

**Maria José Prata Pinheiro**

**TRANSPORTES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS**



**Porto, 2002**

**Maria José Prata Pinheiro**

**TRANSPORTES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**Porto, 2002**

**Orientador:** Prof. Doutor J. M. Soares Fortunato  
**Co-orientador:** Prof. Doutor J. J. Pedroso de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto para obtenção do grau de doutora em Biologia Humana

*Artº 48º, parágrafo 3º*

A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

*(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931,  
Decreto nº 19337)*

## **Professores Catedráticos da Faculdade de Medicina do Porto**

José Augusto Fleming Torrinha  
Serafim Correia Pinto Guimarães  
Manuel Miranda Magalhães  
António Alberto Falcão de Freitas  
Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto  
Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira  
Manuel Augusto Cardoso de Oliveira  
Manuel Maria Paula Barbosa  
Manuel Machado Rodrigues Gomes  
Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões  
Francisco José Zarco Carneiro Chaves  
Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares  
Maria Isabel Amorim Azevedo  
Maria Amélia Duarte Ferreira  
José Agostinho Marques Lopes  
Patrício Manuel Vieira Araújo Soares Silva  
Daniel Filipe de Lima Moura  
Belmiro dos Santos Patrício  
Alberto Manuel Barros da Silva  
José Manuel Lopes Teixeira Amarante  
José Henrique Dias Pinto de Barros  
Maria de Fátima Machado Henriques Carneiro  
Isabel Maria Amorim Pereira Ramos  
Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira  
Maria Dulce Cordeiro Madeira

Cassiano Pena de Abreu e Lima

Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira

Rui Manuel Almeida Mota Cardoso

António Carlos Freitas Ribeiro Saraiva

Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar

## **Professores Jubilados da Faculdade de Medicina do Porto**

António Augusto Lopes Vaz

António Carvalho Almeida Coimbra

António Fernandes da Fonseca

António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga

António Germano Pina Silva Leal

António Luís Tomé da Rocha Ribeiro

António Manuel Sampaio Araújo Teixeira

Cândido Alves Hipólito Reis

Daniel Santos Pinto Serrão

Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Ferreira

Henrique José Ferreira Lecour de Menezes

João Silva Carvalho

Joaquim Oliveira Costa Maia

José Carvalho de Oliveira

José Fernando Barros Castro Correia

José Pinto de Barros

Levi Eugénio Ribeiro Guerra

Luís António Moura Pereira Leite

Manuel Teixeira Amarante Júnior

Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães

Mário José Cerqueira Gomes Braga

Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso

## ***Agradecimentos***

*O trabalho experimental apresentado nesta dissertação foi realizado no Laboratório de Radioisótopos e no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina do Porto.*

*Cumpre-me agradecer à Sr.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izolett Amaral e ao Sr. Prof. Doutor Pina Cabral, nessa altura directores destes departamentos, todas as facilidades concedidas e a disponibilização de meios e equipamentos para a execução deste projecto.*

*Agradeço à Fundação Calouste Gulbenkian o contributo na obtenção de bibliografia, cujo acesso é efectuado de modo simples e eficaz.*

*Ao Sr. Prof. Doutor José Manuel Soares Fortunato, cujas qualidades humanas tive o privilégio de conhecer ao longo de anos, agradeço todo o apoio, orientação e amizade sempre presente. A valiosa bibliografia dispensada e a sua permanente disponibilidade constituiu para mim um esteio forte e indispensável na concretização desta tese.*

*Ao Sr. Prof. Doutor João José Pedroso de Lima, além dos esclarecidos e sábios ensinamentos e do exemplo de uma atitude de dedicação à investigação científica, eu agradeço toda a exigência envolvida em compreensão e incentivo para ir sempre mais longe.*

*À Sr.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raulina Almeida, à Sr.<sup>a</sup> Eng.<sup>a</sup> Maria Amélia Rodrigues, à Sr.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Margarida Garrido, agradeço toda a colaboração efectuada na parte laboratorial.*

*Ao Sr. Fernando Sá, ao Sr. Benedito Alves e à Sr.ª D. Maria Rosa Gonçalves, agradeço todos os esforços nas múltiplas tarefas neste trabalho experimental.*

*A todas as pessoas do Serviço de Fisiologia, cumpre-me agradecer todos os incentivos e atenções dispensadas.*

*À Sr.ª Dr.ª Nazareth Rego expresso o meu reconhecimento pela ajuda dispensada na execução deste livro.*

*À Sr.ª Dr.ª Carmen Silva e à Sr.ª Dr.ª Carla Pedrosa eu agradeço todo o carinho e disponibilidade sempre presente para uma partilha de recursos atenta e generosa.*

*Aos meus amigos, eu agradeço a multiplicidade de valiosas ajudas indispensáveis para a realização de uma tarefa que, sendo solitária, só foi possível com o seu contributo.*

*À minha amiga Maria Isabel, aos meus irmãos, à minha mãe e aos meus filhos, eu agradeço todas as horas do meu trabalho e a eles dedico esta dissertação.*

## **Preâmbulo**

Existia um objectivo de certo modo oculto no início desta tese. Este objectivo era que, para além dos estudos parcelares a realizar sobre movimentos de partículas materiais, energia e informação, característicos dos sistemas biológicos, fosse verificada a possibilidade de que as leis que estariam por detrás dos mecanismos de transporte associados às três entidades apresentassem marcadas semelhanças formais. Existia assim a esperança de que estes processos fossem relacionáveis por análogos, de modo semelhante aos da Teoria dos Sistemas. Se tal fosse viável, para além de constatar, uma vez mais, a ordem da natureza, conseguiríamos também possivelmente uma simplificação do estudo destes mecanismos.

Considerámos que, no âmbito de uma tese de doutoramento, se encontrássemos as referidas analogias nas situações estudadas, estaríamos pelo menos a lançar alicerces para um futuro trabalho.

Uma parte desta tese tem a ver com o estudo do movimento de partículas considerando a integração dos efeitos da interacção molecular, presente nos fenómenos de transporte em sistemas biológicos.

Quando existe interacção, os fenómenos de transporte (em sistemas biológicos e não só) constituem sistemas complexos, representáveis

por funções não lineares, que têm sido objecto de análises recentes.

No caso de sistemas biológicos, pretende-se que as funções utilizadas representem, no âmbito fisiológico e biofísico, a porção com interesse na fenomenologia desse transporte. Deste modo, os resultados obtidos poderão gerar funções mais simples que dão respostas específicas, numa perspectiva biológica limitada aos parâmetros do estudo em curso.

Neste trabalho, é efectuada a aplicação de uma função que tem como suporte o movimento de energia ou de massa. Estes movimentos conduzem a alterações nos elementos no espaço onde se efectuam. Cada interacção de elementos é traduzida como sendo transporte de uma informação.

A utilização desta função nos fenómenos que envolvem interacção de partículas diferenciadas, identifica toda a complexidade destes movimentos como processos de transmissão de informação.

A velocidade de passagem dessa informação depende das propriedades de dois universos de partículas - as que contêm informação e as que ainda não são dela portadoras. Estes universos coexistem em espaços geométricos determinados e interagem por contacto produzido pelo próprio movimento estatístico.

A função referida foi aplicada em duas situações que, embora de âmbitos muito diferentes, têm de comum pressupostos compatíveis com a aplicação de cinéticas semelhantes.

Na primeira parte é apresentado um trabalho experimental que estuda a cinética de elementos figurados do sangue em situação de hipotermia. A fonte de informação consiste num sistema de baixa temperatura exterior que se movimenta para o interior do corpo do animal, sendo o principal veículo de transmissão a circulação sanguínea.

A função de informação, que chamámos função de informação por movimento, é aplicada à descida da temperatura corporal interna constituindo uma nova aproximação ao estudo da propagação do arrefecimento corporal provocado por um meio ambiente a muito baixa temperatura.

Este estudo continuou-se com a aplicação do mesmo modelo à cinética leucocitária e plaquetária, permitindo obter resultados e tirar conclusões acerca da marginação destes elementos e da sua relação funcional com a hipotermia.

Na segunda parte é estudado um modelo teórico que pretende representar os principais mecanismos de transporte intracelular do ião de  $\text{Ca}^{2+}$ . A procura deste modelo tem sido objecto de estudo em vários trabalhos de investigação publicados recentemente. Paralelamente, há cada vez mais publicações que visam o estudo da complexidade da interacção de partículas no processo de difusão.

Neste trabalho foram encontradas analogias com o modelo aplicado à descida da temperatura corporal interna e estas semelhanças formais

permitiram a aplicação do mesmo tratamento matemático.

Neste caso, a fonte de informação é constituída pela elevada concentração do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  existente no espaço extracelular e no retículo sarcoplasmático e que se movimenta para o interior do espaço intracitosólico. Foi possível, com a utilização da função de informação por movimento aplicada a uma célula padrão, traçar possíveis modelos da entrada de cálcio no interior da célula, bem como representações da ligação do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas plasmáticas. A aplicação de um sistema de compartimentos permitiu determinar possíveis representações da onda de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitosólica.

As duas situações estudadas constituem temas científicos de relevância e actualidade: a importância do estudo da hipotermia advém da sua utilização em cirurgia e, em estudos mais recentes, da sua utilização em situações de stress pós-traumático; o interesse do estudo do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  como sendo o controlador de um vasto sistema de processos celulares com complexos mecanismos ainda não inteiramente conhecidos.

Este trabalho constitui um olhar possível, e talvez diferente, do movimento com interacção de elementos. Revelou-se adaptado aos fenómenos estudados e permitiu respostas que contribuem para a sua quantificação e melhor conhecimento.

# Índice

## **1ª Parte**

# **Estudo da cinética dos elementos figurados do sangue em situação de hipotermia**

### **Capítulo 1 - Introdução**

A homeostasia térmica .....	25
Os mecanismos termoreguladores .....	27
Análise do fenómeno hipotermia .....	29
Análise da cinética leucocitária .....	30
Breve resumo dos capítulos da primeira parte deste trabalho .....	32

### **Capítulo 2 - A hipotermia**

Revisão sumária das alterações fisiológicas em hipotermia .....	37
Revisão sumária dos estudos efectuados sobre a cinética leucocitária ..	42
Sub-fenómenos da hipotermia corporal .....	45

### **Capítulo 3 - Material e métodos**

Experimentação animal .....	51
Anestesia e marcação radioisotópica .....	52
Arrefecimento .....	52
Medidas “in vivo” .....	52
Medidas “in vitro” .....	53

### **Capítulo 4 - Análise da descida de temperatura**

Funções da informação .....	57
Transmissão de informação por contacto directo .....	60
Transmissão de informação por movimento .....	62
Significados físico de cada parâmetro da função de informação por movimento .....	65
Aplicação da função à descida de temperatura corporal interna .....	69

**Capítulo 5 - Análise das medidas “in vitro”**

Descida de leucócitos circulantes .....	78
Descida de linfócitos circulantes .....	79
Descida dos neutrófilos circulantes .....	79
Análise das medidas da actividade dos <sup>111</sup> In-neutrófilos .....	80
Comparação das diferentes cinéticas .....	80

**Capítulo 6 - Cinética dos <sup>111</sup>In-neutrófilos**

Análise das medidas “in vivo” obtidas no fígado, baço, pulmões e abdómen .....	87
Relação entre as funções de entrada nos órgãos e as funções de saída da circulação .....	91

**Capítulo 7 - Cinética de eritrócitos e plaquetas em hipotermia**

Estudo da cinética eritrocitária .....	101
Estudo da cinética plaquetária .....	104

**Capítulo 8 - Percurso efectuado e conclusões**

Breve resumo do percurso efectuado nesta apresentação .....	111
Conclusões e alguns comentários sobre:	
Material e métodos .....	112
Cinética eritrocitária .....	114
Arrefecimento corporal .....	115
Cinética leucocitária .....	115
Cinética dos <sup>111</sup> In-neutrófilos .....	117
Cinética das <sup>111</sup> In-plaquetas .....	118
Função de informação por movimento de partículas .....	118

<b>Bibliografia - 1ª Parte</b> .....	123
--------------------------------------	-----

## 2ª Parte

### Estudo de um modelo representativo do transporte intracelular do ião de $\text{Ca}^{2+}$

#### Capítulo 1 - Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ no citoplasma

Introdução .....	139
Potencial de acção .....	140
Sistemas de sinalização .....	142
Movimento com interacção de partículas .....	146
Aplicação da função de informação .....	152
Distribuição dos iões de $\text{Ca}^{2+}$ no interior da célula .....	156

#### Capítulo 2 - Mobilização para receptores

Mobilização para receptores fixos .....	163
Mobilização para receptores móveis .....	166

#### Capítulo 3 - Onda de $\text{Ca}^{2+}$

Modelo utilizado .....	173
Onda de $\text{Ca}^{2+}$ .....	174
Conclusões .....	178

#### Bibliografia - 2ª Parte .....

183

## 3ª Parte

### Análise conjunta dos sistemas estudados

#### Capítulo 1

Movimento e interacção de partículas .....	200
--	-----

Espaços geométricos de movimentação .....	201
Fontes de informação .....	201
Informação por passagem .....	202
Pressupostos para aplicação .....	204
Aplicação da função .....	205
Estabilização dos processos .....	206
O que a função pretende representar .....	208
Sistemas de compartimentos .....	209
Nota final .....	210
<b>Anexos</b> .....	<b>213</b>
Anexo A .....	215
Anexo B .....	219
Anexo C .....	225
Anexo D .....	227
Anexo E .....	229
Anexo F .....	231
Anexo G .....	233
Anexo H .....	235
Anexo I .....	237
<b>Resumo</b> .....	<b>239</b>
<b>Summary</b> .....	<b>247</b>

# **1ª Parte**

**Cinética dos  
elementos figurados  
do sangue em  
situação de  
hipotermia**

# Capítulo 1

# Introdução

## 1.1 A homeostasia térmica

A célula viva é uma estrutura dinâmica integrante dos sistemas biológicos.

A sobrevivência de um sistema biológico faz-se na criação permanente e continuada de condições de adaptação ao meio ambiente, e o êxito de um equilíbrio energético global é, em si próprio, uma condição necessária para a sobrevivência do ser.

Conhecer a estrutura e função da célula como produtora de energia, saber como operam aí os princípios termodinâmicos, isolar os fenômenos até serem explicados pelas leis fundamentais da Física, é dar resposta às questões relacionadas com os mecanismos básicos da vida.

A bioenergética permite uma análise quantitativa de como os organismos obtêm e utilizam a energia. Um conjunto de processos degradativos (catabolismo), coexistem com o processo biossintético que leva à formação das partes componentes do organismo (anabolismo).

Os seres vivos são sistemas complexos e altamente organizados que utilizam a energia do meio ambiente para formar e manter as suas

próprias estruturas em perfeita harmonia com a envolvimento (Anexo A).

Esta estacionaridade é caracterizada pelo valor relativamente constante de múltiplas variáveis cada uma das quais deslizando no seu específico “intervalo óptimo”. É a chamada “homeostasia”. Esta situação exige permanentes dispêndios de energia e estas respostas reguladoras são efectuadas pelo Sistema de Controlo Homeostático. É essencial para o funcionamento deste sistema, a faculdade das células comunicarem entre si por reacções em cadeia e pela entrada em acção de mensageiros activadores e inibidores (hormonas e neurotransmissores). O controlo homeostático é efectuado com uma constante recolha de informações (os estímulos) e elaboração imediata de reacções obedecendo a um sistema de prioridades com uma hierarquia relativamente às condições óptimas de sobrevivência. O estado estacionário dessas variáveis advém de uma constante renovação de energia necessária à viabilidade de permanentes respostas a desequilíbrios ocasionados muitas vezes pela própria reposição de circunstâncias biologicamente favoráveis à sobrevivência.

O deslocamento para além do intervalo aceitável pelo organismo de qualquer uma dessas múltiplas variáveis perturba a homeostasia, induzindo uma forma agressiva de existência, exigindo uma cadeia de múltiplas respostas que em diversas situações se revelam impotentes

para repor a normalidade ou que a agravam. Uma das formas de isolar os fenómenos para extrair ilações sobre os seus vectores primordiais de funcionamento, é o deslocamento provocado para além do limite da normalidade de uma só destas variáveis, de modo a que sejam postos em marcha os fenómenos de defesa e as fragilidades especificamente decorrentes dessa hostilidade.

O estudo destas reacções visa o conhecimento das possibilidades de contribuir de uma forma mais eficaz para o restabelecimento do estado de harmonia quando confrontados com situações que são geradoras desses desequilíbrios irreversíveis.

## **1.2. Os mecanismos termoreguladores**

A resposta do organismo às variações de temperatura é uma questão que tem merecido a atenção de muitos cientistas e está directamente ligada à energia e ao trabalho celular. O sistema biológico termoregulador é o responsável pela produção de calor a um ritmo igual à sua perda, para que a temperatura corporal permaneça constante. A estabilidade do parâmetro “temperatura interna corporal” não depende apenas da grandeza absoluta de entrada e saída de energia mas de mecanismos de modulação e competição entre essas duas acções opostas.

Qualquer arrefecimento corporal leva a respostas que tendem a aumentar a temperatura, minimizando as perdas de calor e



organismo humano implica activação dos receptores térmicos que por sua vez informam o Sistema Nervoso Central o qual vai estimular a contracção do músculo liso dos vasos periféricos (evitando a perda de calor) e a contracção do músculo estriado (originando tremura e movimentos estereotipados para aumentar a produção de calor). Simultaneamente surge a activação metabólica a nível do fígado e da gordura castanha. Assim que a temperatura corporal estabiliza, este mecanismo cessa, com um desfasamento de um intervalo de tempo que depende da diferença de temperaturas, da sensibilidade dos detectores, da eficiência da conexão entre as componentes do sistema biológico e da sua capacidade de resposta específica.

### **1.3 Análise do fenómeno “hipotermia”**

A resistência de um ser humano ao frio depende de um bom sistema termoregulador. Este sistema é menos eficaz nos recém-nascidos e nos idosos. Se as condições do meio ambiente se apresentam de tal modo hostis que estes mecanismos termoreguladores são impotentes para a estabilização da temperatura corporal a níveis de normalidade, é criada uma situação de hipotermia que pode levar a modificações irreversíveis geradoras de situações patológicas. São também os casos de exposição demasiado longa a uma temperatura ambiente muito baixa, de doenças dos vasos periféricos em que há diminuição acentuada da circulação com exposição ao frio (Síndrome de Raynaud), e das cirurgias prolongadas em condições de hipotermia.

A experimentação animal tem dado preciosos contributos no conhecimento das anomalias motivadas pelo deslocamento provocado da variável “temperatura”. Também a descoberta e implementação de novas tecnologias que permitem medir os fenómenos a jusante da hipotermia e do reaquecimento, tem levado à consequente procura das funções matemáticas que explicitem essas dependências de uma forma rigorosa e acrescentada.

#### **1.4 Análise da cinética leucocitária**

De entre esses fenómenos, têm sido objecto de estudo as respostas à hipotermia dadas pelos elementos figurados do sangue : eritrócitos, plaquetas e leucócitos.

Mereceram particular interesse neste trabalho as alterações à cinética leucocitária causadas pela hipotermia. Os diferentes tipos de leucócitos estão classificados de acordo com a sua estrutura, afinidades e funções. A heterogeneidade desta população exigiria respostas diversas específicas para cada tipo de leucócitos? Há diferentes percursos no espaço e/ou no tempo? Qual o papel do fígado, baço e pulmões nesta resposta?

A possibilidade de analisar estes fenómenos foi viabilizada não só pelas novas técnicas de contagem diferenciada de leucócitos em amostras “in vitro”, mas também pela utilização de marcação dos leucócitos (neutrófilos) com o <sup>111</sup>In que veio permitir a visualização e avaliação dos percursos “in vivo”. O radiofármaco usado

anteriormente ( $^{51}\text{Cr}$ ), devido à energia dos seus fotões gama, apenas permitia medidas “in vitro”.

Tendo sido criadas as condições experimentais, o propósito deste estudo foi o conhecimento das alterações provocadas pela hipotermia na cinética dos elementos figurados do sangue através da visualização dos seus percursos, bem como uma possível caracterização das funções e avaliação de parâmetros que tivessem correspondência com os fenómenos fisiológicos associados. Este estudo da cinética leucocitária foi efectuado seguindo as variações da actividade dos traçadores, ao longo do tempo, na circulação e em simultâneo com diversos locais de sequestro e/ou marginação. O estudo de fenómenos fisiológicos associados a esta cinética (por exemplo, a agregação de leucócitos e a adesividade plaquetária) ainda não permitem a separação clara entre estas duas formas de fuga de leucócitos circulantes. O trabalho aqui desenvolvido, utilizando o estudo matemático dessas funções no tempo, encontra a necessidade de existência de propagação de duas cinéticas distintas. A caracterização matemática destas duas cinéticas é explicada pelos conhecimentos já existentes e reformula a interpretação dos fenómenos fisiológicos de uma forma mais consistente.

## **1.5 Breve resumo dos capítulos da primeira parte deste trabalho**

Neste primeiro Capítulo, é feita uma introdução, onde são abordadas as causas e os objectivos que levaram à realização deste trabalho.

No Capítulo 2 é feita uma revisão sumária dos efeitos conhecidos da hipotermia e dos estudos visando a cinética leucocitária.

No Capítulo 3 é descrito o material e os métodos utilizados no trabalho experimental.

No Capítulo 4, após um breve sumário de alguns conceitos físicos do estudo da propagação de calor, é proposta uma função de propagação que melhor se ajusta à descida de temperatura em função do tempo encontrada nesta experimentação. É estudado o significado de cada parâmetro e da derivada da função.

No Capítulo 5 é feita uma diferenciação dos tipos de leucócitos pela análise dos diferentes parâmetros da sua cinética no sangue circulante em condições de hipotermia .

No Capítulo 6 é estudada a distribuição dos leucócitos nos diferentes órgãos durante o arrefecimento, tendo em vista a obtenção de um comportamento padrão para uma cinética leucocitária “in vivo”. A comparação quantitativa desta cinética com a cinética circulante dos

<sup>111</sup>In-neutrófilos determina a existência de um terceiro compartimento de neutrófilos com uma cinética específica, não medido directamente.

No Capítulo 7 é efectuada uma apresentação de resultados obtidos no estudo da hipotermia com a marcação radioactiva de eritrócitos e plaquetas.

O Capítulo 8 visa o enquadramento geral de todas as componentes cinéticas do conjunto complexo de fenómenos simultâneos. É nesta estrutura final de apresentação de resultados que são interpretados os resultados na globalidade. São acrescentados alguns comentários ao trabalho desenvolvido e à possível aplicação da função de propagação a outras situações de sistemas de propagação por movimento até ser atingida uma situação limite.

Finalmente, a bibliografia consultada é apresentada por ordem alfabética do nome do primeiro autor.

## **Capítulo 2**

## A Hipotermia

### 2.1 Revisão sumária das alterações fisiológicas em hipotermia

As trocas de calor envolvidas no equilíbrio térmico do nosso organismo podem ser equacionadas pela fórmula:

$$M = E + C + R + c + Q$$

sendo “M” a produção metabólica de calor do corpo, “E” a quantidade de calor perdido por evaporação de água expelida pelos pulmões e pela pele, “C” a quantidade de calor obtido ou perdido por convecção, “R” o calor emitido ou recebido por radiação actuando a pele como um corpo negro, “c” a troca de calor por condução (sendo o ar um mau condutor inibe as trocas por contacto) e “Q” a energia calorífica gasta ou cedida pelo interior do organismo (K. J. Collins *et al.*, 1983). Todas estas quantidades são referidas à unidade de tempo.

Golan e Spurr (1954) verificaram a existência de um gradiente entre a temperatura da superfície corporal e a temperatura interna corporal. As parcelas “E”, “C”, “R”, e “c” são influenciadas pelas dimensões e forma do corpo, isto é, pela relação “superfície corporal/volume corporal”.

Se o corpo mantém o equilíbrio térmico, a parcela “Q” mantém-se num intervalo perto de zero, de modo que a oscilação da temperatura corporal interna diurna seja aproximadamente de 1 °C.

Se a quantidade de calor “Q” é superior ao mínimo deste intervalo de “equilíbrio”, temos então uma situação de hipotermia que leva o organismo a tentar diminuir essencialmente os factores “E” e “C” com vasoconstrição à periferia tentando reduzir a perda de energia calorífica pelo corpo para o meio ambiente, contrariando a perda de calor interna. O facto das grandes veias e artérias caminharem em paralelo, umas com aporte de sangue frio das extremidades, outras conduzindo o sangue mais quente do coração, justifica o fenómeno da contracorrente (Anexo B) que vai impedir o arrefecimento nos tecidos periféricos, atenuando a diminuição da temperatura na zona interna do corpo. O aumento do factor “M” é muitas vezes efectuado pela produção metabólica de calor com movimentos musculares (tremulo). Estes movimentos são descoordenados porque não é respeitado o princípio de contracção-relaxamento do músculo antagonista. Os músculos contraem-se para produção de calor e não para produzirem movimento (trabalho) (Stoner *et al.*, 1977).

A imersão em água gelada é o meio mais utilizado para induzir a hipotermia corporal porque a água tem uma capacidade calorífica 25 a 30 vezes superior à do ar (o calor específico da água é de 4.184 J/g. °C).

Se a temperatura corporal interna desce ao intervalo 30-34 °C, o trémulo diminui, surge a vasoconstrição, a frequência cardíaca e respiratória que na primeira fase por vezes aumenta, baixa agora acentuadamente e, de um modo geral, todos os fenómenos metabólicos vão gradualmente diminuindo. A actividade muscular e metabólica diminuem em primeiro lugar; outros fenómenos físico-químicos, como por exemplo a difusão de substâncias nos fluídos, são afectados mais tardiamente (Maclean and Emslie-Smith, 1977). No fígado, a neoglucogénese mantém-se mesmo nas hipotermias mais profundas (Fuhrman *et al.*, 1963 e Stoner e Randall, 1990).

O electrocardiograma mostra prolongamento das várias fases do ciclo cardíaco, acréscimo de duração da sístole e da diástole (Heagnauer *et al.*, 1949) (Torres *et al.*, 1958). A pressão sanguínea só baixa em hipotermia profunda porque antes de se atingir esse grau de arrefecimento a redução do débito cardíaco é compensada pela vasoconstrição.

O fenómeno da contracção esplénica, libertando eritrócitos, pode ser causador da hemoconcentração (Kanter *et al.*, 1968). A perda de plasma do compartimento sanguíneo (D'Amato, 1954) também contribui para o fenómeno da hemoconcentração (Heagnauer *et al.*, 1949) (Wilson *et al.*, 1957), aumentando a viscosidade do sangue, originando um fluxo sanguíneo mais lento. O consumo de oxigénio no cão diminui para 15 a 20% do consumo normal (Heagnauer *et al.*, 1954).

Eisman B. *et al.* (1962) observou os efeitos da hipotermia na circulação sanguínea estudando as características reológicas do sangue. Embora o sangue seja um fluido não Newtoniano, o autor utiliza a Fórmula de Poiseuille-Hagen (Anexo C) que relaciona o caudal “J” com a viscosidade “ $\eta$ ”, com a diferença de pressão “ $\Delta P$ ” entre as extremidades de um tubo de comprimento “l” e de raio “r”, em situações de fluxos em regime laminar:

$$J = \pi \Delta P r^4 / 8 \eta l$$

O sangue, a 37 °C, tem viscosidade de 2.7 poises.

Estudando a viscosidade do sangue “in vivo” e “in vitro”, o factor determinante para o aumento da viscosidade seria a hemoconcentração “in vivo”. Este aumento da viscosidade e o decréscimo do débito cardíaco, alteram também o número de Reynolds (o ponto de turbulência está associado à constante de Reynolds “ $R = v \rho d / \eta$ ”, dependente da velocidade média do líquido, “v”, do diâmetro do tubo “d”, da densidade “ $\rho$ ” e da viscosidade do líquido “ $\eta$ ” (Anexo D).

Observações feitas por Fortunato J.S. *et al.*, (1985) verificam que a fase principal da hemoconcentração ocorre na passagem dos 36 °C aos 30 °C.

Pelo processo de microangiografias Escalda *et al.* (1985), mostram que o caudal de perfusão dos capilares sinusoidais do fígado baixa com a hipotermia, fenómeno que é reversível no aquecimento.

A saída de lactato dos músculos aumenta com a descida de temperatura, mas a neoglucogénese mantém-se. O fígado continua a remover lactato, alanina, glicerol e frutose e a convertê-los em glucose. (Fuhrman *et al.*, 1963).

A implicação do pâncreas na hipotermia ainda não está suficientemente esclarecida mas foi verificada necrose do pâncreas em doentes que morreram devido a hipotermia (Stoner *et al.*, 1990).

A activação do sistema simpático causa aumento da concentração das catecolaminas no plasma, sendo o aumento da concentração da adrenalina e das hormonas tiroideas não significativo.

Wilson *et al.* (1957) verificaram a existência de glóbulos brancos aderentes às paredes dos vasos sanguíneos e constatou que plaquetas e leucócitos eram “sequestrados” pelo fígado e baço durante a hipotermia, embora não fossem destruídos.

