

MAURÍCIO GOMES LOMBA

ESTUDOS SOBRE DISTRIBUIÇÃO E EXCREÇÃO
DA CROTOXINA-¹³¹I EM CÃES

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto Central de
Biologia da Universidade de
Campinas

Orientador:

Prof. OSWALDO VITAL BRAZIL

Campinas - 1969.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS

Biblioteca Central

À MINHA ESPÔSA.

AGRADECIMENTOS

Enorme seria a lista de pessoas que durante êsses cinco anos muito contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização dêste trabalho. A ausência de citação nominal não significa esquecimento da colaboração prestada. A todo êsse pessoal nossos mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Oswaldo Vital Brazil, mestre e amigo, sob cuja orientação segura e constante, foi realizado todo êste trabalho, expressamos nossa profunda gratidão.

Ao Dr. Júlio Kieffer, que muito nos ajudou em cada uma das fases de realização dêste trabalho, nossos agradecimentos sinceros.

A todo o pessoal da Divisão de Radiobiologia do I.E.A. e em especial ao Físico Paulo Roberto Leme, cuja dedicação e relevante auxílio prestado muito nos ajudaram, queremos consignar nossos profundos agradecimentos.

Ao Prof. Rômulo Ribeiro Pieroni, Diretor do Instituto de Energia Atômica, pelas facilidades, interêsse e incentivo dispendidos a êste trabalho deixamos aqui o nosso muito obrigado.

Ao Prof. Rubens Murilo Marques, Coordenador do Instituto de Matemática da Universidade de Campinas, agradecemos a orientação estatística e as sugestões construtivas apresentadas.

Somos gratos a todos os componentes do Departamento de Farmacologia do Instituto Central de Biologia da Universidade de Campinas e em particular à Sra. Júlia Prado Franceschi, ao Sr. Nádum Farah Heluany Sobrinho e Srta. Maria Aparecida Moraes pelos

inestimáveis auxílios técnicos e à Srta. Maria Alves de Paula, que, com dedicação e boa vontade, datilografou esta tese.

Ao Sr. Jayme da Costa Patrão e aos Drs. Quivo S.Tahin e José Martins Filho, nossos agradecimentos por t^oda ajuda prestada.

ÍNDICE

	Páginas
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL e MÉTODOS	5
1. Crotoxina - marcação com ^{131}I - controles de pureza química e radioativa	5
2. Determinação da radioatividade de amostras de materiais biológicos	8
3. Experiência em cães	9
4. Cinética da crotoxina em cães	13
5. Análise estatística	15
RESULTADOS	18
1. Crotoxina - marcação e controles físico-químicas e biológicos	18
2. Cinética da crotoxina	18
3. Distribuição da crotoxina em tecidos, órgãos e humores	32
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	46
RESUMO	48
APÊNDICE	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO

Muito pouco se sabe a respeito do destino de peçonhas ofídicas ou de seus componentes, no organismo animal.

O estudo da absorção, distribuição e excreção desses agentes muito contribuirá para esclarecer os mecanismos de ação ou de destoxificação e para um possível aprimoramento das medidas terapêuticas nos acidentes ofídicos.

Só recentemente foram as técnicas dos traçadores radioativos aplicados ao estudo da distribuição das peçonhas ofídicas em envenenamentos experimentais. Para obtenção de peçonha marcada, dois métodos foram utilizados: i. introdução in vitro de ^{131}I e ^{51}Cr na peçonha total^(1, 2, 3, 4) ou em suas frações isoladas;^(3,5,6) ii. introdução in vivo de radionuclídeo na peçonha por administração às serpentes peçonhentas de ^{35}S sob forma quer de cistina- ^{35}S quer de sulfato- ^{35}S ,^(7,8) ou de ^{64}Cu .⁽⁸⁾

A atividade específica obtida pelos processos de biossíntese foi geralmente demasiado baixa para permitir seu uso como traçador em estudos de distribuição.

Gennaro e Ramsey⁽¹⁾ marcaram o veneno total da Agkistrodon piscivorus com ^{131}I e determinaram a radioatividade nos vários tecidos de camundongos injetados com este material. Os radioensaios foram feitos com homogeneizados de órgãos não la

vados, não sendo os resultados corrigidos para a radioatividade do sangue.

Sumik e Kashin⁽²⁾ marcaram com ^{131}I peçonhas de Naja naja, Agkistrodon piscivorus e Crotalus durissus terrificus e estudaram a distribuição em camundongos, usando as técnicas de autorradiografia do animal inteiro, descrita por Ulberg.⁽⁹⁾

Tanto Gennaro e Ramsey⁽¹⁾ como Sumik e Kashin⁽²⁾ marcaram somente a peçonha total. Entretanto, é conhecido o fato de que as peçonhas ofídicas são constituídas por diversos componentes protéicos dotados ou não de atividade biológica. Sabe-se, por outro lado, da facilidade com que proteínas que possuam grupamento tirosina na molécula podem ser marcadas. A iodação da peçonha total levaria, assim, à marcação heterogênea dos seus diversos componentes biologicamente ativos ou não, comprometendo a interpretação dos resultados.

Lee e Tseng⁽³⁾ estudaram em camundongos e coelhos a distribuição da peçonha de Bungarus multicinctus e de suas toxinas α e β -bungarotoxinas. Encontraram em coelhos maior radioatividade nos rins, seguidos, em ordem decrescente, pelos pulmões, baço, coração, trato gastrintestinal e músculo esquelético, sendo a concentração cerebral a menor de todas, cerca de 100 vezes menos que a encontrada nos rins. Verificaram também que a peçonha e ambas as toxinas atravessam com muita dificuldade a barreira hemoliquórica, não atingindo no liquor e, conseqüentemente, no líquido intersticial do cérebro, níveis que justifiquem uma origem central para a paralisia respiratória produzida pela administração venosa da peçonha ou das toxinas. Com o método de Waser e Lüthi⁽¹⁰⁾ de autorradiografia do diafragma de camundongos, demonstraram a localização eletiva da α -bungarotoxina nas placas terminais. Este resultado corrobora a conclusão da pesquisa de Chang e Lee⁽¹¹⁾ de que a α -bungarotoxina atua como a

d-tubocurarina e o decametônio na membrana pós-sináptica.

Como foi dito anteriormente, somente o uso de componentes isolados, química e farmacologicamente homogêneos e definidos, permitirá a correta interpretação dos resultados experimentais, que objetivam esclarecer os problemas relacionados com a distribuição e excreção das peçonhas, no tocante às suas relações com a fisiopatologia do envenenamento ofídico.

Desde 1965 passou o autor a se interessar pelo assunto, dando início a uma série de programas investigativos, todos restritos apenas ao estudo da crotoxina, principal fração da peçonha da cascavel sulamericana (Crotalus durissus terrificus), por ser quimicamente estável e por ser sua farmacologia já bem estabelecida desde há algum tempo. (12, 13, 14, 15, 16)

Sua primeira preocupação foi a de estabelecer as bases metodológicas para a marcação com ¹³¹I da crotoxina, mercê de modificação da técnica de McFarlane⁽¹⁷⁾ e de verificar a conservação das propriedades biológicas desta fração. (5, 6)

De posse de uma crotoxina marcada e de comprovada atividade biológica, era lícito abordar a etapa seguinte, relativa à sua distribuição e cinética em animais de laboratório. Paralelamente, procurou-se estudar as eventuais diferenças de comportamento no animal previamente submetido à administração de soro anti-crotálico.

Sendo, pois, objetivo básico deste trabalho colher informes relativos à distribuição e à dinâmica da crotoxina, que se aceita serem adequadamente representadas pelas da crotoxina marcada, planejou-se obter os dados necessários através de duas séries de experiências diferentes, a saber:

1. dados relativos à cinética propriamente dita da crotoxina, através da clássica metodologia, que se esteia na análise da curva de variação da radioatividade sanguínea em fun-

ção de tempo;

2. dados relativos à concentração alcançada pela crotoxina marcada em diferentes órgãos e tecidos, decorrido de terminado tempo, possivelmente coincidente com a franca ação farmacológica.

A necessidade da segunda série de experiências prende-se ao fato de os dados puros de cinética fornecerem somente informações relativas aos espaços totais de distribuição, aos seus ritmos de transferência e de eliminação, mas não as informações ligadas à distribuição anatômica específica da substância em estudo.

M A T E R I A L E M É T O D O S

1. CROTOXINA - MARCAÇÃO COM ^{131}I - CONTRÔLES DE PUREZA QUÍMICA E RADIOATIVA - CONTRÔLE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA (DL50).

Tôdas as partidas de crotoxina utilizadas no presente trabalho foram isoladas e cristalizadas ^{*} a partir de veneno proveniente de Goiás ^{**} de acôrdo com os métodos descritos por Slotta e Fraenkel-Conrat. (18)

(5, 6)
A marcação da crotoxina obedeceu à técnica já pormenorizadamente descrita e cujas etapas fundamentais vão reproduzidas a seguir.

A 0,7 ml de uma solução de ^{127}ICl , contendo 2,94mg de iôdo, eram adicionados de 3 a 8 mCi de ^{131}I , sob forma de iôdeto de sódio, livre de carreador ("carrier") e de substâncias re

* Os agradecimentos ao Dr. E. Waisbich e O. G. Lomba pela preparação da crotoxina e sua cristalização.

** Ao Instituto Pinheiros somos gratos pelo fornecimento de veneno desprovido de crotamina.

dutoras, sendo o pH ajustado entre 8 e 9 e a solução tamponada com "buffer" de glicina de pH 8,5. O volume da solução radioativa variava de acordo com a atividade específica da mesma, nunca sendo superior a 0,6 ml. A esta mistura (mistura de iodação) era adicionada, sob a forma de jato enérgico, uma solução de crotoxina contendo, em 5 ml, uma quantidade muito bem determinada de crotoxina, da ordem de 30 mg. Após 3 minutos de interação, o excesso de iodo não combinado era removido, percolando-se a solução através de uma coluna de resina de troca iônica sob forma Cl^- (Amberlite IRA-400) ou por diálise. A radioatividade total era, então, determinada em um Curiômetro (Tracerlab - modelo SC56A - série 243, ou modelo SC56 - série 110).

A pureza radioquímica foi verificada procedendo-se à espectrometria gama do produto marcado pronto em espectrômetro monocanal (N. Chicago - modelo 132B), utilizando-se detector de cintilação com cristal de "poço" de 2x2 polegadas. Todas as partidas acusaram apenas a presença de ^{131}I caracterizado pelo seu fotopico de 364 keV.

A pureza química foi controlada mercê de eletroforese em papel Whatman nº 1, tampão de Veronal-Veronal-sódico, pH 8,6, com tempo de migração de 5 horas. À revelação, os eletroforetogramas da crotoxina não marcada e da radioiodada mostraram R_f idênticos.

O controle da presença de iodo livre e sua determinação quantitativa foi realizada em alíquotas de todas as amostras de crotoxina radioiodada, pela precipitação da proteína com ácido tricloroacético a 20%, lavagem do precipitado com ácido tricloroacético a 5% e determinação da radioatividade dos sobrenadantes.

Para o mesmo fim foi também utilizada a eletroforese em papel com tempo de migração de 50 minutos e determina-

cão da radioatividade livre e da ligada à crotoxina, por medida, em cintilador tipo "poço", de frações seqüenciais da própria fita, a fragmentação da fita era orientada pela prévia varredura, em aparelho automático (Vanguard - modelo Autoscaner 880). O teor de iôdo livre, quando superior a 2,5% da radioatividade total, implicava em nova passagem por coluna de resina de troca iônica, como já descrito. Caso êste se mantivesse elevado acima de 2,05%, a partida era desprezada.

Contrôles ulteriores da presença e quantidade de iôdo livre eram realizados por cromatografia em camada delgada, em placas de sílica gel, de 200x200 mm, espessura de 300 micra, ativadas em estufa a 120°C durante 30 minutos. Revelado o cromatograma, as zonas correspondentes à crotoxina marcada e ao iôdo livre eram raspadas, transferidas para tubos de contagem e sua radioatividade medida em detector de cintilação com crital de "poço" de 2x2 polegadas em espectrômetro monocanal (N.Chicago - modelo 132B), utilizando-se uma janela correspondente a um intervalo de energia igual a 95% do fotopico do ¹³¹I. Como nas demais determinações de radioatividade, a contagem se prolongava durante um tempo suficiente para reduzir o êrro estatístico a menos de 1%. (Os limites de confiança eram fixados, também para esta técnica, em 1% da radioatividade total).

Contrôle da atividade biológica - Todas as partidas de crotoxina marcada e "fria" foram controladas quanto à sua atividade biológica, determinando-se a DL50 em camundongos, pombos e pintos* conforme técnica adiante referida. Injetavam-se

* Os pintainhos de 1 dia, Hybro, foram gentilmente cedidos pela Granja ITO, Sumaré - Campinas, a que expressamos nos sos agradecimentos.

nos animais, por via venosa, soluções ou da crotoxina radioiodada ou da não marcada. As quantidades de crotoxina, em volume pré-fixado, estavam entre si em progressão geométrica de razão igual a 1,25. O procedimento de Weil⁽¹⁹⁾ foi usado para os cálculos da DL50 e seus intervalos de confiança a nível de 95%.

A massa de crotoxina ~~radioiodada~~ existente nas soluções de uso ("fria" e marcada) era padronizada quer pelo seu teor em nitrogênio protéico, determinado pela técnica de micro-Kjedal,⁽²⁰⁾ quer pela espectrofotometria diferencial em ultravioleta,⁽²¹⁾ quer pelo processo de Folin-Ciocalteu modificado.^{(22)*}

O ensaio biológico para a crotoxina existente na urina dialisada de cães injetados com crotoxina-¹³¹I foi realizado em 5 lotes, contendo 4 pintainhos cada um de 85 a 110 g. Cada lote recebia na veia da asa, respectivamente, as seguintes quantidades de urina: 2,0; 1,28; 1,01; 0,81 ml, sendo os volumes completados para 2 ml com solução salina a 0,8%. Urina do mesmo cão, colhida antes da administração de crotoxina-¹³¹I, também dialisada, foi injetada em lotes-contrôle.

