

OSVALDO FERRARESI FILHO

TRANSPORTE E METABOLISMO
DE OCTANOATO NO FÍGADO DE RATO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências — **Bioquímica.**

CURITIBA
1993

À minha esposa e nossas crianças

OSVALDO FERRARESI FILHO

TRANSPORTE E METABOLISMO
DE OCTANOATO NO FIGADO DE RATO

Tese aprovada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor no Curso de
Pós-Graduação em Bioquímica pela Comissão
formada pelos Professores:

Orientador: Prof. Dr. Adelar Brachet
UEM

Prof. Dr. Rui Curi
USP

Prof. Dr. Manoel Francisco Guimarães
URPR

Prof^a Dr^a Emy Luiza Ishii Iwamoto
UEM

Prof Dr Luiz Carlos Salomão
USP

Curitiba, 19 de novembro de 1993.

Tese orientada pelo Dr. Adelar Bracht

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	6
	RESUMO	15
1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	Aspectos gerais da função hepática com relação aos ácidos graxos	16
1.2.	Os sistemas enzimáticos responsáveis pela sequestração dos ácidos graxos	18
1.3.	Hipóteses sobre os fatores que determinam a velocidade de captação metabólica dos ácidos graxos	21
1.3.1.	A teoria tradicional para a captação metabólica de ácidos graxos	21
1.3.2.	Um receptor para o complexo albumina-ácido graxo ..	23
1.3.3.	As controvérsias sobre a hipótese do receptor para o complexo albumina-ácido graxo	25
1.3.4.	Uma proteína que liga especificamente ácidos graxos de cadeia longa	31
1.3.5.	As propriedades físico-químicas e a captação metabólica dos ácidos graxos	33
1.3.6.	Medidas de fluxos unidirecionais de ácidos graxos no fígado inteiro	35
1.3.7.	Análise crítica das hipóteses sobre os mecanismos de captação metabólica dos ácidos graxos	38
1.4.	Diferenças entre o octanoato e os ácidos graxos de cadeia longa: uma hipótese de trabalho	39
1.5.	Os objetivos deste trabalho	45
2.	BASES MATEMÁTICAS DA ANÁLISE DE EXPERIMENTOS DE DILUIÇÃO DE INDICADORES	46
2.1.	O fígado: generalidades sobre a microcirculação ...	46
2.2.	Mecanismos de dois estoques celulares	49
2.2.1.	Aspectos gerais e definições	49

2.2.2.	Descrição matemática do comportamento de um traçador ao longo de um sinusóide	50
2.2.2.1.	A condição $k_1 = 0$ e $k_2 = 0$	57
2.2.2.2.	k_1 e k_2 tendem ao infinito	58
2.2.2.3.	k_3 e k_4 tendem ao infinito	63
2.2.2.4.	A condição $k_4 = 0$	66
2.2.2.5.	A condição $k_3 = 0$	69
2.2.2.6.	k_1 , k_2 , k_3 e k_4 tendem ao infinito	71
2.2.2.7.	A condição $k_5 = 0$ e/ou $k_6 = 0$	73
2.2.3.	A resposta do órgão inteiro à injeção de um traçador: integração da resposta de todos os sinusóides	74
2.2.4.	O modelo de dois estoques em condições de estado estacionário	82
2.3.	Os tempos médios de trânsito e a determinação de volumes e da velocidade de metabolização	93
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	97
3.1.	Materials	97
3.2.	Animais	97
3.3.	O líquido de perfusão	97
3.4.	Preparo da mistura contendo os traçadores	98
3.5.	O sistema de perfusão do fígado	98
3.6.	A preparação cirúrgica do fígado	99
3.7.	Teste da homogeneidade da perfusão do fígado	100
3.8.	Os experimentos de diluição de indicadores múltiplos com traçadores	102
3.9.	Analítica	103
3.9.1.	Determinação da [^{131}I]albumina e da [^3H]água	103
3.9.2.	Extração e determinação do [$1\text{-}^{14}\text{C}$]octanoato	103
3.9.3.	A discriminação dos isótopos	104