Villalobos *et al.* (1958) verificaram que a esplenectomia não muda significativamente a resposta das plaquetas e leucócitos durante a hipotermia. Na situação de hepatectomia, com ou sem esplenectomia, a diminuição de plaquetas e de leucócitos circulantes é significativamente menor. Este facto sugere a existência de outros locais de fuga destes elementos ao compartimento circulante.

Trabalhos executados com marcadores radioactivos estudam o decréscimo das plaquetas circulantes durante a hipotermia e a sua

deposição significativa no fígado e baço, num fenómeno reversível com o reaquecimento (Pina Cabral *et al.*, 1974, Hessel *et al.*, 1980 e Fortunato J.S. *et al.*, 1985).

O sequestro hepático é reversível contribuindo em grande medida para a recuperação quase total das plaquetas e leucócitos circulantes. A retenção nos órgãos de sequestro das plaquetas e leucócitos marcados com <sup>111</sup>In e injectados no animal à temperatura corporal interna de 22 °C tem amplitude e velocidade muito inferior à verificada a 36 °C (Quiroga *et al.*, 1985 e Fortunato J.S. *et al.*, 1993).

A leucopenia resulta primariamente de neutropenia e secundariamente da redução de outros leucócitos e verifica-se um aumento de leucócitos circulantes durante o reaquecimento (Olson *et al.*, 1984 e Fortunato J.S. *et al.*, 1988).

Shenaq *et al.* (1986) confirmaram em doentes sujeitos a operações cirúrgicas que plaquetas e leucócitos deixam a circulação durante a hipotermia e, no reaquecimento, as plaquetas não atingem os valores iniciais. Este fenómeno é atribuído por alguns autores ao fenómeno de adesão de plaquetas e leucócitos que ocorre com a sua activação.

## **2.2 Revisão sumária dos estudos efectuados sobre cinética leucocitária**

No homem adulto normal os leucócitos são produzidos na medula óssea com um tempo de renovação de 96 a 144 horas. No cão, este tempo é de 48 a 72 horas.

Os parâmetros de normalidade da cinética leucocitária foram estudados por Athens e Craddock (1960). Consideraram um modelo em equilíbrio e partiram do princípio que a marcação com DF  $^{32}\text{P}$  não lesa as células e é estável durante o período em que as células estavam em circulação. Entre a medula óssea e os tecidos foram considerados dois compartimentos em equilíbrio dinâmico: o compartimento circulante (CGP) e o marginado (MCP). Estes dois compartimentos constituem um compartimento total (TBGP). O número de leucócitos existentes nestes compartimentos por Kg de peso corporal é, no cão: TBGP = 51 a  $106 \cdot 10^7$ , CGP = 15 a  $45 \cdot 10^7$ ; e no homem: TBGP = 14 a  $160 \cdot 10^7$  e CGP = 11 a  $46 \cdot 10^7$ . As células são removidas do sangue segundo uma função exponencial simples (Cartwright *et al.*, 1964). O  $T_{1/2}$  obtido foi de 5 a 8.5 horas no cão e no homem de 4 a 10 horas.

Os estudos efectuados “in vivo” usando leucócitos marcados com  $^{111}\text{In}$  em situação de temperatura normal mostram que estes deixam a circulação com uma entrada no baço, fígado e pulmões que estabiliza antes dos 15 mn seguintes (Thakur *et al.*, 1977 e Fortunato J.S. *et al.*, 1993).

Foram estudadas variações no número de leucócitos circulantes mediadas por respostas ao meio ambiente. A subida de temperatura, a exposição a radiação intensa e a altitude causam leucocitose, enquanto a descida de temperatura causa leucopenia.

A marginação parece estar relacionada com a aderência dos leucócitos às paredes e diminui com a hemodiálise, com a descida de endotoxina, com a adrenalina e glucocorticoides, com o exercício, e eleva-se na inflamação aguda. (MacGregor *et al.*, 1977). Uma maior aderência origina maior marginação e permite uma rápida saída do compartimento intravascular. O grau de aderência é modulado por diferentes factores plasmáticos que são induzidos por fármacos e patologias. Em 1990, K. Yong diz que os receptores de adesão localizam-se nos tecidos cooperando com antigénios receptores.

Plaquetas e leucócitos têm capacidade para interactuar na trombose e na resposta à inflamação; as trocas metabólicas das substâncias bioquímicas geradas entre estas células modulam o processo de estimulação-inibição (Marcus *et al.*, 1988). A adesão neutrófilo-plaqueta aumenta o potencial da interacção bioquímica “in vivo”. Esta interacção permite que os neutrófilos do fluxo circulante adiram às plaquetas imobilizadas induzindo a sua agregação. O aumento de temperatura de 0 a 37 °C facilita a adesividade de neutrófilos em plaquetas activas isoladas e a activação de plaquetas e não de neutrófilos parece ser uma condição necessária para a existência do fenómeno de agregação (Nash *et al.*, 1994).

Os neutrófilos são mais lentos que os eritrócitos no seu trânsito na microcirculação pulmonar. Os vasos dos pulmões têm um diâmetro entre 20 e 50µm. A média de tempo de trânsito aumenta para pequenos vasos e capilares (Hogg J. *et al.*, 1988). O mecanismo que

causa esta retenção ainda não é bem conhecido mas Selby *et al.* (1991) confirma que a deformabilidade celular é determinante na permanência de leucócitos nos pulmões. O efeito da activação dos neutrófilos e as células endoteliais pulmonares pode ser diferente das células dos tecidos vasculares ou essa diferença de comportamento pode ser justificada pela anatomia da microcirculação pulmonar (Hogg J. *et al.*, 1987 e Marlys *et al.*, 1993).

### **2.3 Sub-fenómenos da hipotermia corporal**

Os fenómenos já conhecidos da transmissão de calor (frio) conduzem-nos à sistematização da hipotermia corporal induzida por imersão de água gelada nos seguintes sub-fenómenos:

- a) Hipotermia inicial causada na superfície corporal  
Factor que a determina - quantidade de água gelada como grande receptor de energia (fonte fria).  
Factores que a contrariam - protecção pilosa da pele, impermeabilidade da pele e vasoconstrição periférica.  
O fluxo de calor é essencialmente efectuado por condução.
- b) Hipotermia no sistema circulatório  
Factor que a determina - a circulação do sangue.  
Factores que a contrariam - hemoconcentração por perda de líquido plasmático, aumento da viscosidade sanguínea com

diminuição do fluxo circulante, diminuição da frequência cardíaca.

Factores associados - aumento de concentração de lactato por produção muscular, leucopenia e trombocitopenia, maior concentração de catecolaminas no plasma, continuação da glucogenólise hepática.

O fluxo de calor é essencialmente efectuado por convecção.

c) Hipotermia nos órgãos e tecidos internos

Factores que a determinam - a perfusão dos tecidos obriga à perda de calor por convecção e nos tecidos vizinhos à perda de calor por condução.

Factores que a contrariam - a diminuição do fluxo circulante, do metabolismo celular, a capacidade calorífica dos tecidos, as respostas neuroendócrinas.

Factores associados - diminuição de leucócitos e plaquetas circulantes e acumulação de leucócitos e plaquetas no fígado e no baço.

A cinética leucocitária é afectada de diferentes formas ao longo da hipotermia corporal induzida por banho de água gelada. Neste trabalho, os leucócitos funcionam simultaneamente como suporte de informação para os mecanismos imunológicos e ainda como geradores de informação do seu próprio comportamento. Embora estejam quantificadas estas modificações, não estão ainda estudadas as funções que melhor as representam ao longo do tempo e que consigam

distingui-las ou relaciona-las com os fenómenos físicos correspondentes.

## **Capítulo 3**

## **Material e Métodos**

### **3.1 Experimentação animal**

A hipotermia induz profundas alterações no número de leucócitos e plaquetas circulantes. Foi objectivo deste estudo o esclarecimento dos fenómenos físico-químicos ou biológicos associados à hipotermia e a estas alterações.

As experiências foram efectuadas de forma a que a execução técnica fosse o menos complexa possível para que a informação fosse obtida de maneira sistemática e com o mínimo de factores de dispersão .

A utilização de isótopos marcadores como o  $^{111}\text{In}$  que veio substituir o  $^{51}\text{Cr}$  (só possibilitando leituras “in vitro”), permite a aquisição de imagens e dados quantitativos referentes à distribuição de leucócitos marcados nos diferentes órgãos, o que tornou possível identificar o compartimento circulante e não circulante durante o processo de arrefecimento.

Os dados foram recolhidos de experiências decorridas nos anos de 1990 e 1991. Foram efectuadas utilizando cães mestiços do sexo masculino com um peso médio de 8 Kg. O facto de na altura ter sido utilizado o cão reside no facto de, dos animais disponíveis, ser o que,

devido à sua estrutura física, tem uma resposta à situação de hipotermia e de cinética leucocitária e plaquetária que mais se assemelha à resposta humana.

### **3.2 Anestesia e marcação radioisotópica**

Como anestésico foi utilizado o pentobarbital (50mg/Kg de peso) por via endovenosa.

Nos diversos estudos, a marcação de leucócitos foi efectuada “in vitro” com 150  $\mu$ Ci de  $^{111}\text{In}$ -oxina incubado 20 mn com NaCl 0.9%. A média do rendimento de marcação obtido foi de 97%. O produto marcado foi administrado em *bolus* por via endovenosa na aorta abdominal alta.

### **3.3 Arrefecimento**

A hipotermia foi induzida por imersão em 30 l de água gelada até ser atingida a temperatura esofágica de 22 °C. Esta água foi mantida em degelo durante toda a fase de hipotermia para actuar como fonte fria a potência constante. A sonda do termómetro eléctrico foi colocada no esófago ao nível das aurículas.

### **3.4 Medidas “in vivo”**

Foram registados os tempos de arrefecimento até ser atingida a temperatura de 22 °C.

Durante a experiência o animal foi mantido imóvel, em decúbito dorsal, posicionado a cerca de 20 cm do colimador da gama-camara.

No sentido de identificar os locais de chegada e quantificar a variação da distribuição dos leucócitos nos diferentes órgãos foram feitas aquisições dinâmicas de imagens matriciais, em vista anterior, ao longo do tempo de decurso das experiências. Para esse efeito foi utilizada uma gama-camara “GE 400T” ligada a um computador “PDP11 / 34” da “Digital”.

Foram desenhadas regiões de interesse que delimitassem os órgãos a estudar, escolhendo as imagens em que a actividade nesses órgãos fosse máxima. Para esta recolha de dados, o “software” utilizado foi o “Gamma 11” da “Digital”.

### **3.5 Medidas “in vitro”**

Amostras de sangue foram colhidas ao longo do tempo, coincidindo com intervalos de variações de temperatura corporal de 4 °C, para posterior contagem de actividade e em contadores automáticos totais (isto é, de elementos marcados e não marcados).

Estas contagens totais foram efectuadas em neutrófilos, leucócitos totais e linfócitos.

O grau de confiança destas leituras foi calculado aplicando a distribuição de Poisson.

O processo de marcação utilizado respeita essencialmente a população de neutrófilos.

# Capítulo 4

## **Análise da Descida de Temperatura**

### **4.1 Funções da informação**

Os dados experimentais obtidos nestas experiências em situação de hipotermia nas medidas “in vivo” do fígado confirmam resultados já observados por trabalhos de investigação anteriores (Pina Cabral *et al.*, Fortunato J. S. *et al.*). Na nossa observação, quer as medidas de leucócitos, quer as de plaquetas, são representadas por funções com a forma de uma sigmóide. Observando as medidas da temperatura corporal interna ao longo do tempo de hipotermia, os dados sugerem também uma sigmóide de características idênticas. O tratamento quantitativo do sistema através das equações físicas que traduzem a propagação do calor por condução e convecção em sistemas vivos envolveria um estudo complexo, que não pode ser aplicado de uma forma directa com os dados das experiências realizadas.

O facto dos dados experimentais relativos ao fenómeno da hipotermia e relativos à circulação de leucócitos e plaquetas serem representados por funções com aspectos semelhantes levou à procura de uma função abrangente, o que pode ser efectuado atendendo ao factor que lhes é comum: a propagação de informação, em ambos os casos associada a movimentos materiais, a que chamaremos propagação de informação por movimento.

Estes dados foram tratados como representação de um sistema de informação em que o veículo fundamental é a circulação sanguínea: a transmissão de calor como passagem de informação de energia cinética molecular transmitida por condução ou convecção, e o percurso dos leucócitos constituindo um sistema de informação utilizador da circulação sanguínea.

O atraso na transmissão de um estímulo depende da sua importância em relação às capacidades de reacção dos elementos ou conjunto de elementos aos quais esse estímulo é dirigido.

Neste caso, temos uma fonte fria a 0 °C com temperatura constante, envolvendo um corpo cuja temperatura interna é de 36 °C, e que reagirá a este estímulo fazendo actuar o sistema termoregulador com a cadeia de respostas já referida no Capítulo II.

O modo de actuação do sistema global de “informação de frio” tem as seguintes características:

- a) O primeiro estímulo funciona por contacto directo da fonte com as moléculas da superfície corporal.
- b) A informação é depois transmitida para o interior do corpo sem actuação de contacto directo com a fonte, isto é, cada molécula arrefecida é por sua vez “transmissora de frio” por contacto (condução) ou por movimentação de moléculas (convecção). É de esperar que o factor “condução” seja de

menor potência porque os sistemas vivos têm uma condutividade térmica da ordem da condutividade do carbono.

- c) A transmissão pára quando já não há elementos por transformar (saturação), ou seja, quando a temperatura corporal interna for de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; contudo pode ainda ser atingido um estado estacionário, se a capacidade de informação estiver bloqueada. Neste caso, se o principal modo de propagação de calor (frio) for a convecção, obtém-se uma diminuição da velocidade de propagação muito antes da temperatura corporal interna ser de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uma vez que, aos  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura corporal interna, o sistema circulatório se encontra em condições limite.

As hipóteses de definição das funções de transmissão de informação são efectuadas tendo como base que o número de “contactos” no tempo seja determinado pelas posições geométricas das moléculas, pelo número de moléculas já arrefecidas e pelo número de moléculas que ainda é possível arrefecer.

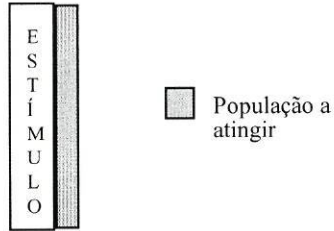
Seja:

- “B” - o número total de moléculas a transformar,
- “Q” - o número de elementos que estão já modificados em cada instante,
- “B – Q” - o número de elementos ainda não modificados em cada instante.

A velocidade de transformação será “dQ/dt”.

Considerem-se duas situações de características diferentes:

#### 4.1.1 1ª situação: Transmissão de informação por contacto directo



Se o estímulo tem acesso directo a grande parte da população, a velocidade de propagação é, em cada instante, proporcional ao número de elementos ainda não atingidos, “B – Q”:

A equação que representa este fenómeno é

$$dQ/dt = k (B - Q)$$

onde k é a constante de proporcionalidade.

Separando as variáveis e integrando:

$$\int (1/(B-Q)) dQ = \int k dt$$

$$- \ln (B-Q) = kt + C \quad (B-Q > 0)$$

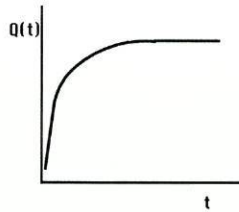
Logo

$$B-Q = e^{-kt} e^{-C}$$

Fazendo  $A = e^{-C}$ , obtém-se a equação

$$Q(t) = B - Ae^{-kt}$$

cujos esboço gráfico se apresenta (gráfico 4.1.1).

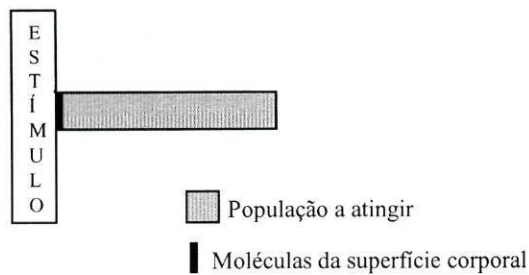


**Gráfico 4.1.1:** Representação gráfica da variação temporal da função de transmissão por contacto directo

O fenómeno imediato do arrefecimento das moléculas pertencentes à superfície corporal que são as que estão em contacto directo com a água gelada, será semelhante aos casos da nossa vivência quotidiana do aparecimento de pessoas doentes por intoxicação alimentar causada pela adulteração de qualquer alimento ou da propagação de uma notícia na televisão num programa de grande audiência. Também nestes casos existe contacto directo da fonte com o conjunto de elementos atingido em simultaneidade.

#### 4.1.2 2ª situação: Transmissão que implica movimentação dos elementos do conjunto

Se o estímulo teve acesso directo a uma pequena parte do conjunto de elementos a modificar e são esses elementos que vão transportar a informação por chegada a outros locais, então a velocidade de informação é em cada instante proporcional ao número de elementos que são portadores de informação e proporcional ao número de elementos que ainda são passíveis de ser informados, isto é, a “Q” e a “B-Q”.



A equação que traduz esta relação é

$$dQ/dt = k Q (B - Q)$$

e integrando:

$$\int (1/Q(B-Q)) dQ = \int k dt.$$

Este cálculo pode ser efectuado utilizando a relação:

$$1/(Q(B-Q)) = 1/B (1/Q + 1/(B-Q))$$

Aplicando esta relação na equação a integrar :

$$(1/B) \int (1/Q) dQ + (1/B) \int 1/(B-Q) dQ = \int k dt.$$

Efectuando, vem

$$(1/B) \ln (Q/(B-Q)) = kt + C \quad (B-Q > 0)$$

$$Q/(B-Q) = e^{Bkt + BC}$$

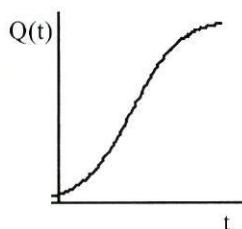
Fazendo  $A_1 = e^{BC}$  :

$$Q = \frac{A_1 B e^{Bkt}}{1 + A_1 e^{Bkt}}$$

E dividindo ambos os termos da fracção por  $A_1 e^{Bkt}$  obtém-se a equação

$$Q(t) = \frac{B}{1 + A e^{-Bkt}} \quad \text{em que } A = 1/A_1$$

cujo esboço gráfico tem a forma apresentada no gráfico 4.1.2.



**Gráfico 4.1.2:** Representação gráfica da variação temporal da função de transmissão por movimento

Usando novamente uma analogia com o que se passa em elementos de uma população, esta função é a característica da propagação de uma notícia através de um boato pessoa a pessoa e da transmissão de doença contagiosa numa população.

Esta função foi aplicada neste trabalho à saída dos leucócitos da circulação e à sua entrada no fígado e no baço.

A informação a transmitir é medida respectivamente pela temperatura interna, pelas medidas “in vitro” e pelas medidas “in vivo”.

Nestas três estruturas de informação, os dados experimentais ajustados a esta função vão permitir diferenciar os fenómenos de informação por contacto dos de informação por movimento em que o veículo fundamental é a circulação sanguínea.

## 4.2 Significado físico de cada parâmetro da função de informação por movimento.

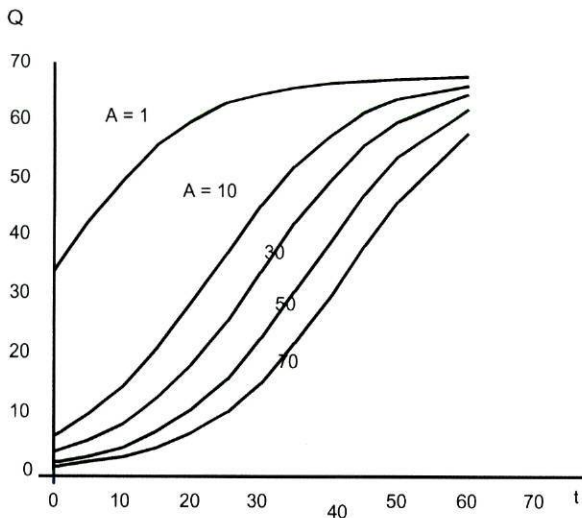
Para melhor observar as variações de cada parâmetro da solução da equação diferencial apresentada:

$$Q = \frac{B}{1 + A e^{-ct}} \quad \text{em que } c = kB,$$

foi utilizado o processo de variar cada parâmetro por sua vez, fixando os outros dois parâmetros.

A equação que foi usada para teste é

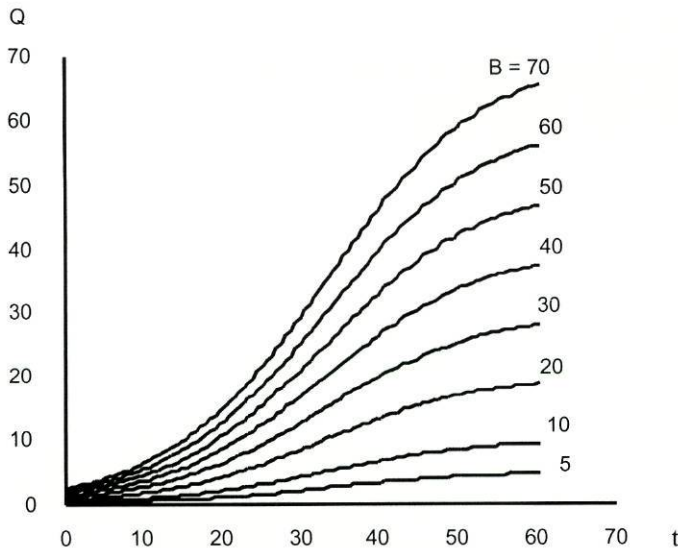
$$“Q = 67.8 / (1 + 27.0 * e^{-0.1t})”.$$



**Gráfico 4.2.1:** Variação da função com o parâmetro “A”

A variação da função com o parâmetro “A” (gráfico 4.2.1) está relacionada com a quantidade de elementos portadores da informação no instante  $t = 0$ . O ponto onde a função intersecta o eixo das ordenadas tem o valor “ $B/(1+A)$ ”.

Tal como foi definido, o parâmetro “B” é o número total de elementos da população atingidos no limite de saturação ou o número total de elementos atingidos quando estão bloqueadas as condições de informação. A variação da função com o parâmetro “B” está representada no gráfico 4.2.2.



**Gráfico 4.2.2:** Variação da função com o parâmetro “B”

O ponto de inflexão da função está situado no instante em que “ $Q = B/2$ ”. Os cálculos que conduzem a este resultado passam pela

determinação dos zeros da segunda derivada da função. Considerando a primeira derivada:

$$\frac{dQ}{dt} = k Q (B - Q).$$

E derivando, vem:

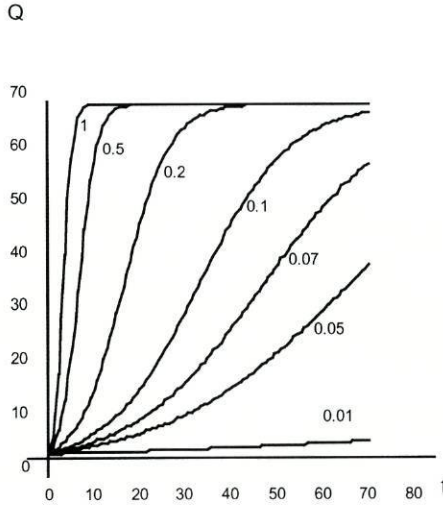
$$\frac{d^2 Q}{dt^2} = k B \frac{dQ}{dt} - 2 k Q \frac{dQ}{dt} \quad \text{isto é,} \quad \frac{d^2 Q}{dt^2} = k \frac{dQ}{dt} (B - 2Q)$$

Para “ $Q=B/2$ ”, o valor da segunda derivada é zero. Este valor corresponde a um máximo da primeira derivada e a um ponto de inflexão da função.

Substituindo na função, é determinado o valor de “ $t$ ” correspondente a este ponto de velocidade máxima de propagação da informação:

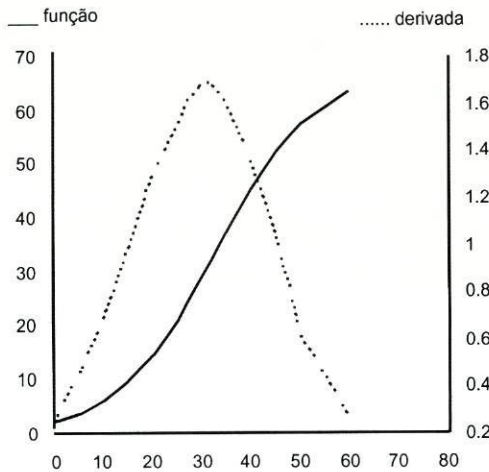
$$t = \ln A / c$$

O parâmetro “ $c$ ” está relacionado com a constante de proporcionalidade, isto é, com a capacidade de movimento e de passagem de informação dos elementos (gráfico 4.2.3).



**Gráfico 4.2.3:** Variação da função com o parâmetro “c”

A função derivada em relação ao tempo (gráfico 4.2.4) é uma função que tem um máximo no instante em que metade dos elementos são portadores de informação, ou seja, quando  $Q=B/2$ , como foi calculado.



**Gráfico 4.2.4:** Função derivada

### **4.3 Aplicação da função de informação à descida de temperatura corporal interna**

O estudo foi efectuado utilizando os dados de dezoito experiências, juntando a estes dados outros obtidos anteriormente e resultantes de onze experiências semelhantes para avaliação da cinética plaquetária e eritrocitária em hipotermia.

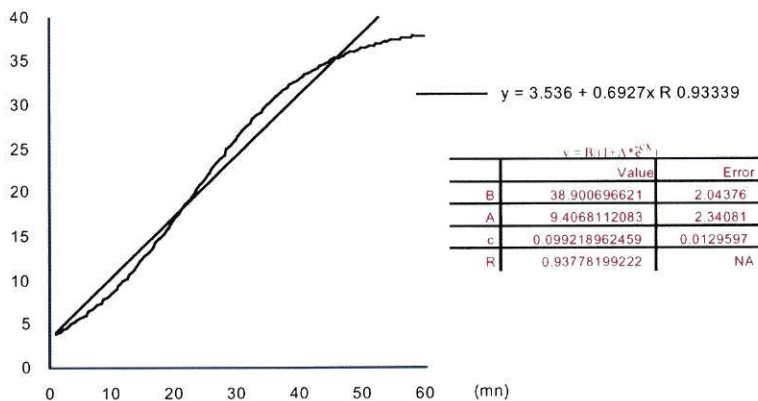
As experiências foram iniciadas com a temperatura corporal interna já inferior a 37 °C pois, após a anestesia, há, em relação à temperatura ambiente, um arrefecimento de 1 a 2 °C.

Foi feita uma correspondência entre as descidas de temperatura interna corporal considerando que haveria 100% de moléculas atingidas quando a temperatura corporal interna fosse de 0 °C, ou seja quando a temperatura descesse 36 °C.

Os dados foram ajustados a uma equação linear e à equação de transmissão de informação de um modo global (gráfico 4.3.1), e considerando cada experiência isoladamente (gráfico 4.3.2).

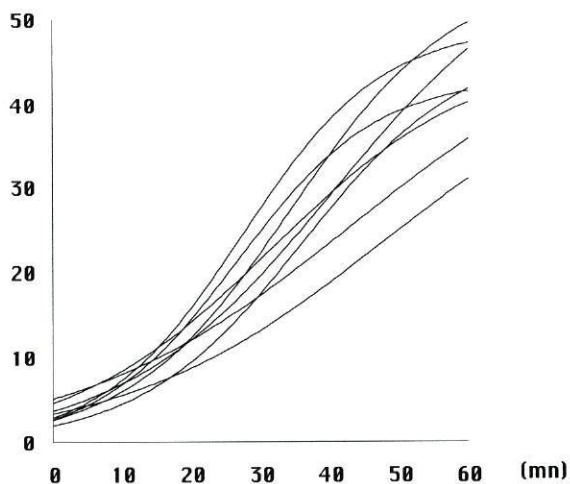
Os ajustes foram efectuados por processo iterativo de aproximação, utilizando as derivadas parciais da função em relação a cada parâmetro.

**% de descida de temperatura  
interna corporal**



**Gráfico 4.3.1:** Ajustes linear e da função de informação (18 experiências)

**% de descida de temperatura  
interna corporal**



**Gráfico 4.3.2:** Exemplos de curvas de descida de temperatura obtidas com ajuste da função de informação por movimento

Os resultados dos diferentes ajustes das equações aos dados obtidos experiência a experiência estão expressos no quadro 4.3.1.

B	$53.1 \pm 5.7$
A	$16.0 \pm 3.9$
c	$0.0769 \pm 0.0191$
r	$0.995 \pm 0.0051$
r linear	$0.987 \pm 0.0111$

**Quadro 4.3.1**

Foram comparados os coeficientes de correlação dos ajustes obtidos com as duas equações utilizando o teste de “t emparelhado” ; a probabilidade encontrada para os 18 casos (34 graus de liberdade) foi  $p=0.020$ , revelando que a equação da informação representa os dados experimentais significativamente melhor.

Observando os valores obtidos para o parâmetro “B”, infere-se que a temperatura interna corporal estabilizaria entre os 43 e 59% de descida, isto é, entre os 20.5 e os 14.8 °C.