2. DETERMINAÇÃO DA RADIOATIVIDADE DE AMOSTRAS DE MATERIAIS BIOLÓGICOS.

Tôdas as determinações foram realizadas em sistema automático de contagem de radiação gama, (modelo 4222 da N. Chi

* Ao acadêmico Roberto Gomes, agradecemos a confecção da curva padrão e diversas determinações realizadas.

cago), provido de cristal de NaI(Tl), tipo "poço", de 3x3 polegadas e dotado de analisador de impulsos. A janela foi ajustada para incluir 95% de fotopico de 364 keV do ^{131}I . Todas as contagens foram prolongadas o suficiente para reduzir o êrro estatístico a menos de 1%.

Quando se tratava de homogeneizados de órgãos ou tecidos ou de fragmentos dos mesmos, os valores foram expressos em percentagem da radioatividade administrada por unidade de massa, sendo, para as amostras de sangue, líquor, bile, urina, humor aquoso e saliva, expressos por ml do material.

As soluções de referência de crotoxina marcada foram preparadas com carreador de iodêto de sódio "frio" e de crotoxina "fria" em excesso. A determinação da radioatividade era processada como para as demais amostras de materiais biológicos.

3. EXPERIÊNCIAS EM CÃES. *

Utilizaram-se 26 cães, pesando de 6 a 21 Kg, a maioria fêmeas de aproximadamente 10 Kg, anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/Kg por via venosa). Uma cânula de polietileno era introduzida na veia femoral, para as injeções. A artéria femoral do lado oposto recebia um tubo de polietileno, conecta-

* Aos acadêmicos Carlos Henrique Barbieri, Lellis Passos Valente, Herbert Luiz de A. Neves e Gyorgy M. Laszlo nos sos agradecimentos pela ajuda prestada durante a realização de parte destas experiências.

do a uma torneira com 2 vias de acesso, para retirada de amostras sanguíneas e lavagem da cânula.

Os ureteres eram canulados para coleta de amostras de urina.

Em apenas 5 experiências foram os animais preparados para registro da pressão arterial carotídea pela técnica clássica, usando-se o manômetro de Ludwig.

Em 4, canulou-se o ducto de Wharton e a saliva era colhida após estimulação da corda do tímpano e sua radioatividade determinada. Na excitação da corda do tímpano empregaram-se estímulos de 10 c/s, 0,2 milisegundos de duração e 5 V. de intensidade, fornecidos por estimulador Grass (modelo S4).

Após toda a manipulação cirúrgica eram os animais heparinizados (2.500 U.I./cão).

Aos 26 cães utilizados administrou-se por via venosa crotoxina-¹³¹I na dose de 250 mcg/Kg, com atividade específica variando de 60 a 280 μ Ci/mg. Na dependência da variação da atividade específica, as doses de radioatividade para cada animal variaram de 70 a 320 μ Ci, doses, portanto, de magnitude tal para seguramente não poderem sugerir qualquer interferência no comportamento cinético do sistema em estudo.

A 10 dos 26 animais, administraram-se, trinta minutos antes da crotoxina-¹³¹I, soro anti-crotálico em doses suficientes para neutralizar o dobro de crotoxina injetada. Esses animais serão chamados, de agora em diante, de cães PROTEGIDOS. Por oposição, os demais serão identificados como NÃO PROTEGIDOS. Para cada experiência com o PROTEGIDO, era realizada outra, no mesmo dia, em NÃO PROTEGIDO, empregando-se a mesma partida de crotoxina marcada.

Material para o estudo cinético - Para este estudo, realizado em 10 cães NÃO PROTEGIDOS e 8 PROTEGIDOS, foram co-

lhidas amostras de sangue total sôbre citrato de sódio sólido, segundo esquemas cronológicos diversos, durante um período de tempo máximo de 360 minutos (variando de 120 a 360) a partir do momento da injeção de crotoxina-¹³¹I. Em cada experiência, o número de amostras nunca foi inferior a 13, tendo-se tido o cuidado de se distribuir maior número destas em correspondência com os pontos de inflexão das correspondentes curvas em função de tempo. Aliquotas de cada amostra, via de regra 1 ml, eram transferidas para tubos plásticos para determinação de sua radioatividade, que neste caso particular, era expressa em contagens líquidas por minuto e por ml (Cpm/ml).

Materiais para estudo de distribuição - Com o objetivo de se obter informes relativos às concentrações de crotoxina em humores, órgãos e tecidos, que facultassem apreciar, em nível anatômico, a distribuição corpórea da crotoxina-¹³¹I, amostraram-se os tecidos e órgãos adiante enumerados, tanto de cães PROTEGIDOS como de NÃO PROTEGIDOS.

O tempo de amostragem foi fixado, no decorrer do trabalho, entre os limites de 2 e 6 horas, a contar da administração de crotoxina-¹³¹I, por se saber que, dentro desse intervalo, os fenômenos de envenenamento para o cão já são evidentes.

Para esse fim utilizaram-se, ao todo, 16 cães NÃO PROTEGIDOS e 10 PROTEGIDOS.

As características metodológicas da coleta e o número de animais empregados para cada tipo de amostra de material biológico são a seguir descritos.

A urina de 15 cães, correspondente à diurese de períodos de tempo sucessivos de 30 minutos, era coletada em tubos de plástico. De cada amostra pipetava-se 1 ml para "contagem" da radioatividade. O restante era dialisado em tubo de celofane "Visking sausage casing" durante 36 horas a 4°C contra solução salina.

na a 0,8%. Após a diálise media-se a radioatividade em 1 ml da amostra. Sempre que possível determinava-se também a atividade biológica da crotoxina, em amostras de urina dialisada, segundo técnica já referida.

De 11 animais retiraram-se de 3 a 6 ml de líquido por punção da cisterna magna e, de 7, de 1 a 3 ml de humor aquoso. Aliquotas de 1 ml eram transferidas para tubos plásticos para medida de radioatividade. Imediatamente após a coleta desses humores, os cães eram sacrificados. Após abertura das cavidades torácica e abdominal, foram ressecados coração (8 experiências), pulmões (19 experiências), rins (19 experiências), fígado (20 experiências), baço (20 experiências), alguns gânglios mesentéricos (13 experiências). Além desses órgãos, foram também removidos a tireóide (26 experiências) e cérebro (8 experiências), bem como fragmentos dos músculos diafragma (10 experiências) e tibial anterior (12 experiências). A vesícula biliar era puncionada para obtenção de bile (5 a 10 ml). Todos os órgãos eram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,8%, até que o líquido de lavagem não apresentasse mais vestígios de sangue à simples observação. Os órgãos retirados eram enxutos em papel de filtro, pesados e homogeneizados em liquidificadores domésticos.* A radioatividade presente em 1 grama dos homogeneizados e em 1 ml de bile foi determinada. A tireóide, os fragmentos de músculos e os gânglios mesentéricos foram pesados e diretamente "contados" em tubos de plástico. As determinações da radioatividade foram todas realizadas conforme já referido, sendo os resultados expres-

* Agradecemos a doação de 4 liquidificadores ao Departamento, feita pela WALITA S/A.

tos para os humores em percentil da dose administrada por ml (%/ml) e para os órgãos e tecidos em percentual da dose administrada por grama de tecido fresco (%/g). Para certos resultados utilizou-se também a correspondência em microgramas de crotoxina por ml ou g (mcg/g), uma vez que se conhecia a atividade específica, ou seja, a radioatividade por micrograma de crotoxina.

4. CINÉTICA DA CROTOXINA-¹³¹I EM CÃES.

Para o estudo da cinética de crotoxina, apreciado através do comportamento da crotoxina-¹³¹I, utilizaram-se os dados relativos à radioatividade sangüínea de cães PROTEGIDOS e NÃO PROTEGIDOS. Para tanto, os valores da radioatividade presente no sangue, expressos em contagem por minuto e por mililitro (Cpm/ml), foram lançados, em função de tempo, em gráfico semilogarítmico.

Aos pontos experimentais era, a seguir, ajustada a curva que melhor os satisfizesse, utilizando-se para esse ajuste, realizado a partir do próprio gráfico, um critério de simples compensação estimativa da dispersão dos valores. Posteriormente, controlou-se tal ajuste através dos cálculos dos desvios percentuais.

A curva assim obtida, que apresenta as características de uma soma de termos exponenciais, foi graficamente decomposta nos seus respectivos termos pela técnica das subtrações sucessivas. Um exemplo da representação gráfica de uma curva desse tipo e de suas componentes, obtidas pela técnica acima descrita

ta, pode ser visto na figura 1.

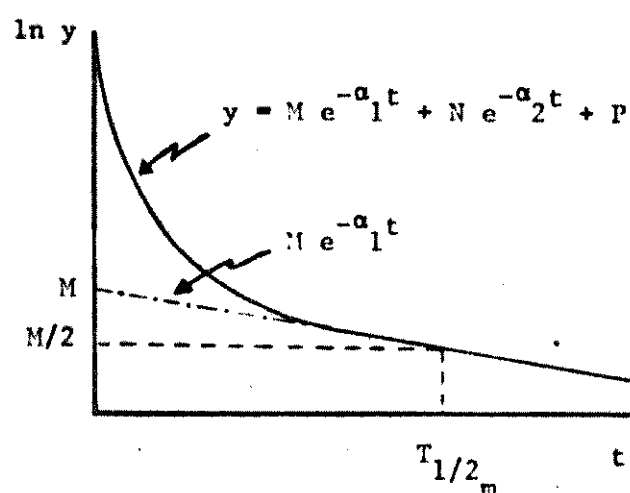
A soma dos valores das componentes para t igual a zero (t_0) fornece o valor numérico da concentração sangüínea da radioatividade no instante zero (C_0). Este valor numérico traduz a concentração que alcançaria a massa radioativa injetada caso se achasse distribuída total e uniformemente no volume do compartimento de introdução, no caso o do leito vascular. Este dado possibilitará o cálculo da volemia (V_I) aplicando-se o princípio da base metodológica da diluição do isótopo. (23,24,25,26)

Obtidas as representações gráficas dos diferentes termos exponenciais calcularam-se os respectivos parâmetros, que possibilitam a determinação dos que são peculiares à distribuição e cinética da substância em estudo.

Os símbolos, definições e expressões dimensionais dos parâmetros acham-se reunidos na tabela I.

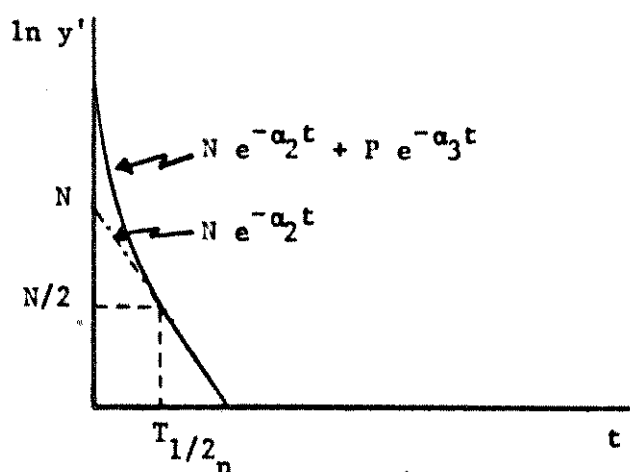
De posse do número de termos exponenciais que compõem a função representativa da variação da radioatividade sangüínea em função de tempo, cumpre eleger um modelo que, satisfeitas as condições impostas pelo número das componentes (número de compartimentos igual ao de exponenciais), simule, na base de premissas fisiológicas, as características de distribuição e cinética. (24, 25)

O modelo assim concebido possibilitará uma solução matemática para o cálculo das funções representativas das variações da radioatividade em qualquer um dos compartimentos idealizados, bem como o dos coeficientes de transferência entre os mesmos. Se houver concordância entre a função representativa da variação da radioatividade no compartimento de introdução do traçador e a função experimental, pode-se inferir que existe uma alta probabilidade de o modelo cinético postulado ser bastante próximo da situação real, ou seja, de que, em nível funcional, os



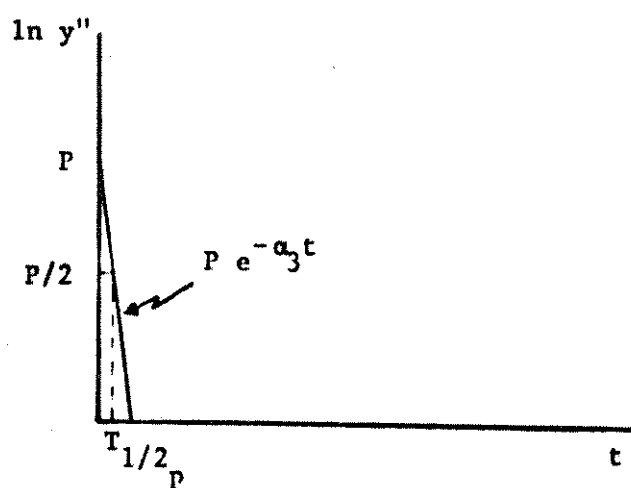
curva soma de três componentes exponenciais

$$\alpha_1 = \frac{0,693}{T_{1/2_m}}$$



curva acima subtraída a componente $M_1 e^{-\alpha_1 t}$

$$\alpha_2 = \frac{0,693}{T_{1/2_n}}$$



curva anterior subtraída a componente $N e^{-\alpha_2 t}$

$$\alpha_3 = \frac{0,693}{T_{1/2_p}}$$

Figura 1. Decomposição gráfica de uma curva composta por uma soma de três termos exponenciais pelo método das subtrações sucessivas.

processos se realizem como esquematizado no modelo.

A formulação de um modelo implica, para a sua solu
ção analítica, na existência de novos parâmetros, cuja definição,
símbolos e dimensão se acham reunidos na tabela I.

A justificativa matemática do modelo e a maneira de
se calcularem os diferentes parâmetros acham-se descritas no a
pêndice.

