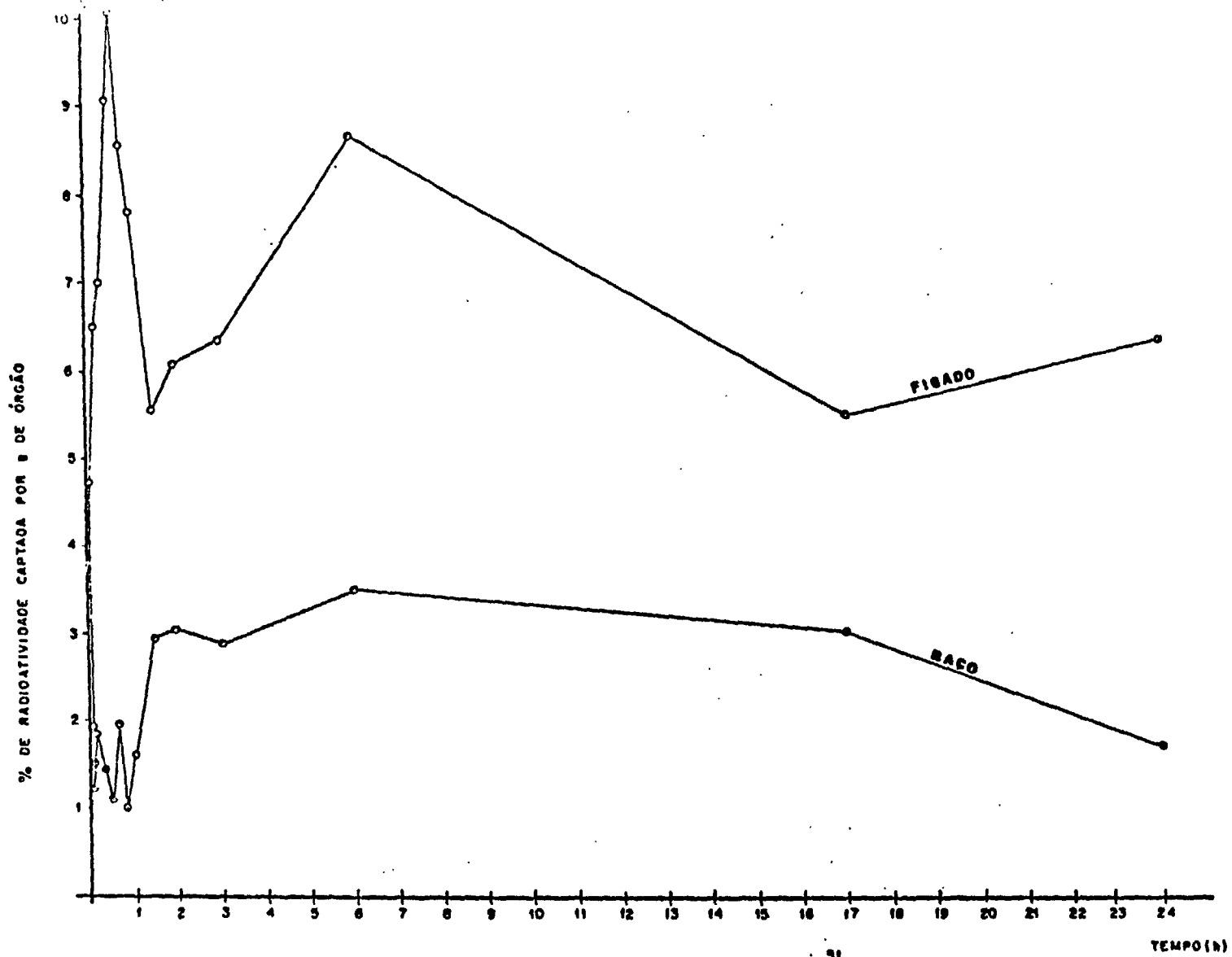