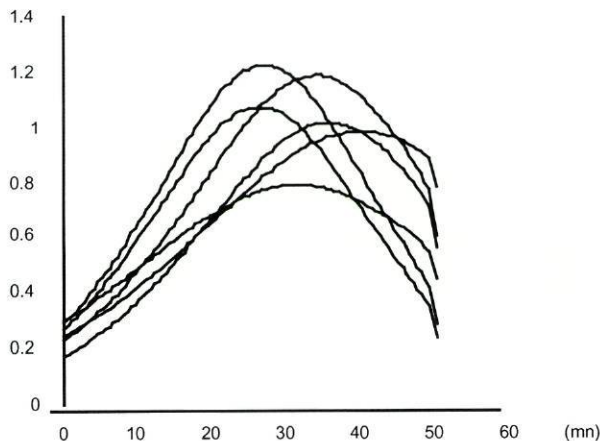
Este resultado, parecendo paradoxal pois o equilíbrio térmico do corpo com a fonte só se atinge aos 0 °C, pode estar em relação com uma previsão do ponto esperado de paragem da circulação sanguínea. Se a circulação for o principal factor de transmissão do “frio”, então, daí em diante, só estará a fazer-se transmissão por condução e a velocidade da transmissão é suficientemente retardada em relação à

anterior (atenda-se a que a condutividade térmica dos seres vivos é da ordem da do carbono, isto é, muito baixa) para não ser significativa.

Outro parâmetro escolhido para a caracterização da função é o ponto de inflexão (“PI”). Representa o instante em que “ $Q = B/2$ ” e simultaneamente o momento em que a velocidade de subida da função é máxima. Depende do parâmetro “A” e “c”:

$$PI = \ln A / c$$

No gráfico 4.3.3 são apresentadas algumas funções derivadas das equações de descida de temperatura pondo em evidência os respectivos máximos correspondentes aos pontos de inflexão. O ponto de inflexão da função de arrefecimento corporal situou-se entre os 27 e os 43 mn .



**Gráfico 4.3.3:** Algumas derivadas de funções de ajuste

# Capítulo 5

## **Análise das Medidas “In vitro”**

### **Comparação dos parâmetros de descida na circulação de diferentes tipos de leucócitos durante a hipotermia**

Nas colheitas de sangue efectuadas durante o arrefecimento corporal foram efectuadas as contagens de leucócitos totais e a percentagem dos diferentes tipos. Dada a escassa frequência de monócitos, basófilos e eosinófilos, estas medidas parciais não foram consideradas de uma forma específica apesar de valorizarem as medidas dos linfócitos e neutrófilos.

Na análise das medidas “in vitro” em que não estava em causa o factor “marcação radioactiva” foram utilizados também dados de outras experiências em que o protocolo foi em tudo idêntico às efectuadas neste trabalho, excepto na técnica de marcação radioactiva específica para marcação de plaquetas ou de eritrócitos.

Foram também efectuadas as contagens em aparelho de cintilação das medidas da actividade de  $^{111}\text{In}$ , correspondendo ao número de leucócitos marcados em circulação (essencialmente neutrófilos, pois a marcação radioactiva tem para estes uma afinidade específica).

Para posterior comparação com a curva de arrefecimento e com as equações de chegada dos leucócitos aos órgãos obtidas nos capítulos seguintes, utilizamos para a variável dependente o valor da “percentagem de descida de leucócitos circulantes” em substituição do valor do “número de leucócitos circulantes”. Esta percentagem foi calculada em relação ao número de leucócitos circulantes em situação basal, isto é, após a estabilização da entrada de  $^{111}\text{In}$ -neutrófilos (neutrófilos\*) no fígado e antes do início do arrefecimento.

A análise da descida dos diferentes tipos de leucócitos foi testada de dois modos:

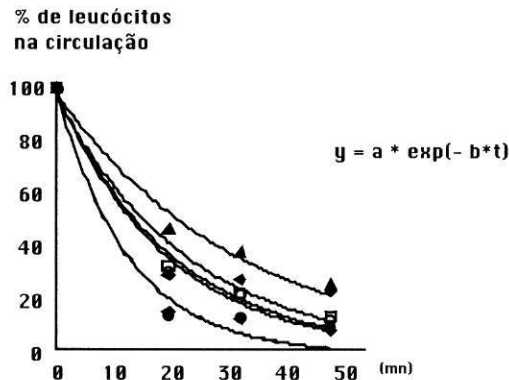
- Com ajuste a uma curva exponencial simples (equação de contacto directo)

$$y = a * e^{-b * t}$$

- Com ajuste à função de informação por movimento

$$y = B / (1 + A * e^{-c * t})$$

Alguns ajustes obtidos utilizando a função de contacto directo estão representadas no gráfico 5.1



**Gráfico 5.1:** Representação gráfica de ajustes a uma equação de transmissão por contacto directo

Em todos os casos, o ajuste à função de informação por movimento foi significativamente melhor e só este está referido nos estudos seguintes.

Os ajustes foram efectuados por processo iterativo de aproximação, utilizando as derivadas parciais da função em relação a cada parâmetro.

Os dois parâmetros utilizados para caracterização do fenómeno foram:

- A percentagem de descida máxima “B”, que caracteriza a amplitude.
- O ponto de inflexão “PI”, que localiza o tempo em que 50% dos leucócitos deixaram a circulação e, simultaneamente, representa o instante em que a saída de circulação atinge o máximo da velocidade.

Estes parâmetros foram utilizados para a determinação das três equações teóricas representativas das diferentes funções de movimento consideradas: leucócitos totais, neutrófilos e  $^{111}\text{In}$ -neutrófilos.

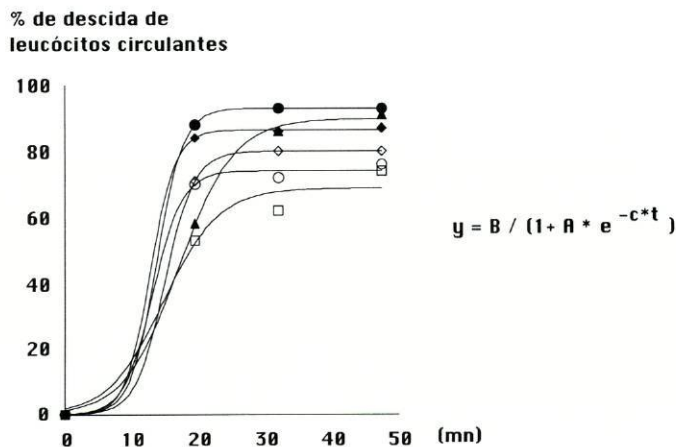
## 5.1 Descida de leucócitos circulantes

Foram utilizados 24 conjuntos de dados experimentais.

A equação geral representativa da descida dos leucócitos na circulação foi obtida com base nas 24 equações calculadas, considerando os 24 parâmetros “B” e os 24 pontos de inflexão “PI”.

Os resultados estão nos quadros 5.5.1 e 5.5.2 e alguns exemplos de ajustes estão representados no gráfico 5.1.1.

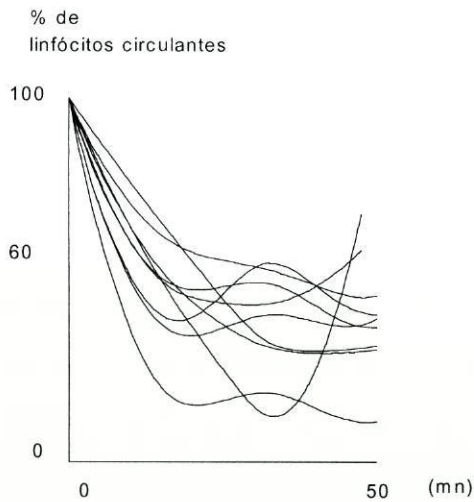
A equação final está representada geometricamente no gráfico 5.5.1.



**Gráfico 5.1.1:** Representação gráfica de algumas curvas de ajuste à descida de leucócitos circulantes

## 5.2 Descida de linfócitos circulantes

Embora haja uma descida de linfócitos da circulação de amplitude significativa as medidas obtidas a partir dos 20 mn (30 °C) são irregulares (gráfico 5.2.1) e não foi efectuado sobre estes dados qualquer ajuste que levasse à obtenção de parâmetros.



**Gráfico 5.2.1:** Representação gráfica da variação de linfócitos circulantes

## 5.3 Descida de neutrófilos circulantes

O processo de análise matemática foi em tudo semelhante ao utilizado para a descida dos leucócitos totais. Com o ajuste da função exponencial simples, isto é, da função de informação por contacto directo foram obtidos resultados ainda menos significativos do que os encontrados no ajuste dos dados dos leucócitos totais. A função de

informação por movimento revela-se de ajuste significativamente melhor.

Os resultados obtidos com os 23 conjuntos de dados experimentais estão nos quadros 5.5.1 e 5.5.2 e a representação gráfica da equação da descida de neutrófilos circulantes está apresentada no gráfico 5.5.1.

#### **5.4 Análise das medidas da actividade dos $^{111}\text{In}$ -neutrófilos circulantes**

Foram realizadas 10 experiências com marcação de neutrófilos com  $^{111}\text{In}$ .

Os resultados obtidos utilizando o método de análise usado anteriormente e estão sumariados nos quadros 5.5.1 e 5.5.2 e a representação gráfica da equação final representativa do fenómeno é apresentada no gráfico 5.5.1.

#### **5.5 Comparação das diferentes cinéticas (com e sem marcação radioactiva)**

As diferenças de amplitude e velocidade da percentagem de descida na circulação entre leucócitos, neutrófilos e  $^{111}\text{In}$ -neutrófilos (neutrófilos\*) foram analisadas utilizando o teste “t de Student” efectuado aos parâmetros caracterizadores “B” e “PI” referidos anteriormente.

Os valores das respectivas probabilidades estão nos quadros 5.5.1 e 5.5.2.

	leucócitos	neutrófilos	neutrófilos *
<b>Parâmetro B</b>	n = 24	n = 23	n = 10
	78.5 ± 10.8	79.2 ± 11.9	41.6 ± 8.7
leucócitos		ns	p = 0,000
neutrófilos			p = 0.000

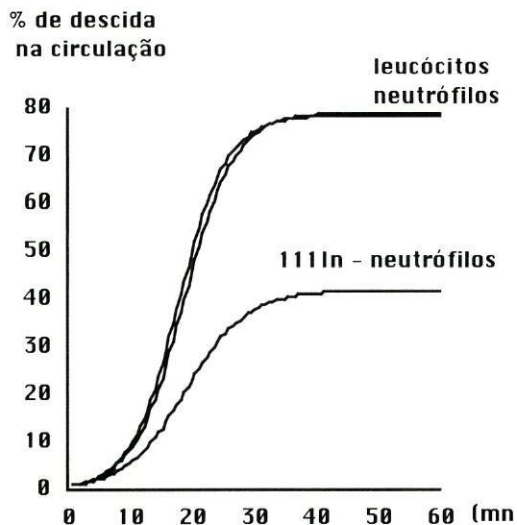
Quadro 5.5.1

	leucócitos	neutrófilos	neutrófilos *
<b>Parâmetro PI</b>	n = 24	n = 23	n = 10
	17.9 ± 5.8	18.8 ± 6.7	19.6 ± 7.0

Não foram encontradas diferenças significativas nos três grupos entre si.

Quadro 5.5.2

Estes resultados estão apresentados de uma forma de análise mais directa no gráfico 5.5.1.



**Gráfico 5.5.1:** Gráfico de curvas de % de descida de leucócitos, neutrófilos e <sup>111</sup>In-neutrófilos

Não existem diferenças significativas nas amplitudes das funções de descida dos leucócitos e neutrófilos não marcados.

Não existem diferenças significativas nas velocidades de descida leucocitária entre os três grupos estudados. A invariabilidade do ponto de inflexão dos três grupos sugere que este parâmetro, não lhes sendo específico, está ligado à circulação leucocitária em hipotermia.

O facto deste ponto de inflexão anteceder no tempo o ponto de inflexão da descida de temperatura interna pode ser consequência da diferença de comportamentos das duas funções de informação:

1. A transmissão da informação de “frio” funciona à velocidade da circulação geral e é transportada por todas as moléculas existentes no sangue. Podemos considerar que a fuga de plasma para os espaços intersticiais é em si uma forma de fuga de informação que vai atrasar a transmissão de informação.
2. A transmissão da informação de saída de leucócitos da circulação funciona pela mesma via mas é uma informação conduzida não só pela velocidade da circulação mas contém em si fenómenos químicos associados como, por exemplo, o quimiotactismo e a adesividade a outras moléculas.

A amplitude de descida dos neutrófilos marcados é cerca de metade da amplitude de descida dos leucócitos e neutrófilos não marcados. Esta diminuição na amplitude de descida pode ser atribuída às modificações que a marcação radioactiva provoca nos neutrófilos, alterando as ligações da molécula dos receptores, e consequentemente o seu comportamento em relação às moléculas adesivas.

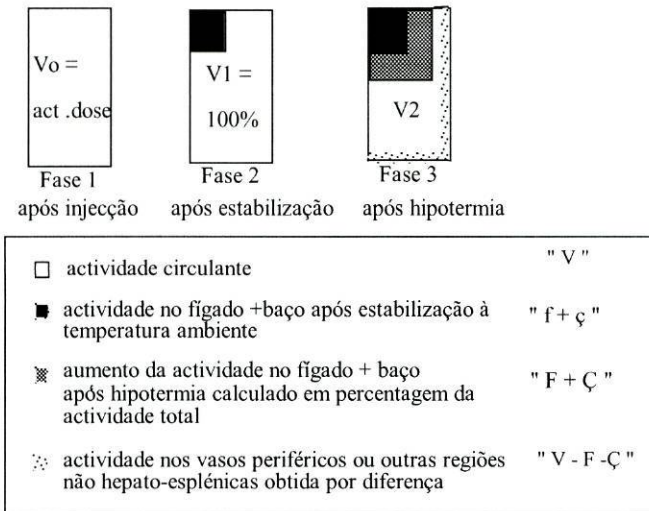
# Capítulo 6

## Cinética dos $^{111}\text{In}$ -neutrófilos

### 6.1 Análise das medidas “in vivo” obtidas no fígado, baço, pulmões e abdómen

Em trabalhos anteriormente apresentados (Fortunato J.S. *et al.*, 1993) e realizados em situação de normotermia, foram estudadas as funções representativas da entrada de  $^{111}\text{In}$ -neutrófilos em diversos órgãos e determinados os tempos em que esta entrada estabiliza.

A metodologia utilizada para relacionar as medidas obtidas no decorrer das experiências pode ser explicitada em termos de movimentação da marcação radioactiva em espaços determinados (esquema 6.1.1).



Esquema 6.1.1

Foi considerada na fase inicial a administração da dose de  $^{111}\text{In}$ -neutrófilos. Neste esquema não consideramos as passagens de neutrófilos pelos pulmões pois só foi iniciado o fenómeno do arrefecimento depois de estar estabelecido o equilíbrio .

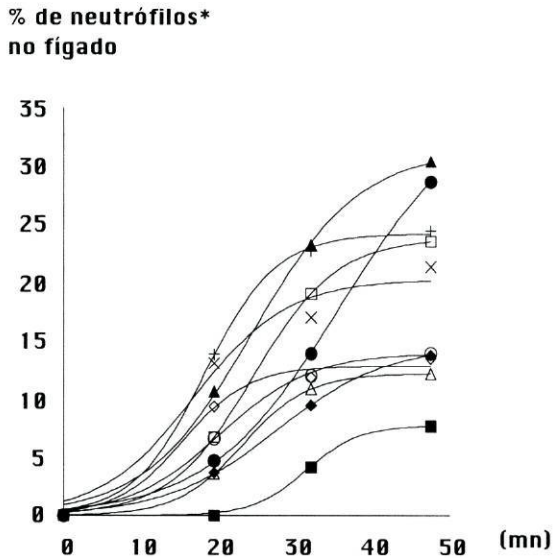
Na segunda fase, a actividade localizada no fígado e no baço vai funcionar como uma “actividade de fundo” que foi sempre descontada à actividade encontrada na mesma região de interesse nos tempos subsequentes. Esta actividade foi considerada não pertencente aos 100% de actividade total.

A terceira fase é constituída pelo tempo em que decorre a hipotermia.

Nas 10 experiências com marcação de neutrófilos com  $^{111}\text{In}$  a percentagem de actividade foi determinada em relação ao valor inicial, isto é, ao valor da actividade existente na região de interesse após a estabilização dos neutrófilos marcados mas antes do início da descida de temperatura corporal. Os valores das medidas “in vivo”, foram todos calculados em percentagem da actividade total existente, descontando o valor obtido nas respectivas medidas da fase 2.

Para obter os parâmetros caracterizadores da função de entrada de neutrófilos no fígado foram feitos ajustes com a equação de informação por movimento que estão representados no gráfico 6.1.1. Os respectivos coeficientes de correlação variaram entre 0.995 e 1.000.

Os resultados estão resumidos no quadro 6.1.1.



**Gráfico 6.1.1**

O processo de análise de dados efectuado para os 10 conjuntos de leituras obtidas no baço foi semelhante ao processo utilizado para as do fígado, embora a presença de neutrófilos marcados no baço (média de 10 % do total “in vivo”) seja muito inferior à verificada no fígado (cerca de 20 % do total “in vivo”).

Foram feitos ajustes com a equação de informação por movimento cujos resultados estão representados no gráfico 6.1.2. Os seus coeficientes de correlação variaram entre 0.973 e 0.999.

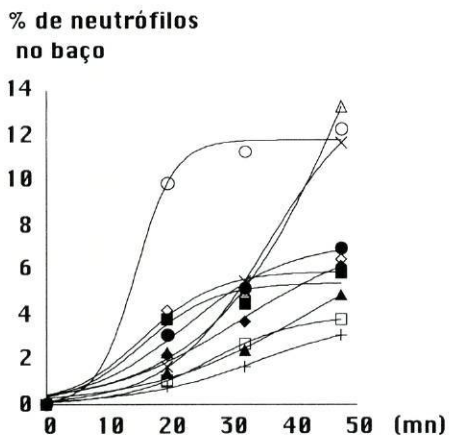


Gráfico 6.1.2

Verifica-se a existência de maior dispersão do parâmetro “B” e “PI” correspondentes ao baço (Quadro 6.1.1).

	Fígado	Baço
PI (mn)	25.0 ± 5.4	28.1 ± 12.2
B (%)	19.6 ± 9.0	10.0 ± 8.0

Quadro 6.1.1

Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores do parâmetro “PI” correspondentes às funções de entrada de neutrófilos marcados no fígado e no baço ( $p = 0.06$ ).

Foram estudadas as diferenças das medidas de actividade nos pulmões e abdómen antes e após a hipotermia e estas não se mostraram estatisticamente significativas.

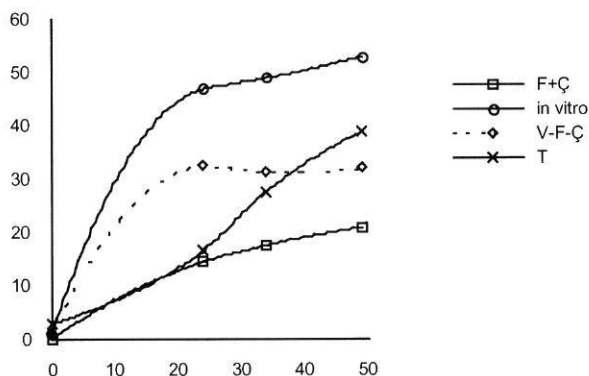
## **6.2 Relação entre as funções de entrada nos órgãos e as funções de saída da circulação**

O estudo global foi efectuado considerando a evolução de cada experiência separadamente. Em cada caso foram consideradas a função de saída de percentagem de actividade circulante (medidas “in vitro” – “V”), a função da percentagem de aumento de actividade no fígado adicionada à percentagem de aumento de actividade no baço “F+Ç”.

Teoricamente, não sendo aparentes nas imagens obtidas outros “espaços” de actividade de neutrófilos\*, a soma da percentagem de actividade que deixa a circulação seria igual à actividade que entraria no fígado e no baço e a soma destas percentagens, todas calculadas em relação à actividade total, seria de 100% (esquema 6.1.1, fase 3).

O gráfico 6.2.1 representa um dos estudos referidos e aspecto semelhante é apresentado por mais oito experiências.

Foi calculada esta diferença de actividades ao longo do tempo “V-F-Ç” e foi representada simultaneamente a função de descida de temperatura.



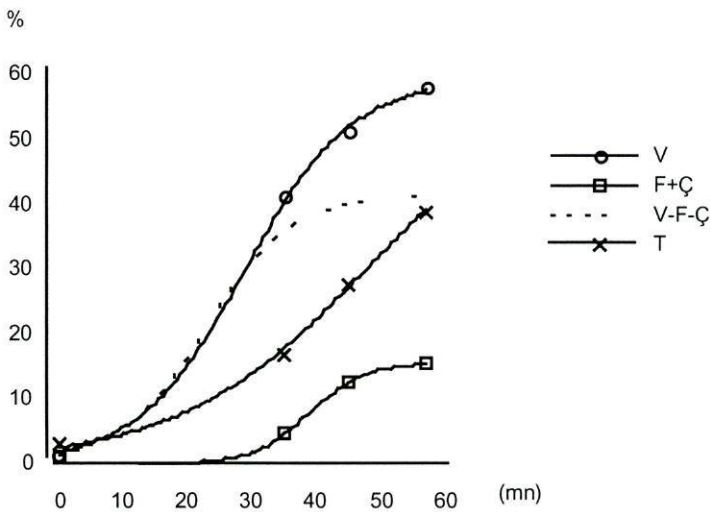
**Gráfico 6.2.1**

- V - % de descida de actividade circulante
- F + Ç - % de actividade no fígado + baço
- V-F-Ç - % de actividade nos órgãos extra hepato-esplénicos
- T - % de descida de temperatura

Adicionando as funções de percentagem de actividade obtida ao longo do tempo nos dois órgãos, fígado e baço, e comparando esta soma com a descida da actividade circulante, descobre-se que existirão neutrófilos\* que já não estão em circulação e que não estão também localizados nos órgãos.

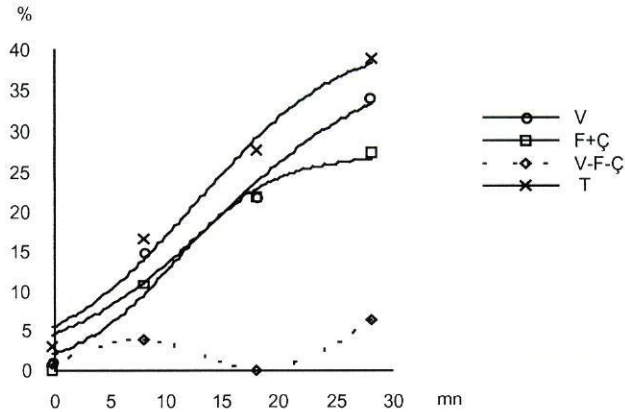
A diferença calculada “V-F-Ç”, é representativa de presença de neutrófilos\* fora dos espaços que consideramos nas nossas medições.

Os gráficos 6.2.2 e 6.2.3 caracterizam as outras duas experiências em que os resultados mais se afastam dos valores médios e apareceram em situações de limite máximo e mínimo do intervalo de tempo de decurso da experiência, isto é, do tempo que demorou a descida de temperatura até aos 22 °C.



**Gráfico 6.2.2**

- V - % de descida de actividade circulante
- F + Ç - % de actividade no fígado + baço
- V-F-Ç - % de actividade nos órgãos extra hepato-esplénicos
- T - % de descida de temperatura



**Gráfico 6.2.3:** Representação gráfica das curvas de % de actividade e da descida de temperatura no caso de mínimo tempo de experiência

- V - % de descida de actividade circulante
- F + Ç - % de actividade no figado + baço
- V-F-Ç - % de actividade nos órgãos extra hepato-esplênicos
- T - % de descida de temperatura

Estes resultados globais obtidos estudando cada experiência separadamente, e pondo em evidência a função de marginação, podem ser orientadores da indicação da sua importância como mecanismo de defesa contra a descida de temperatura.

As duas experiências que se apresentam como casos limites, sugerem que, quando a descida de temperatura interna se efectua mais rapidamente, a função de marginação é mais reduzida, e se a descida de temperatura corporal é mais lenta, então a função de marginação apresenta-se mais elevada.

Os resultados das 10 experiências podem ser representados pelas suas equações teóricas obtidas a partir dos parâmetros “PI” e “B” para cada cinética.

Foram comparados os parâmetros “B” e “PI” respeitantes às dez curvas do fígado, baço e dos neutrófilos circulantes utilizando o teste “t de Student emparelhado”. Existem diferenças significativas em todos os casos excepto no parâmetro “PI” entre o fígado e o baço.

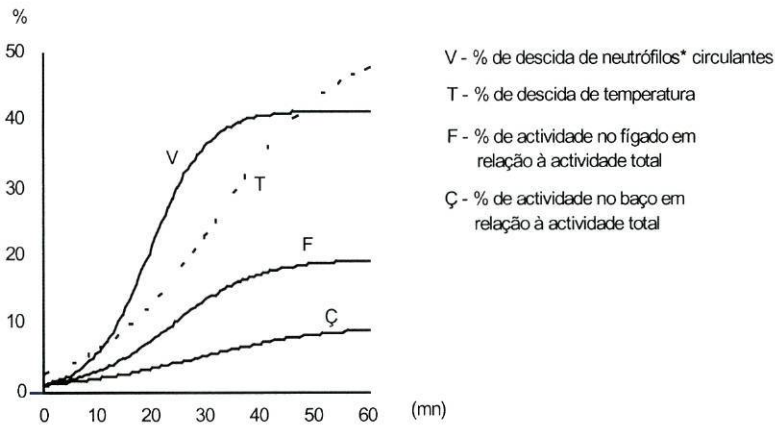
As equações encontradas para representar a percentagem de neutrófilos presente no fígado, no baço e a percentagem de neutrófilos circulantes são as seguintes:

$$\text{Fígado} \quad F = 19.6 / (1 + 21.0 e^{-0.12179 t})$$

$$\text{Baço} \quad \zeta = 10.0 / (1 + 9.0 e^{-0.07819 t})$$

$$\text{Neutrófilos* circulantes} \quad V = 41.6 / (1 + 40.6 e^{-0.18897 t})$$

A sua representação gráfica simultânea com a representação da percentagem de descida de temperatura está apresentada no gráfico 6.2.4, pondo em evidência o atraso do ponto de inflexão da função de descida de temperatura em relação ao das outras funções.



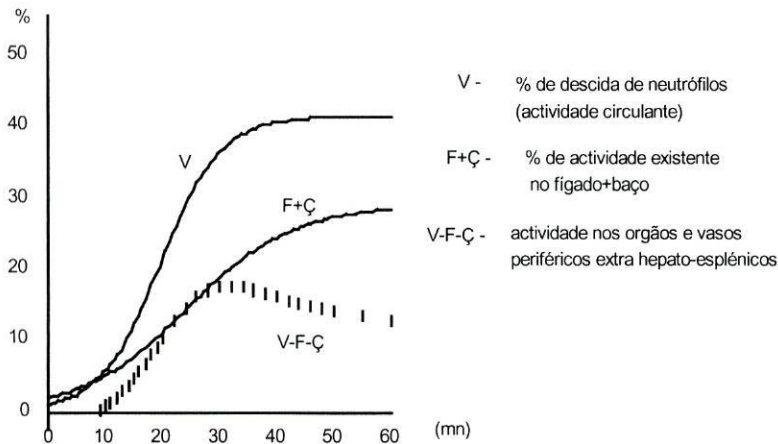
**Gráfico 6.2.4:** Representação das equações teóricas representativas da % de actividade e da descida de temperatura

A função diferença entre os valores da função representativa dos neutrófilos\* circulantes e dos neutrófilos\* situados no fígado e baço, isto é, a função representativa dos neutrófilos\* que se encontram nos tecidos dos vasos periféricos ou noutros órgãos extra hepato-esplénicos, está representada no gráfico 6.2.5.

Pode pôr-se a hipótese da existência deste “espaço” ter interferências de acções químicas nomeadamente do fenómeno de aderência dos leucócitos às paredes dos vasos periféricos ou aos tecidos de outros órgãos extra hepato-esplénicos.

Esta importante função de marginação de neutrófilos será analisada mais adiante em simultâneo com a função de marginação encontrada

no estudo da cinética plaquetária em hipotermia e que se apresenta com características semelhantes.