Cumprе ressaltar que os "modelos" utilizados nos es
tudos de distribuição e cinética são, geralmente, super-simpli-
ficações que visam apenas permitir um melhor entendimento do pro
blema ou então, facultar uma primeira aproximação a este, não im
plicando, necessariamente, na total aceitação das consequências
analíticas do modelo escolhido.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Com a finalidade de se analisar o comportamento da
crotoxina nos vários órgãos e sistemas estudados submeteram-se
os resultados de cada um deles a uma análise de variância segun-
do o modelo hierárquico a dois critérios de classificação. ⁽²⁷⁾

Assim foram constituídos dois grupos PROTEGIDOS e NÃO PROTEGIDOS
e dentro de cada um desses, considerados dois tempos (até 3 ho-
ras e mais de 3 horas).

Algumas comparações que também apresentavam interês
se e que não puderam ser obtidas pela partição feita, foram rea-
lizadas através do método de contraste de Scheffé. ⁽²⁷⁾

Para os órgãos dos quais não se dispunha de um nú-
mero suficiente de observações para a realização da análise aciu

ma descrita, limitou-se à comparação das médias, testando-lhes a significância das diferenças através do teste "t" de Student.

O nível de significância adotado foi sempre o de 5% e, em ambos os casos, propôs-se normalizar-se a homoelasticidade para as variáveis em consideração.

TABELA I

Símbolo	Definição	Expressão dimensional
$T_{1/2\ m}$	Semiperíodo; tempo necessário para que a concentração radioativa expressa pelo componente m se reduza à metade.	min.
$T_{1/2\ n}$	Semiperíodo da componente n	min.
$T_{1/2\ p}$	Semiperíodo da componente p	min.
α_1, α_2 e α_3	Constantes de renovação das componentes m, n e p . No caso particular $\frac{d\alpha_1}{dt}$ representa a fração da fase crotoxina que é removida na unidade de tempo	% por min.
M, N, P	Valores em t_0 das componentes m, n e p	%
$k_{12} - k_{21}$	Constantes de transferência entre os compartimentos 1 e 2	% da massa dos compartimentos transferida por min.
$k_{13} - k_{31}$	Constantes de transferência entre os compartimentos 1 e 3	% da massa dos compartimentos transferida por min.
k_{14}	Constante de transferência do compartimento 1 para o compartimento 4 (meio exterior)	% da massa do compartimento transferida por min.
V_T	Volume total da fase ("pool") crotoxina	l e ou % do peso corpóreo
V_I	Volume intravascular, equivalente ao compartimento 1	l e ou % do peso corpóreo
V_E	Volume extravascular, equivalente a soma dos compartimentos 2 e 3	l e ou % do peso corpóreo
A_{t_0}	Radioatividade total contida na dose administrada e presente em t_0 no compartimento 1	contagens por min

Tab. I. - Símbolos, definições e expressões dimensionais dos parâmetros empregados no estudo da cinética da crotoxina-¹³¹I.

R E S U L T A D O S

1. CROTOXINA - MARCAÇÃO E CONTRÔLES FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICOS.

Obtiveram-se em tôdas as marcações rendimentos variando de 30 a 85%. Utilizaram-se apenas aquelas partidas de atividade específica igual ou superior a $53\mu\text{Ci/mg}$ e teor de iôdo livre inferior a 2,05% da atividade total.

Na tabela II podem ser observados o rendimento, a atividade específica e a percentagem de iôdo livre presentes nas partidas de crotoxina- ^{131}I usadas nêste trabalho.

Na figura 2 estão representados os valôres das determinações da DL50 da crotoxina- ^{131}I e da não marcada em camundongos, pombos e pintainhos.

2. CINÉTICA DA CROTOXINA.

Aplicadas às curvas semilogarítmicas representativas da variação da radioatividade sangüínea por crotoxina marcada dos 10 cães NÃO PROTEGIDOS as diretrizes gerais de análise gráfica referidas no capítulo próprio, verificou-se serem tôdas

TABELA II

Partida (nº)	Rendimento (%)	Atividade específica $\mu\text{Ci}/\text{mg}$	Concentração mg/ml			Íodo livre (%)
			Ultra violeta	Micro Kjedahl	Folin- Ciocalteu	
3	79,31	280,0	1,425	1,380	—	0,72
6	53,00	53,0	—	10,000	—	1,70
22	46,00	149,7	1,240	1,240	—	2,01
28	53,80	865,6	0,337	0,338	—	2,05
31	41,00	102,6	—	2,130	—	1,20
42	49,50	907,0	—	0,818	—	0,80
45	40,00	156,0	—	2,560	—	1,40
52	40,00	157,0	3,820	3,000	3,82	0,57
57	64,70	195,0	2,510	2,280	—	0,66
60	69,23	286,7	—	—	1,96	1,66
68	50,00	289,0	3,450	—	3,45	1,50
75	85,2	240,0	—	—	2,50	0,83

Tab. II - Características das várias partidas de crotoxina usadas neste trabalho.

Crotoxina
 Crotoxina-¹³¹I

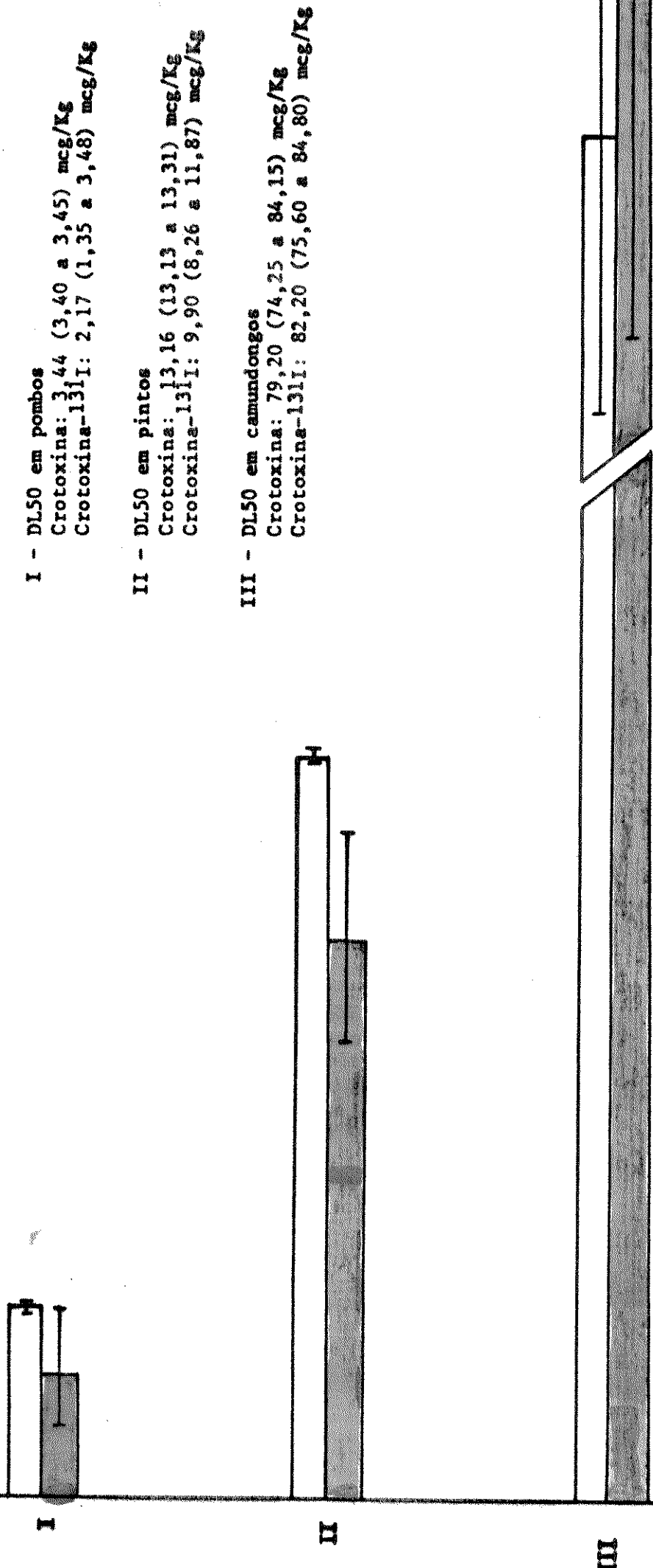


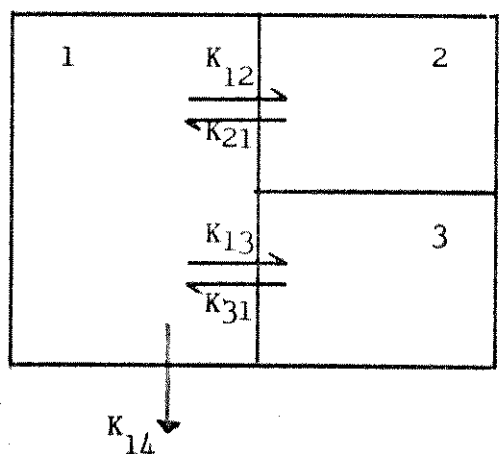
FIGURA 2- Comparação entre as DL50 em pombos, pintos e camundongos

3,0 10,0 15,0 68,4 76,6 83,

elas compatíveis com uma função que é satisfeita pela soma de três termos exponenciais. Uma curva e as componentes resultantes da análise gráfica de um caso típico acham-se representadas na figura 3, para cão NÃO PROTEGIDO.

A resultados análogos levou a análise das curvas semilogarítmicas da radioatividade sanguínea de todos os 8 cães PROTEGIDOS. Exemplo típico representativo deste grupo é reproduzido na figura 4.

Como corolário desses resultados, foi idealizado como modelo representativo da fase ("pool") crotoxina de cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS um sistema tricompartimentalizado. Dentre os diversos modelos possíveis, elegeu-se o representado na figura 5, por bem se ajustar às evidências experimentais como a diante será referido.



Volume da fase = V_T
 Volume do compartimento 1 = V_1
 (Volume intravascular)
 Volume do compartimento 2 = V_2
 Volume do compartimento 3 = V_3
 Volume extravascular = V_E
 $V_E = V_2 + V_3$

Figura 5

Assim, a fase crotoxina resulta formada essencialmente por dois espaços, um correspondendo ao volume do intravascular e que se identifica com o compartimento 1 (compartimento de introdução e amostragem do traçador) e outro, de localização extravascular, que, para satisfazer as características cinéti-

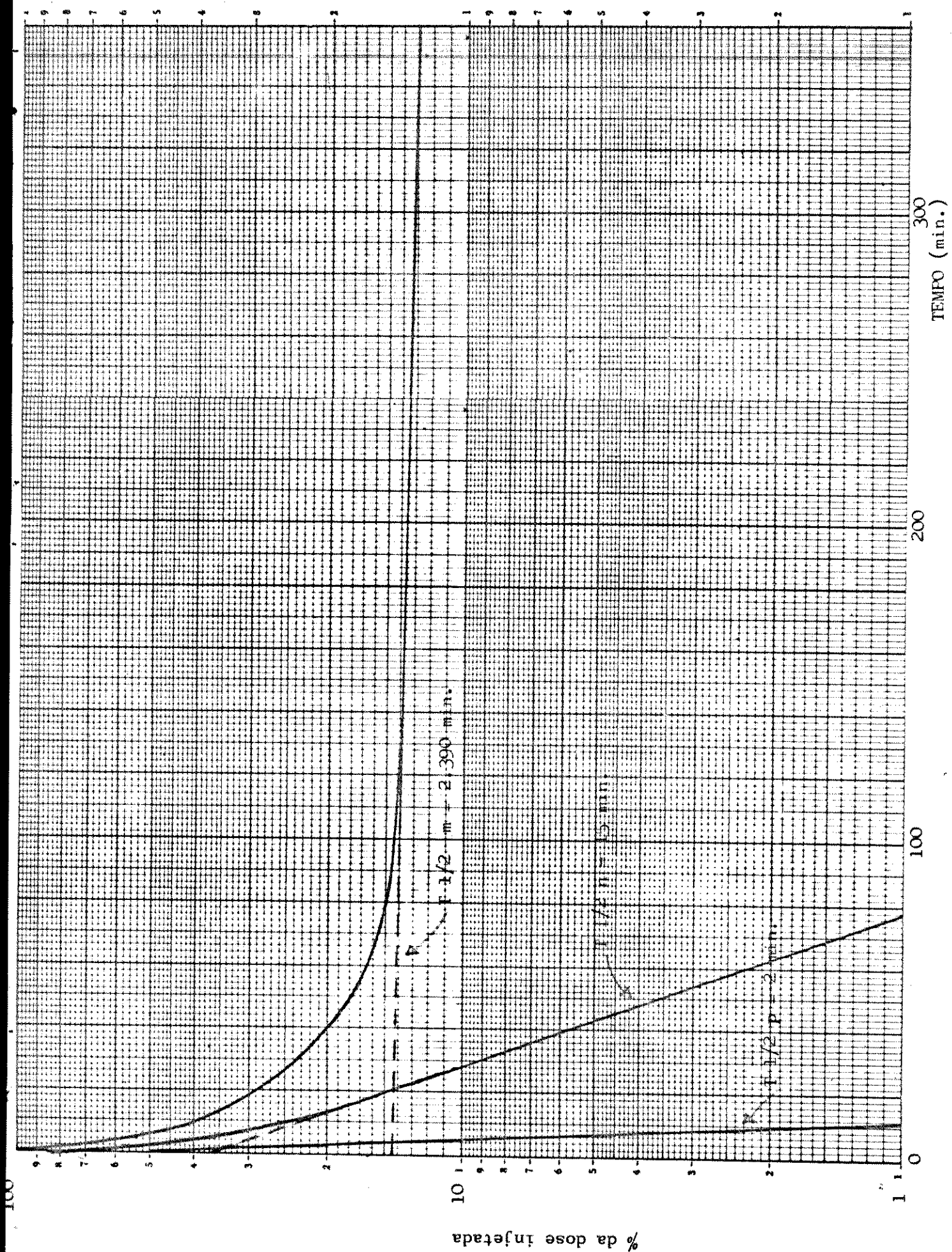


Figura 3 - Curva típica da radioatividade no sangue total em função do tempo. Suas componentes em cao