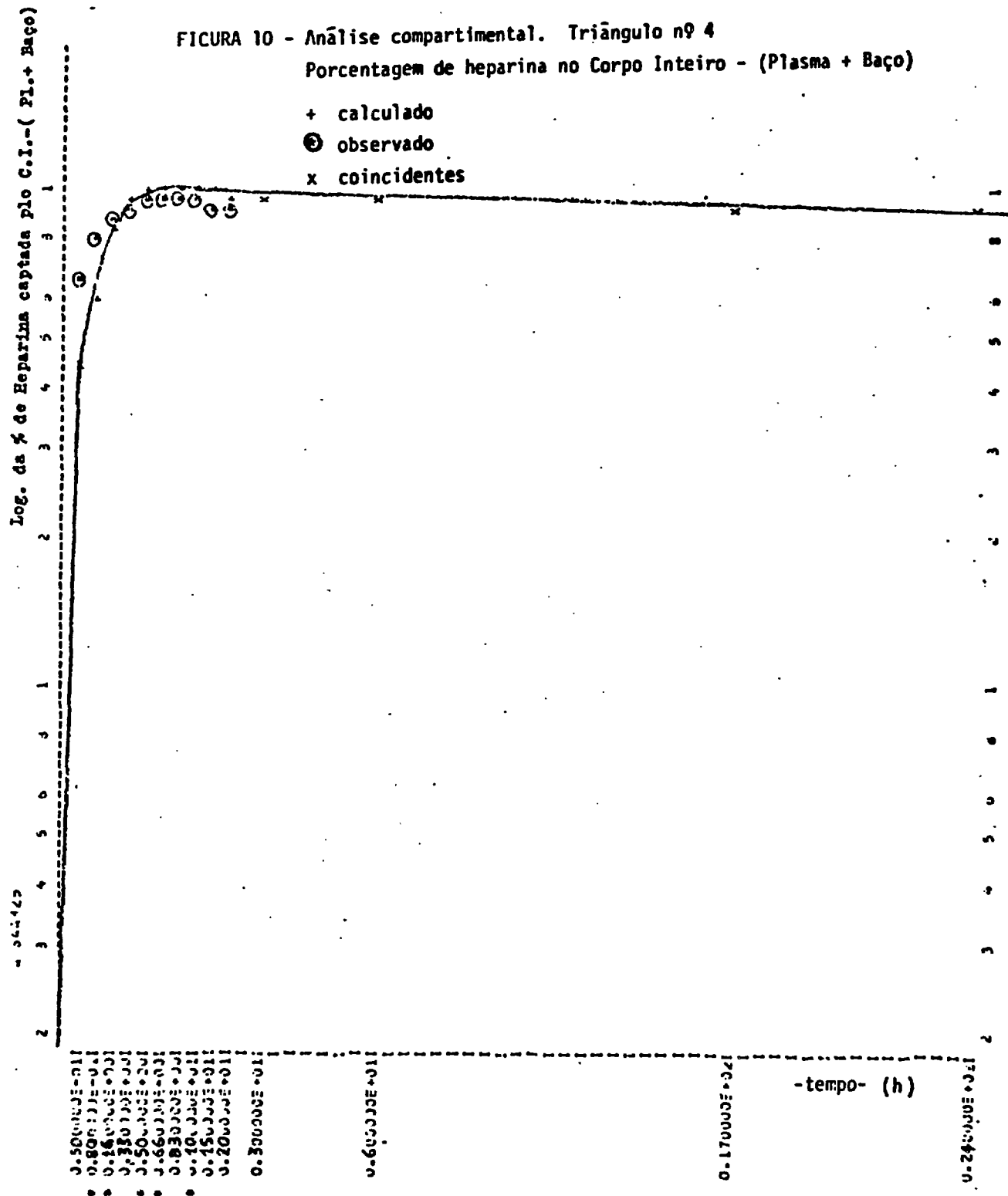