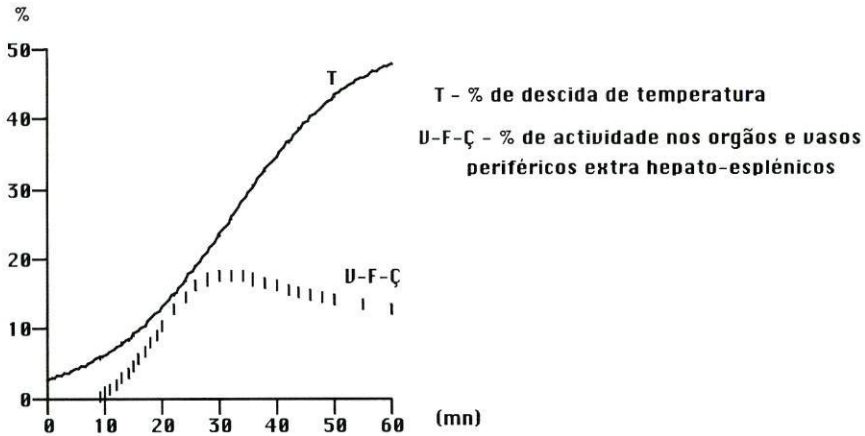
**Gráfico 6.2.5:** Representação das equações teóricas da % de actividade circulante e da % da actividade no figado+baço e da curva obtida por diferença

Embora o sangue seja um fluido não Newtoniano, aplicando a lei de Newton, considerando “ $\mu$ ” a resistência do fluido à deformação, a tensão tangencial ou de cisalhamento “ $\tau$ ” é proporcional ao gradiente de velocidade “ $dv/dy$ ”:

$$\tau = \mu \, dv/dy$$

Neutrófilos e plaquetas marginam em simultaneidade provavelmente acompanhando a fuga de plasma para os tecidos intersticiais e será este fenómeno a origem do aumento da viscosidade sanguínea com o conseqüente decréscimo de fluxo circulante e aumento da tensão

tangencial ou tensão de cisalhamento em direcção paralela à parede do vaso.



**Gráfico 6.2.6:** Representação da “função de marginação” e da função de descida de temperatura

Se compararmos a função de descida de temperatura corporal com a curva de marginação (gráfico 6.2.6), verificamos que o ponto de inflexão da função de descida de temperatura corporal coincide com o instante a partir do qual a função deixa de ser crescente, estabilizando desde esse instante ou até decrescendo ligeiramente.

Pode sugerir-se que os elementos que marginaram constituíram uma fuga de informação da função de transmissão de “frio”.

# Capítulo 7

# Cinética de Eritrócitos e Plaquetas em Hipotermia

## 7.1 Estudo da cinética eritrocitária

A marcação radioactiva de eritrócitos foi efectuada segundo a técnica de A. M. Zimmer *et al.*, com  $^{99m}\text{Tc}$ , “in vivo”, 20 a 30mn após injeção de pirofosfato estano.

Foram efectuadas sete experiências com um protocolo idêntico ao utilizado para os leucócitos.

Analizadas as medidas obtidas “in vitro”, foi encontrada uma descida de apenas 9% durante o arrefecimento. Nas medidas “in vivo”, foi analisada a actividade no fígado, baço, pulmões e abdómen. Apenas no baço se registou um aumento do valor correspondente a eritrócitos sequestrados.

A entrada de eritrócitos para o baço, sendo irreversível durante o reaquecimento (Fortunato J. S. *et al.*, 1989), pode resultar da fragilização de alguns eritrócitos provocada pelo processo de marcação radioactiva e da sua acumulação nos seios venosos do baço ou de um fenómeno de diluição nos eritrócitos não marcados.

A cinética eritrocitária constitui-se como cinética de elementos corpusculares com uma dinâmica diferente dos leucócitos e das plaquetas. São os elementos de maior porte na suspensão do fluido

sanguíneo (discos bicôncavos com eixo maior de  $8\mu\text{m}$  e com  $2\mu\text{m}$  de espessura) e ocupam cerca de 45% do volume total, em condições normais. Mesmo em condições de temperatura normal, este fluido não tem comportamento Newtoniano. Com a hipotermia, o deslocamento de plasma para os espaços intersticiais aumenta consideravelmente a hemoconcentração e a viscosidade sanguínea.

Houve vários autores que relacionaram a hemoconcentração com a viscosidade sanguínea mas as hipóteses de estudo foram: a inexistência de interações entre as partículas e a estabilização do parâmetro viscosidade. A equação obtida experimentalmente (Dinlenfass L., 1977) é da forma

$$\eta = \eta_0 (1 - \text{TKC})^{-2.5}$$

em que:

$\eta$  - viscosidade da suspensão

$\eta_0$  - viscosidade do fluido suspensor

T - temperatura absoluta

K - constante dependente de interações químicas no meio

C - concentração de partículas.

A distribuição da viscosidade sanguínea não é uniforme (Pries A. R. *et al.*, 1986) (Tangelder G. J. *et al.*, 1986). Para os vasos de diâmetro superior ao do diâmetro do eritrócito, os eritrócitos têm tendência a circular no eixo do vaso, afastando-se da parede. Em condições de

fluxos sanguíneos diminuídos, como é o caso da hipotermia, os eritrócitos circulando em vasos superiores ao seu diâmetro, colam-se, formando agregados que se desfazem quando o fluxo aumenta.

O equilíbrio constantemente repostado na circulação resulta de vectores fundamentais sempre presentes e que são específicos do local: a viscosidade do sangue, a velocidade da circulação (forças de inércia) e a força de resistência aplicada às paredes do vaso (tensão tangencial).

A heterogeneidade das paredes dos vasos sanguíneos é um factor importante pois cria alterações mecânicas locais e gera modificações na bioquímica do meio envolvente.

Tem havido várias tentativas de encontrar funções do comportamento reológico do sangue. Este estudo foi iniciado por Casson em 1959, utilizando um modelo de suspensão de partículas de tinta. A sua aplicação é particularmente relevante em situações de fluxos sanguíneos baixos na circulação dos microvasos em que estes não podem ser considerados uma estrutura separada, estando integrados como parte funcionante do tecido que alimentam, sendo o fluxo sanguíneo capilar responsável pelo gradiente de concentração química e hidrostática entre o lumen do capilar e os tecidos envolventes. Considerando “ $\tau_0$ ” uma tensão no campo resultante destes gradientes químicos e hidrostáticos, em termos matemáticos, a tensão tangencial ou de cisalhamento “ $\tau$ ” pode ser equacionada relacionando a tensão no campo, “ $\tau_0$ ”, uma constante das

características da resistência do líquido à deformação “ $\mu$ ” e o gradiente de velocidade do fluido no local “ $\gamma$ ”:

$$\tau = \tau_0 + \mu\gamma$$

Para altos fluxos sanguíneos, a influência da tensão no campo diminui e a fórmula reduz-se à relação obtida para fluidos Newtonianos:

$$\tau = \mu\gamma \qquad \text{em que } \gamma = dv/dy$$

## 7.2 Estudo da cinética plaquetária

A marcação radioactiva de plaquetas foi efectuada segundo a técnica de H. Sinzinger *et al.*,(1984), com  $^{111}\text{In}$ -oxina sulfato.

Foram efectuadas dez experiências com um protocolo idêntico ao utilizado para os leucócitos.

O processamento de dados referentes às medidas de plaquetas circulantes e às medidas “in vivo” de plaquetas foi semelhante ao efectuado para os leucócitos, pois o conjunto dos dados obtidos assim o sugeriu. A única excepção diz respeito às medidas “in vivo” encontradas no baço que, no caso das plaquetas, não apresentava aumento significativo após a hipotermia.

Foram efectuados ajustes à função de informação por movimento das medidas “in vitro” de  $^{111}\text{In}$ -plaquetas e às medidas “in vivo” referentes à região de interesse correspondente ao fígado. Os resultados obtidos

(quadro 7.2.1) foram comparados utilizando o teste “t de Student emparelhado”. Estes resultados mostram a existência de diferenças significativas entre as amplitudes das duas funções ( $p=0.002$ ), e a não existência de diferenças significativas em relação ao ponto de inflexão das funções de saída de circulação e de entrada no fígado.

	Plaquetas circulantes	Fígado
PI (mn)	m= 25.0 d = 7.6	m = 28.4 d = 7.6
B (%)	m= 41.1 d = 22.3	m = 18.6 d = 10.5

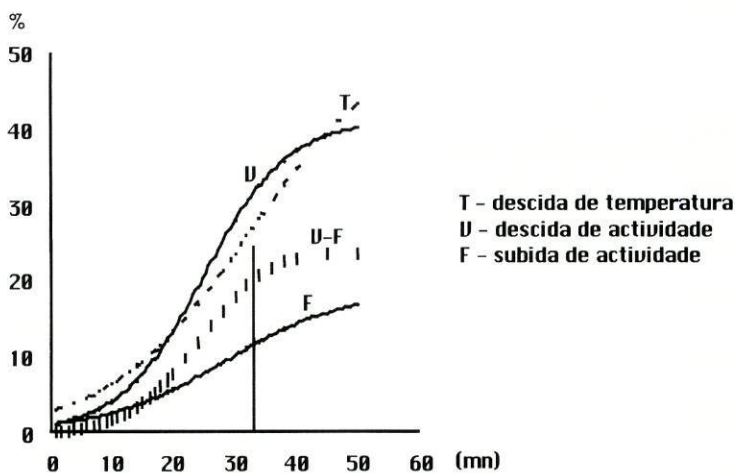
Quadro 7.2.1

As equações teóricas obtidas para representação destas funções são as seguintes:

Fígado	$F = 18.6 / (1 + 17.6 e^{-0.10096t})$
Plaquetas* circulantes	$V = 41.1 / (1 + 40.1 e^{-0.14765t})$

Tal como para os leucócitos, foi estudado o conjunto de dados caso a caso para confirmar a existência sistemática de outro “espaço” plaquetário não directamente medido.

A representação gráfica simultânea das equações teóricas representativas das alterações efectuadas na circulação e das medidas obtidas no fígado, juntamente com a função de marginação que as complementa, e com a equação de descida de temperatura corporal, está representada no gráfico 7.2.1.



**Gráfico 6.2.1:** Representação das curvas de % de actividade circulante, de actividade no fígado, da descida de temperatura e da função obtida por diferença das % de actividade

A função de marginação obtida com o estudo da cinética plaquetária é semelhante à da cinética leucocitária. Pode pôr-se a hipótese de uma cinética comum de marginação pelo arrastamento destes elementos

pelo plasma na sua deslocação para os espaços intersticiais decorrente da vasoconstrição provocada pelo arrefecimento corporal.

No entanto, mesmo em condições basais, existe um fluxo plaquetário para as paredes dos vasos cujo modelo matemático foi estudado por Turitto e Baumgartner (1979) e é assim definido:

$$J(x) = \frac{C_o}{K^{-1} + (\gamma_w D_w^2 / 6.43 x)^{1/3}}$$

em que:

- J - fluxo da plaqueta situada na posição de distancia “x”
- C<sub>o</sub> - concentração de plaquetas no sangue
- K - coeficiente de interacção entre as plaquetas e a parede do vaso, isto é, um coeficiente bioquímico dependente do local
- γ<sub>w</sub> - gradiente de velocidade no vaso
- D<sub>w</sub> - difusividade plaquetária, dependente em polinómio de 2º grau da hemoconcentração (Aarts, 1985).

Pela análise dos resultados obtidos nas duas funções, circulante e de marginação plaquetária, observa-se que a marginação aumenta simultaneamente com o decréscimo de concentração de plaquetas circulantes. Neste caso, a concentração de plaquetas no sangue não pode ser factor determinante da função de marginação o que implica uma importância maior aos factores químicos e ao aumento

da difusividade plaquetária provocado pelo aumento da hemoconcentração.

Keller e Wang (1979) e Aarts (1984) consideram que o aumento de eritrócitos actua como elemento perturbador local para as relativamente pequenas plaquetas (discos de 3  $\mu\text{m}$  de eixo maior e de 0.6 a 1  $\mu\text{m}$  de espessura). A agregação de eritrócitos no eixo dos vasos sanguíneos provocada pela hemoconcentração leva ao aparecimento de partículas de volume múltiplo do volume dos eritrócitos e este efeito de projecção de plaquetas para as paredes dos vasos é directamente proporcional ao quadrado do diâmetro da partícula maior.

# Capítulo 8

## **Percurso Efectuado e Conclusões**

### **8.1 Breve resumo do percurso efectuado**

Após uma reflexão sobre as publicações científicas no âmbito da matéria que este estudo envolve, e a descrição dos materiais e métodos utilizados no campo experimental neste trabalho, foi proposta uma interpretação dos fenómenos associados ao contacto e à movimentação de elementos na circulação sanguínea como transmissores de informação ao longo do tempo.

Apresentadas as equações matemáticas representativas dessa interpretação, foram determinados os parâmetros das suas representações em diversas situações, efectuando ajustes por processo iterativo utilizando derivadas parciais. Os ajustes da função de transmissão por movimento mostraram ser adequados para representar os dados obtidos nas diversas experimentações.

Os parâmetros escolhidos como caracterizadores da função de transmissão por movimento, “B” e “PI”, foram determinados para cada caso e foram objecto de processamento de estudo estatístico adequado.

Estabeleceram-se as funções teóricas representativas da “transmissão de frio” de uma fonte de água gelada para o interior de um corpo, as

funções definidoras da cinética circulante e da cinética “in vivo” de leucócitos e de plaquetas durante a hipotermia corporal.

Comparando as funções da cinética circulante às funções de entrada significativa de leucócitos e de plaquetas em órgãos, foi encontrada uma terceira função de “estacionamento” de leucócitos e de plaquetas provenientes da circulação. Esta função de marginação de leucócitos e plaquetas foi interpretada como associada à cadeia de respostas do organismo na reacção à hipotermia.

## **8.2 Conclusões e alguns comentários**

### **8.2.1 Material e métodos**

Alguna reflexão deve ser feita a propósito dos condicionamentos desta experimentação.

A dificuldade de acesso a material adequado à experimentação animal levou à utilização de material que, ou está obsoleto, ou é inexistente, e então é substituído por adaptações cuja precariedade obriga a esforços suplementares para a execução das tarefas executadas pelo experimentador .

A Experimentação Animal associada à Medicina Nuclear, tem originado a publicação de inúmeros trabalhos científicos. Sendo proibido o uso de animais comuns é difícil a execução de experiências

pois o preço dos animais criados para o efeito é exorbitante relativamente às verbas disponíveis para os trabalhos de investigação.

Quanto à metodologia utilizada, alguns comentários sobre possíveis causas de erro devem ser referidos:

1. A anestesia é por si um factor de arrefecimento corporal e isso foi verificado pois no tempo de estabilização houve descida de temperatura corporal de 1 a 2 °C, não havendo portanto medições radioactivas efectuadas em condições consideradas basais de temperatura corporal.
2. O facto do animal estar na posição de decúbito dorsal não permitiu uma eficiente medição da actividade pulmonar ou do baço, isto é, com a mesma ordem de significância das leituras sobre o fígado, porque a eficiência da medida de actividade varia na razão inversa do quadrado da distância ao colimador. Esta deficiência poderia ser superada pela existência de uma gamma-câmara com dois campos de leitura paralelos, permitindo a utilização da média geométrica das medidas obtidas nas vistas posterior e anterior.
3. Em alguns casos de animais mais corpulentos, os membros e parte da cabeça ficavam de fora do campo da gama-câmara o que origina erros na determinação das percentagens de actividade em relação à actividade total medida “in vivo”.

4. O estudo matemático efectuado sugere que seria bom terem sido efectuadas mais medidas de descida de temperatura bem como mais colheitas de sangue durante a situação de hipotermia para obtenção de dados.

### **8.2.2 Cinética eritrocitária**

Não foi efectuado processamento matemático de funções da cinética eritrocitária, pois a única fuga da circulação dos eritrócitos durante a hipotermia é para o baço, em percentagem escassa, e esta saída é proveniente da fragilização provocada pelo seu manuseamento durante o processo de marcação radioactiva e da sua acumulação nos seios venosos.

Vários trabalhos científicos publicados sobre o estudo dos efeitos da hipotermia corporal indicam que o principal fenómeno associado aos eritrócitos é indirecto e proveniente da hemoconcentração provocada pela fuga de plasma para os espaços extravasculares. Devido a esta hemoconcentração, há um aumento da viscosidade do sangue com a consequente alteração dos parâmetros físicos da dinâmica circulatória, tais como a descida da intensidade do fluxo e a deslocação da constante de Reynolds para um valor inferior ao que seria normal em condições basais.

### **8.2.3 Arrefecimento corporal**

Estas alterações na circulação condicionam de uma forma directa o transporte da informação de arrefecimento pois a convecção mostrou ser o principal veículo.

A equação determinada para a descida de temperatura esofágica atinge o limite máximo no momento a partir do qual havia grandes probabilidades de arritmias ou paragem cardíaca (22 °C). A esta temperatura, o fluxo sanguíneo está diminuído e a transmissão de calor por movimento fica estacionária. Este momento é muito anterior ao tempo em que seria atingida a temperatura de equilíbrio com a fonte de água gelada (0 °C) o que fisicamente se obteria muito mais tardiamente com o processamento de transmissão do calor por condução.

A equação teórica obtida representativa da descida de temperatura interna leva-nos a considerar para ponto de velocidade máxima de descida, o instante em que metade dos elementos estão arrefecidos. Daí em diante, a velocidade da informação baixa até ser atingido o limite mínimo de condições de circulação.

### **8.2.4 Cinética leucocitária**

O estudo da cinética leucocitária efectuado em medidas “in vitro” permitiu:

1. O aproveitamento de maior número de casos em que foi possível testar o melhor ajuste da função de informação por movimento, tendo sido utilizadas contagens de leucócitos de experimentações com marcação radioactiva de plaquetas e de eritrócitos. Este facto sugere que esta cinética circulante segue uma variação compatível com as alterações da velocidade de circulação.
2. Concluir que não existem diferenças significativas entre a saída de circulação de neutrófilos e de leucócitos, nem em quantidade nem em velocidade de saída.
3. Concluir que o ponto de inflexão da saída de leucócitos circulantes antecede significativamente o ponto de inflexão da função de descida de temperatura esofágica.

Pode ainda ser considerado o facto de, além da via circulante, haver a influência de outros fenómenos químicos ou biológicos que aumentariam a velocidade de saída dos neutrófilos circulantes.

Pode ainda ser considerado que há diferenças entre as características intrínsecas de mediação da informação nos dois casos considerados: enquanto a transmissão de “frio” é um sistema que tem perdas para fora do conjunto de moléculas transmissoras por movimento (por exemplo a fuga do plasma para os espaços intersticiais), a cinética leucocitária constitui-se como um sistema fechado em que são medidos

directamente dois espaços e o terceiro é determinado por diferença.

4. Verificar que a percentagem de saída de neutrófilos marcados é muito inferior (cerca de metade) à saída da percentagem de neutrófilos não marcados. Este facto pode ser explicado pelas alterações que a marcação radioactiva provoca na molécula, inibindo a sua aptência para a ligação a outras moléculas adesivas.

### **8.2.5 Cinética dos $^{111}\text{In}$ -neutrófilos**

O estudo da cinética dos neutrófilos marcados efectuado “in vivo” permitiu:

1. Verificar o aumento de sequestro de neutrófilos no fígado e no baço em relação ao verificado em condições basais.
2. Reencontrar um “espaço” de neutrófilos que saíem da circulação para os vasos periféricos ou para órgãos extra hepato-esplénicos.
3. Encontrar a função de entrada de neutrófilos para este “espaço” obtida por diferença de duas funções.
4. Relacionar a variação da função de entrada para este espaço com o ponto de inflexão da equação de descida de temperatura

interna. A função de entrada cresce até este instante e a partir daí mantém-se constante.

### **8.2.6 Cinética das <sup>111</sup>In-plaquetas**

O estudo da cinética das plaquetas marcados efectuado “in vivo” permitiu:

1. Verificar o aumento de sequestro de plaquetas no fígado em relação ao verificado em condições basais.
2. Reencontrar um “espaço” de plaquetas que saíem da circulação para os vasos periféricos ou para territórios extra hepato-esplénicos.
3. Encontrar a função de entrada de plaquetas para este “espaço” obtida por diferença de duas funções.
4. Relacionar a variação da função de entrada para este espaço com o ponto de inflexão da equação de descida de temperatura interna. A função de entrada cresce até este instante e a partir daí mantém-se constante.

### **8.2.7 Função de informação por movimento de partículas**

A utilização desta função nesta estrutura mostrou ser de utilidade e o relacionamento dos parâmetros que ela gera com os aspectos físicos dos processos envolvidos merece a atenção para a sua aplicabilidade a

outros campos em que pode estar subjacente uma estrutura semelhante.

As condições iniciais que terão de estar presentes nos fenómenos são:

1. Uma lógica (binária) associada aos elementos de um conjunto em que haja elementos “1” e “0”.
2. Uma velocidade de passagem de elementos “0” a “1” que seja proporcional ao número de elementos em estado “0” e proporcional ao número de elementos em estado “1”.
3. A consideração de que a velocidade de passagem pode anular-se antes de os elementos ficarem todos “1”, isto é, antes de ser atingida a saturação, se estiver bloqueado o sistema de transmissão. Um exemplo deste caso foi encontrado neste trabalho no bloqueamento da descida de temperatura interna pela acentuada descida da velocidade de circulação.

# **Bibliografia – 1ª Parte**

RED BLOOD CELL DEFORMABILITY INFLUENCES PLATELET VESSEL  
WALL INTERACTION IN FLOWING BLOOD

**Aarts P.A.M.M.**, R. M. Heetbaar and J. J. Sixma

Blood, pp 1228-1233, 1984

BLOOD PLATELETS ARE CONCENTRATED NEAR THE WALL AND RED  
BLOOD CELLS IN THE CENTER IN FLOWING BLOOD

**Aarts Piet A.M.M.**, Sjaak A. T. van den Broek, Gerrit W. Prins, Gerard D.C.  
Kuiken, Jan J. Sixma, and Robert M. Heetbaar

Arteriosclerosis, Vol 8, N° 6, November/December, 1988

EXERCISE LEUKOCYTOSIS WITH AND WITHOUT BETA-ADRENERGIC  
BLOKADE

**Ahlborg B.** and Ahlborg G.

Acta Med Scand, Vol 187, pp 241 - 246, 1970

THE DISTRIBUTION OF GRANULOCYTES IN THE BLOOD OF NORMAL  
SUBJECTS

**Athens J. W.**, O. P. Haab, S. O. Raab, A. M. Mauer, H. Ashenbrucker, G. E.  
Cartwright and M. M. Windrobe

Leukokinetic Studies, pp 159-164, 1960

THE TOTAL BLOOD, CIRCULATING AND MARGINAL GRANULOCYTE  
POOLS AND THE GRANULOCYTE TURNOVER RATE IN NORMAL  
SUBJECTS

**Athens J. W.**, O. P. Haab, S. O. Raab, A. M. Mauer, H. Ashenbrucker, G. E.  
Cartwright and M. M. Windrobe

Leukokinetic Studies, pp 989 - 995, 1961

THE INFLUENCE OF THE "COLLECTION INJURY" ON THE SURVIVAL AND DISTRIBUTION OF INDIUM-111 LABELLED CANINE PLATELETS

**Badenhorst P. N.**, M. G. Lotter, A. du P. Heyns, O. R. van Reenen, C. Herbst, H. Pieters, H. F. Kotze, L. J. Duyvené de Wit and P. C. Minnaar.

British Journal of Haematology, 52, pp 233-240, 1982

NEW "EX VIVO" RADIOISOTOPIC METHOD OF QUANTITATION OF PLATELET DEPOSITION - STUDIES IN FOUR ANIMAL SPECIES

**Badimon L.**, V. Fuster, J. H. Chesebro and M. K. Dewanjee

Tromb Haemostas (Stuttgart), 50 (3) , pp 639 - 644, 1983

NEUTROPHIL MIGRATION IN VITRO AND IN VIVO DURING HIPOTERMIA

**Biggar W. D.**, D. J. Bohn, G. Kent, C. Baker and G. Hamilton

Infection and Immunity, pp 857-859, Dec., 1984

THE KINETICS OF GRANULOPOIESIS IN NORMAL MAN

**Cartwright G. E.**, J. W. Athens and M. M. Wintrobe

Blood, Vol 24, N°6, December, 1964

A FLOW EQUATION FOR PIGMENT-OIL SUSPENSION OF THE PRINTING INK TYPE

**Casson N.**

Rheology of Disperse Systems, pp 84-104, 1959

HYPOTHERMIA

**Collins K.J.**

Oxford University Press, 1983

VENTRICULAR FIBRILATION IN HYPOTERMIC DOG

**Covino V.G.**, Diana A. Charleson and Henry E. D'Amato

1954

PULMONARY VASCULAR LEUKOSTASIS RESULTING FROM  
COMPLEMENT ACTIVATION BY DIALYSER CELLOPHANE MENBRANES

**Craddock P.R.**, J. Fehr, A.P.Dalmasso, K.L.Brigham and H. S. Jacob

The Journal of Clinical Investigation, 59, pp 879-888, 1977

THIOCYANATE SPACE AND THE DISTRIBUTION OF WATER IN THE  
MUSCULATURE OF THE HYPOTHERMIC DOG

**D'Amato H. E.**

Am. J. Physiology, 178, pp 143-147, 1954

THEORETICAL ASPECTS AND CLINICAL APPLICATIONS OF THE BLOOD  
VISCOSITY EQUATION CONTAINING A TERM FOR THE INTERNAL  
VISCOSITY OF THE RED CELL

**Dintenfass L.**

Blood Cells, 3, pp 367-374, 1977

LEUKOCITE AND PLATELET MARGINATION WITHIN  
MICROVASCULATURE OF RABBIT LUNGS

**Doerschuk C.M.**, Downey G.P., Doherty D.E., English D., Gie R. P., Phgami M.,

Worthen G.S., Henson P.M. and J. C. Hogg

J. Appl. Physiol., 68 (5), pp 1956-1961, 1990

RETENTION OF LEUKOCYTES IN CAPILLARIES: ROLE OF CELL SIZE  
AND DEFORMABILITY

**Downey G. P.**, D. E. Doherty, B. Schwab III, E. L. Elson, P. M. Henson and S.

Worthen

J. Appl. Physiol., 69(5), pp 1767-1778, 1990

EFFECT OF HIPOTHERMIA ON THE FLOW CHARACTERISTICS OF BLOOD

**Eiseman B.**, F.C. Spencer

Recent Advances in Surgery, 52(3), pp 532-544, 1962

L'EFFET DE L'HYPOTHERMIE PROVOQUÉE DANS LA CIRCULATION  
CAPILLAIRE DU FOIE

**Escalda A.**, J. Silva Carvalho et J. Mirabeau Cruz

C. R. Soc. Biol., 179, pp 801-804, 1985

HYPOTHERMIA-INDUCED HAEMOSTATIC AND BIOCHEMICAL  
PHENOMENA. AN EXPERIMENTAL MODEL

**Escalda A.**, M. Marques, L. Silva Carvalho, M.A. Barradas, J. Silva Carvalho, J.  
Mirabeau Cruz, D.P. Mikhailidis

Platelets, 4, pp 17-22, 1993

EFEITOS DA HIPOTERMIA SOBRE A CINÉTICA DOS ELEMENTOS  
CORPUSCULARES DO SANGUE

**Fortunato J. S.**, Pinheiro M. J., Rodrigues M. A., Amaral I

III Congresso Nacional de Medicina Nuclear, 1985

THROMBOCYTOPENIA DURING BODY HIPOTHERMIA

**Fortunato J. S.**, Pinheiro M. J., Rodrigues M. A., Amaral I.

Atheroma, II, pp 21-23, 1989

ACUTE EFFECTS OF ADRENALINE ON PLATELET AGGREGATION AND  
KINETICS IN VIVO. INHIBITION OR REVERSION OF THOSE EFFECTS BY  
INDOBUFEN AND LIDOCAINE

**Fortunato J.S.**, Pinheiro M.J., Rodrigues M.A., Monteiro M.C., Amaral I.

Fibrinolysis, 4, suppl 1, 1990

ACUTE EFFECTS OF ADRENALINE ON PLATELET AGREGATION AND KINETICS *IN VIVO*

**Fortunato J.S.**, Pinheiro M.J., Monteiro M.C., Rodrigues M. A., Amaral I.

The Journal of Nuclear Biology and Medicine, 35, pp 105-110, 1991

FASE INICIAL DO SEQUESTRO DE PLAQUETAS MARCADAS APÓS A INJEÇÃO NA LEUCOPENIA, TROMBOCITOPENIA E HEMOCONCENTRAÇÃO DURANTE A HIPOTERMIA CORPORAL.