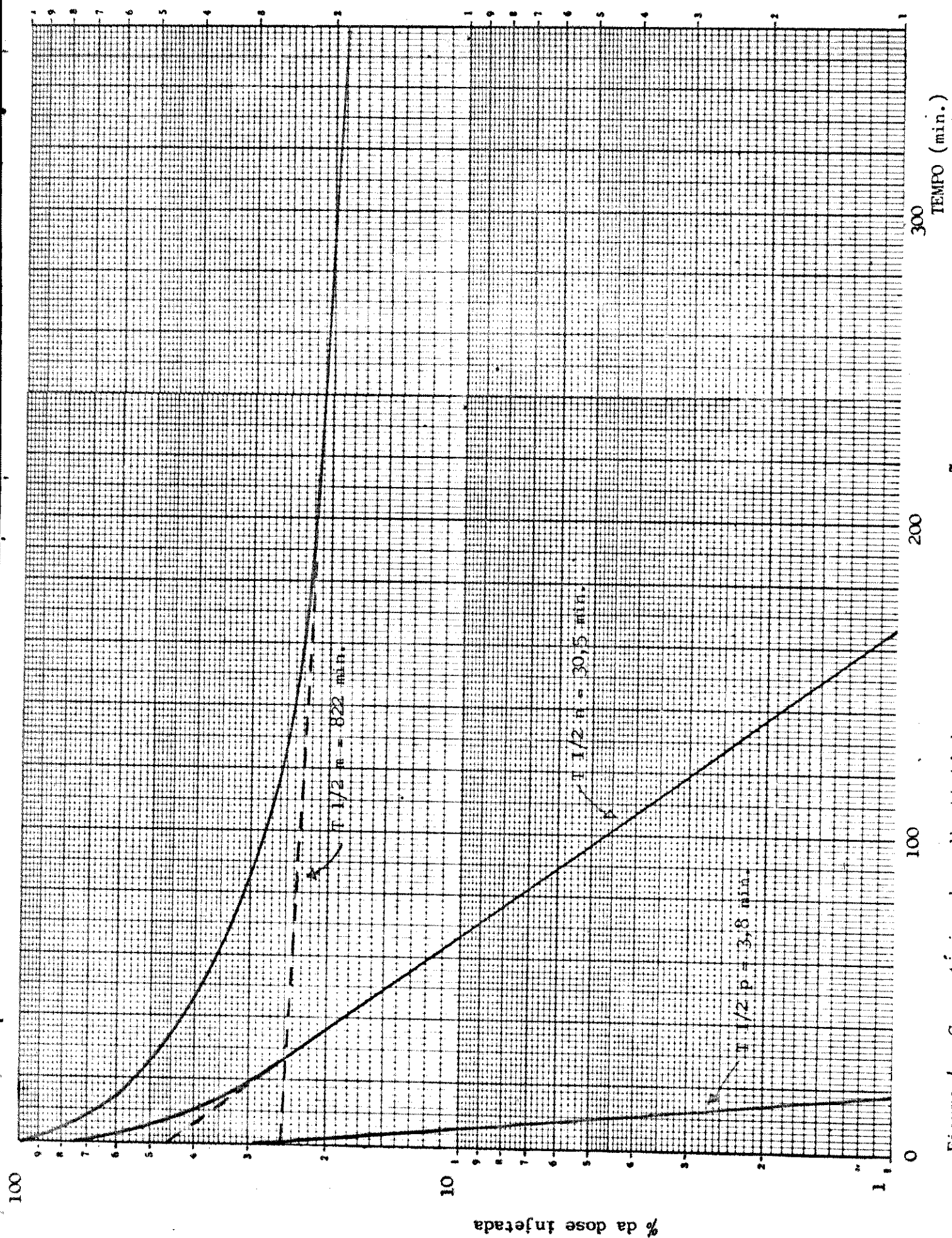


Figura 1 - Curvas de injeção de dose

cas, deve ser representado por dois compartimentos (compartimentos 2 e 3) trocando e equilibrando com o compartimento intravascular com ritmos diferentes.

Para os diversos componentes calcularam-se os valores dos $T_{1/2}$ e dos α . Obtiveram-se também os volumes da fase crotoxina (V_T) e os dos compartimentos intra e extravasculares (V_1 e V_E). Os valores numéricos, dados de acordo com as expressões dimensionais constantes da tabela I, com as respectivas médias e desvios padrão, acham-se reunidos nas tabelas III e IV. Esses resultados referem-se a cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS, respectivamente.

Para 7 cães NÃO PROTEGIDOS e 3 PROTEGIDOS determinaram-se os valores numéricos das constantes de transferência K_{12} , K_{21} , K_{13} , K_{31} e K_{14} , apenas com o objetivo de se conhecer, de um lado, a ordem de grandeza dos mesmos e facultar o cálculo de V_2 e V_3 e, de outro lado, para simular, em computador analógico, a cinética da crotoxina e comparar os dados oriundos do modelo com os experimentais. As figuras 6 e 7 mostram as curvas obtidas no computador analógico para os compartimentos dos cães NÃO PROTEGIDO e PROTEGIDO respectivamente.

Nas tabelas V e VI acham-se consignados respectivamente os valores médios dos coeficientes de transferência, dos volumes da fase e de seus compartimentos, obtidos em cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS, respectivamente.

Cotejando-se os parâmetros fundamentais da cinética em cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS verifica-se que as diferenças significativas entre eles situam-se, nas alterações dos volumes total e extravascular, assim como nas do ritmo de remoção da crotoxina, conforme se verifica na tabela VII. Encontra-se também aí assinalada a magnitude da variação.

TABELA III

Nº	Peso (Kg)	Volume distrib. (l)	Volume distrib. (% do peso)	Coefficiente de eliminação (% min ⁻¹)	Volume intravascular (l)	(%)	Volume extravascular (l)	(%)
1	10,0	6,17	61,7	0,0315	0,79	7,90	5,38	53,8
4	11,0	9,74	88,5	0,0288	0,85	7,73	8,89	80,8
6	10,1	7,49	74,2	0,0257	0,78	7,70	6,72	66,5
8	8,5	4,52	53,2	0,0290	0,66	7,76	3,86	45,4
10	7,8	5,80	74,4	0,0288	0,53	6,90	4,27	67,5
12	18,2	10,95	60,2	0,0252	1,31	7,20	9,64	53,0
13	8,0	5,83	72,9	0,0235	0,78	9,75	5,05	63,1
15	10,4	8,11	78,0	0,0233	0,80	7,69	7,31	70,3
17	11,2	5,90	52,7	0,0285	1,06	9,46	4,84	43,2
18	10,5	6,20	59,0	0,0288	0,81	7,71	5,39	51,3
Média e desvio padrao		67,5 ± 11,8		0,0273 ± 0,0027	7,98 ± 0,91		59,5 ± 12,0	

Volumes de distribuição e ritmo de excreção da crotoxina para cães NÃO PROTEGIDOS.

TABELA IV

Nº	Pêso (Kg)	Volume distrib. (l)	Volume distrib. (% do peso)	Coefficiente de eliminação (% min ⁻¹)	Volume intravascular (l)	Volume intravascular (%)	Volume extravascular (l)	Volume extravascular (%)
2	17,0	3,10	18,2	0,0813	1,41	8,29	1,68	9,9
3	6,9	1,97	28,6	0,0843	0,53	7,68	1,44	20,9
7	8,2	1,85	22,6	0,0813	0,79	9,63	1,07	13,0
9	13,2	2,84	21,5	0,0825	1,14	8,64	1,70	12,9
11	21,0	4,55	21,7	0,1110	1,57	7,48	2,98	14,2
14	11,0	2,92	26,7	0,0825	0,79	7,18	2,14	19,5
16	11,4	2,76	24,2	0,0875	0,74	6,50	2,02	17,7
19	8,6	1,94	22,6	0,0813	0,66	7,67	1,28	14,9
Média e desvio padrão		23,3 ± 3,2		0,0865 ± 0,0101	7,88 ± 0,96		15,4 ± 3,7	

Volumes de distribuição e ritmo de excreção da crotoxina para cães PROTEGIDOS.

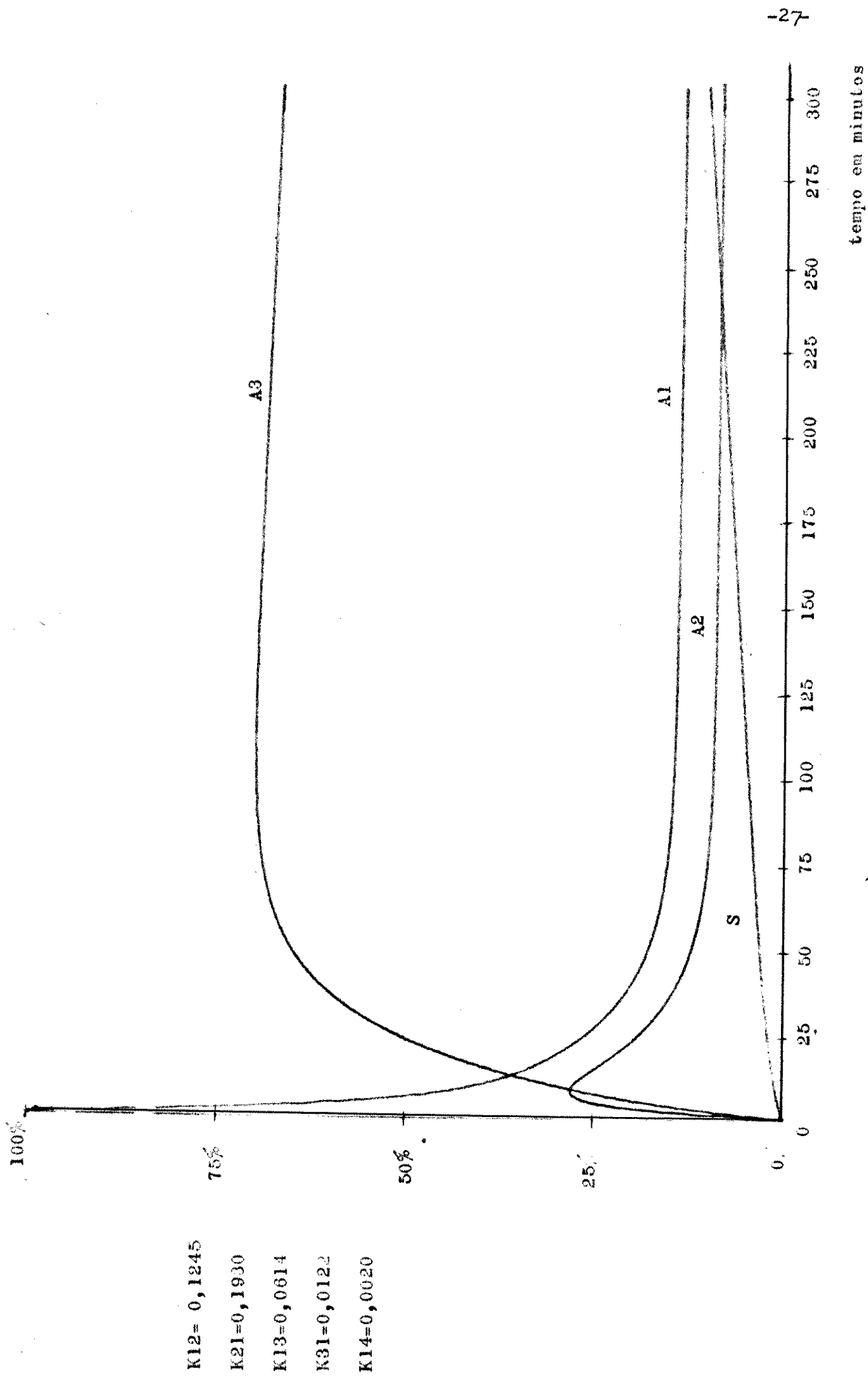


Figura 6 - Curvas do computador analógico para os compartimentos de cão NÃO PROTEGIDO. A₁, A₂, A₃ - representam os compartimentos 1, 2 e 3. S - representa a excreção.