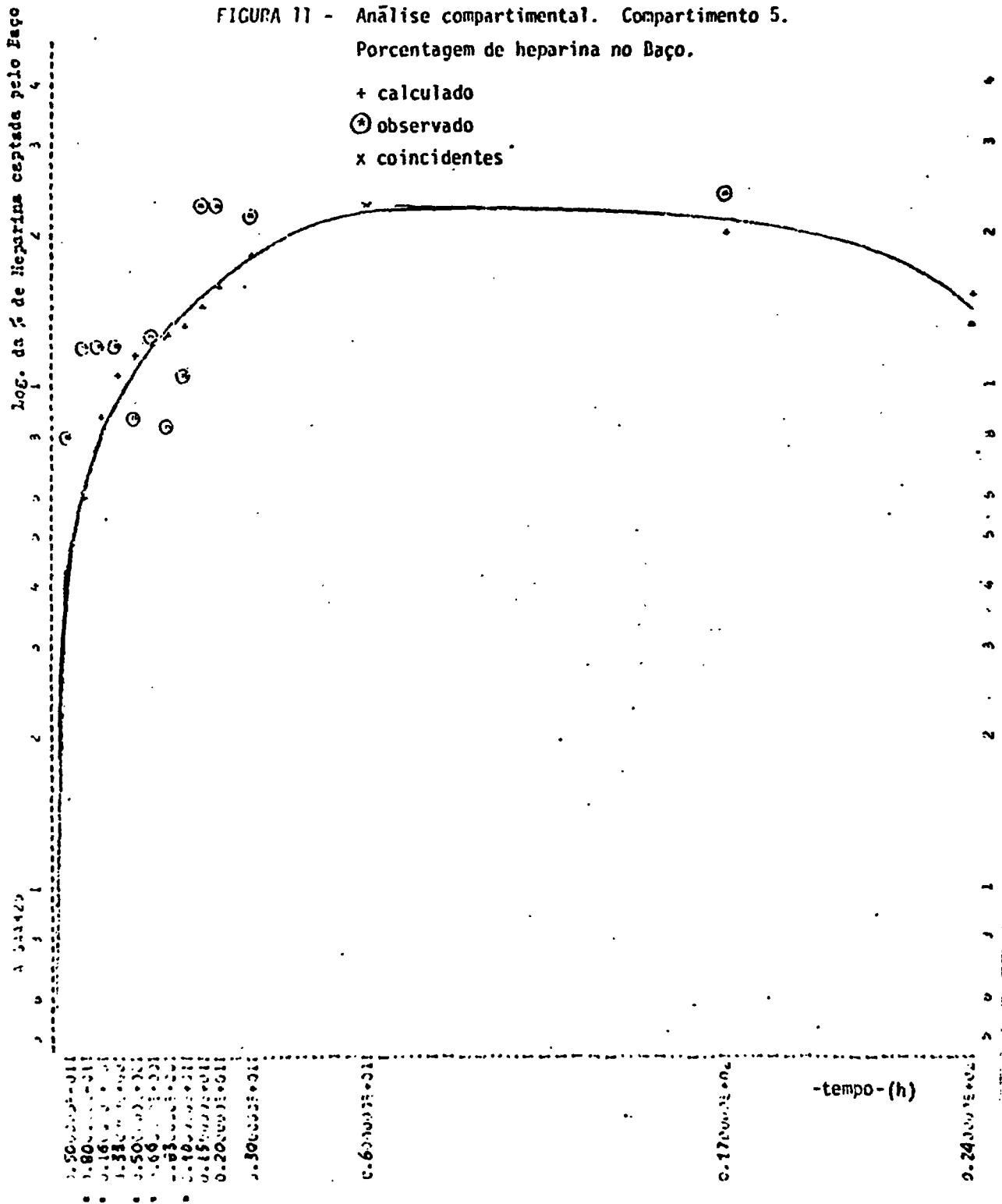