**Fortunato J.S.**, Pinheiro M. J., Fortunato M.D., Rodrigues M. A.

Reunião da Sociedade Portuguesa de Fisiologia, Coimbra, 1993

A RAPID METHOD FOR ESTIMATING MEAN PLATELET SURVIVAL TIME

**Giuliani D. C.**, E. H. Ford and B. S. Morse

J. Nucl. Med., 30, pp 1550-1553, 1989

HYPOTHERMIA OF 1.5°C IN DOGS FOLLOWED BY SURVIVAL

**Gollan F.**, D.S. Tysinger, J.T. Grace, R.C. Kory and G.R. Meneely

Am. Physiol. Soc., 13, pp 297-303, 1954

CARDIOVASCULAR RESPONSE OF THE DOG TO IMMERSION HYPOTHERMIA

**Hegnauer A.H.**, W.J. Shriber and O. Haterius

Lab. Clin. Med., 161, pp 455-465, 1950

PLATELET KINETICS DURING DEEP HYPOTHERMIA

**Hessel E.A.**, G. Schmer, D.H. Dillard

Journal of Surgical Research, 28, pp 23-34, 1980

NEUTROPHIL KINETICS AND LUNG INJURY

**Hogg James C.**

Physiological Reviews, 67, n°4, October, 1987

ERITHROCYTE TRANSIT AND NEUTROPHYL CONCENTRATION IN THE  
DOG LUNG

**Hogg James C.**, T. McLean, B.A. Martin and B. Wiggs

J. Appl. Physiol, 65(3), pp 1217-1225, 1988

BATH REWARMING FROM IMMERSION HIPOTHERMIA

**Hoskin R.W.**, M.J. Melinyshyn, T.T. Romet and R.C.Goode

Appl. Physiol, 61(4), pp 1518-1522, 1986

HYPOTHERMIC HEMOCONCENTRATION

**Kanter G.S.**, R.H. Lubinski

Am. J. Physiol., 214(4), 856-859, 1968

CLINICAL HEMATOLOGY

**Lee G. R.**, T. C. Bithell, J. Foerstes, J. W. Athens and J. N. Lukens

Wintrobe's, ninth edition, 1993

KINETICS, DISTRIBUTION AND SITES OF DESTRUCTION OF CANINE  
BLOOD PLATELETS WITH IN-111 OXINE

**Lotter M.G.**, P.M. Badenhorst, A.P. Heyns, O.R. Van Reenen, P.C. Minnaar

J. Nuclear Medicin, 21, pp36-40, 1980

EVALUATION OF MATHEMATICAL MODELS TO ASSESS PLATELET KINETICS

**Lotter M.G.**, A.P. Heyns, P.M. Badenhorst, P. Wessels, J. M. Van Zil, H. F. Kotze, P.C. Minnaar

J. Nuclear Medicine, 27, pp 1192-1201. 1986

GRANULOCYTE ADHERENCE CHANGES INDUCED BY HEMODIALYSIS ENDOTOXIN, EPINEPHRINE AND GLUCOCORTICOIDS

**MacGregor R.R.**

Annals of Internal Medicine 86, pp 35-39, 1977

PLATELET-NEUTROPHIL INTERACTIONS

**Marcus A.J.**, L. B. Safier, H.L.Ullman, N. Islam, M.J. Broekman, J.R. Falck, S. Fisher and C. von Schacky

The Journal of Biological Chemistry, 263, pp 2223-2229, 1988

NEUTROPHIL-ENDOTHELIAL CELL INTERACTIONS IN THE LUNG

**Marlys H.G.** and K.H. Albertine

Ann. Rev. Physiol., 55, pp 227-248, 1993

ADHESION BETWEEN NEUTROPHILS AND PLATELETS: A MODULATOR OF THROMBOTIC AND INFLAMMATORY EVENTS?

**Nash G. B.**

Thombosis Research, Vol 74, Suppl.1, pp S3-S11, 1994

CATECHOLAMINES, CIRCULATION AND THE KIDNEY DURING IMMERSION IN HUMANS

**Norsk P.**, B. Flemming and N.J. Christensen

J. Appl. Physiol., 69(2), pp 479-484, 1980

HEMATOLOGIC VALUES IN HYPOTHERMIC AND REWARMED YOUNG CALVES

**Olson D. P.**, South P. J., Hendrix K.

Am. J. Vet Res, Vol 44, N° 4, pp 572-576, 1982

INTRAHEPATIC KINETICS OF INDIUM-111-LABELLED PLATELETS

**Peters A. M.**, S. H. Saverymuttu, F. Malik, P.W. Ind and J. P. Lavender

Thrombosis and Haemostasis, 54(3), pp 595-598, 1985

HEPATIC AND SPLENIC PLATELET SEQUESTRATION DURING DEEP HIPOTHERMIA IN THE DOG

**Pina-Cabral J. M.**, I. Amaral, M. M. Pinto and L.H.Guerra e Paz

Haemostasis 2, pp 235-244, 1974

PLATELET SEQUESTRATION DURING HIPOTHERMIA IN DOGS TREATED WITH SULPHINPYRAZONE AND TICLOPIDINE - REVERSIBILITY ACCELARATED AFTER INTRA-ABDOMINAL REWARMING

**Pina-Cabral J. M.**, Ribeiro da Silva A. and A. Almeida Dias

Thrombosis and Haemostasis, 54(4), pp 838-841, 1985

THE EFFECT OF BODY TEMPERATURE ON LEUKOCYTE KINETICS DURING CARDIOPULMONARY BYPASS

**Quiroga M.M.**, Miyagisshima R., Haendschen M.D., Glovsky M., Martin B.A. and J.C. Hogg

J. Thorac Cardiovasc Surg,90, pp 91-96, 1985

HYPOTHERMIA: PATHOPHYSIOLOGY, CLINICAL SETTINGS AND MANAGEMENT

**Reuler J. B.**

Annals of Internal Medicine 89, pp 519-527, 1978

IN VIVO NEUTROPHIL SEQUESTRATION WITHIN LUNGS OF HUMANS IS DETERMINED BY IN VITRO "FILTERABILITY"

**Selby C.**, E. Drost, P. K. Wraith and W. Macnee

Neutrophil Deformability and Lung Sequestration, pp 1996 - 2003, 1991

EFFECTS OF PROFOUND HIPOTHERMIA ON LEUCOCYTES AND PLATELETS

**Shenaq S. A.**, D.H. Yawn, A. Saleem, R. Joswiak and E. S. Crawford

Annals of Clinical and Labory science, Vol 16, N°2, 1986

ADHESION OF ACTIVATED PLATELETS TO POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

**Spangenberg P.**

Thrmbsis Research, Vol 74, Suppl 1, pp S35-S44, 1994

THE METABOLIC ASPECTS OF HYPOTERMIA

**Stoner H. B.**, Randall P. E.

The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease, pp 403-416, 1990

EFFECTS OF CIRCULATORY ARREST AND REWARMING ON REGIONAL BLOOD FLOW DURING SURFACE-INDUCED HYPOTHERMIA

**Su J. W.**, Amory D. W., Murray P. Sands, H. Mohri

American Heart Journal, Vol 100, N° 3, September, 1980

BLOOD PLATELET KINETICS IN NORMAL SUBJECTS MODELLED BY COMPARTMENTAL ANALYSIS

**Sweetlove M.A.**, M. G. Lotter, J.P.Roodt, P.N. Badenhorst, H.F. Kotzé, A.P.Heyns

Eur. J. Nucl. Med., 19, pp 1023-1031, 1992

INDIUM-111-LABELED AUTOLOGOUS LEUKOCYTES IN MAN

**Thakur M. L.**, J. P. Lavender, R. N. Arnot, D. J. Silvester and A. Segal

J. Nuclear Medicine, Vol 18, N° 10, 1977

EFFECT OF ARTIFICIALLY CONTROLLED HEART RATE ON THE  
INCIDENCE OF VENTRICULAR FIBRILLATION IN HYPOTHERMIA

**Torres J. C.**, E. T. Angelakos and A. H. Hegnauer

Am. J. Physiology, 195(2), pp 437-439, 1958

PLATELET DEPOSITION ON SUBENDOTHELIUM EXPOSED TO FLOWING  
BLOOD: MATHEMATICAL ANALYSIS OF PHYSICAL PARAMETERS

**Turitto V. T.** and Baumgartner H. R.

Trans. Am. Soc. Artif., 21, pp 593-600, 1979

HYPOTHERMIA-INDUCED REVERSIBLE PLATELET DYSFUNCTION

**Valery C.R.**, Feingold H., Cassidy G., Ragno G., Khuri S., Altschule M. D.

Ann. Surg., 205(2), pp 175-181, 1987

A CAUSE OF THROMBOCYTOPENIA AND LEUKOPENIA THAT OCCUR IN  
DOGS DURING DEEP HYPOTHERMIA

**Villalobos T. J.**, E. Adelson, P. A. Riley and W. H. Crosby

J. Clinical Invest., Vol 37, pp 1-7, 1958

BLOOD STUDIES IN THE HYPOTHERMIC DOG

**Willson J. T.**, Miller W. R. and Eliot T.S.

Surgery, 43 (6), pp 979 - 989, 1957

LEUCOCYTE CELLULAR ADHESION MOLECULES

**Yong K.**, A. Khwaja

Blood Reviews, 4, pp 211 - 225, 1990

HEMODYNAMICS AND BLOOD FLOW DISTRIBUTION FOLLOWING  
PROLONGED CIRCULATION AT 5 °C

**Zarins C. K.** and Skinner D. B.

Am. J. Physiol., 229(2), pp 275-278, 1975

## **2ª Parte**

**Estudo de um  
modelo  
representativo do  
transporte  
intracelular do íon  
de  $\text{Ca}^{2+}$**

# Capítulo 1

# Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ no Citoplasma

## 1.1 Introdução

$\text{Ca}^{2+}$  é um íão universal de sinalização que controla um vasto sistema de processos celulares incluindo secreção glandular, contracção muscular e divisão celular (Martin and Michael, 1995).

Os fenómenos associados a estes múltiplos processos variam no tempo e no espaço, mas os complexos mecanismos que os geram não são ainda inteiramente conhecidos.

As células utilizam essencialmente duas fontes de cálcio ambas de muito mais elevada concentração do que a citoplasmática: entrada a partir de reservatórios intracelulares (por exemplo, pelo retículo sarcoplasmático) e a entrada através da membrana plasmática.

Estas entradas têm características específicas para cada tipo de célula. Nas células do músculo esquelético, o íão  $\text{Ca}^{2+}$  entra no citoplasma proveniente sobretudo do retículo sarcoplasmático que se encontra muito desenvolvido sendo o sinal eléctrico mediado por túbulos transversais. Nas células do músculo cardíaco, o íão  $\text{Ca}^{2+}$  entra no citoplasma proveniente do retículo sarcoplasmático moderadamente desenvolvido, com túbulos transversais e também do fluído extracelular. Nas células do músculo liso, o íão  $\text{Ca}^{2+}$  entra vindo do

retículo sarcoplasmático, pouco desenvolvido e sem túbulos transversais, do fluido extracelular, e talvez das mitocôndrias. (Stuart I. Fox, 1996).

Nos ovos dos animais sempre se presumiu que as fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular residiam no retículo endoplasmático liso. No entanto resultados recentes demonstraram que tanto o núcleo como a mitocôndria também funcionam como reservatórios de cálcio (Sousa *et al.*, 1997).

A permeabilidade das membranas pode ser alterada para efectuar mudanças rápidas de fluxos de iões, abrindo e fechando canais específicos de cada ião por variações de potencial eléctrico.

## 1.2 Potencial de acção

A entrada do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana é regulada pelo estado eléctrico expresso pelo grau de despolarização. Esta despolarização é provocada por alterações da permeabilidade da membrana ao  $\text{Na}^+$  e ao  $\text{K}^+$  e é regulada por canais específicos que abrem em resposta a um estímulo.

No potencial de acção, a difusão destes iões ocorre em duas fases: primeiro o  $\text{Na}^+$  entra (período refractário absoluto) e na segunda fase o  $\text{K}^+$  sai (período refractário relativo). Este fluxo de iões provoca mudanças no potencial de membrana e depende das propriedades de

condução da própria membrana. Dá-se a despolarização quando determinado estímulo provoca alteração da permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  com a entrada de cargas positivas para o interior da célula em repouso. O retorno ao estado anterior será a repolarização. Se um estímulo causa a entrada de cargas negativas para o interior da célula em repouso, então verifica-se a hiperpolarização. Consoante a amplitude do estímulo aumenta, a frequência dos potenciais de acção produzidos nesse ponto aumentarão simultaneamente.

Com o aumento da frequência, o tempo entre os sucessivos potenciais de acção decresce mas apenas até um certo valor limite, nunca podendo um início acontecer antes do período anterior ser completado. Durante o período refractário, a membrana é incapaz de responder a outro estímulo. Se um segundo estímulo é aplicado enquanto os canais de  $\text{Na}^+$  estão abertos em resposta a um primeiro estímulo, o segundo estímulo não provocará nenhum efeito. A membrana encontra-se então no chamado período refractário absoluto. Passado este período, se um estímulo é aplicado abrindo os canais de  $\text{K}^+$ , a membrana entra num processo de repolarização (período refractário relativo). Uma fracção de segundo depois da abertura dos canais de  $\text{Na}^+$ , estes fecham. O estímulo de despolarização causa a abertura dos canais de  $\text{K}^+$  tornando a membrana permeável ao  $\text{K}^+$ . A alteração de (-65 a -90) mv a (20 a 40) mv e o regresso (repolarização) a (-65 a -90) mv dura aproximadamente 3ms.

É neste período refractário relativo que ocorre a entrada de cálcio pela membrana. Os canais de cálcio, activados pelas variações de tensão, provocam a entrada do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana celular e esta entrada serve de sinal para a libertação de neurotransmissores ou hormonas. De um modo similar, nos músculos, o ião  $\text{Ca}^{2+}$  desencadeia o processo mecânico da contracção com a excitação eléctrica.

### 1.3 Sistemas de sinalização

A concentração de cálcio citoplasmático é muito baixa quando comparada com a concentração de cálcio no fluído extracelular ou no retículo sarcoplasmático. Este *status quo* é mantido e necessário para a actuação do cálcio como segundo mensageiro. O ião  $\text{Ca}^{2+}$  serve de segundo mensageiro na acção de várias hormonas.

Um sinal biológico pode ser definido como um indicador de início ou terminação de um processo intracelular. Quando a epinefrina estimula os órgãos alvo, liga-se a proteínas receptoras nas membranas. Há dois tipos de receptores adrenérgicos:  $\alpha$  e  $\beta$ . A estimulação dos receptores  $\alpha_1$  activa a célula alvo pela via do sistema do segundo mensageiro de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A ligação da epinefrina ao seu receptor  $\beta_1$  adrenérgico, activa (via proteína G) a enzima fosfolipase C na membrana celular. O substrato desta enzima é o bifosfato de fosfatidilinositol. Da cisão deste produto resulta o trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG).

A libertação de cálcio das reservas intracelulares é controlada por dois sistemas: os receptores rianodínicos (RyR) e os receptores de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). São os factores determinantes na abertura destes canais de difusão. A abertura de canais por  $\text{IP}_3$  não só requer  $\text{IP}_3\text{R}$  mas ainda depende da concentração local de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bezprozvanny *et al.*, 1991; Finch *et al.*, 1991; Iino and Endo, 1992).

Embora os mecanismos deste fenómeno não sejam ainda conhecidos em detalhe, estes canais podem estar fechados, abertos ou inactivos; fechados quando a concentração de cálcio é baixa, com a probabilidade de abertura a aumentar quando a concentração de cálcio excede um certo limiar. Os canais activos podem então passar ao estado de inactividade.

Tal como na activação, as velocidades de desactivação são mais rápidas com altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ . Contudo a desactivação é muito mais prolongada que a activação. Estas propriedades não lineares do  $\text{IP}_3\text{R}$  constituem um mecanismo de feedback - positivo para a activação, negativo para a desactivação (Raz *et al.*, 1997). A capacidade de desactivação é uma importante característica de  $\text{IP}_3\text{R}$  porque consegue sustentar a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo contribuir para o fenómeno de redução da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol.

Diferente do sistema de  $\text{IP}_3\text{R}$ , os receptores rianodínicos (RyR) apenas induzem abertura de canais mas têm propriedades de feedback semelhantes (Gyorke and Fill, 1993).

Estes dois receptores controlam o processo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e são de importância fundamental para coordenar essa entrada e os efeitos subsequentes de picos e ondas de cálcio.

O processo de indução de  $\text{Ca}^{2+}$  é autocalítico significando que uma pequena largada de  $\text{Ca}^{2+}$  é amplificada criando um feedback positivo até que o processo de entrada termine originando um feedback negativo. Num músculo em estado de relaxamento, a concentração de cálcio é baixa e o potencial de membrana é de cerca de  $-90\text{mv}$ . Quando há um aumento muito significativo da concentração de cálcio, a célula muscular é estimulada a contrair-se. A esta contracção segue-se um longo período refractário da ordem das centenas de ms.

O tempo de ocorrência deste fenómeno de desactivação é variável de célula para célula. Por exemplo, no músculo liso é de  $100\text{ms}$ , no miócito cardíaco é de  $200\text{ms}$  e no ovócito de *Xenopus*, com um diâmetro de  $4\text{-}6\mu\text{m}$ , é de cerca de  $500\text{ms}$ . No entanto, no músculo cardíaco, o tempo de resposta global com chegada a toda a célula é de  $600\text{ms}$  (Martin and Michael, 1995).

Durante esta despolarização há um declínio da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma e a velocidade e extensão da desactivação são independentes do grau de activação (W. Melzer *et al.*, 1984).

A concentração dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma varia de um modo pulsátil, com oscilações regulares cuja frequência aumenta na despolarização celular. A correlação espacial de um pico de  $\text{Ca}^{2+}$  é

uma onda de cálcio na qual este está inicialmente elevado apenas numa região da célula, acabando por se propagar a toda a célula. Por exemplo, a análise da concentração celular dos íões de cálcio nos ovócitos recentemente fecundados, mostraram que o espermatozoide fecundante induz, não apenas um aumento passageiro de cálcio, mas também uma série de ondas de cálcio. A frequência dessas oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  mostrou ser determinante no ciclo celular, actuando como um código para desencadear o desenvolvimento embrionário (Sousa *et al.*, 1997).

Como já foi explicitado, os íões de cálcio regulam e coordenam um conjunto de acontecimentos celulares incluindo a actividade eléctrica, secreção, contracção muscular, síntese de proteínas e expressão genética. Estes acontecimentos são mediados pelos receptores de cálcio localizados em regiões celulares distintas. Por exemplo, o sensor de cálcio para um rápido esvaziamento das pequenas vesículas sinápticas está localizado muito próximo dos canais de cálcio activados pelas variações de potencial (Llinás *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1990; Adler *et al.*, 1991). Pelo contrário, a depleção lenta de grandes vesículas e a regulação da síntese de proteínas ocorre através de sensores localizados a alguma distância da membrana plasmática (Verhage *et al.*, 1991).

Muitos estudos de modelação têm sido efectuados nesta área. Um grupo de estudos versa os factores determinantes dos aumentos

rápidos dos níveis de cálcio na imediata vizinhança dos canais de membrana (Chad and Eckert, 1984; Fogelson and Zucker, 1985; Simon and Llinas, 1985; Parnas *et al.*, 1989; Yamada and Zucker, 1992, Augustine *et al.*, 1987). Outro grupo de estudos de modelação determina a distribuição de cálcio livre nas várias partes da célula em tempos alongados (Smith and Zucker, 1980; Connor and Nikolakopoulou, 1982; Stockbridge and Moore, 1984; Sala and Hernandez-Cruz, 1990).

#### **1.4 Movimento com interacção de partículas**

Difusão é o processo que traduz a tendência do movimento aleatório de moléculas ou íões se efectuar de regiões de alta concentração para regiões de mais baixa concentração, reduzindo os gradientes de concentração e aumentando a entropia (Anexo E). Por outro lado, recentes estudos de modelação (Markran *et al.*, 1998; Narafhi and Neher, 1997) têm posto em evidência os efeitos da interacção molecular nos fenómenos de transporte.

A natureza estocástica das interacções moleculares pode ter um profundo efeito nas propriedades dinâmicas. De uma forma macrocópica, a difusão é medida em termos de uma mudança de concentração no tempo como consequência de um fluxo de matéria. Este fluxo obedece às leis de Fick e foi já estudado em tratamento analítico extenso das equações de difusão (Crank, 1975). Se houver

interacção de partículas, o fenómeno passa a ser explicado por funções não lineares tal como tem sido verificado por vários autores.

A distribuição destas funções é essencial para a compreensão da variação espacial e temporal do cálcio na célula depois da entrada pelos canais da membrana plasmática ou proveniente dos armazéns intracelulares.

Einstein mostrou em 1905 que, como consequência dos seus movimentos de translação, rotação e vibração, uma pequena partícula em solução pode atingir cerca de  $10^{13}$  a  $10^{15}$  colisões por segundo com as moléculas vizinhas. O coeficiente de fricção depende da forma e dimensão das moléculas mas não directamente da sua massa. Considerando apenas uma partícula esférica e utilizando a fórmula de Stokes o coeficiente de fricção é  $f=6\pi\eta r$  em que “ $r$ ” é o raio das partículas e “ $\eta$ ” a viscosidade do solvente se o solvente for homogéneo (Anexo G).

No caso da célula temos um meio muito heterogéneo com uma gama de partículas de raios muito diferentes entre as quais o ião  $\text{Ca}^{2+}$ .

De um modo geral, três tipos de forças agem em cada partícula do soluto: de difusão, de pressão e de interacções entre partículas. Estas forças influenciam o movimento em diferentes situações de tempo e distância. Pelas reacções interpartículas o coeficiente de difusão tem variações, sendo inibido por interacções directas (James *et al.*, 1989).

As interações de partículas são suficientes para produzir alterações nos coeficientes de difusão. As restrições à difusão com obstáculos foram identificadas como um factor limitador em inúmeros processos biológicos, tais como aporte de nutrientes das células tumorais (Freyer and Sutherland,1986), taxa de extracção de oxigénio pelos eritrócitos (Coin and Olson,1979), e transporte de cálcio em células do músculo liso (Kargacin,1994).

As velocidades relativas destes mecanismos são determinantes para separar o fenómeno complexo de difusão e reacção a obstáculos. Utilizando o método de Monte Carlo foram simuladas diferentes situações com três tipos de obstáculos que afectam a difusão e que podem ser aplicados à dinâmica dos fenómenos celulares (Mark *et al.*,1995).

A constante de difusão para uma dada temperatura absoluta e para um meio com determinada viscosidade pode ser calculada usando directamente a teoria cinética do gás e entrando com as constantes termodinâmicas e parâmetros moleculares.

Einstein foi o primeiro a verificar que, num sistema não homogéneo, o coeficiente de difusão está relacionado com a pressão osmótica  $P$  (difusão de solvente) e com o coeficiente de fricção  $f$  do seguinte modo (Purse and Tough,1985):

$$D(\rho) = (1/ f(\rho)) * (dP(\rho)/d \rho)$$

Nesta equação generalizada de Stokes-Einstein,  $\rho$  é a densidade das proteínas. Pode mostrar-se que esta equação é equivalente à fórmula de Einstein:

$$D = K_B T / f$$

considerando que

$$P = \rho K_B T$$

onde  $K_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura absoluta.

Nas análises de difusão tridimensional, é assumido que a pressão osmótica é modificada por interacção directa das partículas e que a dependência do coeficiente de fricção é essencialmente devida a interacções de partículas.

Estas interacções de partículas constituem obstáculos à difusão. As interacções de partículas influenciam a difusão de um modo complexo e não linear. Se os obstáculos são móveis, a constante de difusão depende da fracção da área dos obstáculos e da interacção das partículas (Michael J. Saxton, 1987).

Percursos aleatórios em sistemas não obstruídos no seu todo mostram uma estrutura que pode ser interpretada como difusão livre, difusão obstruída, movimento directo ou movimento em domínios finitos. Foi feito o estudo, não só destas trajectórias, mas também da probabilidade de ocorrência destas trajectórias (Michael J.

Saxton,1993) utilizando o processo de *random walk* com obstáculos e o método de Monte Carlo. É utilizada a função de probabilidade acumulada, fracção de *random walks* que permanecem na região até ao tempo t:

$$F(R,T) = \int_0^R c(r,t) 2\pi r dr$$

sendo  $c(r,t)$  uma função de uma região cilíndrica de raio R, função esta que é dependente de funções de Bessel.

Os resultados obtidos por Michael J. Saxton para a função de probabilidade acumulada  $F(R,T)$  de permanência de uma partícula numa região  $r < R$  como função de r para vários tempos apresentam-se como séries de sigmoides em desfasamento com as séries de tempos estudadas.

A situação em estudo resulta de um fenómeno por demais complexo porque a molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  ao efectuar a sua trajectória no meio intracelular vai passar obstáculos muito heterogéneos. Teria de ser calculado um coeficiente de fricção para cada espécie de molécula intracelular. Para as moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  e para cada molécula obstáculo teriam de ser consideradas as suas várias energias:

A energia térmica é a energia associada ao movimento aleatório das moléculas. Maior energia tem como consequência mais intenso movimento.

Pode dividir-se a energia molecular por partição entre os diferentes graus de liberdade:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{tr}} + E_{\text{rot}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{el}}$$

em que

$E_{\text{tr}}$  - energia de translação

$E_{\text{rot}}$  - energia de rotação

$E_{\text{vib}}$  - energia de vibração

$E_{\text{el}}$  - energia potencial de posição dos electrões

Cada uma destas contribuições é quantificada separadamente obedecendo ao princípio da exclusão. Por exemplo, para cada estado electrónico diferente, existe uma série de estados de vibração.

Alguns intervalos típicos destas energias são:  $\Delta E_{\text{rot}}$  é de cerca de  $10^{-3}\text{ev}$ ,  $\Delta E_{\text{vib}}$  cerca de  $10^{-1}\text{ev}$ ,  $\Delta E_{\text{tr}}$  cerca de  $10^{-16}\text{ev}$  e  $\Delta E_{\text{el}} > 1\text{ev}$  atendendo a que  $1\text{ev/molécula} = 23,06\text{Kcal/mol} = 96.50\text{KJ/mol}$  (Bauer R. D. *et al.*, 1983).

Assumindo movimento aleatório ( $v_x^2 = v_y^2 = v_z^2$ ), a energia média é

$$E_{\text{tr}} = N_A (m/2) \bar{v}^2 = (3/2) RT$$

onde  $N_A$  é o número de Avogadro,  $m$  a massa molecular,  $R$  é a constante do gás e  $T$  a temperatura absoluta.

Assumindo movimento aleatório, a energia média por grau de liberdade à temperatura absoluta T vem:

$$\frac{1}{2} RT / N_A = \frac{1}{2} K_B T$$

onde  $K_B$  é a constante de Boltzmann.

Outra forma de energia é a energia química. É uma forma de energia armazenada dentro das unidades estruturais das moléculas. Pode ser considerada uma forma de energia potencial porque está associada às posições relativas dos arranjos dos átomos que formam a molécula.

O potencial químico é energia livre/mole  $u = u_0 + RT \ln C_i$ .

Teriam de ser consideradas ainda outras energias: energia potencial eléctrica – grad V, energia potencial gravitacional – peso da partícula, energia potencial de pressão e a energia cinética de agitação térmica.

Na impossibilidade de um cálculo exaustivo de todas estas energias, o problema da difusão no tão heterogéneo meio intracelular irá ser abordado de uma forma global de movimento de passagem por obstáculos.

## 1.5 Função de informação

A velocidade dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  é máxima perto das membranas onde se dá o transporte e vai decrescendo no sentido do interior da célula.

(Timmer *et al.*, 1988; Wagner *et al.*, 1994; Klingauf and Neher, 1997; Nowycky and Pinter, 1993; Bormann *et al.*, 2000).

A utilização de uma função de entrada da molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente distribuição no citoplasma deve obedecer também a estes pressupostos:

1. Na fase inicial, reflectir a complementaridade da função de potencial de acção na membrana que conduz à saída de  $\text{K}^+$ .
2. Considerar que as funções de probabilidade acumulada de presença de partículas numa região são séries de sigmóides desfasadas no tempo e no espaço.
3. Dar importância fundamental à interacção das moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  com todas as outras partículas existentes no citoplasma e que constituem obstáculos à sua passagem.
4. Perante a dificuldade de considerar a troca de energia com cada molécula obstáculo isoladamente e até a impossibilidade de os segmentar em categorias ou vários enxames devido à enorme diversidade de moléculas existentes no citoplasma, foi utilizada a forma de criar um obstáculo global que contivesse todas essas categorias.
5. A troca de energia de cada molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  com cada obstáculo é considerada uma troca de informação por passagem.

Consideremos então os obstáculos no seu conjunto como se de uma parede descontínua se tratasse. Consideremos que cada molécula que atravessa esta parede transporta uma informação que podemos chamar informação por movimento.

A fonte inesgotável de informação advém basicamente da elevada concentração do cálcio plasmático e da concentração de cálcio do retículo sarcoplasmático quando comparada com a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitosólico.

A velocidade de passagem dos íões de  $\text{Ca}^{2+}$  é, em cada instante, proporcional ao número de partículas que passaram este muro com saída de informação e proporcional ao número de partículas que ainda não passaram este obstáculo e que estão portanto a entrar para transmitir informação.

Consideremos o espaço celular como uma esfera dividida em conchas esféricas de distribuição uniforme (Nowycky and Pinter, 1993; Blumenfeld *et al.*, 1992) cada uma significando uma parede de obstáculos. Podemos imaginar que as que estão a entrar se encontram na primeira parte do obstáculo e as que estão de saída se encontram na segunda fase do seu percurso no interior da concha esférica.

A distribuição uniforme dos íões de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de cada camada da concha esférica acontece no momento de velocidade máxima de passagem de informação em que o número de partículas na entrada é igual ao número de partículas de saída.

À velocidade teoricamente perto de 0 correspondem duas situações: ao início da entrada enquanto nenhuma partícula atingiu a saída da respectiva concha esférica e no momento final em que já não existem partículas a entrar e só existem partículas de saída.