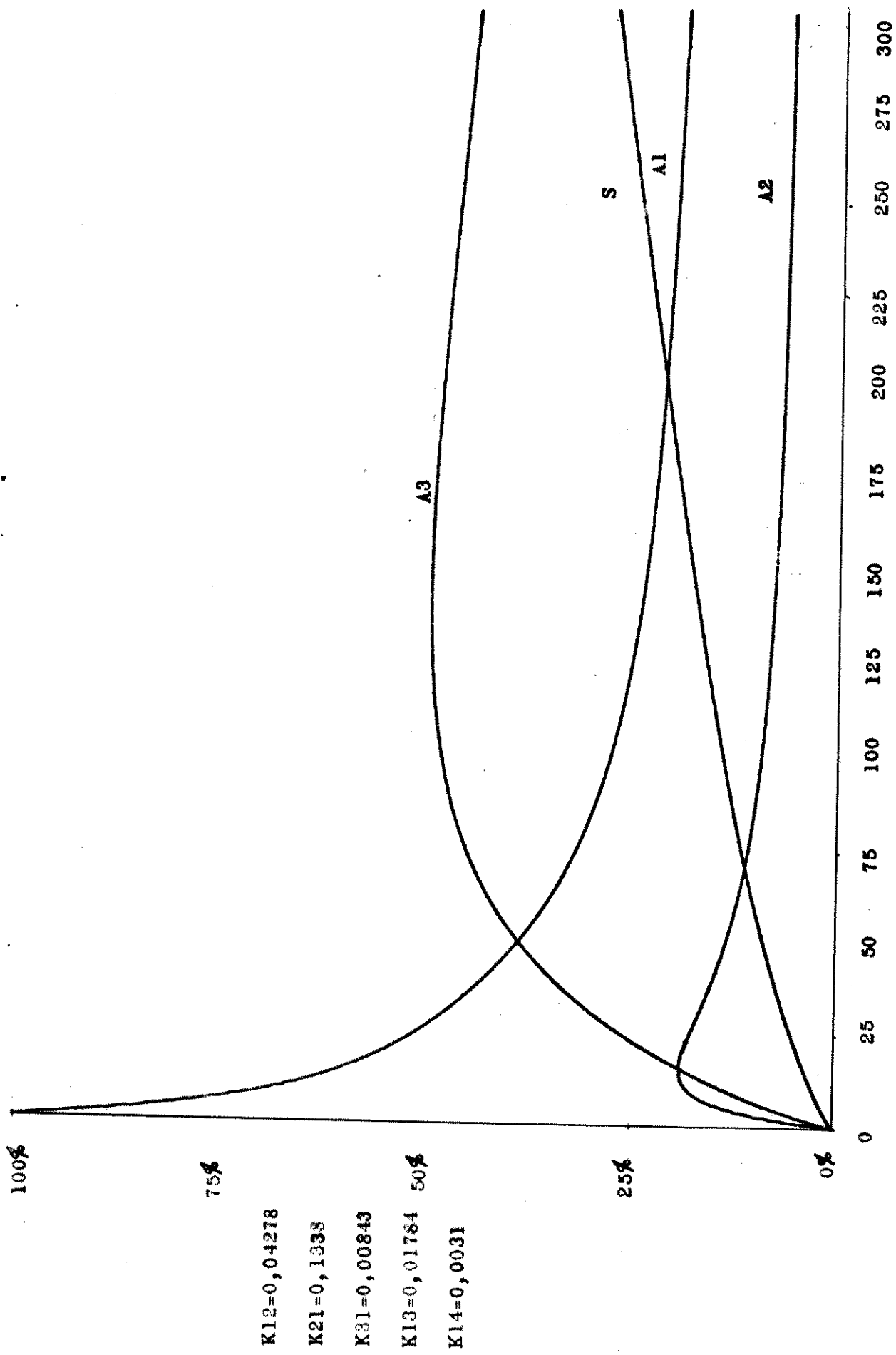


Figura 7 - Curvas do computador analógico para os compartimentos de cão PROTEGIDO. A₁, A₂, A₃ - representam os compartimentos 1, 2 e 3. S - representa a excreção.

TABELA V

Valores médios e respectivos desvios-padrão das constantes de transferência, de renovação e dos volumes dos compartimentos obtidos em cães NÃO PROTEGIDOS (n = 7)

Pêso Kg	10,60 ± 3,59	Kg
T 1/2 m	2633 ± 225	min.
T 1/2 n	15,28 ± 2,71	min.
T 1/2 p	2,38 ± 0,52	min.
k ₁₄	0,18 ± 0,09	%
k ₁₂	10,89 ± 1,06	%
k ₂₁	15,89 ± 4,06	%
k ₁₃	6,95 ± 2,31	%
k ₃₁	1,22 ± 0,25	%
v ₁	8,06 ± 1,10	%
v ₂	5,96 ± 2,01	%
v ₃	52,50 ± 10,34	%
v _T	66,51 ± 10,80	%
v _E	58,43 ± 11,00	%
λ_1	0,0263 ± 0,0028	%

TABELA VI

Valores médios e respectivos desvios-padrão das constantes de transferência, de renovação e dos volumes dos compartimentos, obtidos em cães PROTEGIDOS ($n = 3$)

Pêso Kg	9,20 $\pm$ 1,02	kg
T 1/2 m	922,00 $\pm$ 65,00	min.
T 1/2 n	30,50 $\pm$ 5,80	min.
T 1/2 p	3,80 $\pm$ 0,95	min.
k_{14}	0,31 $\pm$ 0,15	%
k_{12}	4,28 $\pm$ 0,43	%
k_{21}	13,38 $\pm$ 3,34	%
k_{13}	1,78 $\pm$ 0,49	%
k_{31}	0,34 $\pm$ 0,17	%
V_1	3,30 $\pm$ 1,66	%
V_2	2,70 $\pm$ 0,70	%
V_3	17,60 $\pm$ 5,16	%
V_T	23,60 $\pm$ 4,29	%
V_E	20,30 $\pm$ 3,99	%
α_1	0,034 $\pm$ 0,010	%

TABELA VII

Parâmetros fundamentais da cinética da crotoxina-¹³¹I, cujas diferenças são estatisticamente significantes.

Cães	V_2	V_3	V_T	V_E	∞
NÃO PROTEGIDO	$5,96 \pm 2,01$	$52,50 \pm 10,34$	$66,51 \pm 10,80$	$58,43 \pm 11,00$	$0,0263 \pm 0,0028$
PROTEGIDO	$2,7 \pm 0,70$	$17,60 \pm 5,16$	$28,60 \pm 4,29$	$20,30 \pm 3,99$	$0,0843 \pm 0,0100$
RELAÇÃO NÃO PROTEGIDO PROTEGIDO	2.20	2.93	2.32	2.97	0.31

Na tabela VIII pode ser verificada a comparação entre as quantidades de radioatividade eliminadas, determinadas quer através de cálculo, quer experimentalmente através da amostragem de urina.

A óbvia diferença de comportamento entre NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS é claramente verificada pelo cotejo das respectivas curvas de radioatividade sangüínea. A figura 8 traduz o exposto, através da comparação das curvas sangüíneas dos cães NÃO PROTEGIDO (nº 8) e PROTEGIDO (nº 3).

Comparando-se a evolução da radioatividade em função de tempo, calculada analiticamente para o compartimento 1 no mesmo animal e nas mesmas condições experimentais, com a observada experimentalmente, constatou-se a perfeita identidade dos andamentos. Isto é altamente sugestivo da validade do modelo, justificando assim sua escolha. Os dados correspondentes a esta comparação estão na tabela IX.

3. DISTRIBUIÇÃO DA CROTOXINA EM TECIDOS, ÓRGÃOS E HUMORES.

Nas tabelas X e XI acham-se os valores médios da concentração de crotoxina-¹³¹I, correspondentes aos cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS sacrificados entre 2 a 6 horas. Êsses valores são expressos em microgramas por mililitro ou por grama (mcg/ml ou g) e dizem respeito a cada um dos humores, órgãos e tecidos a mostrados.

Do cotejo dêsses dados relativos a NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS resultam, como significativamente diferentes ao nível de 5% os valores reunidos na figura 9. Como se verifica, no cão

TABELA VIII

Valores da radioatividade eliminada por um animal representativo
do grupo NÃO PROTEGIDO (nº 13)

Tempo em min.	Radioatividade eliminada (% da dose injetada)			
	ligada a crotoxina	Não ligada a proteínas	Total	
			Experimental	Calculada atraves de k_{14}
30	_____	_____	1,76	1,71
60	_____	_____	3,53	2,73
90	_____	_____	4,48	3,72
120	_____	_____	5,06	4,18
360	1,51	6,03	7,54	6,45

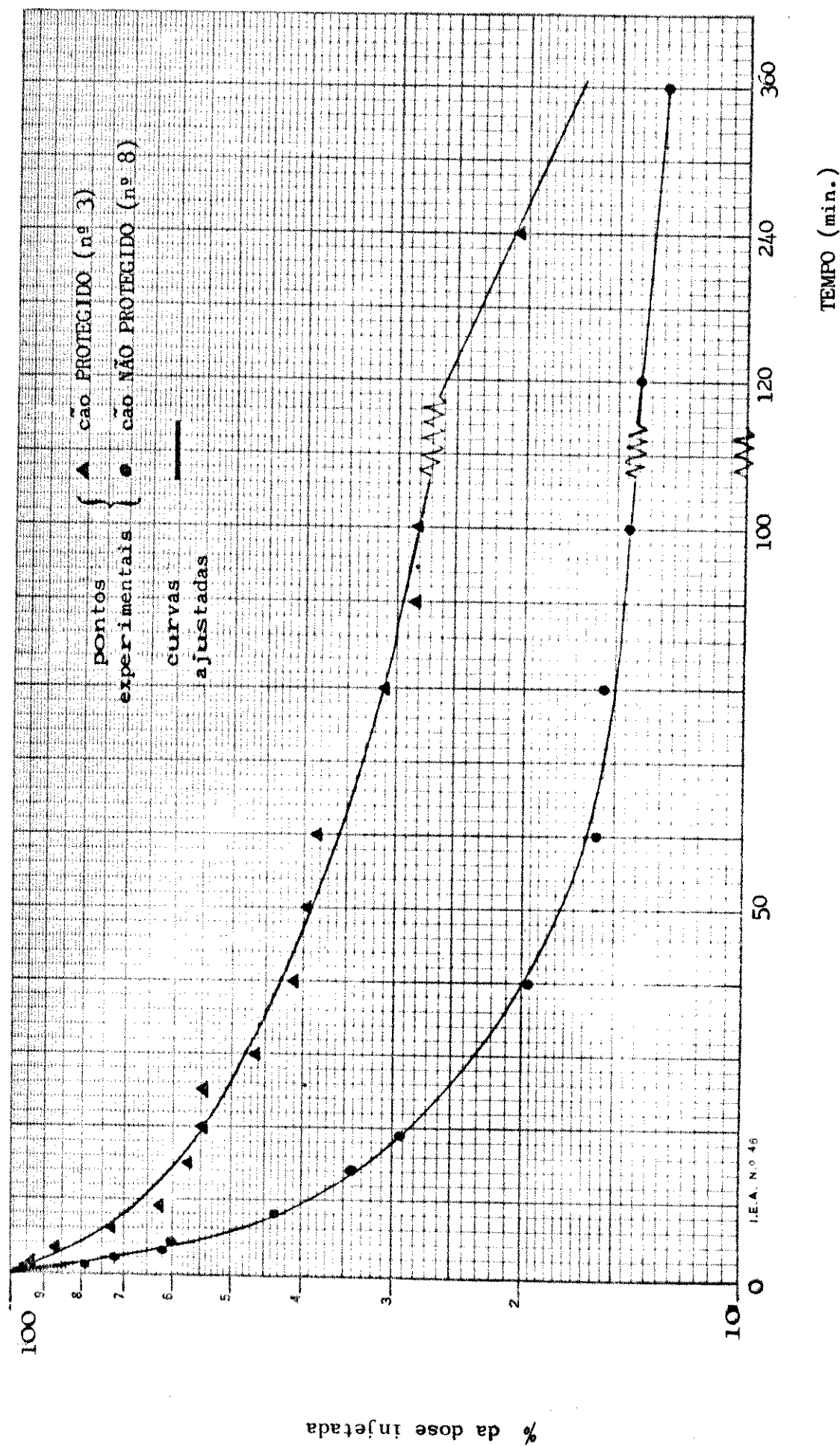


Figura 8 - Curvas típicas da radioatividade no sangue total em função do tempo, após administração intravenosa de crotoxina-¹³¹I a cães PROTEGIDO e NÃO PROTEGIDO com sôro anticrotálico.

Comparação entre os valores experimentais e os valores teóricos calculados pelo computador e os respectivos desvios percentuais.

NÃO PROTEGIDO (nº 8)				PROTEGIDO (nº 3)			
Tempo em min.	Valores em % da dose total		Desvio (%)	Tempo em min.	Valores em % da dose total		Desvio (%)
	Experi-mental	Calculado			Experi-mental	Calculado	
0,5	96,37	91,31	5,54	1,0	94,09	94,09	0,00
1,0	79,02	83,90	-5,81	3,0	86,31	84,65	1,96
2,0	71,82	72,11	-0,40	6,0	72,67	74,68	-2,69
3,0	62,26	63,38	-1,77	15,0	57,31	59,28	-3,33
4,0	60,23	50,84	5,95	20,0	54,81	54,58	0,42
8,0	43,50	42,49	2,38	25,0	54,37	50,92	6,77
14,0	34,13	33,70	1,26	30,0	46,46	47,87	-2,95
19,0	29,29	29,45	-0,54	40,0	40,98	42,89	-4,45
40,0	19,72	19,95	-1,18	50,0	39,62	38,95	1,73
60,0	15,83	16,43	-3,63	60,0	38,26	35,78	6,94
80,0	15,46	14,98	3,19	80,0	31,08	31,13	-0,17
100,0	14,37	14,36	0,06	90,0	28,33	29,43	-3,74
120,0	13,89	14,06	-1,19	100,0	28,05	28,04	0,02
300,0	13,21	13,21	0,00	240,0	20,67	20,95	-1,34
360,0	12,98	12,98	0,00	300,0	19,78	19,78	0,00
Soma dos desvios			3,86	Soma dos desvios			-0,83

PROTEGIDO as concentrações sangüínea e esplênica são mais elevadas, enquanto se encontram diminuídas as concentrações nos tecidos renal e muscular (tibial anterior e diafragma).

A radioatividade presente no líquido céfalo-raquidiano e no cérebro é muito baixa tanto em cães PROJETADOS como nos NÃO PROTEGIDOS, não havendo diferenças significativas entre as médias obtidas em um e outro caso (vide apêndice, tabela 9).

A radioatividade existente na saliva e na bile (vide apêndice, tabelas 11 e 12), corre muito provavelmente por conta de iôdo livre e não de crotoxina-¹³¹I. Este fato pode ser verificado "contando-se" as amostras antes e após diálise prolongada (48 horas) contra água destilada.

TABELA X

Valôres em mcg/ml ou g calculados em função da atividade específica injetada, presentes em 1 g ou 1 ml do material retirado de cães NÃO PROTE
GIDOS.