FIGURA 9 - CURVAS REPRESENTATIVAS DA EVOLUÇÃO DA HEPARINA-⁵¹Cr NO FÍGADO E BAÇO, INJEÇÃO ENDOVENOSA.





C A P Í T U L O V I I

CONCLUSÕES

- 1 - A marcação da heparina com ^{51}Cr resultou num composto com as características fisiológicas da heparina e permitiu a obtenção de dados farmacocinéticos desse importante mucopolissacarídeo.
- 2 - A distribuição biológica da heparina- ^{51}Cr por via endovenosa ou intraperitoneal em ratos Wistar, revelou que os órgãos mais ricos em células do sistema retículo-endotelial (baço e fígado) são os que captam maior porcentagem de heparina.
- 3 - Por via intraperitoneal, a vizinhança das membranas mesentéricas faz com que a captação pancreática seja grande, pois a captação é na realidade feita pelas membranas mesentéricas, ricas em mastócitos que acompanham o pâncreas do rato na retirada do mesmo.
- 4 - A curva de decaimento plasmático é biexponencial, comportando dois compartimentos: o plasmático e o extraplasmático; no princípio a heparina deixa o plasma com T/2 bastante curto e depois de 1 hora passa a abandonar o plasma com T/2 maior.

- 5 - O cálculo do Volume de Distribuição Aparente leva-nos a concluir que já no instante zero a heparina passa para um compartimento extravascular, pois o volume de 16,5 ml é superior ao volume plasmático dos ratos.
- 6 - A eliminação de heparina via urinária é maior nas primeiras 24 horas, caindo para níveis baixos até 432 horas.
- 7 - A eliminação fecal é pequena, embora um pouco maior nas primeiras 24 horas, mostrando que essa via é pouco representativa na eliminação da heparina.
- 8 - O coeficiente de depuração renal é pequeno e o fluxo renal (clearance) igualmente pequeno.
- 9 - A Meia-vida biológica da heparina é longa e conseqüentemente a taxa de renovação é curta; o tempo médio de permanência no organismo é longo.
- 10 - O modelo compartimental escolhido, compreendendo um período de 24 horas, deu como resultado após a entrada de heparina no compartimento plasmático, um rápido encaminhamento para o compartimento extraplasmático, com tendência a se armazenar no sistema retículo-endotelial representado pelo baço e fígado, este último armazenando até 84,19% da droga após 168 horas.

- 11 - O modelo matemático escolhido para a análise compartimental, apresentou bom ajuste, havendo satisfatória concordância dos pontos da curva calculada com os da curva experimental.

- 12 - Os coeficientes de troca calculados para o encaminhamento da heparina de um compartimento a outro, revelam que os coeficientes do compartimento 1 para 3 e 1 para 2 são de troca rápida enquanto os demais são de troca lenta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ALTMAN, P.; DITTMER, D. - editores. Blood and other body fluids. Washington, D.C., Dittmer, 1961.
- 2 - ARIENS, E. & SIMONIS, A. - Analysis of the action of drugs and drug combination. In: DE JONGE, H. Quantitative methods in pharmacology. Amsterdam, North Holland , 1961. p.286-311.
- 3 - BARLOW, G. & CARDINAL, E. - Proc.Soc.exp.Biol.Med., 123: 831, 1966 apud VARGA, L.; ANTONIO, F.; SKALKA, M.; ZEDGNIDZE, I. In vitro labelling of heparin with ⁵¹Cr . Int.J.appl.Radioat.Isotopes, 22:165-169, 1971.
- 4 - BARR, A.; GOODNIGHT, J.; SALL, J.; HELVY, J. - A user guide to SAS-76. Raleigh, North Carolina 27605, 1976 (SAS Institute Inc.).
- 5 - BENACERRAF, B. - Influence of irradiation on resistance to infection. Bact.Rev., 24:35, 1960.
- 6 - BERMAN, M. & WEISS, C. - User Manual for SAAM-Version SAAM-25. Bethesda, Maryland. Laboratory of Theoretical Biology, ^{ional} National Cancer Institute, National Institute of Health, 1974.
- 7 - BESSIS, M. - Traité de cytologie sanguine. Paris, Masson, 1954. p.501-5.
- 8 - BEST, C. & TAYLOR, N. - The physiological basis of medical practice. 8.ed., Baltimore, Md., Williams & Wilkins , 1966. p.586.