Considerando estes pressupostos podemos equacionar deste modo a velocidade de passagem de informação:

$$dQ/dt = K Q (B-Q)$$

sendo

B – número do total de íões de  $\text{Ca}^{2+}$  que entraram no citoplasma pelos canais da membrana

Q – número de íões de  $\text{Ca}^{2+}$  que estão a sair do obstáculo (concha esférica) tendo transmitido a informação por passagem.

B-Q – número de íões de  $\text{Ca}^{2+}$  em trânsito no obstáculo

Integrando, obtemos a sigmoide que representa a função do número de partículas que transmitiram a informação no instante t, isto é, partículas que nesse instante passaram o obstáculo:

$$Q = B / (1 + Ae^{-Bkt})$$

As características desta função foram já estudadas em detalhe na primeira parte deste trabalho na sua aplicação ao estudo da hipotermia corporal.

Naquela situação, foi considerada a passagem de informação no meio heterogéneo da diversidade celular.

Neste caso, temos a sua aplicação à passagem de informação no meio heterogéneo das moléculas existentes no interior da célula.

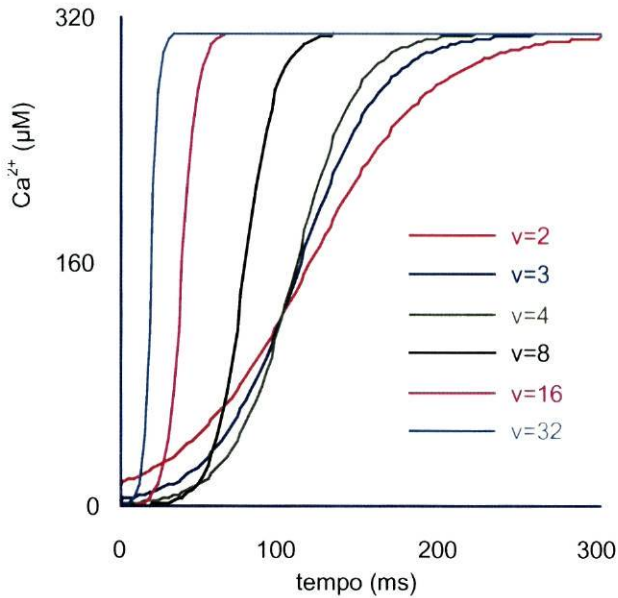
A fonte de frio atrás considerada tem agora correspondência na alta concentração dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular e no retículo sarcoplasmático.

Nos dois fenómenos, a interacção de partículas é interpretada como uma passagem de informação por movimento que se processa vinda de uma fonte de partículas dela detentora.

## **1.6 Distribuição dos iões de $\text{Ca}^{2+}$ no interior da célula**

O cálculo da distribuição de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula processa-se efectuando ajustes da função obtida utilizando parâmetros retirados da bibliografia. Estes ajustes foram efectuados pelo mesmo método usado anteriormente.

Foi utilizado o valor basal de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $0.1\mu\text{M}$  (Carafoli, 1987; Allbritton *et al.*, 1992). Este valor foi também já considerado por outros autores (Nowycky and Pinter, 1993; Wagner and Keizer, 1994; Klingauf and Neher, 1997).



**Gráfico 1.6.1:** Representação da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas diferentes camadas no interior da célula

Para o número total de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , valor muito variável, foi utilizado o valor de  $310\mu\text{M}$  (Klingauf and Neher,1997) que está dentro do intervalo de valores estimados teoricamente por Timmer *et al.*, 1998. No entanto, no músculo estriado da rã, Melzer *et al.*, 1984, encontrou valores de  $\text{Ca}^{2+}$  da ordem de 572 a  $1126\mu\text{M}$ . Nowycky and Pinter, 1993, estimou valores entre 333 e  $490\mu\text{M}$ .

O tempo de relaxamento em consideração pode variar de 200ms a 600ms consoante o tipo de célula (Martin and Michael,1995) e este tempo também é variável com a temperatura (Parnas *et al.*,1989).

Considerando a série de conchas esféricas distribuídas no interior de uma célula de raio  $7.5\mu\text{m}$  (Nowycky and Pinter,1993, Klingauf and Neher,1997), foram efectuados traçados correspondentes a diferentes profundidades.

Os valores das velocidades máximas correspondem às derivadas da função no ponto de inflexão. O valor da velocidade máxima de  $2\mu\text{M}/\text{ms}$  obtido por Melzer *et al.*,1986, e utilizado por Timmer *et al.*,1998, foi o parâmetro considerado como sendo a velocidade máxima na situação de maior profundidade, isto é, nos pontos situados mais longe das membranas. Os valores obtidos por Nowycky and Pinter,1993, variaram no intervalo de  $20\mu\text{M}/\text{ms}$  a  $1.49\mu\text{M}/\text{ms}$  no percurso da membrana para o centro da célula.

Neste trabalho, considerando a utilização destes parâmetros, foi feito o respectivo ajuste por processo iterativo. No gráfico 1.6.1 estão apresentados os resultados de uma série de simulações efectuadas utilizando valores de velocidade máxima de 32, 16, 8, 4, 3 e de  $2\mu\text{M}/\text{ms}$  respectivamente. Estas simulações representam a função de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas membranas e sua subsequente distribuição nas diferentes camadas a diversas profundidades.

É uma representação teórica, pois durante este percurso os íões de  $\text{Ca}^{2+}$  vão ser mobilizados para duas espécies de armazéns (receptores) de origem muito diferente.

Um sistema de mobilização consiste na passagem dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  através das membranas em sentido contrário ao do gradiente de concentração. É efectuado por transporte activo e é representado pela ligação a um receptor fixo.

O outro sistema de mobilização (transporte para receptor móvel) consiste na ligação dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas tais como calmodulina, miosina, troponina, calbindina, etc.

Os receptores móveis transportam os iões de  $\text{Ca}^{2+}$ , os receptores fixos imobilizam-nos.

As funções que representam estes dois fenómenos distintos vão ser objecto de estudo no capítulo seguinte.

## **Capítulo 2**

## Mobilização para Receptores

### 2.1 Mobilização para receptores fixos

Altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  são catastróficas para a sobrevivência das células. Estas conseguem evitar tais efeitos utilizando meios de diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma. Um deles depende de um transporte activo e pode ser trabalhado fisicamente como uma ligação a um receptor fixo. É um compartimento saturável que mantém o equilíbrio de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula e que depende directamente da concentração de cálcio dentro e fora das membranas celulares.

A paragem na entrada de cálcio ocorre quando o gradiente electroquímico de  $\text{Ca}^{2+}$  está diminuído pelo aumento do cálcio no citoplasma. Este fenómeno mantém-se até que a taxa de remoção de cálcio pelos receptores excede a taxa de movimentação de cálcio através dos canais da membrana (Jaffri *et al.*, 1992)

O transporte activo de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser efectuado por dois processos. Um deles é o transporte activo primário via Ca-ATPase proteínas. Em muitas membranas também existe o contratransporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que usa a passagem de  $\text{Na}^+$  a favor do gradiente de concentração para bombear iões de  $\text{Ca}^{2+}$  para o exterior da célula por transporte activo secundário (Vander *et al.*, 1994).

Este mecanismo de remoção tem lugar quando uma célula está com a concentração de cálcio elevada. O sistema de transporte activo actua nas membranas bombeando  $\text{Ca}^{2+}$  para fora da membrana celular e para o retículo sarcoplasmático.

A energia necessária a este transporte depende directamente das concentrações dentro e fora das membranas e pode ser calculada pela fórmula

$$\Delta G = RT \ln(C_1/C_2)$$

em que

“R” é a constante do gás, “T” a temperatura absoluta e “ $C_1$ ” e “ $C_2$ ” as concentrações dentro e fora da membrana.

A eficácia deste sistema de transporte é ajudada pela existência, dentro do retículo sarcoplasmático, de grandes quantidades de uma proteína, a calsequestrina, que se liga à molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  de uma forma reversível, baixando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre dentro do retículo sarcoplasmático e diminuindo desta forma a energia necessária a este transporte (Moffett, 1993).

A função representativa deste compartimento de saída de  $\text{Ca}^{2+}$  livre do citoplasma foi estudada por vários autores e é corrente a sua correspondência ao intervalo de aproximação linear da cinética de Michaelis-Menten (Sala and Hernandez-Cruz, 1990).

Os parâmetros utilizados são a constante  $K_M=0.83\mu\text{M}$  (Zhou and Neher,1993) e a máxima velocidade de transporte de  $5\text{ pmol cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$  também usada por Klingauf and Neher,1997.

O relaxamento proveniente deste transporte activo de  $\text{Ca}^{2+}$  através das membranas foi ajustado a uma exponencial tal como foi já efectuado por outros autores (Tse *et al.*,1994; Herrington *et al.*,1996; Kupferman *et al.*,1997).

A equação aqui utilizada para determinação da função de passagem para este receptor fixo foi :

$$Q_{\text{Rfix}} = A(1-e^{-kt})$$

Para o parâmetro de concentração total neste receptor foi utilizado o valor de  $150\mu\text{M}$  utilizado por Wagner and Keizer,1994.

O valor calculado para a velocidade máxima foi de  $0.33\mu\text{M/ms}$  que está em consonância com o valor de  $0.25\mu\text{M/ms}$  apresentado por Jaffri *et al.*,1992.

A função obtida com a utilização destes parâmetros vai ser usada posteriormente em simultâneo com a equação de ligação a receptores móveis descrita no parágrafo seguinte.

## 2.2 Mobilização para receptores móveis

Os receptores móveis constituem outro sistema de remoção do cálcio livre no citoplasma. A interacção de moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  com locais de ligação cria um sistema complexo de reacções.

A função principal destes receptores é manter a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre dentro de intervalos fisiologicamente aceitáveis, fixando de forma reversível uma parcela considerável do  $\text{Ca}^{2+}$  livre.

São constituídos por proteínas de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  tais como calmodulina, troponina, miosina, calbindina, etc. Estas proteínas estão dispersas no citoplasma e ligam-se a um terço a metade das moléculas de cálcio. Contêm múltiplos locais de ligação com diferentes afinidades e velocidades de reacção. A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre depende do equilíbrio associação/dissociação com estes receptores. Uma vez ligado, o ião  $\text{Ca}^{2+}$  é desligado muito lentamente destes locais de alta afinidade (Robertson *et al.*, 1981).

A distribuição dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  entre os receptores móveis e receptores fixos tem efeito nas propriedades de transporte destes iões: os receptores móveis transportam os iões de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma, os receptores fixos imobilizam-nos.

Como é sabido, a concentração mioplasmática dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  livre regula a actividade contráctil do músculo (Robertson *et al.*, 1981). Estes fenómenos são complexos. No músculo cardíaco, a cinética dos

complexos cálcio-troponina nos filamentos é regulada por dois tipos de cooperação: o primeiro tipo está associado com a concentração das pontes de miosina ligadas aos filamentos enquanto o segundo tipo está relacionado com a concentração dos complexos cálcio-troponina (Izacov *et al.*, 1991). Há uma relação directa dos complexos cálcio-troponina salientando a apetência de cada um para libertar locais da actina, aumentando a sua contribuição para a tensão muscular (Katsnelson et Markhasin, 1996).

Quase todo o cálcio ligado às miofibrilas está associado à troponina embora algum (dependendo do  $\text{Mg}^{2+}$ ) possa estar ligado à miosina (Holroyde *et al.*, 1979; Bremel and Weber., 1975). Estas proteínas incorporam locais de alta afinidade ao ião  $\text{Ca}^{2+}$ . A troponina esquelética contém dois locais de ligação que não são influenciados pelo  $\text{Mg}^{2+}$  (Potter and Gergely, 1975), enquanto a troponina cardíaca só tem uma destas ligações específicas (Holroyde *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 1980).

Outras duas proteínas não fibrilares, a calmodulina e a parvalbumina têm um papel indirecto na regulação da contracção mediada pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . O cálcio regula múltiplas actividades celulares via ligação à calmodulina (Cheung, 1980). Esta, contudo, está presente no músculo em muito menor concentração que a troponina (Walsh *et al.*, 1980), contendo no entanto quatro locais específicos de ligação a  $\text{Ca}^{2+}$ . Embora a função fisiológica da parvalbulina não seja ainda conhecida,

é importante a sua competição com a troponina (na tartaruga há cerca de dez vezes mais parvalbumina que troponina (Lehky *et al.*, 1980)).

A equação representativa da ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  aos receptores móveis aplicada neste trabalho foi a função de informação por movimento. A sua aplicação é justificada como representativa deste fenómeno considerando que cada ligação da molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  a qualquer proteína intracelular constitui uma passagem de informação.

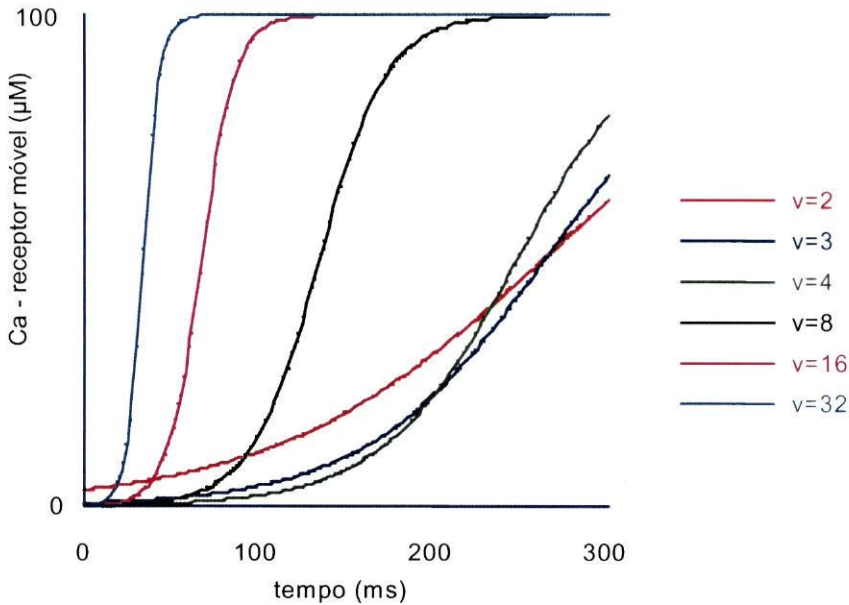
Em cada instante, considera-se que a velocidade de ligação ao receptor móvel é proporcional ao número de moléculas ligadas às proteínas e proporcional ao número de moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  ainda livres no citoplasma.

O fenómeno de associação/dissociação é aqui observado na sua globalidade pois, em cada instante, todas as moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  livres ou ligadas são consideradas de per si.

Existem duas situações em que a velocidade é teoricamente próxima de 0: no início, antes de qualquer ligação estar efectuada, e quando terminam as hipóteses de ligação, isto é, na situação de saturação dos receptores móveis.

Os ajustes à equação obtida foram efectuados a partir de parâmetros da literatura. Os resultados obtidos no modelo de Timmer *et al.*, 1998, apontam para uma concentração total deste receptor de cerca de metade da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma. O número total

de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  neste receptor determinado por Wagner and Keizer, 1994, foi de  $114\mu\text{M}$ . Neste trabalho foi utilizado o valor de  $100\mu\text{M}$ , também usado por Klingauf and Neher, 1997.



**Gráfico 2.2.1:** Representação das ligações aos receptores móveis nas camadas no interior da célula

O valor da concentração inicial utilizado foi o mesmo valor que o usado para a função de entrada no citoplasma, também utilizado por vários autores.

No gráfico 2.2.1 estão representadas as funções de ligação aos receptores móveis nas situações correspondentes às estudadas para a entrada de cálcio livre no citoplasma.

As velocidades máximas consideradas para as simulações foram obtidas atendendo a uma proporcionalidade com os logaritmos dos coeficientes de difusão. Para o coeficiente de difusão do  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma foi considerado o valor de  $220\mu\text{m}^2/\text{s}$  (Allbritton *et al.*, 1992), e para o coeficiente de difusão do receptor móvel foi usado o valor de  $15\mu\text{m}^2/\text{s}$  (Zhou and Neher, 1993; Klingauf and Neher, 1997).

## **Capítulo 3**

# Onda de $\text{Ca}^{2+}$

## 3.1 Modelo utilizado

A onda de cálcio intracelular tem sido objecto de recentes estudos por vários autores tendo em conta a sua relevância fisiológica principalmente nas células musculares e nomeadamente na função cardíaca (Wagner and Keizer,1994; Kupferman *et al.*,1997; Timmer *et al.*,1998; Jaggar *et al.*, 2000; Stuyvers *et al.*, 2000).

Jaggar *et al.*, 2000, apresenta imagens bidimensionais da progressão de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior de uma célula do músculo liso obtidas por fluorescência. O fenómeno foi observado por imagens sequenciais de 0 a 158ms. Estas imagens vão desde a entrada na membrana até à sua distribuição no interior da célula e é visível o acréscimo inicial e subsequente decréscimo da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma.

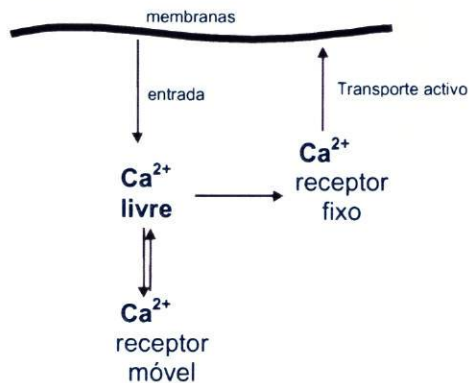


Figura 1: Modelo de compartimentos utilizado

A Figura 1 representa o modelo que é utilizado neste trabalho para a determinação da onda de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma.

Neste modelo estão representadas globalmente a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pela membrana celular e a entrada pela membrana do retículo sarcoplasmático. São considerados dois sistemas de remoção de  $\text{Ca}^{2+}$ : a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  por transporte activo para o espaço extracelular e para o retículo sarcoplasmático (ligação ao receptor fixo) e a saída por ligação a proteínas citoplasmáticas (ligação ao receptor móvel).

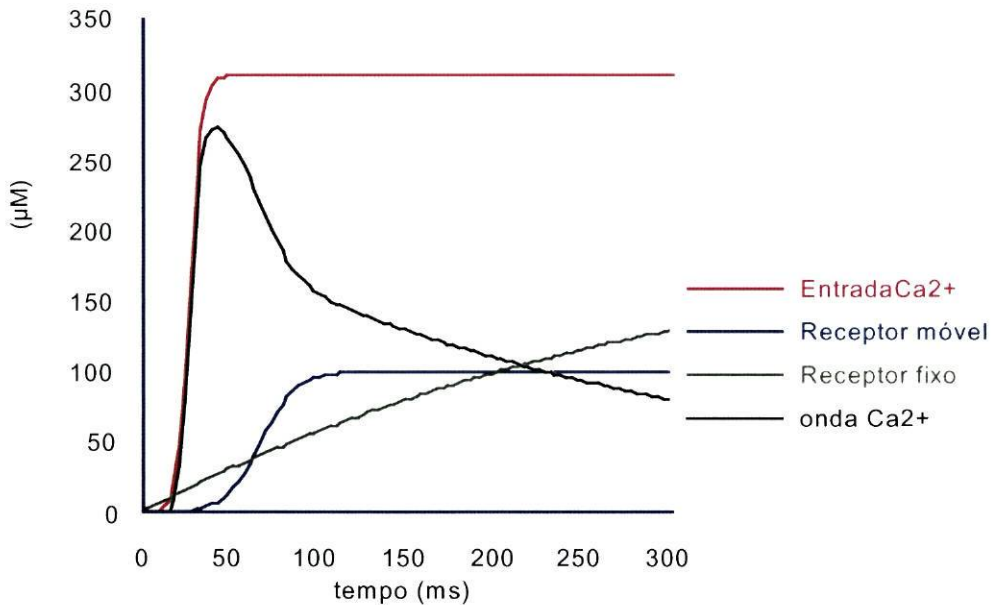
As oscilações do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático advêm desta acção conjunta de entrada e remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  e pode ser estudada através deste modelo de sistema de compartimentos utilizando as equações de transporte já estudadas. A distribuição ao longo do tempo de um ciclo após a entrada de cálcio no citoplasma calculada com a utilização deste sistema de compartimentos é representativa da onda de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma.

### **3.2 Onda de cálcio**

A onda de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser decomposta na sua fase ascendente e na fase descendente. Na fase ascendente é determinante a entrada de cálcio pelas membranas e a fase descendente, mais complexa, é resultante dos sistemas de remoção.

No gráfico 3.2.1 está representada uma onda de  $\text{Ca}^{2+}$  de maior velocidade que corresponde a uma camada perto da membrana com

um tempo de subida da ordem dos 10ms e com um decréscimo rápido que dura cerca dos 50ms.



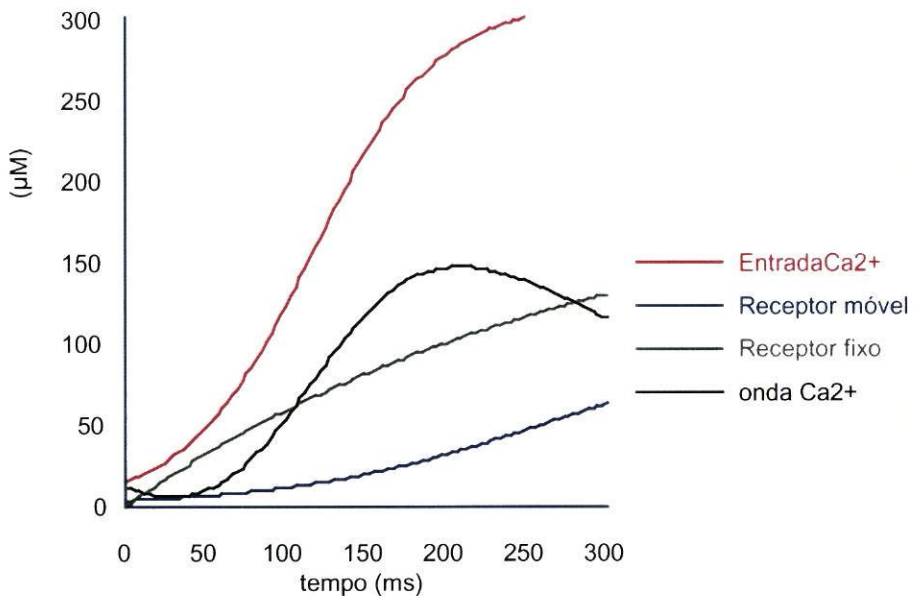
**Gráfico 3.2.1:** Representação dos compartimentos numa camada perto das membranas

No gráfico 3.2.2 está representada uma onda de  $\text{Ca}^{2+}$  de menor velocidade correspondente a uma camada no interior da célula com tempos de subida da ordem dos 200ms e com um tempo de decréscimo da ordem dos 150ms.

Jaggar *et al.*, 2000, considerou nas suas observações por fluorescência a distribuição no interior da célula até à profundidade de  $2.4\mu\text{m}$ .

Fazendo ajustes a funções biexponenciais e calculados os  $T_{1/2}$  do decréscimo do número de acontecimentos, encontrou um tempo de subida de 5 a 180ms e um  $T_{1/2}$  de decréscimo de 20 a 60ms para a primeira exponencial.

Estes resultados estão em consonância com os resultados obtidos nestes traçados da onda de cálcio utilizando o modelo de sistema de compartimentos apresentado.

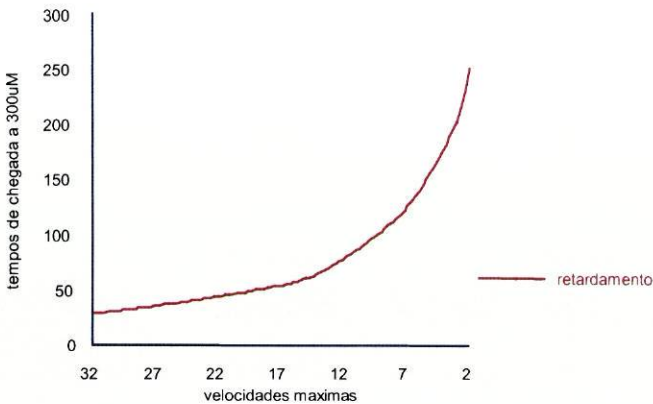


**Gráfico 3.2.2:** Representação dos compartimentos numa camada do interior da célula

No gráfico 3.2.3 está representado o retardamento que vai progressivamente aumentando à medida que consideramos as camadas no interior da célula.

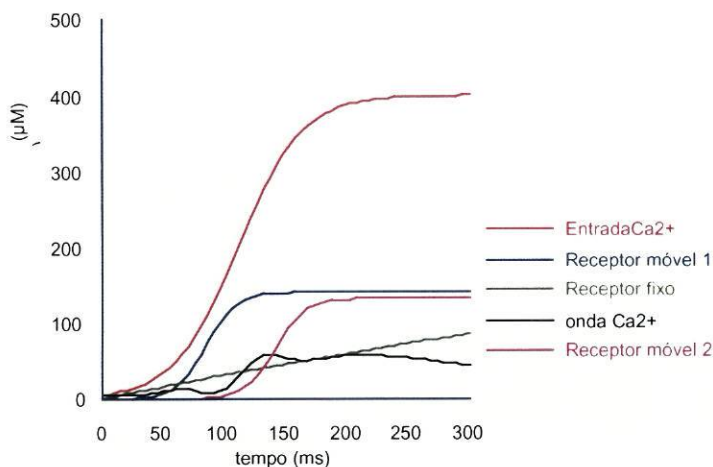
Consideremos para raio da célula o valor de  $7.5\mu\text{m}$ . O uso deste valor para o raio da célula é aplicado por vários autores por ser o raio das células de cultura usadas para medição de parâmetros. Considerando então o trajecto de  $\text{Ca}^{2+}$  desde a entrada pela membrana até ao interior da célula num espaço de  $7.5\mu\text{m}$ , podemos calcular a velocidade média do pico da onda de  $\text{Ca}^{2+}$  na sua progressão intracelular.

O valor obtido com os resultados deste trabalho é de  $34\mu\text{m/s}$ . Este valor coincide com o valor calculado por Kupferman *et al.*, 1997, e está dentro do intervalo de  $43\pm 28\mu\text{m/s}$  medido por Wang and Thompson, 1995.



**Gráfico 3.2.3:** Representação do aumento dos tempos de chegada à medida da progressão no interior da célula

Se considerarmos que numa célula podem existir duas proteínas como dois receptores móveis independentes e desfasados no tempo, podemos obter uma onda complexa cuja representação está no gráfico 3.2.4.



**Gráfico 3.2.4:** Representação do traçado de uma onda de  $\text{Ca}^{2+}$  com a presença de dois receptores móveis em desfasamento

### 3.3 Conclusões

A importância do conhecimento das funções representativas dos fenómenos que conduzem à tradução da onda de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma é fundamental para a interpretação do funcionamento celular.

Qualquer perturbação neste sistema tem a sua tradução em patologias. A título de exemplo, Katsnelson and Markhasin, 1996, estudaram um

modelo que mostra como a cinética do  $\text{Ca}^{2+}$  está relacionada com a função mecânica do miocárdio. As suas experiências e o modelo matemático utilizado sugerem que, provocando uma diminuição no receptor fixo, aumentando portanto a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, este fenómeno está relacionado com a situação patológica da hipertrofia do miocárdio.

Os fenómenos envolvendo interacção de partículas implicam que o seu estudo seja efectuado com funções não lineares (Anexo F). As funções utilizadas neste trabalho são funções não lineares e os seus pressupostos não necessitam de demarcação de um modelo bi ou tridimensional, considerando a célula como um todo. Constitui uma perspectiva diferente mas que tem aplicação real e cujos resultados estão de acordo com os resultados recentes obtidos experimentalmente ou estimados por outros modelos matemáticos tratados por outros autores.

O modelo apresentado neste trabalho pretende representar as oscilações de cálcio intracelular através da utilização de funções que têm como pressuposto a assumpção de um espaço, o espaço intracelular, no qual se movem partículas portadoras de uma informação, informação essa que vão transmitindo por passagem na sua relação com as outras partículas.

A utilização destas funções nos fenómenos que envolvem interacção de partículas transforma toda a complexidade dessas ligações num processo de progressão de uma informação. A velocidade de passagem desta informação depende da quantificação de dois universos de partículas – as que contêm informação e as que ainda não a detêm.

A abordagem ao problema do movimento com interacção de elementos efectuada com estas funções envolveu um número muito reduzido de constantes pré-definidas e é geradora de novos resultados e de obtenção de alguns parâmetros de referência que estão em consonância com resultados obtidos por outros autores com a sua experimentação ou com a utilização de outros modelos em casos particulares.

## **Bibliografia – 2ª Parte**

ALIEN INTRACELLULAR CALCIUM CHELATORS ATTENUATE  
NEUROTRANSMITTER RELEASE AT THE SQUID GIANT SYNAPSE.

**Adler E. M.**, G. J. Augustine, S. N. Duffy, and M. P. Charlton  
J. Neurosci., 11, pp 1496-1507, 1991

RANGE OF MESSENGER ACTION OF CALCIUM ION INOSITOL  
1,4,5-TRIPHOSPHATE

**Allbritton N. L.**, T. Meyer and L. Stryer  
Science, 258, pp 1812-1815, 1992

CALCIUM ACTION IN SYNAPTIC TRANSMITTER RELEASE.