Órgãos	Nº de experiências	Média	Desvio padrão
Sangue	16	0,358	0,069
Rim	11	1,747	1,060
Baço	12	0,436	2,286
Pulmão	12	0,759	0,619
Fígado	12	0,964	0,214
Coração	6	0,215	0,223
Músculo tibial- anterior	6	0,031	0,010
Músculo diafragma	7	0,129	0,173
Gânglios mesenté- ricos (linfáticos)	7	0,271	0,124
Cérebro	5	0,009	0,011
Líquor	8	0,009	0,007

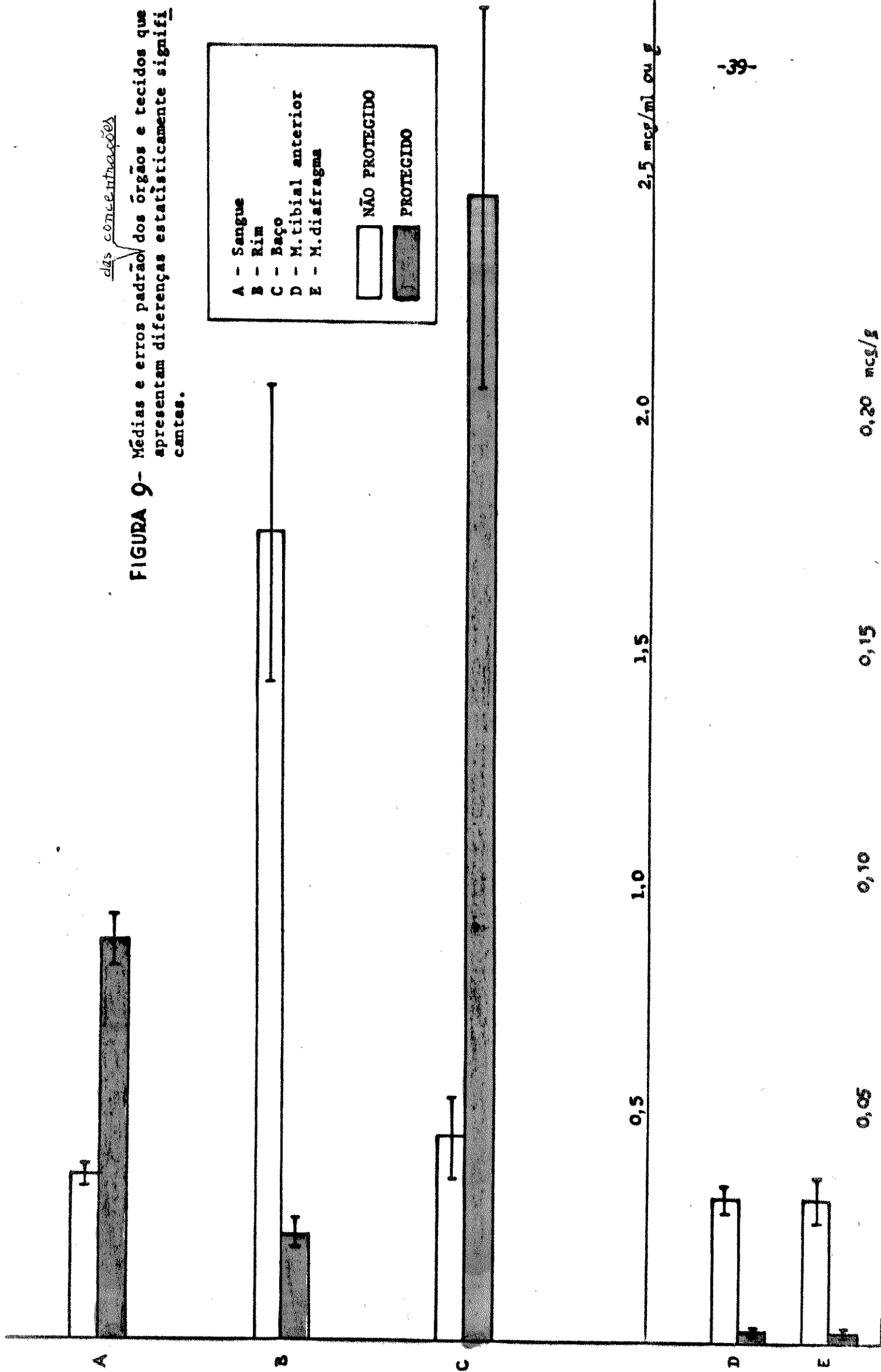
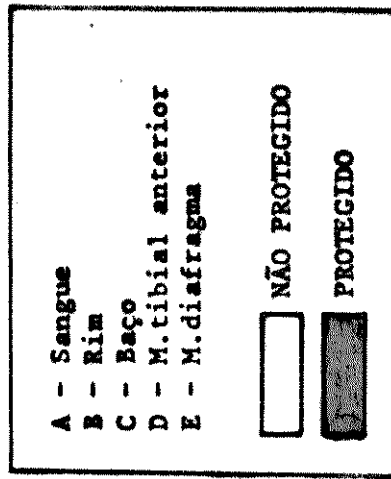
TABELA X I

Valôres em mcg/ml ou g calculados em função da atividade específica injetada, presentes em 1 g ou 1 ml do material retirado de cães PROTEGIDOS.

Órgãos	Nº de experiências	Média	Desvio padrão
Sangue	10	0,868	0,175
Rim	8	0,233	0,105
Baço	8	2,475	1,349
Pulmão	7	0,318	0,210
Fígado	7	1,502	0,519
Coração	2	0,064	0,014
Músculo tibial anterior	5	0,0022	0,0007
Músculo diafragma	3	0,0019	0,0007
Gânglios mesentéricos (linfáticos)	6	0,212	0,151
Cérebro	3	0,0025	0,0077
Líquor	3	0,0072	0,0034

dás concentrações

FIGURA 9- Médias e erros padrão dos órgãos e tecidos que apresentam diferenças estatisticamente significantes.



DISCUSSÃO

O fulcro dêste trabalho é a premissa de que a crotoxina marcada com ^{131}I seja efetivamente traçador adequado da crotoxina não marcada, ou seja, de que seu comportamento biológico espelhe fielmente o da proteína que não sofreu qualquer tratamento radioativo.

Para se presumir da identidade de comportamento quanto à distribuição parece suficiente referir as seguintes comprovações:

1. identidade de comportamento eletroforético;
2. identidade de comportamento químico, face a reagentes precipitantes;
3. identidade de toxidez;
4. identidade de ações farmacológicas.⁽⁶⁾

A análise gráfica a que foram submetidas as curvas de radioatividade sangüínea em função de tempo em ambos os grupos de cães estudados levou a aceitá-las como funções satisfeitas pela soma de três termos exponenciais. A êstes devem corresponder, portanto, um igual número de compartimentos da fase ("pool") crotoxina. (24, 25)

Dos modelos de três compartimentos escolheu-se o da figura 5. Nêste, o compartimento 1 é o de introdução e amostragem do traçador e os 2 e 3 são compartimentos que equilibram com

o primeiro, decorrido um certo tempo. Este modelo é estruturalmente igual tanto para cães NÃO PROTEGIDOS como para PROTEGIDOS, divergindo apenas, nos dois grupos, em suas características dinâmicas.

O compartimento 1 pode facilmente ser identificado com o espaço intravascular, uma vez que nele se introduziu a toxina cujo peso molecular é suficientemente elevado (P.M. 30.000), para se poder presumir que não abandone este território com a rapidez de um eletrólito.

Os compartimentos 2 e 3 representam o espaço de distribuição extravascular da crotoxina. O volume total de sua distribuição (V_T), tem valor medio de 67,5% da massa corpórea no caso dos cães NÃO PROTEGIDOS.

Analisando-se os valores correspondentes aos compartimentos 1, 2 e 3 nos cães NÃO PROTEGIDOS (Tabela V) verifica-se que a soma de V_1 e V_2 representa aproximadamente 25% do valor de V_T , o que poderia equivaler ao espaço extracelular. Enquanto que o volume do compartimento 3 (V_3) poderia representar a crotoxina-¹³¹I firmemente ligada a estruturas celulares. A possibilidade de V_3 representar o espaço intra-celular parece estar excluída, por quanto, sendo a crotoxina desprovida de lipossolubilidade, dificilmente poder-se-ia admitir sua passagem através das membranas celulares. Corrobora esta dedução a verificação experimental de que a crotoxina não atravessa a barreira hemoliquórica.

Examinando-se os valores das concentrações de crotoxina nos órgãos e tecidos de animais NÃO PROTEGIDOS (Tabela X), verifica-se haver concentrações importantes naqueles altamente celulares e nos músculos.

Esta interpretação anatômica dos espaços cinéticos,

resultantes do estudo da dinâmica da crotoxina marcada, acha-se de acordo com os fatos conhecidos, ligados ao seu próprio efeito farmacológico, ou seja, de que é ao nível das placas terminais e das células dos túbulos renais que se exercem preponderantemente as ações desta toxina.

Analisando-se a curva sanglínea e especialmente, a reconstrução analógica da variação da radioatividade em função de tempo nos três compartimentos (Figuras 6 e 7), torna-se evidente que o equilíbrio de distribuição é obtido por volta de 120-150 minutos.

A crotoxina, nos animais NÃO PROTEGIDOS, é removida de sua fase, segundo um ritmo que é, em média, de 0,027% da massa total por minuto, ou seja em 44 horas 50% da crotoxina foi removida do organismo. É interessante referir que 48 horas após a administração venosa de crotoxina em doses de 200-250 mg/Kg a paralisia, regra geral, acha-se em franca regressão.

A sede do processo de remoção da crotoxina, ainda n determinada, deve situar-se em algum lugar que, dinamicamente, se identifica com o espaço intravascular, uma vez que o modelo a ceito e confirmado, até o limite compatível com a capacidade de metodologia empregada, exige esta identificação (ritmo de remoção k_{14}). Isto não significa que o "catabolismo" seja intravascular, mas exige que o mesmo se dê em "sítio" tão próximo do in travascular, para, dinamicamente, portar-se como se aí estivesse localizado.

A existência de atividade tóxica da urina eliminada pelos cães NÃO PROTEGIDOS, estimada em cerca de 1,5% da dose de crotoxina-¹³¹I administrada, mostra que, da radioatividade total eliminada por esta via (em média 20% da dose em 6 horas) aproximadamente 80% deve ser representada por iôdo livre ou seja, por

radioiôdo oriundo presumivelmente da degradação metabólica da molécula da crotoxina marcada.

A fração da dose eliminada pela urina, correspondente à crotoxina metabolizada é da mesma ordem de grandeza da calculada pelo ritmo de transferência k_{14} (6,4% e 7,5% respectivamente).

Da análise dos dados relativos aos animais PROTEGIDOS, verifica-se que, do ponto de vista compartimental, não houve qualquer alteração. O mesmo modelo cinético aplica-se, pois, a ambos os grupos de animais, com as mesmas consequências dinâmicas gerais.

A diferença fundamental no comportamento dos dois grupos assenta-se nas divergências apontadas pela tabela VII onde se registram os valores numéricos significativamente diferentes.

Chama desde logo a atenção a diversidade do espaço global de distribuição (V_T), ou seja, a fase crotoxina dos PROTEGIDOS é significativamente menor, por um fator da ordem 2,3. Pode verificar-se que esta diminuição se deu quase que exclusivamente à custa da diminuição do compartimento 3. Com efeito, enquanto a soma de V_1 e V_2 diminui por fator de apenas 1,2 (de 13 para 11), V_3 decresceu no PROTEGIDO por um fator de 2,98 (de 52,5 para 17,6). Houve, pois, considerável redução do espaço correspondente ao compartimento 3. Como corolário dessa diversa distribuição dever-se-ão encontrar, no caso dos PROTEGIDOS, valores de concentração radioativa muito mais baixos nos órgãos representativos da maior porção da massa corpórea.

Realmente foi o que se observou nas concentrações da radioatividade dos músculos que se reduziram a valores da ordem de 1/10. Este achado leva a aceitar a hipótese de que a

crotoxina não logra distribuir-se aos territórios críticos (músculos e rins) em concentrações suficientes para que seus efeitos se observem quando da prévia administração de soro anticrotálico em quantidades suficientes.

Analisando, por outro lado, o ritmo de remoção de crotoxina em cães PROTEGIDOS, verifica-se que o mesmo se acelerou alcançando valor (Tabela VII) cerca de três vezes maior que o do NÃO PROTEGIDOS (0,026 para 0,084). Uma mudança de ritmo tão significativa deve, supostamente, estar ligada a outro tipo de processo como responsável pela remoção da crotoxina. Realmente, formando o antiveneno crotálico com a crotoxina complexo molecular (macromolécula), pode admitir-se, para este, um mecanismo de remoção diretamente ligado à ação fagocitária do sistema retículo endotelial.

Uma sugestiva evidência dessa interpretação é fornecida pelos valores de concentração radioativa em determinados órgãos dos animais PROTEGIDOS. Com efeito, se se comparar (Figura 9) os dados relativos ao baço, órgão particularmente rico em sistema retículo-endotelial, de cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS, verifica-se que a concentração no baço dos últimos subiu na proporção de 5,7 vezes. Isto atesta o incremento de um fenômeno de seqüestração, que bem poderia ser o responsável pelo aumento do ritmo de remoção da crotoxina complexada.

Os valores da concentração sanguínea devem, obviamente, apresentar-se elevados nos animais PROTEGIDOS, uma vez que o complexo toxina-antitoxina, não podendo difundir-se ao espaço ^(VE) crotoxina, permanece represado no intravascular.

Os dados relativos à concentração radioativa em humores e órgãos, permite abordar um aspecto muito importante da farmacologia da crotoxina. Aceita-se com base no estudo farmaco-

logico das ações da crotoxina que os efeitos motores estejam li
gados tão somente à ação desta toxina sobre as placas terminais
da junção neuromuscular e não sobre o sistema nervoso central. A
conclusões analogas poder-se-ia chegar em vista da extremamente
baixa concentração radioativa verificada no cerebro e liquido ce
falo-raquidiano dos animais NÃO PROTEGIDOS. Por outro lado, os va
lores nos tecidos nervosos centrais e no liquor não diferiram em
ambos os grupos de cães, conservando-se extremamente baixos.

CONCLUSÕES

1. A cinética da crotoxina é adequadamente representada, nos animais não tratados e nos protegidos com sôro anticrotálico, por um modelo cinético representado por uma fase tricompartimentalizada.

2. Os compartimentos em que se subdivide a fase ("pool") crotoxina podem assim ser identificados: compartimento 1, espaço intravascular, que, unido ao 2, corresponde presumivelmente ao espaço extracelular; o compartimento 3, representa possivelmente o espaço coberto pelas estruturas celulares a nível das quais a crotoxina-¹³¹I se fixa firmemente.