- 9 - BOZLER, von G.; HEINZEE, G.; KOSS, F.; WOLF, M. - Modellentwicklung in der Pharmacokinetik. Arzneimittel-Forsch., 27 (4A):897-900, 1977.
- 10 - BRIMACOMBE, J. & WEBBER, J. - Mucopolysaccharides. v. 6, Amsterdam, Elsevier, 1964. p.92-135.
- 11 - BROWNELL, G.; BERMAN, M.; ROBERTSON, J. - Nomenclature for Tracer Kinetics. Int.J.appl.R.Isotopes, 19:249 - 262, 1968.
- 12 - CHARGAFF, E. & OLSEN, K. - J.biol.Chem., 122, 153, 1937 apud BRIMACOMBE, J. & WEBBER, J. Mucopolysaccharides. v.6, Amsterdam, Elsevier, 1964. p.92-135.
- 13 - COHEN, Y. - Transport function of the blood. Pharmacological studies using radioisotopes. J.Nucl.Biol.Med., 12:26-34, 1968.
- 14 - DANIEFSKY, I. & EIBER, H. - Studies on the metabolism of heparin. Archs.Biochem.Biophys: N.York, 85:53-61 , 1959.
- 15 - DRAPER, N. & SMITH, H. - Applied regression analysis. N. York, N.Y., Willey, 1966.
- 16 - EIBER, H. & DANIEFSKY, I. - Fate of injected heparin . Trans.Am.Soc.artif.internal Organs, 4:152-6, 1958.
- 17 - EIBER, H.; DANIEFSKY, I., BERRELLI, J. - Studies made with Radioactive Heparin in humans. Angiology, 11:40-3 , 1960.
- 18 - ESTES, J.; PELIKAN, E.; KRÜGER-THIEMER, E. - A retrospective study of the pharmacokinetics of heparin. Clin.Pharmac. Ther., 10(3):329-37, 1969.

- 19 - ESTES, J. - The kinetics of heparin. Ann.N.Y.Acad.Sci., 179:187-204, 1971.
- 20 - ESTES, J. & POULIN, P. - Pharmacokinetics of heparin distribution and elimination. Thromb.Diath.haemorrh., 33:26-37, 1974.
- 21 - ESTES, J. - The fate of heparin in the body. Curr. ther. Res., 18(1):45-57, 1975.
- 22 - FORBES, G. - Nutritional applications of the whole body counter. Nutr.Rev., 21(11):321, 1963.
- 23 - GANONG, W. - Fisiologia médica. 2.ed., São Paulo, Atheneu, 1973. p.423.
- 24 - GARLICK, P. & WATERLOW, J. - Measurements of protein turnover in man with Nitrogen - 15. International Atomic Energy Agency. Modern trends in the biological applications of stable isotopes: technical committee meeting on modern trends in the biological applications of stable isotopes in Leipzig, 14-18, Feb. 1977. Vienna, 1977. p.323-33.
- 25 - GOUVEIA, A.S. - Estudo da cinética de sistemas multicompartimentalizados com traçadores radioativos. São Paulo, 1976 (Dissertação de Mestrado. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo).
- 26 - HAMERMAN, D. - Staining Methods in chromatography of Acidic and Neutral Mucopolysaccharides. Science (New York), 122:924-5, 1955.
- 27 - HARRIS, P. & HARRIS, K. - Kinetics of heparin removal from circulation of the minipig. Journ.Pharm.Sciences, 63(1):138-9, 1974.
- 28 - HEPLER, O. - Manual prático de análises clínicas. Barcelona, Labor, 1965. p.50.