3.9.4.	Determinação da quantidade injetada de [1- ¹⁴ C]octanoato	107
3.9.5.	Determinação do consumo de oxigênio	108
3.9.6.	Dosagens enzimáticas	108
3.9.7.	Quantificação da produção de ¹⁴ CO ₂	110
3.10.	Métodos numéricos	111
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
4.1.	Aspectos gerais do metabolismo do octanoato: o estabelecimento de condições de estado estacionário	113
4.2.	Experimentos de diluição de indicadores com [1- ¹⁴ C]octanoato	115
4.2.1.	Os experimentos com albumina 450 μM	116
4.2.2.	Os experimentos com albumina 150 μM	122
4.2.3.	Os experimentos com albumina 50 μM	128
4.3.	O ajuste de um modelo às curvas de diluição do [1- ¹⁴ C]octanoato	132
4.3.1.	Considerações preliminares	132
4.3.2.	O cálculo de t ₀ e θ'	134
4.3.3.	Ajustes de mínimos quadrados das equações [4A] e [5A] aos dados experimentais	135
4.3.3.1.	A série com albumina 450 μM	138
4.3.3.2.	A série com albumina 150 μM	139
4.3.3.3.	A série com albumina 50 μM	142
4.4.	Testes de consistência do modelo de troca rápida do octanoato com a membrana plasmática	145
4.4.1.	Considerações preliminares	145
4.4.2.	Variação de parâmetros calculados com as constantes de velocidade em função de C _a	148
4.4.2.1.	A série de experimentos com albumina 450 μM	148
4.4.2.2.	A série de experimentos com albumina 150 μM	153

4.4.2.3.	A série de experimentos com albumina 50 μM	154
4.4.3.	Correlações teoricamente independentes da concentração de albumina	157
4.5.	A exclusão de outros possíveis mecanismos para descrição do comportamento do octanoato	163
4.5.1.	O ajuste da equação [2A] às curvas de diluição do [1- ^{14}C]octanoato	164
4.5.2.	Uma análise da correlação entre F_{met} e $C_{\text{ekin}}/(k_{\text{ef}} + k_{\text{met}})$	170
4.5.3.	A utilização da equação [1A] para a análise das curvas de diluição do [1- ^{14}C]octanoato	176
4.5.3.1.	Ajuste da equação [1A] às curvas de diluição do [1- ^{14}C]octanoato	178
4.5.3.2.	Simulações utilizando a equação [1A] com altos valores de k_1 e k_2	184
4.6.	Um paralelo do comportamento do octanoato, do palmitato e do niflumato	189
5.	DISCUSSÃO FINAL	196
5.1.	Aspectos gerais — Conclusões	196
5.2.	A natureza do primeiro estoque de octanoato: há lipídeos suficientes na membrana celular para acomodar o octanoato?	199
5.3.	A natureza do segundo estoque de octanoato	203
6.	BIBLIOGRAFIA	210
7.	AGRADECIMENTOS	218

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Esta lista inclui apenas os símbolos definidos no texto. Ela não contém os símbolos e abreviaturas que já são de uso corrente, tais como mol, μ mol, nmol, ATP, etc.

Símbolo	Primeira menção na página	Definição
α	55	Uma das raízes da equação do segundo grau $s^2 + (k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_6)s + (k_2k_4 + k_2k_6 + k_3k_6 + k_4k_6 + k_5k_6) = 0$
a_{esp}	110	Atividade específica do $[1-^{14}C]$ octanoato
Alb	51	Albumina livre no espaço extracelular
Alb·u	51	Traçador complexado com albumina no espaço extracelular
Alb _t	112	Concentração total de albumina
Alb·C	83	Octanoato complexado com albumina no espaço extracelular
a_1	104	Fração de ^{131}I no canal 1 do contador de cintilações
a_2	104	Fração de ^{131}I no canal 2 do contador de cintilações
b_1	104	Fração de ^{14}C no canal 1 do contador de cintilações
b_2	104	Fração de ^{14}C no canal 2 do contador de cintilações
β	55	Uma das raízes da equação do segundo grau $s^2 + (k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_6)s + (k_2k_4 + k_2k_6 + k_3k_6 + k_4k_6 + k_5k_6) = 0$

C_1	104	Fração de ^3H no canal 1 do contador de cintilações
C	104	cpm do isótopo ^{14}C numa amostra
C_{acet}	109	Concentração venosa de acetoacetato
C_{but}	109	Concentração venosa de β -hidróxi-butirato
C_e	51	Concentração extracelular média, livre mais ligada, do octanoato
C_{ef}	51	Concentração extracelular média da forma livre, não ligada, do octanoato
C_{11}	51	Concentração do octanoato, livre mais ligado, no primeiro estoque celular
C_{11f}	51	Concentração da forma livre do octanoato no primeiro estoque celular
C_{12}	51	Concentração do octanoato, livre mais ligado, no segundo estoque celular
C_{12f}	51	Concentração da forma livre do octanoato no segundo estoque celular
C_p	91	Concentração portal de octanoato
C_v	91	Concentração venosa de octanoato
C_{vO_2}	108	Concentração venosa de oxigênio
C_1	104	Contagem (cintilações por minuto) no canal 1 do cintilador
C_2	104	Contagem (cintilações por minuto) no canal 2 do cintilador
C_3	104	Contagem (cintilações por minuto) no canal 3 do cintilador