**Augustine G.J.**, M.P. Charlton, and S. J. Smith.  
Annual Rev. Neuroc., 10, pp 633-693, 1987

BIOPHYSICS

**Bauer R. D.**

Hoppe W., W.Lohmann,H.Markl, Ziegler H editors, Springer-Verlag, 1983

BELL-SHAPED CALCIUM-RESPONSE CURVES OF INS(1,4,5)P<sub>3</sub> AND  
CALCIUM-GATED CHANNELS FROM ENDOPLASMATIC RETICULUM OF  
CEREBELLUM.

**Bezprozvanny**, J. Watras, and B. E. Ehrlich.  
Nature, 351, pp 751-754, 1991

EVALUATION OF CELLULAR MECHANISMS FOR MODULATION OF  
CALCIUM TRANSIENTS USING A MATHEMATICAL MODEL OF FURA-2  
CA<sup>2+</sup> IMAGING IN APLYSIA SENSORY NEURONS.

**Blumenfeld H.**, L.Zablow ,B. Sabatini  
Biophys. J., 63, pp 1146-1164, 1992

MODELING MOLECULAR DIFFUSION-COMPUTATIONAL METHODS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY.

**Bormann G.**, F. Brosens, E. De Schutter

J.M. Bower and Bolori editors, MIT Press, 2000

CALCIUM BINDING TO RABBIT SKELETAL MYOSIN UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS.

**Bremel R. D.**, and A. Weber

Biochim. Biophys. Acta, 376, pp 366-374, 1975

INTRACELLULAR CALCIUM HOMEOSTASIS

**Carafoli E.**,1987

CALCIUM DOMAINS ASSOCIATED WITH INDIVIDUAL CHANNELS CAN ACCOUNT FOR ANOMALOUS VOLTAGE RELATIONS OF CA-DEPENDENT RESPONSES

**Chad J. E.**, and R. Eckert.

Biophys. J., 45, pp 933-999, 1984

CALMODULIN PLAYS A PIVOTAL ROLE IN CELLULAR REGULATION

Cheung W. Y.

**Science (Wash. D. C.)**,207, pp 19-27, 1980

THE RATE OF OXIGEN UPTAKE BY HUMAN RED BLOOD CELLS

**Coin J. T.** and J. S. Olson.

J. Biol. Chem., 254, pp 1178-1190, 1979

CALCIUM DIFFUSION AND BUFFERING IN NERVE CYTOPLASM.

**Connor J. A.**, and G. Nikolakopoulou.

Lect. Math. Life Sci., 15, pp 79-101, 1982

THE MATHEMATICS OF DIFFUSION

**Crank J.**

2<sup>nd</sup> ed. Clarendon Press, Oxford, 414 pp., 1975

ON THE MOVEMENT OF SMALL PARTICLES SUSPENDED IN A  
STATIONARY LIQUID DEMANDED BY MOLECULAR KINETICS OF HEAT

**Einstein A.**

Ann Phys 17, pp 549-560, 1905

CALCIUM AS A COAGONIST OF INOSITOL 1,4,5-TRISPHOSPHATE  
-INDUCED CALCIUM RELEASE.

**Finch E. A.**, T. J. Turner, and S. M. Goldin.

Science, 252, pp 443-446, 1991

PRESYNAPTIC CALCIUM DIFFUSION FROM VARIOUS ARRAYS OF  
SINGLE CHANNELS. IMPLICATIONS FOR TRANSMITTER RELEASE AND  
SYNAPTIC FACILITATION

**Fogelson A. L.**, and R. S. Zucker.

Biophys. J., 48, pp 1003-1017, 1985

REGULATION OF GROWTH SATURATION AND DEVELOPMENT OF  
NECROSIS IN EMT6/RO MULTICELLULAR SPHEROIDS BY THE GLUCOSE  
AND OXYGEN SUPPLY.

**Freyer J. P.**, and R. M. Sutherland.

Cancer Res., 46, pp 3504-3512, 1986

RYANODINE RECEPTOR ADAPTATION, pp CONTROLMECHANISM OF  
CA<sup>2+</sup>-INDUCED CA<sup>2+</sup>-RELEASE IN HEART.

**Gyorke S.**, and M. Fill.

Science, 260, pp 807-809, 1993

DOMINANT ROLE OF MITOCHONDRIA IN CLEARANCE OF LARGE  $\text{Ca}^{2+}$  LOADS FROM RAT ADRENAL CHROMAFFIN CELLS.

**Herrington J.**, Y. Park, D. Babcock, B. Hille

Neuron, 16, pp 219-228, 1996

THE CALCIUM BINDING PROPERTIES OF PHOSPHORYLATED AND UNPHOSPHORYLATED CARDIAC AND SKELETAL MYOSINS

**Holroyde M. J.**, J. D. Potter and J. R. Solaro

J. Biol. Chem, 254, pp 6478-6482, 1979

THE CALCIUM AND MAGNESIUM BINDING SITES ON CARDIAC TROPONIN AND THEIR ROLE IN REGULATION OF MYOFIBRILLAR ADENOSINE TRIPHOSPHATASE

**Holroyde M. J.**, S. P. Robertson, R. J. Solaro and J. D. Potter

J. Biol. Chem., 255, pp 11688-11693, 1980

CALCIUM-DEPENDENT IMMEDIATE FEEDBACK CONTROL OF INSITOL 1,4,5- TRISPHOSPHATE-INDUCED CALCIUM RELEASE.

**Iino M.**, and M. Endo.

Nature, 360, pp 76-78, 1992

COOPERATIVE EFFECTS DUE TO CALCIUM BINDING BY TROPONIN CONSEQUENCES FOR CONTRACTION AND RELAXATION OF CARDIAC MUSCLE UNDER VARIOUS CONDITIONS OF MECHANICAL LOADING

**Izakov V. Y.**, Katsnelson L. B., Blyakhman F.A., Markhasin V. S., Shklyar T. P.

Cir. Res., 69, pp 1171-1184, 1991

A MEMBRANE MODEL FOR CYTOSOLIC CALCIUM OSCILATIONS

**Jaffri M. S.**, S. Vajda, P. Pasic, and B. Gillo

Biophys. J., 63, pp 235-246, 1992

CALCIUM SPARKS IN SMOOTH MUSCLE

**Jaggur J. H.**, V.A. Porter, W. J. Lederer, M. T. Nelson

Am. J. Physiol, 278, pp C235-C256, 2000

SELF DIFFUSION OF INTERACTING MEMBRANE PROTEINS.

**James R. Abney**, B. A. Scalettar, and J. C. Owicki.

Biophys. J., 55, pp 817-833, 1989

MUTUAL DIFFUSION OF INTERACTING MEMBRANE PROTEINS.

**James R. Abney**, B. A. Scalettar, and J. C. Owicki.

Biophys. J., 56, pp 315-326, 1989

A FLUORESCENCE PROBE STUDY OF  $\text{Ca}^{2+}$  BINDING TO THE  $\text{Ca}^{2+}$  SPECIFIC SITES OF CARDIAC TROPONIN AND TROPONIN C.

**Johnson J. D.**, J. H. Collins, S. P. Robertson and J. D. Potter

J. Biol. Chem., 255, pp 9635-9640, 1980

MODELING BUFFERED  $\text{Ca}^{2+}$  DIFFUSION NEAR THE MEMBRANE. IMPLICATIONS FOR SECRETION IN NEUROENDOCRINE CELLS

**Klingauf J.** and E. Neher

Biophys. J., 72, pp 674-690, 1997

CALCIUM SIGNALING IN RESTRICTED DIFFUSION SPACES.

**Kargacin G. J.**

Biophys. J., 67, pp 262-272, 1994

MATHEMATICAL MODELING OF RELATIONS BETWEEN KINETICS OF FREE INTRACELLULAR CALCIUM AND MECHANICAL FUNCTION OF MYOCARDIUM.

**Katsnelson L. B.** and Markhasin V. S.

J. Mol. Cell Cardiol., 28, pp 475-486, 1996

ANALYTICAL CALCULATION OF INTRACELLULAR WAVE CHARACTERISTICS

**Kupferman R.**, P. Mitra, P. C. Hohenberg, S. Wang

Biophys. J., 72, pp 2430-2444, 1997

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PARVALBUMINS FROM THE SKELETAL MUSCLE OF HIGHER VERTEBRATES.

**Lehky P.**, E. Blum, E. H. Fisher

J. Biol. Chem., 249, pp 4332-4334, 1974

RELATIONSHIP BETWEEN PRESYNAPTIC CALCIUM CURRENT AND POSTSYNAPTIC POTENTIAL IN SQUID GIANT SYNAPSE.

**Llinás R.**, I. Z. Steinberg, and K. Walton.

Biophys. J., 33, pp 323-352, 1981

MONTE CARLO SIMULATION IN DIFFUSION AND REACTION IN TWO-DIMENSIONAL CELL STRUCTURES.

**Mark R. R.**, H. M. Buettner, F. J. Muzzio, and S. C. Reyes.

Biophys. J., 68, pp 1716-1726, 1995

COMPETITIVE CALCIUM BINDING, pp IMPLICATIONS FOR DENTRITIC CALCIUM SIGNALING.

**Markram H.**, A. Roth., F. Helmchen

J Comput Neurosci 5, pp 331-348, 1998

THE ELEMENTAL PRINCIPLES OF CALCIUM SIGNALING.

**Martin D. B.** and J.B. Michael

Cell, 83, pp 675-678, 1995

THE ROLE OF  $Ca^{2+}$  IONS IN EXCITATION-CONTRACTION COUPLING OF SKELETAL MUSCLE FIBRES

**Melzer W.**, A. Herrmann-Frank and H.C. Luttgau

Biochim. Biophys. Acta, 1241, pp 59-116, 1995

TIME COURSE OF CALCIUM RELEASE AND REMOVAL IN SKELETAL MUSCLE FIBERS.

**Melzer W.**, E. Rios and M. F. Schneider.

Biophys. J., 45, pp 637-641, 1984

LATERAL DIFFUSION IN A ARCHIPELAGO. THE EFFECT OF MOBILE OBSTACLES.

**Michael J. Saxton.**

Biophys. J., 52, pp 989-997, 1987

LATERAL DIFFUSION IN A ARCHIPELAGO. SINGLE-PARTICLE DIFFUSION.

**Michael J. Saxton..**

Biophys. J., 64, pp 1766-1780. 1993

HUMAN PHYSIOLOGY

**Moffett D.**

1993

LINEARIZED BUFFERED  $CA^{2+}$  DIFFUSION IN MICRODOMAINS AND ITS IMPLICATIONS FOR CALCULATION OF  $CA^{2+}$  AT THE MOUTH OF A CALCIUM CHANNEL

**Naraghi M.** and E. Neher

J Neurosci 17, pp 6961-6973, 1997

TIME COURSES OF CALCIUM-BOUND BUFFERS FOLLOWING CALCIUM INFLUX IN A MODEL CELL

**Nowycky M. C.** and Martin J. Pinter

Biophys. J., 64, pp 77-91, 1993

EFFECT OF  $CA^{2+}$  DIFFUSION ON THE TIME COURSE OF NEUROTRANSMITTER RELEASE.

**Parnas H.**, G. Hovav, and I. Parnas.

Biophys. J.,55, pp 859-874, 1989

THE CALCIUM AND MAGNESIUM BINDING SITES ON TROPONIN AND THEIR ROLE IN THE REGULATION OF MYOFIBRILLAR ADENOSINE TRIPHOSPHATASE

**Potter J. D.** and J. G. Gergely

J. Biol. Chem.,250, pp4628-4633, 1975

PARTICLE INTERACTIONS.

**Pursey P. N.**, and R. J. A. Tough.

R. Pecora, editor. Plenum Publishing Corp. New York. 85-179, 1985

ANALYTICAL CALCULATION OF INTRACELLULAR CALCIUM WAVES CHARACTERISTICS

**Raz K.**, Partha P. M., P. C. Hohenberg, and S. S. H. Wang.

Biophys. J., 72, pp 2430-2444, 1997

COLOCALIZATION OF ION CHANNELS INVOLVED IN FREQUENCY SELECTIVITY AND SYNAPTIC TRANSMISSION AT PRESYNAPTIC ACTIVE ZONES OF HAIR CELLS.

**Roberts W. J.**, R. A. Jacobs, and A. J. Hudspeth.

J. Neurosc. 10, pp 3664-3684, 1990

THE TIME COURSE OF  $Ca^{2+}$  EXCHANGE WITH CALMODULIN, TROPONIN, PARVALBUMIN, AND MYOSIN IN RESPONSE TO TRANSIENT INCREASES IN  $Ca^{2+}$ .

**Robertson S. P.**, J.D. Johnson and J. D. Potter

Biophys. J., 34, pp559-569, 1981

CALCIUM DIFFUSION MODELING IN A SPHERICAL NEURON. RELEVANCE OF BUFFERING PROPERTIES.

**Sala F.**, and A. Hernandez-Cruz

Biophys. J., 57, pp 313-324, 1990

COMPARTMENTALIZATION OF THE SUBMEMBRANE CALCIUM ACTIVITY DURING CALCIUM INFLUX AND ITS SIGNIFICANCE IN TRANSMITTER RELEASE.

**Simon S. M., and R. R. Llinás.**

Biophys. J., 48, pp 485-498, 1985

AEQUORIN RESPONSE FACILITATION AND INTRACELLULAR CALCIUM ACCUMULATION IN MOLLUSCULAR NEURONES.

**Smith S. J., and R. S. Zucker..**

J. Physiol., 300, pp 167-196, 1980

ROLE OF CALCIUM OSCILATIONS DURING HUMAN PREIMPLANTATION  
EMBRYO DEVELOPMENT

**Sousa M.**, A. Barros, C. Mendoza, J. Tesarik

Assisted Reproduction Reviews, 7(3), pp 139-149, 1997

DYNAMICS OF INTRACELLULAR CALCIUM AND ITS POSSIBLE  
RELATIONSHIP TO PHASIC TRANSMITTER RELEASE AND  
FACILITATION AT THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION.

**Stockbridge N.**, and J. W. Moore.

J. Neurosci., 4, pp 803-811, 1984

HUMAN PHYSIOLOGY

**Stuart I. Fox**

Wm. C. Brown Publishers, 1996

CALCIUM WAVES – PHYSIOLOGICAL RELEVANCE IN CARDIAC  
FUNCTION

**Stuyvers B. D.**, P. A. Boyden, H. E. D. J. ter Keurs

Cir. Res. 86, pp 1016-1018, 2000

CALCIUM HOMEOSTASIS IN IDENTIFIED RAT GONADOTROPHS

**Tse A.**, W. Tse, B. Hille

J. Physiol., 477, pp 511-525, 1994

NUMERICAL METHODS TO DETERMINE CALCIUM RELEASE FLUX  
FROM CALCIUM TRANSIENTS IN MUSCLE CELLS

**Timmer J.**, T Muller ., W. Melzer

Biophys. J., 74, pp 1694-1707, 1998

HUMAN PYISIOLOGY

**Vander A.**, J. Sherman , D. Luciano

McGraw-Hill, sixth edition, 1994

DIFFERENCIAL RELEASE OF AMINO ACIDS, NEUROPEPTIDES AND CATECHOLAMINES FROM ISOLATED NERVE TERMINALS.

**Verhage M.**, H. T. McMahon, W. E. J. M. Ghijsen, F. Boomsma, G. Scholten, W. Greet, V. M. Wiegant, and D. G. Nicholls.

Neuron., 6, pp 517-524, 1991

EFFECTS OF RAPID BUFFERS ON  $CA^{2+}$  DIFFUSION AND  $CA^{2+}$  OSCILLATIONS

**Wagner J.** and J. Keiser

Biophys. J., 67, pp 447-456, 1994

HOMOLOGOUS CALCIUM-BINDING PROTEINS IN THE ACTIVATION OF SKELETAL, CARDIAC AND SMOOTH MUSCLE MYOSIN LIGHT CHAIN KINASES.

**Walsh M. P.**, B. Vallet, J. C. Cavadore and J. G. Demaille

J. Biol. Chem., 255, pp 335-337, 1980

TIME COURSE OF TRANSMITTER RELEASE CALCULATED FROM SIMULATIONS OF A CALCIUM DIFFUSION MODEL.

**Yamada W. M.**, and R. S. Zucker.

Biophys. J., 61, pp 671-782, 1992

MOBILE AND IMMOBILE CALCIUMBUFFERS IN BOVINE ADRENAL CHROMAFFIN CELLS.

**Zhou Z.** and E. Neher

J. Physiol.,469, pp 245-273,1993

# **3ª Parte**

**Análise conjunta dos  
sistemas estudados**

# Capítulo 1

# **Análise Conjunta dos Sistemas Estudados**

## **1.1 Introdução**

A ideia de encontrar uma equação de transporte que represente simultaneamente o movimento de massa ou de energia baseia-se no estabelecimento de relações que descrevam condições análogas.

Considerando o fenómeno da difusão linear em meio homogéneo, a 1ª lei de Fick (Anexo H) pode ser aplicada também ao transporte de calor e de corrente eléctrica adaptando as unidades de medida para cada caso específico.

Neste trabalho pretendeu estudar-se fenómenos de difusão em meios não homogéneos considerando a existência de interacção de partículas. São fenómenos que não podem ser traduzidos por equações lineares e que envolvem a resolução de uma complexa rede de factores que são específicos de cada situação.

A proposta deste estudo foi encontrar, nas estruturas em causa, analogias que permitissem um tratamento matemático comum e que considerassem os fenómenos fisiológicos e biofísicos associados a cada situação.

A análise destes sistemas determinou, nos modelos estudados, semelhanças formais em relação aos seguintes factores: existência de movimento, existência de interacção de elementos, existência de um espaço geométrico delimitador desse movimento e existência de fontes de energia ou massa situadas fora desse espaço.

A interacção de partículas ou moléculas em movimento foi traduzida em informação.

Neste capítulo vai ser efectuada a síntese destas condições de aplicabilidade e dos resultados obtidos com a aplicação das funções a cada caso específico.

## **1.2 Movimento e interacção de partículas**

Foram consideradas duas espécies de movimento provocado por sistemas muito diferentes: o transporte por convecção provocado pela circulação sanguínea e o movimento browniano de moléculas que conduz à difusão das mesmas, ou seja, ao aumento de entropia (Anexo E).

É através destes movimentos que as partículas ou moléculas são consideradas portadoras de uma informação que vai modificar de algum modo as partículas ou moléculas que encontram na sua trajectória. São transportes de unidades portadoras de uma informação que provoca alteração na temperatura no primeiro caso, ou de uma

informação indutora de alterações na concentração de leucócitos, plaquetas e iões de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A função de informação estudada neste trabalho pretende ser a medida destas modificações em função do tempo.

### **1.3 Espaços geométricos de movimentação**

Os espaços geométricos de movimentação considerados estão delimitados do seguinte modo:

1. no estudo da hipotermia e do transporte de leucócitos e plaquetas, a rede do aparelho circulatório do animal é o campo de movimentação das partículas;
2. o espaço de movimentação considerado para o estudo do transporte de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  é o citosol.

Nas duas situações, o transporte é considerado em espaços geométricos de limites bem definidos. Esta característica é importante pois foi utilizado o parâmetro “B” significando a quantidade total de elementos que se movimentam nesse espaço.

### **1.4 Fontes de informação**

As fontes de informação estão situadas na envolvimento externa destes espaços: a superfície corporal do animal, a membrana celular e a

membrana do retículo sarcoplasmático. É através destas superfícies que a informação chega ao interior.

No estudo da hipotermia, a informação é a passagem de frio (percentagem de descida de temperatura) e a fonte de informação é assegurada pelo banho de água gelada que rodeia o animal.

Leucócitos e plaquetas, seguindo a circulação sanguínea, são considerados portadores da mesma informação embora o fenómeno seja medido e traduzido em unidades de percentagem de elementos circulantes.

Na situação do movimento de iões de  $\text{Ca}^{2+}$ , a informação traduz-se nas alterações da concentração destes iões. A fonte de informação consiste na elevada concentração do ião  $\text{Ca}^{2+}$  no plasma envolvente celular e no retículo sarcoplasmático.

## **1.5 Informação por passagem**

Na situação de hipotermia o processo inicia-se junto da pele do animal com o arrefecimento dos tecidos e vasos periféricos. A partir deste momento, está iniciado o processo de arrefecimento por convecção e cada partícula arrefecida é portadora de uma informação de frio, provocando o arrefecimento noutras partículas que encontra no seu percurso.

A informação é transportada da pele do animal para o interior do corpo. A unidade de medida utilizada é a % de descida de temperatura.

No estudo da passagem dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula, a informação traduz-se pela ocupação do espaço intracitosólico por estes iões.

Após a entrada pela membrana celular ou pela membrana do retículo sarcoplasmático, estes iões interagem por passagem com outras moléculas existentes no citoplasma. Pode considerar-se que as alterações das condições advêm da modificação que a passagem do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca nos campos energéticos que vai encontrando na sua envolvimento ao percorrer aquele trajecto.

A informação traduz-se na alteração da concentração por passagem no lugar geométrico relativo a cada camada intracitosólica.

Foi considerado neste trabalho ainda outro sistema de informação. A informação que é transportada pelos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  que entraram no citoplasma e que estabelecem ligações com proteínas tais como troponina, calmodulina, etc. Neste caso, a passagem de informação traduz-se numa ligação química .

A unidade de medida da informação para o tratamento da função relativa ao ião  $\text{Ca}^{2+}$  é proporcional à concentração deste ião.

## 1.6 Pressupostos para aplicação da função de informação

O estabelecimento da função de velocidade de passagem da informação baseia-se nas condições de progressão de uma partícula ou molécula pertencente ao universo detentor de informação para o universo de elementos não detentores de informação. Nestes dois universos, existe um em expansão devido à transmissão de informação, e outro em remissão, à medida que os seus elementos vão sendo detentores da informação.

No estudo da hipotermia, a velocidade de passagem é considerada proporcional ao número de partículas que já estão arrefecidas (contêm já a informação de frio) e é proporcional à quantidade de partículas que estão ainda por arrefecer.

Na situação do percurso dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  a velocidade de passagem é considerada proporcional ao número de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  que entram no espaço geométrico da camada da concha esférica considerada e proporcional aos elementos que se encontram de saída para a próxima camada.

Na aplicação da função à ligação química do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  com proteínas celulares foi considerado que em cada instante a velocidade de passagem da informação era proporcional ao número de moléculas que se encontravam ligadas e proporcional ao número de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  que ainda não estavam ligados.

A função de velocidade de passagem foi então definida para os sistemas apresentados:

$$dQ/dt = k Q (B-Q)$$

em que

- Q - número de elementos portadores de informação
- B - número total de elementos existentes nos espaços geométricos considerados

Esta função tem uma representação gráfica em forma de sino. Por integração da equação representativa da velocidade de passagem de informação, foi obtida a função teórica representativa do fenómeno de crescimento do universo dos elementos modificados pela informação.

A integração da função representativa da velocidade de informação foi efectuada utilizando uma mudança de variáveis. A função obtida foi

$$Q = B / (1+Ae^{-ct})$$

cuja representação gráfica é uma sigmoide.

### **1.7 Aplicação da função**

A função foi aplicada a dados retirados de experiências (caso de estudo da hipotermia e da circulação de leucócitos e plaquetas) e a

dados retirados de bibliografia existente relativamente a parâmetros respeitantes ao estudo do ião  $\text{Ca}^{2+}$ .

Na situação de hipotermia, os dados retirados foram: medição da temperatura corporal interna, medidas “in vivo” de actividade radioactiva de leucócitos e plaquetas no fígado e baço e de medidas “in vitro” de contagem de leucócitos e plaquetas marcados e não marcados.

Para o estudo do percurso do ião  $\text{Ca}^{2+}$ , foram consideradas medidas de uma célula padrão. Os parâmetros considerados foram resultantes de medidas efectuadas e utilizadas por vários autores.

Esta função tem um ponto de inflexão no momento de velocidade máxima de passagem de informação. Neste ponto, é igual o número de elementos dos dois universos.

Foi possível para cada caso estabelecer o tempo em que esta velocidade máxima ocorreu.

Outro parâmetro com interesse para a caracterização dos fenómenos é o ponto de estabilização dos sistemas estudados. É representado pelo limite da função quando o parâmetro  $t$  tende para infinito.

## **1.8 Estabilização dos processos**

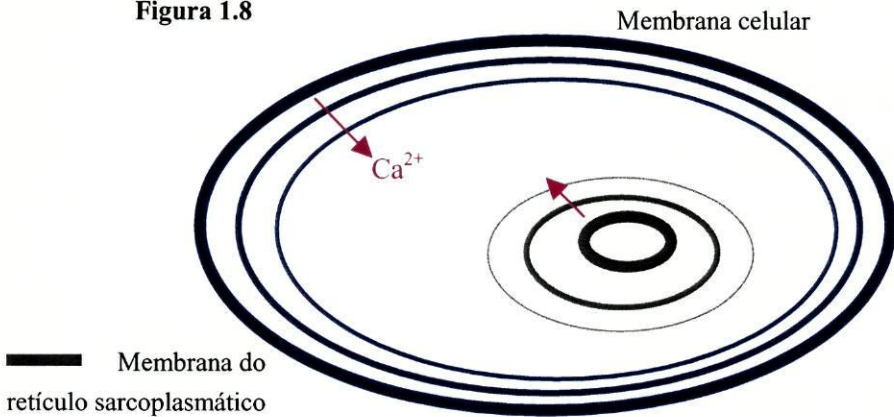
Na situação de hipotermia, o processo teoricamente estabilizaria quando todas as partículas estivessem à temperatura da fonte de água

gelada; no entanto, o processo estabiliza no momento em que cessa o movimento, isto é, quando a descida de temperatura é suficiente para bloquear a circulação sanguínea. A partir deste instante, o arrefecimento é efectuado por condução.

No estudo da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol, o processo estabiliza em cada camada quando cessa o movimento de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  na passagem do limite externo da camada (do lado da membrana da célula ou da membrana do retículo sarcoplasmático) para o limite interno da camada (parte mais afastada das membranas) (Figura 1.8).

No estudo da ligação do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  às proteínas celulares, o processo estabilizaria teoricamente quando todos os iões estivessem ligados a proteínas celulares. O processo não é estabilizado por saturação porque estas reacções químicas são reversíveis, e portanto, o ponto de estabilidade é atingido no momento de equilíbrio das reacções.

**Figura 1.8**



## 1.9 O que a função pretende representar

Na situação de hipotermia, a função representa a chegada da onda de frio ao esófago sendo este considerado o indicador da temperatura corporal interna.

No caso do estudo das medidas “in vitro” da circulação leucocitária e plaquetária, a função mostra o seu aparecimento na circulação sanguínea após administração em “bolus” de leucócitos e plaquetas na aorta abdominal alta. No estudo “in vivo” obtemos a representação da chegada de leucócitos e plaquetas ao fígado e ao baço.

Na célula, na aplicação da função ao transporte dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$ , as funções obtidas pretendem representar a progressão do movimento no seu percurso desde a membrana celular e a membrana do retículo sarcoplasmático até ao interior da célula, ou seja, até às camadas mais afastadas das membranas.

Na situação da aplicação da função à ligação química dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  com proteínas do citosol, a função representa o modo como esta ligação química se processa no tempo.

Em todas as situações, a função pretende representar a progressão da quantidade de elementos modificados por uma informação

proveniente de uma fonte situada a montante, no início do movimento destas partículas.

### **1.10 Aplicação de sistemas de compartimentos para determinação de outras funções**

Quando uma função pretende ser significativa de fenómenos fisiológicos e biofísicos pode ser possível a sua utilização como geradora de novos resultados pela análise dos sistemas subjacentes. Esses resultados podem traduzir-se na representação de novas funções como aconteceu neste trabalho.

Na primeira parte, a obtenção de funções representativas da distribuição “in vivo” e “in vitro” de leucócitos e plaquetas permitiu, com a utilização de um sistema de compartimentos, a definição de uma nova função medidora do processo de marginação de leucócitos e plaquetas ao longo do tempo.

A marginação é um fenómeno conhecido mas que nunca foi medido de uma forma global. Neste trabalho, foi possível obter indirectamente a sua medida e verificar as flutuações dos seus valores relacionando-as com a velocidade de descida de temperatura corporal: a função de marginação diminui nos casos em que a descida da temperatura corporal se processa mais rapidamente.

Na segunda parte houve o propósito de encontrar representações teóricas possíveis da onda de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  livres no citosol .

Este estudo foi efectuado utilizando um sistema de compartimentos, subtraindo às funções representativas do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  livre as funções representativas do ião de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a proteínas citoplasmáticas assim como a saída por transporte activo. Foi determinado um valor da velocidade de propagação dessa onda para o interior da célula. Este valor está dentro do intervalo de valores encontrados por outros autores obtidos por métodos experimentais.

### **1.11 Nota final**

A informação científica deve provar a sua aplicabilidade perante uma complexidade estruturada e parcialmente desconhecida.

Este trabalho traduz uma nova perspectiva do problema do transporte em sistemas biológicos segundo determinadas condições.