- 29 - HIRTZ, J. - Quelques notions fondamentales en pharmacocinétique. La nouvelle Presse Médicale, 6(27):2431-5, 1977.
- 30 - HOCH, H. & CHANUTIN, A. - Effects of Anticoagulants on Serum and Plasma. J.biol.Chem., 197:503, 1952.
- 31 - KANAVAGH, L. & JACQUES, L. - Comparison of Analytical Values for Commercial Heparin. Arzneimittel-Forsch., 23:605-11, 1973.
- 32 - KELSALL, M. & CRAB, E. - Lymphocytes and mast cells. Baltimore, Williams & Wilkins, 1959, p.56.
- 33 - KISS, J. - Chemistry of heparin. Thromb.Diath.haemorrh., 33(1):20-5, 1974.
- 34 - KJELLÉN, L.; OLDBERG, A.; RUBIN, K.; HÖÖK, M. - Binding of heparin and heparan sulphate to rat liver cells. Biochem.biophys.Res.Commun., 74(1):126-33, 1977.
- 35 - KOLLER, F. - The physiological function of heparin. Thromb. Diath.haemorrh., 33(1):17-9, 1974.
- 36 - KRAINTZ, L. TALMAGE, R. - Distribution of Radioactivity following intravenous administration of trivalent Chromium 51 in the Rat and Rabbit. Proc.Soc.exp.Biol. Med., 81:490-7, 1952.
- 37 - KULKARNI, P.; PARKEY, R.; BUJA, L.; WILSON, J.; BONNE, F.; WILLERSON, J. - Tc-labeled heparin: preliminary report of a new radiopharmaceutical with potential for imaging damaged coronary arteries and myocardium. J.nucl.Med., 19(17):810-5, 1978.
- 38 - LAURENT, T. - Studies on fractionated heparin. Archs.Biochem. Biophys, 92:224-31, 1961.

- 39 - LOOMIS, T. - Distribution and excretion of heparin. Proc. Soc.exper.Biol.Med., 106(1):490-2, 1962.
- 40 - McDONALD, N.; HAYES, M.; FIGUEROA, W. - Medical utility of a total body counter. J.nucl.Med., 8(8):588-600, 1967.
- 41 - McLEAN, J. - Am.J.Physiol., 41,250, 1916 apud BRIMACOMBE, J. & WEBBER, J. Mucopolysaccharides.v.6, Amsterdam, Elsevier, 1964. p.92-135.
- 42 - MEHL, J. - Whole body counters around the world. Nucleonics, 21(10):50-1, 1963.
- 43 - MENEELY, G.; LINDE, S.; MENEELY, E. - Measuring gamma activity with whole-body counters. Nucleonics, 21(10):46-9, 1963.
- 44 - MOMBELLI, G.; SCHAEDELIN, J.; BECK, E. - Pharmacokinetic von heparin nach einmaliger intravenöser oder subkutaner Injektion. Schweiz.med.wachr., 107(23):810-5, 1977.
- 45 - MONASTERIO, G. & DONATO, L. - I radioisotopi nell'indagine medica. Pisa, Minerva, 1960.
- 46 - MONKHOUSE, F. - Physiological Factors concerned with the removal of injected heparin from the circulating blood. Am.J.Physiol., 178:223-8, 1954.
- 47 - NODINE, J.; PLATT, J.; CARRANZA, J.; DYKYJ, R.; MAPP, Y. - Digital Computer Analysis of human isotopic Drug kinetics. Int.J.appl.Radiat.Isotopes, 15:263-8, 1964.
- 48 - OLSSON, P.; LAGERGREN, H.; EK, S. - The elimination from plasma of intravenous heparin. Acta med. scand., 173:619-30, 1963.