3. A crotoxina é removida do animal NÃO PROTEGIDO segundo um ritmo equivalente a cerca de 38,8% da massa total por dia.

4. A distribuição da concentração radioativa em humores, órgãos e tecidos reforça o conceito de que a ação periférica da crotoxina esteja ligada à sua concentração ao nível dos tecidos musculares.

5. Os rins de cães NÃO PROTEGIDOS foram os órgãos que apresentaram maior concentração de crotoxina, justificando provavelmente as lesões degenerativas e necróticas descritas.

6. A crotoxina não atravessa a barreira hemoliquó

rica, nem a hemoencefálica, pelo menos no período de tempo co
berto pela experiência (6 horas).

7. A prévia administração de sôro anticrotálico a
cães determina profundas alterações da dinâmica e da distribu
ição da crotoxina, caracterizadas pela diminuição do compar
timento 3, aumento do ritmo de remoção que provavelmente pas
sa a depender de um incremento do mecanismo fagocitário e di
minuição altamente significativa da concentração da radioati
vidade ao nível das células musculares, sede da ação perifé
rica da crotoxina e ao nível das células renais.

R E S U M O

A finalidade do presente trabalho foi investigar a cinética e distribuição, em cães, da crotoxina, principal fração da peçonha de Crotalus durissus terrificus. Para tanto a crotoxina foi radioiodada, usando-se o ^{131}ICl . O comportamento eletroforético, químico e biológico da crotoxina ^{131}I foi idêntico ao da não marcada, podendo-se presumir que esse traçador espelhe fielmente o comportamento da proteína que não sofreu qualquer tratamento radioativo.

Um modelo de três compartimentos foi escolhido e testado para o estudo da cinética da crotoxina. O compartimento 1 foi identificado como sendo o intravascular que, unido ao 2, representa presumivelmente o espaço extracelular. O compartimento 3 representa provavelmente o espaço coberto pela porção celular que fixa firmemente a crotoxina.

O ritmo de remoção da crotoxina calculado, para NÃO PROTEGIDOS, através de α_1 e o determinado experimentalmente através da amostragem de urina são da mesma ordem de grandeza e correspondem a aproximadamente 38,8% da massa total injetada por dia ($T_{1/2} = 2.633$ min.).

As concentrações de crotoxina- ^{131}I relativamente altas existente nos músculos e extremamente baixas no líquido e cérebro corroboram a hipótese de uma ação periférica para a crotoxina.

Os rins foram os órgãos que apresentaram, no caso dos NÃO PROTEGIDOS, maior concentração de radioatividade.

Isto parece justificar as lesões degenerativas e necróticas das células renais que a crotoxina causa.

A administração prévia de sôro anticrotálico altera profundamente a distribuição da crotoxina. Um modêlo tricompartimentalizado se ajusta aos dados experimentais tam bém para êsses animais (PROTEGIDOS).

Há redução do volume do compartimento 3 e aumento significativo da excreção (3 vezes maior), sendo o $T_{1/2}$ igual a 822 minutos. Parece haver um incremento da fagocitose quando se forma o complexo toxina-antitoxina. Êste fato é atestado pela presença de altas concentrações no baço de cães PROTEGIDOS.

A concentração da radioatividade presente nos rins dêsses animais sofreu uma redução de 7,6 vezes.

Parece que as informações obtidas confirmam as conclusões do estudo sôbre a ação farmacodinâmica da crotoxina e poderão possivelmente trazer esclarecimentos úteis para a terapêutica dos acidentes causados por picada de cascavel.

A P Ê N D I C E

As curvas representativas da evolução no tempo da concentração radioativa (atividade por unidade de volume) sanguínea, ajustam-se a uma função composta por uma combinação linear de três termos exponenciais.

Tal fato sugere um modelo cinético constituído por três compartimentos ⁽²⁴⁾, conforme esquematizado na figura 5.

A variação no tempo de concentração radioativa nos diversos compartimentos e em uma fase de eliminação ou acúmulo, é regida pelas equações diferenciais:

$$\frac{dA_1}{dt} = - (K_{12} + K_{13} + K_{14}) A_1 + K_{21} A_2 + K_{31} A_3$$

$$\frac{dA_2}{dt} = + K_{12} A_1 + K_{21} A_2$$

$$\frac{dA_3}{dt} = + K_{13} A_1 + K_{31} A_3$$

$$\frac{dS}{dt} = K_{14} A_1$$

onde: A_1 , A_2 , A_3 e S , representam as atividades por unidade de volume, respectivamente, nos compartimentos 1, 2 e 3 e na fase de eliminação;

K_{12} -representa a fração da radioatividade presente no compartimento 1 que é transferida ao compartimento 2, na unidade de tempo e é denominado coeficiente de transferência;

K_{21} -coeficiente de transferência do compartimento 2 ao compartimento 1;

K_{13} -idem, do compartimento 1 ao 3;

K_{31} -idem, do compartimento 3 ao 1;

K_{14} -representa a fração da radioatividade presente no compartimento 1 que é removida do sistema com caráter irreversível (catabolismo), na unidade de tempo.

O sistema de equações diferenciais lineares pode ser resolvido pelo método proposto por RESCIGNO (29,30), ou seja, através do emprego de transformadas de Laplace.

MATTEWS (28), empregou tal método e expressou, sob forma explícita, as equações resultantes da variação da concentração radioativa em quaisquer compartimentos e em uma fase de eliminação ou acúmulo (S), como se segue:

$$A_1 = M_1 e^{-\alpha_1 t} + N_1 e^{-\alpha_2 t} + P_1 e^{-\alpha_3 t}$$

$$A_2 = M_2 e^{-\alpha_1 t} + N_2 e^{-\alpha_2 t} + P_2 e^{-\alpha_3 t}$$

$$A_3 = M_3 e^{-\alpha_1 t} + N_3 e^{-\alpha_2 t} + P_3 e^{-\alpha_3 t}$$

$$S = M_4 e^{-\alpha_1 t} + N_4 e^{-\alpha_2 t} + P_4 e^{-\alpha_3 t}$$

havendo as seguintes relações entre os diversos parâmetros:

$$K_{14} = \frac{\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3}{M_1 \alpha_2 \alpha_3 + N_1 \alpha_1 \alpha_3 + P_1 \alpha_1 \alpha_2}$$

$$\Delta = \left[M_1 (\alpha_3 - \alpha_1) + N_1 (\alpha_3 - \alpha_2) + \alpha_1 - \alpha_2 \right]^2 + 4N_1 (\alpha_2 - \alpha_1) (\alpha_3 - \alpha_2)$$

$$K_{21} = \frac{1}{2} \left[M_1 (\alpha_3 - \alpha_1) + N_1 (\alpha_3 - \alpha_2) + \alpha_1 + \alpha_2 + \sqrt{\Delta} \right]$$

$$K_{31} = \frac{1}{2} \left[M_1 (\alpha_3 - \alpha_1) + N_1 (\alpha_3 - \alpha_2) + \alpha_1 + \alpha_2 - \sqrt{\Delta} \right]$$

$$K_{12} = \frac{(K_{21} - \alpha_1) (K_{21} - \alpha_2) (K_{21} - \alpha_3)}{K_{21} (K_{31} - K_{21})}$$

$$K_{13} = \frac{(K_{31} - \alpha_1) (K_{31} - \alpha_2) (K_{31} - \alpha_3)}{K_{31} (K_{21} - K_{31})}$$

Os volumes dos compartimentos são calculados pelas relações:

$$V_1 = \frac{A_{t_0}}{M_1 + N_1 + P_1} = \frac{A_{t_0}}{C_0}$$

$$V_2 = \frac{K_{12}}{K_{21}} V_1$$

$$V_3 = \frac{K_{13}}{K_{31}} V_1$$

onde: A_{t_0} é a atividade total administrada; C_0 é a concentração radioativa sanguínea no instante zero.

O cálculo de V_1 está baseado na metodologia de diluição de isótopos (23), e o de V_2 e V_3 é resultante da condição de equilíbrio dinâmico.

O volume de distribuição (volume total V_t), pode ser determinado simplesmente, pela soma dos volumes parciais, ou diretamente por:

$$V_t = \frac{A_{t_0}}{M_1}$$

onde M_1 é o coeficiente do termo exponencial correspondente ao semi-período mais longo.

S A N G U E

Valores individuais para amostras de sangue colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por ml de sangue e o equivalente à crotoxina em (mcg/ml) micrograma por mili litro para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/ml	mcg/ml	% da dose injetada/ml	mcg/ml
2,0	0,0210	0,453	0,0260	1,110
2,0	0,0166	0,325	0,0322	1,061
2,0	0,0160	0,406		
2,5	0,0130	0,250	0,0489	1,003
2,5	0,0130	0,242	0,0500	1,000
3,0	0,0160	0,443	0,0430	0,924
3,0	0,0147	0,386	0,2950	0,641
3,0	0,0110	0,369		
3,0	0,0241	0,451		
4,0	0,0074	0,298	0,0410	0,713
4,0	0,0116	0,393		
4,0	0,0110	0,289		
5,0	0,0100	0,420	0,0158	0,828
5,0			0,0201	0,629
5,5			0,0271	0,772
6,0	0,0160	0,329		
6,0	0,0084	0,386		
6,0	0,0168	0,294		
Média	0,358 $\pm$ 0,069 mcg/ml		0,868 $\pm$ 0,175 mcg/ml	
Até 3 horas	0,369 $\pm$ 0,081 mcg/ml		0,956 $\pm$ 0,166 mcg/ml	
Mais de 3 horas	0,344 $\pm$ 0,054 mcg/ml		0,735 $\pm$ 0,085 mcg/ml	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (análise de variância)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Entre grupos	1	1,599	1,599	26,70*
Entre tempos (dentro grupo)	2	0,120	0,060	5,61*
Entre animais (dentro tempos dentro grupos)	22	0,235	0,011	
Total	25	1,954		

* Significante a nível de 5%.

R I M

Valores individuais para amostras de rim colhidas no momento do sa
crifício (horas). São expressos em % da dose injetada por grama de
ôrgão e em equivalente à concentração de crotoxina-¹³¹ em microgra
mas por grama (mcg/g), para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/g	mcg/g	% da dose injetada/g	mcg/g
2,0	0,1970	4,178	0,0031	0,134
2,0	0,0560	1,095	0,0076	0,250
2,5	0,0450	0,860	0,0216	0,444
2,5	0,1210	2,317		
3,0	0,0340	0,967	0,0065	0,139
3,0	0,0360	0,945		
4,0	0,0460	1,860	0,0110	0,189
4,0	0,0790	2,071		
5,0	0,0300	1,200	0,0063	0,329
5,0	—	—	0,0067	0,211
5,5	—	—	0,0059	0,169
6,0	0,0550	1,105	—	—
6,0	0,0580	2,616	—	—
Média geral	1,747 $\pm$ 1,060 mcg/g		0,233 $\pm$ 0,105 mcg/g	
Ate 3 horas	1,727 $\pm$ 1,315 mcg/g		0,242 $\pm$ 0,143 mcg/g	
Mais de 3 horas	1,770 $\pm$ 0,628 mcg/g		0,224 $\pm$ 0,070 mcg/g	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (análise de variância)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Entre grupos	1	10,614	10,614	3,695*
Entre tempos (dentro grupo)	2	0,006	0,003	
Entre animais (dentro tempos dentro grupos)	15	10,356	0,690	
Total	18	20,976		

* Significante a nível de 5%.

TABELA 3

F Í G A D O

-55-

Valores individuais para amostras de fígado colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por grama de órgão e em equivalente à concentração de crotoxina-¹³¹I em microgramas por grama (mcg/g), para cães NÃO PROTEGIDOS E PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/g	mcg/g	% da dose injetada/g	mcg/g
2,0	0,034	0,729	0,0219	0,930
2,0	0,046	0,905	0,0251	0,827
2,5	0,047	0,905	0,0850	1,746
2,5	0,043	0,822		
3,0	0,031	0,869	0,0525	1,128
3,0	0,031	0,840		
4,0	0,023	0,928	0,0799	1,378
4,0	0,028	0,943		
4,0	0,030	0,778		
5,0	0,027	1,102	0,0344	1,807
5,5			0,0494	1,904
6,0	0,070	1,397		
6,0	0,030	1,356		
Média geral	0,964 ± 0,214 mcg/g		1,502 ± 0,519 mcg/g	
Até 3 horas	0,845 ± 0,066 mcg/g		1,158 ± 0,412 mcg/g	
Mais de 3 horas	1,084 ± 0,249 mcg/g		1,846 ± 0,376 mcg/g	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (análise de variância)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Entre grupos	1	1,387	1,387	2,160
Entre tempos (dentro grupo)	2	1,285	0,642	9,331 *
Entre animais (dentro tempos dentro grupos)	16	1,101	0,069	
Total	19	3,773		

* Significante a nível de 5%.

B A Ç O

Valores individuais para amostras de baço colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por grama de órgão e em equivalente a concentração de crotoxina-¹³¹I em micrograma por grama (mcg/g), para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/g	mcg/g	% da dose injetada/g	mcg/g
2,0	0,0160	0,352	0,0235	1,000
2,0	0,0170	0,341	0,0535	1,766
2,5	0,1200	0,237	0,2510	5,156
2,5	0,0220	0,428		
3,0	0,0130	0,356	0,0970	2,085
3,0	0,0110	0,294		
4,0	0,0140	0,562	0,1077	1,858
4,0	0,0150	0,496		
4,0	0,0070	0,173		
5,0	0,0060	0,240	0,0711	3,736
5,0			0,0897	1,609
5,5			0,0673	2,589
6,0	0,0630	1,265		
6,0	0,0110	0,490		
Media geral	0,436 $\pm$ 0,286 mcg/g		2,475 $\pm$ 1,349 mcg/g	
Até 3 horas	0,335 $\pm$ 0,064 mcg/g		2,501 $\pm$ 1,827 mcg/g	
Mais de 3 horas	0,538 $\pm$ 0,388 mcg/g		2,448 $\pm$ 0,955 mcg/g	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (análise de variância)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Entre grupos	1	19,951	19,951	311,7*
Entre tempos (dentro grupo)	2	0,128	0,064	
Entre animais (dentre tempos dentre grupos)	16	13,534	0,846	
Total	19	33,613		

* Significante a nível de 5%.