A sua representação é constituída por um modelo matemático teórico que se estrutura sobre os princípios fisiológicos e biofísicos conhecidos que estão associados aos fenómenos estudados. Esta abordagem tem na sua essência a sugestão de que a complexidade que envolve a interacção de elementos com transporte de energia ou massa pode ser representada por uma transmissão de informação.

Com toda a simplicidade das reflexões que destacam que não há observações sem os seus respectivos observadores, surgem as bases da ciência contemporânea. Fica a ideia que os conhecimentos que nos interessam enquanto investigadores são resultados de operações que

mantêm estreitas dependências com as limitações, perspectivas e meios de que dispõem os observadores. As explicações e interpretações científicas são operações que são efectuadas dentro de uma sucessão de experiências de observação do investigador.

O modo de proceder da investigação em biologia contém em si as limitações da dificuldade que existe para falar de um sistema total abrangente a partir do estudo de cada parte per si. Cada resolução de um problema de uma forma parcial contém em si a distorção de uma visão incompleta.

Em qualquer processo científico há a pretensão do investigador de minimizar os efeitos da sua observação da realidade à qual pertence e interfere. Os conhecimentos são o resultado de construção de um observador (o investigador).

A busca de uma verdade objectiva é um valor inalcançável. O objectivo de uma investigação desliza para o encontro de possíveis explicações que se pretende sejam melhores e mais úteis.

Para cada experiência coexistem vários tipos e níveis de objectividades no sentido da descoberta da sua racionalidade através de teorias, hipóteses, conceitos e métodos. Múltiplos universos de significação podem coexistir simultaneamente e este estudo pretende aí ter o seu lugar.

# **Anexos**

## Anexo A

### Metabolismo basal

O termo metabolismo basal refere-se às funções fisiológicas que o corpo mantém em repouso.

É necessário trabalho para sustentar estas funções. Muitas destas funções são macroscópicas tais como o bater do coração, a respiração, a digestão, etc. Há também que considerar o trabalho a nível celular. Por exemplo, dois terços da energia gasta pelo metabolismo basal são requeridos para mover os iões contra o gradiente de concentração.

Para uma avaliação quantitativa do metabolismo celular terão de ser tratadas várias formas de energia. Estas distinções são necessárias porque estamos perante um sistema estatístico com grandes números de elementos. Por grandes números entenda-se que são da ordem de  $6,022 \times 10^{23}$  (Número de Avogadro). Tais sistemas tornam complexo o tratamento de movimento individual de cada elemento.

A estas partículas estão associadas variáveis estatísticas cujos valores dependem só do valor actual do sistema e não de valores passados no tempo. As três variáveis mais importantes são a temperatura, a pressão e o volume. A pressão e a temperatura são variáveis intrínsecas pois não dependem das dimensões do sistema. A pressão é assumida variar

com a pressão atmosférica. A energia térmica pode ser estudada usando o teorema da equipartição utilizando graus de liberdade (isto é, de translação, de rotação e vibracional).

Devido ao número de partículas e à sua frequente colisão descreve-se a trajectória de uma dada partícula como um “random walk”.

Com o avanço do estudo de sistemas não lineares, apareceram outras formas mais recentes de abordagem a estes problemas dos mecanismos moleculares.

Estudam-se estruturas representadas por sistemas dinâmicos discretos cujo comportamento é especificado em termos da relação de cada elemento com o local onde está inserido. São criados universos estilizados representados em forma de grelhas e em que cada célula se dirige para um novo estado, dependente do seu estado anterior e do estado da sua vizinhança.

Os cálculos destes transportes envolvem resoluções de sistemas de equações diferenciais de uma e duas dimensões que representam os fenómenos de difusão, movimento de ondas, oscilações e reacções de activação-inibição.

Nas reacções, os padrões de comportamento encontrados são complexos pois é considerado que, simultaneamente à reacção, os elementos que a compõem estão também em situação de difusão.

A investigação neste campo tem sido dirigida principalmente a reacções que envolvem duas substâncias: um auto catalizador activador que ao mesmo tempo produz uma substância inibidora.

As variáveis consideradas para estas reacções químicas incluem: concentração do activador e do inibidor, suas constantes de difusão, velocidade de produção e de remoção e variáveis decorrentes dos elementos da vizinhança.

O objectivo dos estudos nesta área da homeostasia visam o comportamento celular e baseiam-se em determinados pressupostos:

1. cada célula contém em si uma entidade caracterizadora, o estado;
2. os estados estão estruturados por escalas discretas;
3. um novo estado é atingido usando a informação do seu estado anterior e dos estados da sua vizinhança espacial e temporal.

As variáveis em estudos celulares incluem factores de:

estado actual da célula,

estado anterior,

estado seguinte,

vizinhança da célula no espaço e vizinhança da célula no tempo.

Trabalhando estes dados em computadores de grande capacidade, as soluções de comportamentos exprimem vários tipos de complexidade: morte celular (atractor pontual), padrão fixo de comportamento e ciclos periódicos (atractor cíclico), comportamentos de auto organização (atractor estranho), e comportamentos caóticos (atractor aleatório).

## Anexo B

### Fenómeno da contracorrente

Um dos mecanismos de transferência de calor é por condução. Está relacionada com a colisão molecular. Se considerarmos a colisão de elementos com igual massa, e que o fenômeno se realiza sem perda de energia mecânica, a velocidade dos dois elementos troca de sinal na colisão. Supondo duas moléculas com velocidades  $v_1$  e  $v_2$ , então

$$(v_1 - v_2) = (v_2' - v_1')$$

onde  $v_1'$  e  $v_2'$  representam as velocidades após colisão. Como estamos a considerar moléculas de igual massa, a conservação do momento implica

$$v_1 + v_2 = v_1' + v_2'$$

Combinando as duas equações verifica-se que as moléculas trocam as velocidades

$$v_1 = v_2' \quad \text{e} \quad v_2 = v_1'$$

Se  $v_1$  é maior que  $v_2$ , então  $v_2'$  é maior que  $v_2$ . Isto significa que, se a molécula 1 vem de uma região mais quente que a molécula 2, a

molécula 2 fica aquecida com a colisão. Moléculas mais quentes fazem a transferência de calor para as que estão mais frias utilizando este mecanismo.

Se considerarmos uma peça de um material na qual os dois extremos estão a diferentes temperaturas, a quantidade de calor que flui do extremo mais quente para o extremo arrefecido é proporcional à diferença de temperatura  $\Delta T$ , à área  $A$  da secção transversa da peça de material, e ao tempo  $\Delta t$  durante o qual o calor está a fluir. A quantidade de calor  $\Delta Q$  é também inversamente proporcional à distância  $d$  entre os extremos a diferentes temperaturas. A constante de proporcionalidade,  $k$ , é chamada condutividade térmica.

$$\Delta Q / \Delta t = k A \Delta T / d$$

Esta equação pode ser usada para calcular uma aproximação da perda de calor do corpo humano para o ambiente. Estabelecemos a diferença de temperatura do interior do corpo,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para a pele que consideramos à temperatura ambiente. Outras aproximações podem ser efectuadas tais como a comparação do corpo humano a um cilindro de dimensões semelhantes.

As trocas de calor por convecção são fenómenos mais complexos, que envolvem muitas variáveis. O corpo humano desprotegido de roupa tem uma rápida perda de calor em parte provocada pela circulação

sanguínea. Há, no entanto, mecanismos de protecção de que o organismo dispõe para reagir a esta perda.

Um dos fenómenos de transferência de calor que ocorre na circulação sanguínea é o fenómeno da contracorrente.

Consiste na perda de calor de um vaso sanguíneo mais aquecido para o aquecimento de um vaso sanguíneo na vizinhança que está na direcção paralela e com a circulação em sentidos opostos. Esta transferência de calor é efectuada por condução e o fluido mais frio é aquecido por absorção desse calor.

São frequentes as estruturas animais que permitem trocas de calor por contracorrente. Os membros superiores das baleias são irrigados por artérias rodeadas de veias. Se a baleia está mergulhada em água fria, a grande superfície dos membros promove uma substancial perda de calor em relação ao coração do animal. Se o sangue retornasse ao coração tão frio quanto a água envolvente, o metabolismo do animal teria de fazer um grande esforço para repor esse calor. Com o processo da contracorrente em funcionamento, o sangue arterial aquecido vindo do coração, vai aquecer o sangue que regressa pelas veias a temperaturas muito mais baixas e por sua vez vai arrefecer. Quando o sangue arrefecido chega aos tecidos em contacto com a água fria já não perde tanto calor como se viesse com a temperatura cardíaca. A alteração do metabolismo é assim consideravelmente reduzida.

O sistema vascular do antebraço tem uma construção similar para permitir as trocas de calor por contracorrente. O processo é um pouco mais complicado que o caso dos membros superiores da baleia. No antebraço há dois sistemas de veias. Um destes sistemas fica junto às artérias e faz as trocas de calor de modo semelhante ao descrito. O outro sistema fica à superfície e recebe a influência da temperatura ambiente. O sangue de regresso é canalizado pelas veias interiores ou exteriores por músculos vasoconstritores ou vasodilatadores que são controlados pelos sensores de temperatura localizados na mão. Se a mão está em ambiente frio, o sangue retorna pelas veias do interior e a perda de calor é reduzida pelo fenómeno da contracorrente. Se o ambiente está aquecido, o sangue corre perto da superfície e o calor é dissipado para o ambiente provocando o arrefecimento corporal. Este complexo sistema serve a função dual de preservar o calor quando necessário, e de arrefecimento na situação inversa.

O processo das trocas por contracorrente também pode ser usado para arrefecer deliberadamente partes do corpo. A fertilidade de muitos mamíferos cai substancialmente quando a temperatura do corpo aumenta. As trocas por contracorrente permitem que a temperatura se mantenha baixa com pouca perda de calor pelo corpo.

As trocas por contracorrente também permitem que, animais em que a temperatura aumenta substancialmente com exercício violento, consigam manter o cérebro a temperaturas aceitáveis.

O princípio das trocas por contracorrente não está limitado à conservação do calor. Podemos entender a sua utilidade noutras situações reconhecendo que, nos sistemas de troca de calor que consideramos, um pequeno gradiente térmico no sistema conjunto de veia e artéria produz uma grande diferença de temperatura no final da estrutura.

Num sistema caracterizado por transporte activo, há usualmente um gradiente térmico máximo que o sistema pode aguentar. O processo da contracorrente pode funcionar como um multiplicador das condições do transporte activo e aumentar este gradiente de funcionamento.

O sistema da troca de calor por contracorrente constitui-se como uma vantagem da natureza numa grande variedade de estruturas.

## Anexo C

### Equação de Poiseuille-Hagen

A equação de Poiseuille-Hagen é utilizada em situações de fluxo laminar e relaciona o caudal “J” com a viscosidade “ $\eta$ ” e com a diferença de pressão “ $\Delta P$ ” entre as extremidades de um tubo de comprimento “l” e de raio “r”:

$$J = \pi \Delta P r^4 / 8 \eta l$$

Esta equação é utilizada para obter ordens de grandeza do sistema cardiovascular que de outro modo não poderiam ser calculadas.

Consideremos um ramo de uma artéria maior de raio 0.75cm que se divide em dois ramos menores de raio 0.5cm. Como todo o sangue que passa na artéria maior vai passar nas duas artérias menores, o caudal da maior deve ser duas vezes o caudal de cada uma das menores.

$$\pi \Delta P_M r_M^4 / 8 \eta l_M = 2 \pi \Delta P_m r_m^4 / 8 \eta l_m$$

$$\Delta P_M r_M^4 / l_M = 2 \Delta P_m r_m^4 / l_m$$

$$\Delta P_m / l_m = 2.53 \Delta P_M / l_M$$

A relação obtida significa que a diferença de pressão por unidade de comprimento nas artérias mais estreitas é maior duas vezes e meia que a das artérias mais largas. Se imaginarmos a divisão sucessiva em ramos cada vez mais estreitos a pressão cairia para níveis muito baixos.

Este raciocínio indica que devemos esperar que o comprimento dos pequenos vasos decresça também para evitar que a pressão fique demasiado baixa. Este facto impediria a viagem de regresso ao coração.

Como o fluxo é igual à velocidade vezes a área da secção:

$$v \pi r^2 = \pi \Delta P r^4 / 8 \eta l$$

$$v_m / r_m^2 = 2.53 v_M / r_M^2$$

$$v_m / v_M = 1.13$$

Podemos verificar que a velocidade do sangue num vaso mais pequeno é maior do que a velocidade do sangue num vaso de maior raio considerados com o mesmo fluxo.

A equação de Poiseuille-Hagen permite-nos saber a ordem de grandeza dos efeitos das dimensões dos vasos no fluxo sanguíneo

## Anexo D

### Viscosidade e velocidade sanguínea

Quanto maior for a viscosidade de um fluido maior é a sua resistência à mudança de forma.

Num tubo (ou vaso sanguíneo), o perfil das velocidades visto em projecção de um diâmetro é essencialmente parabólico:

$$v = \Delta P (a^2 - r^2) / 4 l \eta$$

Onde  $\Delta P$  é a diferença de pressão entre a entrada e saída do tubo, “a” é o raio do tubo, “r” é a distância do ponto ao centro, “l” é o comprimento do tubo e “ $\eta$ ” é a viscosidade do fluido.

Para uma secção perpendicular ao tubo o gradiente de velocidades tem uma simetria circular. O facto da velocidade ser constante em cada coroa circular levar-nos-ia a pensar em divisão em camadas concêntricas mas a velocidade é uma função contínua da distância ao centro.

Com o aumento da viscosidade o gradiente de velocidade baixa. Quanto maior for a viscosidade, mais baixa é a forma da parábola de velocidades, isto é, menos alterações tem a velocidade ao longo da secção.

Os fluidos estão sujeitos à turbulência. O regime de movimento chama-se laminar quando as camadas do fluido se movimentam de forma contínua. Em ambos os casos há perdas de energia por dissipação. Durante o regime de fluxo laminar a viscosidade causa perdas devido à fricção entre as camadas do fluido. Este resiste às mudanças no gradiente da velocidade e isso gasta energia. Em regime de fluxo turbulento a energia é requerida para criar a turbulência e é dissipada pelo fluido em todo o espaço de movimentação.

O fluxo passa de regime laminar a turbulento quando o parâmetro chamado Número de Reynold “R” atinge cerca de 2000. É assim definido:

$$R = \rho l v / \eta$$

Em que “v” é a velocidade do fluido, “l” o comprimento do tubo, “ρ” é a densidade do fluido e “η” a sua viscosidade.

## Anexo E

### Entropia

Entropia é a medida da energia de um sistema que não está disponível para produzir trabalho. Como o trabalho é obtido pela ordem, a medida da entropia é também a medida da desordem ou aliatoridade de um sistema.

Se a energia na forma de calor  $dQ$  é adicionada num sistema que está a temperatura constante  $T$ , a alteração da entropia  $dS$  é:

$$dS = (dU + p dV)/T \geq dQ/T$$

onde  $dU$  é a alteração da energia,  $p$  a pressão e  $dV$  é a alteração de volume.

Para processos reversíveis,  $dS = dQ/t$  e  $S$  é uma variável de estado porque o seu valor é completamente determinado pelo estado actual do sistema, isto é, independente do percurso seguido para atingir esse ponto.

Todos os processos naturais são irreversíveis e envolvem um aumento de entropia;

$$dS > dQ/T$$

A magnitude da entropia varia de zero à quantidade total de energia contida num sistema.

O conceito de entropia foi proposto em 1850 pelo físico alemão Rudolf Clausius e é por vezes apresentado como a 2ª lei da Termodinâmica.

Segundo esta lei, a entropia aumenta durante um processo irreversível tal como uma mistura espontânea de gases a diferentes temperaturas, a expansão de um gás no vácuo ou uma combustão.

Numa interpretação estatística de entropia, para um grande sistema em estado de equilíbrio, a entropia  $S$  é proporcional ao logaritmo natural da quantidade  $W$  que representa o número máximo de estados microscópicos nos quais o estado macroscópico correspondente a  $S$  pode ser realizado; isto é,

$$S = k_B \ln W$$

em que  $k_B$  é a constante de Boltzmann.

## Anexo F

### **Não linearidade**

Muitos modelos matemáticos são estruturados assumindo que os sistemas são lineares. Esta ideia envolve a utilização de equações que embora sejam mais fáceis de resolver, não são realistas. Hoje em dia sabe-se que os sistemas não lineares reflectem a realidade de um modo muito mais próximo. Por isso se fala de um modo geral em ciência não linear abrangendo importantes áreas da Física, Biofísica e Matemática.

As duas características importantes dos sistemas lineares são a proporcionalidade e a sobreposição.

A proporcionalidade significa que a relação entre o “input” e o “output” do sistema linear se traduz por uma linha recta.

Sobreposição refere-se ao facto que o comportamento dos sistemas lineares compostos de múltiplas componentes podem ser traduzidos pelo “output” da soma dessas partes.

Mesmo os sistemas mais simples violam estas duas características. Por exemplo, a não linearidade da equação que descreve uma parábola advém do termo quadrático. Esta equação tem uma dinâmica

extraordinariamente complexa que, dependendo do parâmetro  $k$ , a mesma equação pode gerar um sistema em equilíbrio, oscilações regulares ou compostos altamente instáveis.

O mesmo acontece com a equação utilizada neste trabalho como função de informação.

## Anexo G

### Cinética molecular

Como consequência do movimento térmico e da vibração, uma pequena partícula em solução atinge entre  $10^{13}$  a  $10^{15}$  colisões por segundo com as moléculas da sua vizinhança, daí resultando o movimento browniano. Considerando que os sucessivos passos são independentes uns dos outros, a média dos quadrados dos deslocamentos é proporcional ao tempo  $t$ :

$$\text{Média } (x^2) = Ct \qquad C = \text{const.}$$

em que  $x$  é a componente do deslocamento no tempo  $t$  e a média de  $x^2$  é a média obtida por muitas observações durante o mesmo tempo. Consideramos a média dos quadrados porque o passo  $+x$  e  $-x$  têm a mesma probabilidade e portanto a média  $(x)=0$ . Devido à alta frequência de colisão, tempos de observação de  $t \geq 1 \mu\text{s}$  são suficientemente longos para efectuar a média.

Para macromoléculas em solução, a força de fricção,  $F_r$ , é proporcional à velocidade,  $v$ , com o coeficiente de fricção,  $f$ :

$$F_r = - f v$$

O coeficiente  $f$  depende da forma e tamanho da macromolécula e da viscosidade do solvente.

Para partículas esféricas pode ser aplicada a fórmula de Stokes:

$$f = 6 \pi \eta a$$

Em que “ $a$ ” é o raio da partícula esférica e “ $\eta$ ” a viscosidade do solvente.

## Anexo H

### 1ª lei de Fick

### Equação de transporte aplicada a fenómenos de difusão linear em meio homogéneo

As analogias dos fluxos lineares de partículas, massa, energia e carga eléctrica podem ser explicitadas através de várias formas da mesma equação de transporte.

Se considerarmos o fenómeno de transporte de um modo unidimensional, a existência de fluxo material é caracterizada por um gradiente de concentração e pode ser explicitada pela equação:

$$j_x = -D (dC/dx)$$

em que  $D$  é o coeficiente de difusão. O sinal “-” é explicado pelo sentido do fluxo da alta concentração para a baixa concentração:

se  $dC/dx$  é positivo, o fluxo processa-se na direcção  $-x$ .

Esta relação é chamada 1ª lei da difusão de Adolf Fick, um fisiologista alemão do séc. XIX.

Esta equação de difusão pode ser considerada como uma das formas da equação de transporte. Para a energia(calor) explicitará o fluxo

de calor:

$$J_c = -\lambda (dT/dx)$$

E para a carga eléctrica será

$$J_e = -\sigma (dV/dx)$$

Em que  $j_e$  é a intensidade da corrente e  $V$  é o potencial eléctrico.

## Anexo I

### 2ª lei de Fick

A 1ª lei de Fick (Anexo H) relaciona o fluxo de difusão com o gradiente de concentração:

$$j_x = -D (dC/dx)$$

Diferenciando esta equação obtém-se:

$$d_jx/dx = -D (d^2C/dx^2)$$

Equações semelhantes podem ser formuladas para o eixo dos yy e dos zz.

Considerando uma esfera podemos aplicar a equação de continuidade:

$$-dC/dt = d_jx/dx + d_jy/dy + d_jz/dz$$

E combinando estas equações obtemos a 2ª lei de Fick para a difusão

$$dC/dt = D (d^2C/dx^2 + d^2C/dy^2 + d^2C/dz^2) = D \text{ Laplaciano } (C)$$

Uma das soluções desta equação é a função de distribuição Normal ou de Gauss.

# **Resumo**

Neste trabalho estuda-se o movimento de energia e massa, considerando a integração dos efeitos da interacção molecular presente nos fenómenos de transporte em sistemas biológicos.

Quando existe interacção, os fenómenos de transporte (em sistemas biológicos e não só) constituem sistemas complexos, representáveis por funções não lineares, que têm sido objecto de análises recentes.

Na primeira parte é apresentado um trabalho de experimentação animal que estuda o fenómeno de transporte de frio e a cinética de elementos figurados do sangue em situação de hipotermia.

A hipotermia foi induzida no animal por imersão em água gelada. Foram retirados dados da temperatura esofágica até ser atingida a temperatura de 22 °C considerando os respectivos tempos de arrefecimento. Durante o arrefecimento, foram efectuadas medidas “in vitro”, com e sem marcação radioisotópica, de leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Foi ainda efectuada a quantificação da chegada destes elementos aos diferentes órgãos utilizando medidas “in vivo” obtidas em gama-câmara ligada a um computador.

Na segunda parte é estudado um modelo teórico que pretende representar os principais mecanismos de transporte intracelular do ião  $\text{Ca}^{2+}$ .

Os dados foram retirados da bibliografia. Foram utilizados valores das concentrações do íon  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol, no compartimento de transporte activo e no compartimento constituído pelas ligações do íon  $\text{Ca}^{2+}$  a outras proteínas citoplasmáticas.

Nos sistemas em estudo, é aplicada uma função que pressupõe a existência de movimento de energia ou de massa. Estes movimentos conduzem a alterações nos elementos no espaço onde se efectuam. Cada interacção de elementos é traduzida como sendo transporte de uma informação.

A utilização desta função nos fenómenos que envolvem interacção de partículas diferenciadas identifica toda a complexidade destes movimentos como processos de transmissão de informação.

Considera-se que a velocidade de passagem dessa informação depende das propriedades de dois universos de partículas – as que contêm informação e as que ainda não são dela portadoras. Estes universos coexistem em espaços geométricos determinados, e interagem por contacto produzido pelo próprio movimento.

A função referida foi aplicada em duas situações que, embora de âmbitos muito diferentes, têm de comum pressupostos compatíveis com a aplicação de cinéticas semelhantes.

A análise destes sistemas determinou, nos modelos estudados, semelhanças formais nos seguintes factores: existência de movimento,

---

de interacção de elementos, de um espaço geométrico delimitador desse movimento e existência de fontes de energia ou massa situadas no exterior desse espaço.

A função de informação, que chamámos função de informação por movimento, é aplicada à descida da temperatura corporal, constituindo uma nova aproximação ao estudo da propagação do arrefecimento corporal provocado por um meio ambiente frio. No estudo comparativo com uma função linear, esta função apresentou melhores resultados na representação do fenómeno.

A equação utilizada, representativa da descida da temperatura corporal interna, leva-nos a considerar para ponto de velocidade máxima de descida o instante em que metade dos elementos estão arrefecidos. Daí em diante a velocidade da função de descida de temperatura diminui até ser atingido o limite mínimo de condições de circulação.

Este estudo continuou-se com a aplicação do mesmo modelo à cinética leucocitária e plaquetária. A função é aplicada aos dados retirados de medidas “in vitro”, com e sem marcação radioisotópica, e medidas “in vivo” obtidas com marcação de leucócitos e plaquetas com  $^{111}\text{In}$ .

Foram estabelecidas as funções de entrada e saída de leucócitos e plaquetas dos compartimentos seguintes: compartimento circulatório, hepático, esplénico e compartimento extrahepatoesplénico. Foi

efectuado o estudo comparativo destas funções e da sua relação funcional com a hipotermia.

Utilizando um sistema de compartimentos, foram determinadas soluções de comportamento do fenómeno de marginação de leucócitos e plaquetas e foi relacionada a amplitude deste fenómeno com a velocidade de descida de temperatura.

Na segunda parte, no estudo dos mecanismos de transporte intracelular do ião  $\text{Ca}^{2+}$ , foram encontradas analogias com o modelo aplicado à descida da temperatura corporal interna. Estas semelhanças formais permitiram a aplicação do mesmo tratamento matemático.

Neste caso, a fonte de informação é constituída pela elevada concentração do ião  $\text{Ca}^{2+}$ , existente no espaço extracelular e no retículo sarcoplasmático, que se movimenta para o espaço intracitosólico. Com a utilização da função de informação por movimento aplicada a uma célula padrão, foram efectuados os traçados da progressão da entrada de cálcio no interior da célula, bem como os traçados do conjunto de representações da ligação do ião  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas plasmáticas. A aplicação de um sistema de compartimentos permitiu determinar possíveis representações da onda de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitosólica.

As duas situações estudadas constituem temas científicos de relevância e actualidade: a importância do estudo da hipotermia advém da sua utilização em cirurgia e, em estudos mais recentes, da

sua utilização em situações de *stress* pós-traumático; o interesse do estudo do íon de  $\text{Ca}^{2+}$ , como sendo o controlador de um vasto sistema de processos celulares com complexos mecanismos ainda não inteiramente conhecidos.

# **Summary**

This work presents a study of particle movement, considering the effect of the molecular interaction present on biological transport systems.

When interaction exists, transport phenomena (not only on biological systems) are complex systems, which can be represented by non-linear functions that have been subject of recent analysis.

In the first part, an animal experimental work is presented. It studies the phenomena of cold transport and also blood elements kinetics on a hypothermic situation.

Hypothermia was induced in the animal by iced water bath.

Considering the respective times, esophageic temperature was measured till 22 °C are reached.

During cooling, data was taken from “in vitro” measurements, with and without radioisotopic labelling, and from “in vivo” measurements obtained with leukocytes and platelets labelled with  $^{111}\text{In}$ .

It was done the quantification of the uptake of these elements to the different organs using a gamma camera switched to a computer.

In the second part, a theoretical model intending to represent the ion  $\text{Ca}^{2+}$  main intracellular transport mechanisms is studied.

Data was taken from bibliography. It was used the value of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the citosol,  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the active transport compartment, and  $\text{Ca}^{2+}$  bound to cytoplasmatic proteins.

A function that assumes the existence of energy or mass movement is applied. These movements lead to changes on the elements on the space they occur. Each element interaction is seen as information transport.

Using this function on phenomena involving different kinds of particles we may identify these movements as information transfer processes.

The velocity of information transmission is considered to depend on the properties of two universes of particles: those that carry information and those not carrying it yet. These universes coexist at determined geometrical spaces and interact by the contact generated by the movement itself.

The referred function has been applied on two situations that, although belonging to very different domains, have in common compatible assumptions with the application of similar kinetics.

The analysis of these systems has determined, on the studied models, formal similarities on the following factors: existence of movement, existence of interaction between elements, existence of a geometrical

space delimitating of this movement, and the existence of energy or mass sources positioned outside this space.

The information function, called “by movement information function”, is applied to the core temperature lowering resulting on a new approach to the study of the body cooling propagation caused by a very low temperature environment.

The information source consists of a low exterior temperature system that moves towards the core of the body, being the blood circulation the main transmission channel.

The obtained equation represents the body core temperature decrease. It makes us consider the point where there are as many cooled particles as particles yet to be cooled as the point where cooling rate reaches its maximum. From that point on, temperature-falling rate diminishes until the minimum limit of circulation is reached.

This study was continued applying the same model to the leucocyte and platelet kinetics. The function is applied to data from “in vitro” measurements, with and without radioisotopic labelling, and from “in vivo” measurements obtained with leucocytes and platelets labelled with  $^{111}\text{In}$ .

It has been possible to establish the leukocyte and platelet in and out functions of the following compartments: circulatory, hepatic, splenic

and extra hepatic-splenic compartment. A comparative study of these functions and their functional relation with hypothermia was done.

In the second part, a theoretical model intending to represent the ion  $\text{Ca}^{2+}$  main intracellular transportation mechanisms is studied.

In this work, analogies with the model applied to the internal body temperature decrease were found, allowing the use of the same mathematical treatment.

On this case, the information source is the high concentration of the ion  $\text{Ca}^{2+}$  that exists at extracellular space and at the sarcoplasmic reticulum and that moves towards the interior of the cytosolic space. Using the “by movement information function” applied to a standard cell, it was possible to sketch possible models to the calcium entrance in the cell as well as representations of the ion  $\text{Ca}^{2+}$  binding to plasmatic proteins. The application of a compartment system allowed to determinate possible representations for the intracytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  wave.

The two studied situations are relevant and actual scientific themes: the importance of the hypothermia study comes from its use at surgery and, at more recent studies, its use at posttraumatic stress situations; the interest of the ion  $\text{Ca}^{2+}$ , as being the controller for cellular processes involving complex mechanisms not yet entirely known.

Inscrição: "O mundo está ligado por nós invisíveis"  
Gravura de A. Kircher, *Magneticum naturæ regum*, Roma, 1667