- 49 - PERRY, O.; HORTON, J. - Kinetics of heparin administration. Archs.Surg., 111; 403-9, 1976.
- 50 - PERRY, M.; POWELL, G.; WUSTERMAN, F.; CURTIS, C. - The catabolism of intravenously injected heparan N(³⁵S) sulphate in the rat. Biochem.J., 166:373-9, 1977.
- 51 - PIERONI, R.R. - Metodologia y aplicaciones clínicos de los radioisótopos, São Paulo, Instituto de Energia Atômica, 1959 (IEA-Pub.35).
- 52 - PIPER, J. - The fate of heparin in Rabbits after intravenous injection. Filtration and tubular secretion in the kidneys. Acta pharmc.tox., 3:373-84, 1974.
- 53 - RESCIGNO, A. & SEGRE, G. - Drug and Tracer Kinetics, Waltham, Mass., Blaisdell, 1966.
- 54 - ROCHA, A. - Medicina nuclear. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976, p.341.
- 55 - ROUILLER, C. editor. - The liver.v.2. New York, N.Y., Academic, 1964, p. 37.
- 56 - SARGENT, T.W. - Metabolic studies with ⁵⁹Fe, ⁴⁷Ca and ¹¹C in various diseases in whole-body counters. In: International Atomic Energy Agency. Whole-body counting; proceedings of the symposium on whole-body held in Vienna, 12-16 June 1961. Vienna, 1962. p.447-68 (Proceeding series).
- 57 - SZIRMAI, E. editor. - Nuclear hematology. New York, N.Y., Academic, 1965, p.201.
- 58 - TUBIS, M. & WOLF, W. - Radiopharmacy, New York, N.Y., 1976. p.626.

- 59 - VARGA, L.; ANTONIO, F.; SKALKA, M.; ZEDGNIDZE, I. - In vitro labelling of heparin with ^{51}Cr . Int.J.appl. Radioat. Isotopes, 22: 165-169, 1971.
- 60 - VEALL, N. & VETTER, H. - Técnicas con radioisótopos para la investigación y el diagnóstico en clínica, Buenos Aires, Universidade de Buenos Aires, 1964, p. 236.
- 61 - VESEK, W.; WHITNEY, I.; KUHN, U.; COMAR, C. - Metabolism of ^{51}Cr by animals as influenced by chemical state. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 84:610-7, 1953.
- 62 - WAGNER, Jr. H. - Principles of nuclear medicine. Philadelphia, Pa., Saunders, 1968, p.44.
- 63 - WEINER, M. - The significance of the physiologic deposition of drugs in anticoagulant therapy. Semin. hematol., 1 (4):345-74, 1964.
- 64 - WILANDER, O. - Skand.Arch.Physiol., supl.81, 1 apud PIPER, J. - The fate of heparin in Rabbits after intravenous injection. Filtration and tubular secretion in the kidneys. Acta pharmac. tox., 3:373-84, 1974.
- 65 - WILSON, J. - Hepatic structure in relation to function. Am.Inst.Biol.Sc.Publ., 4, 175-192, 1958, apud ROUILLER, C. editor. The liver, vol. 2, New York, N.Y., Academic 1964, p.37.
- 66 - WINKLER, E. & HÜBNER, G. - Concepts for the interpretation of tracer experiments and their application in the investigation of nitrogen metabolism. International Atomic Energy Agency. Modern trends in the biological applications of stable isotopes: technical committee meeting on modern trends in the biological applications of stable isotopes in Leipzig, 14-18. Feb. 1977. Vienna, 1977. p.303-22.

- 67 - ZÖLLNER, N. & KAISER, W. - Über Verteilungsraum und Halbwertszeit von intravenös injiziertem Heparin. Res. exp. Med., 158:89-94, 1972.
- 68 - ZUCAS, S.M.; LAJOLO, F.M.; BARBERIO, J.C. - Gaiola metabólica para ratos testados por meio de zinco radioativo ⁶⁵Zn. Revta. Fac. Farm. Bioquim., 7(2):353-9, 1969.
- 69 - ZUCKERMAN, L.; RAMSTACK, J.; VAGHER, J.; CAPRINI, V.; MACKROS, L. - Neutralization of heparin by cellular blood elements. Thromb. Research., 7:149-59, 1975.



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

As abreviaturas dos títulos de periódicos foram feitas de acordo com o "World List of Scientific Periodicals" 4.ed., London, 1964.