Valores individuais para amostras de pulmão colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por grama de órgão e em equivalente à concentração de crotoxina-¹³¹I em micrograma por grama (mcg/g), para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/g	mcg/g	% da dose injetada/g	mcg/g
2,0	0,0200	0,431	0,0034	0,148
2,0	0,0150	0,300	0,0157	0,518
2,5	0,0560	0,868	—	—
2,5	0,0200	0,386	—	—
3,0	0,0205	0,555	0,0142	0,306
3,0	0,0203	0,525	—	—
4,0	0,0250	1,035	0,0125	0,215
4,0	0,0170	0,562	—	—
4,0	0,0120	0,313	—	—
5,0	—	0,905	0,0017	0,092
5,0	—	—	0,0171	0,652
5,5	—	—	0,0076	0,294
6,0	0,1290	2,580	—	—
6,0	0,0140	0,652	—	—

Média geral	0,759 ± 0,619 mcg/g	0,318 ± 0,210 mcg/g
Até 3 horas	0,511 ± 0,198 mcg/g	0,324 ± 0,186 mcg/g
Mais de 3 horas	1,008 ± 0,811 mcg/g	0,313 ± 0,240 mcg/g

ANÁLISE ESTATÍSTICA (análise de variância)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Entre grupos	1	0,862	0,862	2,323
Entre tempos (dentro grupo)	2	0,741	0,371	1,490
Entre animais (dentro tempos dentro grupos)	15	3,729	0,249	
Total	18	5,332		

TABELA 6
MÚSCULO

Valores individuais para amostras de músculo colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por grama de órgão e em equivalente a concentração de crotoxina-131I (mcg/g) para NÃO PROTEGIDO e PROTEGIDO.

Horas	NÃO PROTEGIDO			PROTEGIDO		
	Tibial anterior mcg/g	Diafragma mcg/g		Tibial anterior mcg/g	Diafragma mcg/g	
2,0	0,035	—		0,0009	0,0010	
2,5	0,030	0,042		—	—	
3,0	0,043	0,026		0,0024	0,0018	
3,0	0,021	0,016		—	—	
4,0	0,042	—		—	—	
4,0	0,014	0,014		—	—	
5,0	—	0,034		0,0029	—	
5,0	—	—		0,0021	—	
5,5	—	—		0,0030	0,0029	
6,0	—	0,064		—	—	
6,0	—	0,025		—	—	
Média geral	0,031 ± 0,010 mcg/g	0,031 ± 0,017 mcg/g		0,0022 ± 0,0007 mcg/g	0,0019 ± 0,0007 mcg/g	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t de "Student")

Comparação entre as médias para o tibial anterior dos NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS. $t = 5,550^*$

Comparação entre as médias para o diafragma dos NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS. $t = 2,91^*$

* Diferença ~~para~~ significativa a nível de 5%.

TABELA 7

C O R A Ç ã O

Valores individuais para amostras de coração colhidas no momento do sacrifício (hora). São expressos em % da dose injetada por grama de órgão e em equivalente à concentração de crotoxina-¹³¹I em micrograma por grama (mcg/g), para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/g	mcg/g	% da dose injetada/g	mcg/g
2,5	0,0350	0,667	_____	_____
3,0	0,0050	0,153	_____	_____
3,0	0,0030	0,092	_____	_____
4,0	0,0030	0,088	_____	_____
5,0	0,0030	0,133	0,0015	0,048
5,5	_____	_____	0,0020	0,080
6,0	0,0080	0,157	_____	_____
Média geral	0,215 ± 0,123 mcg/g		0,0640 ± 0,0141 mcg/g	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t de "Student")

$$t = 0,834$$

Diferença não significativa a nível de 5%.

C É R E B R O

Valores individuais para amostras de cérebro colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por grama de órgão e em equivalente à concentração de crotoxina-¹³¹I em micrograma por grama (mcg/g), para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/g	mcg/g	% da dose injetada/g	mcg/g
2,0	0,00002	0,0003	0,00001	0,0003
2,5	0,00050	0,0105	_____	_____
3,0	0,00030	0,0030	_____	_____
3,0	0,00020	0,0050	0,00010	0,0021
5,0	_____	_____	0,00010	0,0050
6,0	0,00010	0,0040	_____	_____
Média geral	0,0045 $\pm$ 0,0037 mcg/g		0,0025 $\pm$ 0,0023 mcg/g	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t de "Student")

$$t = 0,721$$

Diferença não significativa a nível de 5%.

TABELA 9

L Í Q U O R

Valores individuais para amostras de líquido colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por mililitro de humor e em equivalente à concentração de crotoxina-¹³¹I em mililitro (mcg/ml), para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/ml	mcg/ml	% da dose injetada/ml	mcg/ml
2,0	_____	_____	0,000038	0,00082
3,0	0,00046	0,0130	_____	_____
3,0	0,00003	0,0007	_____	_____
3,0	0,00035	0,0118	_____	_____
3,0	0,00021	0,0040	_____	_____
4,0	0,00067	0,0227	_____	_____
4,0	0,00018	0,0046	_____	_____
5,0	_____	_____	0,000134	0,00700
5,5	_____	_____	0,000274	0,00640
6,0	0,00025	0,0115	_____	_____
6,0	0,00015	0,0030	_____	_____
Média geral	0,0089 ± 0,0072 mcg/ml		0,0072 ± 0,0034 mcg/ml	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t de "Student")

$$t = 0,693$$

Diferença não significativa a nível de 5%.

G Â N G L I O S M E S E N T É R I C O S

Valores individuais para amostras de gânglios colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da dose injetada por grama de órgão e em equivalente à concentração de crotoxina-¹³¹I em micrograma (mcg/g), para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/g	mcg/g	% da dose injetada/g	mcg/g
2,0	0,0090	0,191	0,0157	0,372
2,5	0,0128	0,244	0,0038	0,078
3,0	0,0170	0,475	—	—
4,0	0,0051	0,171	0,0236	0,406
4,0	0,0053	0,140	—	—
5,0	0,0088	0,402	0,0036	0,190
5,0	—	—	0,0009	0,029
5,5	—	—	0,0070	0,200
6,0	0,0138	0,277	—	—
Média geral	0,271 $\pm$ 0,124 mcg/g		0,212 $\pm$ 0,151 mcg/g	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t de "Student")

$$t = 1,088$$

Diferença não significativa a nível de 5%.

TABELA 11

S A L I V A

Valores individuais para amostras de saliva colhidas até o momento do sacrifício (horas). São expressos em % da radioatividade total injetada para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDO.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/ml	mcg/ml	% da dose injetada/ml	mcg/ml
3,0	0,0573	_____	_____	_____
4,0	0,0163	_____	_____	_____
5,0	0,0095	_____	0,0351	_____
Média geral	0,0277 $\pm$ 0,0220		_____	_____

Não foi realizada a análise estatística.

TABELA 12

B I L E

Valores individuais para amostras de bile colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da radioatividade total injetada para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/ml	mcg/ml	% da dose injetada/ml	mcg/ml
3,0	0,0313	_____	_____	_____
3,0	0,0117	_____	_____	_____
3,0	0,0191	_____	_____	_____
3,0	0,0121	_____	_____	_____
4,0	0,0005	_____	_____	_____
4,0	0,0151	_____	_____	_____
5,0	_____	_____	0,0132	_____
5,0	_____	_____	0,0269	_____
5,5	_____	_____	0,0290	_____
Média geral	0,0147 $\pm$ 0,0101 %/ml		0,0230 $\pm$ 0,0154 %/ml	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t de "Student")

$$t = 1,032$$

Diferença não significativa a nível de 5%.

HUMOR AQUOSO

Valores individuais para amostras de humor aquoso colhidas no momento do sacrifício (horas). São expressos em % da radioatividade total injetada para cães NÃO PROTEGIDOS e PROTEGIDOS.

Horas	NÃO PROTEGIDO		PROTEGIDO	
	% da dose injetada/ml	mcg/ml	% da dose injetada/ml	mcg/ml
3,0	0,0009	_____	0,0010	_____
4,0	0,0005	_____	_____	_____
4,0	0,0080	_____	_____	_____
5,0	_____	_____	0,0001	_____
5,5	_____	_____	0,0035	_____
6,0	0,0085	_____	_____	_____
Média geral	0,0045 $\pm$ 0,0043 %/ml		0,0015 $\pm$ 0,0017 %/ml	

ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t de "Student")

$$t = 0,955$$

Diferença não significativa a nível de 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GENNARO, J. F. Jr. and RAMSEY, H. W.- Distribution in the mouse of lethal and sub-lethal doses of cottonmouth moccasin venom labelled iodine-131. *Nature*, 184:1244, 1959.
2. SUMIK, C. B. and KASHIN, P.- Mechanism of snake venom action. U. S. Government Research Report, AD600981, Department of Commerce, 1964.
3. LEE, C. Y. and TSENG, L. F.- Distribution of Bungarus multicinctus venom following envenomation. *Toxicon*, 3:281, 1966.
4. FARRER, P. A., STARZECKI, B., HORNER, G. J. and HALMAGYI, D.F. J.- Distribution in sheep of radioactive rattlesnake venom and antivenin labelled with $\text{Cr}^{51}\text{-Cl}_3$. *Proc. Australian Physiol. Soc.*, May, p.38, 1964.
5. LOMBA, M. G., VITAL BRAZIL, O., KIEFFER, J., PIERONI, R. R. e WAISBICH, E.- Crotoxina marcada com ^{131}I . Técnica de marcação, controles, propriedades biológicas. *Ciencia e Cultura*, 17: 273, 1965.
6. LOMBA, M. G., KIEFFER, J., WAISBICH, E. and VITAL BRAZIL, O. — Preparation and properties of ^{131}I -Labelled crotoxin. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33(3):921, 1966.
7. LOMBA, M. G., VITAL BRAZIL, O. and BARBÉRIO, J. C.- A biosynthetic method of labelling snake venoms. In: *Radioactive Isotopes in Pharmacology* (Eds. Glasson/Waser), London, John Wiley & Sons Limited. p.49. (In press)
8. MOAV, B., GITTER, S., WELWART, Y. and AMIEL, S.- Tracing and trace element composition of snake venom by analysis. *Congress of Radiochemical methods of analysis I.A.E.A.*, Salzburg, 1964.

9. ULBERG, S.- Autoradiographic studies on the distribution of labeled drugs in the body. Proc. 2nd Internath. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, vol.2, Part 1, p.248. Geneva, 1958.
10. WASER, P. G. and Lüthi, V.- Autoradiographische Lokalisation von C^{14} -Calbassen-Curarin I und C^{14} -Decamethonium in der motorischen Endplatte. Arch. int. Pharmacodyn., 112:272, 1957.
11. CHANG, C. C. and LEE, C. Y.- Isolation of neurotoxins from the venom of Bungarus multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action. Arch. int. Pharmacodyn., 144:241, 1963.
12. VITAL BRAZIL, O., WAISBICH, E., LOMBA, M. G. e Franceschi, J.P.- Farmacologia da crotoxina. Ciencia e Cultura, 17(2):272, 1965.
13. VITAL BRAZIL, O., FRANCESCHI, J. P. and WAISBICH, E.- Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33(3):973, 1966.
14. VITAL BRAZIL, O.- Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33(3):981, 1966.
15. VITAL BRAZIL, O., FARIÑA, R., YOSHIDA, L. and OLIVEIRA, V. A. de- Pharmacology of crystalline crotoxin. III. Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and Crotalus durissus terrificus venom. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33(3):993, 1966.
16. HADLER, W. A. and VITAL BRAZIL, O.- Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac., 33(3):1001, 1966.
17. McFARLANE, A. S.- Efficient trace-labelling of proteins with iodine. Nature, 182:53, 1958.
18. SLOTTA, C. H. e FRAENKEL-CONRAT, H. L.- Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. Mem. Inst. Butantan, 12:505, 1938-39.
19. WEIL, C. S.- Tables for convenient calculation of median effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. Biometrics, 8:249, 1952.

20. TASTALDI, H.- Bioquímica analítica qualitativa (2ª parte).
São Paulo, Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo, 5ª ed., 1960. (Apostila).
21. FRUTON-SIMONDS.- General Biochemistry, 2nd. ed., New York, 1960.
22. TAHIN, Q. S. e KAKITANI, M.- O efeito dos pH sobre a reação de Folin. *Ciencia e Cultura*, 17(2):284, 1965.
23. WAJCHENBERG, B. L. et al.- Aplicação do método da diluição de isótopos ao estudo da composição do corpo humano. São Paulo, CNEN-IEA - nº 9, 29 p., 1960.
24. SHEPPARD, C. W.- Basic principles of the tracer method. New York, John Willey & Sons, Inc., 1962.
25. VEALL, N. and VETTER, H.- Radioisotope techniques in clinical research and diagnosis. London, Butterworth & Co., 1961.
26. ROBERTSON, J. S.- Theory and use of tracers in determining transfer rates in biological systems. *Physiol Review*, 37:133, 1957.
27. MARQUES, R. M. e BERQUÓ, E.- Análise de variância. São Paulo, Departamento de Estatística Aplicada, Faculdade de Higiene e Saude, USP, 3ª ed., 1963. (Apostila).
28. MATTHEWS, C. M. E.- The theory of tracer experiments with ¹³¹I labelled plasma proteins. *Physics in Med. Biol.*, 2:36, 1957.
29. RESCIGNO, A.- A contribution to the theory of tracer methods. *Bioch. Biophys. Acta*, 15:340, 1954.
30. RESCIGNO, A.- A contribution to the theory of tracer methods. Part II. *Bioch. Biophys. Acta*, 21:11, 1956.
31. BERMAN, M., SCHOENFELD, R.- Invariants in experimental data on linear kinetics and the formulation of models. *J. Appl. Physiol.*, 27:1361, 1956.