cpm	104	Cintilações por minuto
ϵ	56	Variável de integração da integral de convolução da equação [18].
F	75	Fluxo de perfusado através do fígado (ml/min)
F_{ef1}	86	Velocidade de retorno do primeiro estoque celular para o espaço extracelular
F_{ef2}	86	Velocidade de retorno do segundo para o primeiro estoque celular
F_{efap}	88	Velocidade de efluxo calculada a partir de k_{ef} , k_{met} e C_e (equação [21A])
F_{in1}	86	Velocidade de passagem do espaço extracelular para o primeiro estoque celular
F_{in2}	86	Velocidade de passagem do primeiro para o segundo estoque celular
F_{inap}	88	Velocidade de influxo calculada a partir de k_{in} e C_e (equação [20A])
F_{met}	86	Velocidade de metabolização calculada a partir de constantes de velocidade
F_{met}^*	94	Velocidade de metabolização calculada a partir dos tempos médios de trânsito da [^{131}I]albumina e da [3H]-água e da diferença de concentração porto-venosa
F_e	53	Fluxo através do sinusóide (volume/tempo)
$f(\tau)$	75	Função de distribuição de frequência dos tempos de trânsito pelos sinusóides
$f(\tau)d\tau$	74	A fração dos sinusóides com tempo de trânsito entre τ e $\tau+d\tau$
f_1	51	Constante de velocidade para a entrada no primeiro estoque da forma livre do octanoato

f_2	51	Constante de velocidade para a saída do primeiro estoque da forma livre do octanoato
f_3	51	Constante de velocidade para a entrada no segundo estoque da forma livre do octanoato
f_4	51	Constante de velocidade para a saída do segundo estoque da forma livre do octanoato
f_5	51	Constante de velocidade para a metabolização da forma livre do octanoato no primeiro estoque celular
f_6	51	Constante de velocidade para a metabolização da forma livre do octanoato no segundo estoque celular
Φ	71	Razão k_3/k_4
H	104	cpm do isótopo ^3H
I	104	cpm do isótopo ^{131}I
k_{ef}	78	Constante de velocidade de efluxo aparente, determinável, em geral função de outras constantes de velocidade
k_{in}	78	Constante de velocidade de influxo determinável e que pode ser função complexa
k_{met}	78	Constante de velocidade de metabolização aparente, determinável, em geral função de outras constantes de velocidade
k_1	50	Constante de velocidade composta para o influxo de octanoato no primeiro estoque celular [= $f_1(C_{ef}/C_e)$]
k_2	50	Constante de velocidade composta para o retorno (efluxo) do octanoato do primeiro estoque celular ao espaço extracelular [= $f_2(C_{11f}/C_{11})$]
k_3	50	Constante de velocidade composta para o influxo de octanoato no segundo estoque celular [= $f_3(C_{11f}/C_{11})$]

k_4	50	Constante de velocidade composta para o efluxo de octanoato do segundo estoque intracelular [= $f_4(C_{12f}/C_{12})$]
k_5	50	Constante de velocidade composta para a transformação metabólica de octanoato no primeiro estoque celular [= $f_5(C_{11f}/C_{11})$]
k_6	50	Constante de velocidade composta para a transformação metabólica de octanoato no primeiro estoque celular [= $f_6(C_{12f}/C_{12})$]
$K_{a1}, K_{a2},$ etc. (K_{aj})	42	Constantes de equilíbrio para a ligação do ácido niflúmico, octanoato e vários ácidos graxos de cadeia média e longa à albumina de soro bovino
k_{dise}	40	Constante de velocidade de dissociação do complexo equimolecular albumina-ácido graxo (tempo^{-1})
L	53	Operador da transformada de Laplace
M	51	Membrana plasmática
m	112	Número de sítios de ligação de ligantes à albumina
N_1	112	Produto $1/K_{a1} \cdot 1/K_{a2} \cdot \dots \cdot 1/K_{an}$
Ω	60	Razão k_1/k_2 , equivalente à razão do espaço aparente do traçador na membrana plasmática e adjacências para o espaço extracelular
$\delta(t)$	53	Função impulso
$\delta(t-x/W)$	56	Função impulso que descreve o deslocamento do pulso de traçador ao longo do sinusóide
ϕ_1	89	$1 + k_3/k_4$
ϕ_2	89	$k_3k_4/(1 + k_3/k_4)$
P	108	Peso úmido do fígado (g)

p	158	Probabilidade de que uma diferença seja devida ao acaso no teste t de Student, isto é, $p = \int_0^t f(t) dt$, sendo $f(t)$ a distribuição de Student (Brandt, 1975).
P	83	Produto de metabolização de um traçador no primeiro estoque intracelular
P^*	51	Produto de metabolização de um traçador no primeiro estoque celular
q	74	Quantidade do traçador injetado na veia porta
q_{a1b}	75	Quantidade de [^{131}I]albumina marcada injetada
q_s	53	Quantidade de traçador que alcança cada sinusóide
Q	83	Produto de metabolização no segundo estoque intracelular
Q^*	51	Produto de metabolização de um traçador no segundo estoque celular
$Q_{a1b}(t)$	76	Fração da [^{131}I]albumina injetada que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo
$Q'_{a1b}(t)$	75	Quantidade da [^{131}I]albumina injetada que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo
$Q(t)$	76	Fração de [$1-^{14}C$]octanoato injetado que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo
$Q'(t)$	74	Quantidade de [$1-^{14}C$]octanoato injetado que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo

r	160	Coeficiente de correlação
R	107	Razão (cpm [^{131}I]albumina injetada)/ (cpm [^{14}C]octanoato injetado)
σ	136	Erro padrão da estimativa
s	53	Número complexo na transformada de Laplace
$S(t-x/W)$	56	Função degrau (<i>step function</i>) que é igual a zero quando $(t-x/W) < 0$ e igual à unidade quando $(t-x/W) > 0$
τ	74	Tempo variável de trânsito pelos sinusóides
t	52	Tempo
θ'	52	Razão do espaço aquoso intracelular para o espaço extracelular (sinusóide + espaço de Disse) no fígado
$\bar{t}_{\text{água}}$	94	Tempo médio de trânsito da água triciada
\bar{t}_{alb}	94	Tempo médio de trânsito da albumina
\bar{t}_{ref}	95	Tempo médio de trânsito da nova referência para o [^{14}C]octanoato
t_0	74	Tempo de trânsito uniforme pelos grandes vasos e nos tubos entre o fígado e o sistema de coleta das amostras
u	51	Concentração total (livre mais ligada) do traçador no espaço extracelular
u_f	51	Concentração do traçador livre no espaço extracelular
$u(W\tau, t-t_0)$	75	Função corrigida que descreve o comportamento do traçador num único sinusóide

\bar{U}	54	Transformada de Laplace da função que descreve o comportamento de um traçador no sinusóide
v	51	Concentração total (livre mais ligada) do traçador no primeiro estoque celular
v_f	51	Traçador livre no primeiro estoque intracelular
V	94	Volume de distribuição
\bar{V}	54	Transformada de Laplace da função que descreve o comportamento de um traçador no primeiro estoque celular
V_{oct}	19	Velocidade máxima de uma acil-CoA sintetase para com o octanoato
V_{pal}	19	Velocidade máxima de uma acil-CoA sintetase para com o palmitato
V_{acet}	109	Velocidade de produção de acetoacetato
v_{but}	109	Velocidade de produção de β -hidróxi-butirato
v_{CO_2}	110	Velocidade de produção de $^{14}CO_2$
V_e	50	Espaço extracelular (espaço de Disse + espaço sinusoidal)
V_i	50	Espaço intracelular
v_{O_2}	108	Velocidade de consumo de oxigênio, expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
x	52	Posição ao longo do sinusóide
X	51	Componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no primeiro estoque celular
$X \cdot v$	51	Traçador complexado no primeiro estoque celular
$X \cdot C$	83	Substância complexada no primeiro estoque celular

W	52	Velocidade aparente de convexão, expressa em distância por unidade de tempo, de uma substância no sinusóide que troca com velocidade infinita com o espaço de Disse adjacente
W_T	74	Comprimento de cada sinusóide
Y	51	Componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no segundo estoque celular
$Y \cdot z$	51	Traçador complexado no segundo estoque celular
$Y \cdot C$	83	Substância complexada no segundo estoque celular
z	51	Concentração total (livre mais ligada) do traçador no segundo estoque celular
z_f	51	Traçador livre no segundo estoque celular
\bar{z}	54	Transformada de Laplace da função que descreve o comportamento do traçador no segundo estoque celular

RESUMO

Neste trabalho, o transporte e o metabolismo do octanoato no fígado de rato foram investigados, utilizando basicamente a técnica da diluição de indicadores múltiplos no fígado em perfusão isolada. O fígado foi perfundido isoladamente com meio livre de hemoglobina (tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato), oxigenado até à saturação com uma atmosfera de 95% de O₂, aquecido a 37°C e suplementado com albumina e octanoato em concentrações variáveis. Os experimentos de diluição de indicadores consistiam na injeção simultânea de uma mistura contendo [1-¹⁴C]octanoato, [¹³¹I]albumina (indicador para o espaço extracelular) e [³H]água (indicador para o espaço aquoso total) sob condições de estado estacionário previamente estabelecidas. O perfusado efluente foi fracionado e as curvas normalizadas, que refletem os eventos aos quais cada substância foi submetida no fígado, foram interpretadas.

A interpretação baseou-se nos parâmetros obtidos ajustando equações matemáticas que descrevem vários mecanismos. As equações foram derivadas com base num modelo espaço-distribuído, com tempos de trânsito sinusoidais variáveis. Os parâmetros obtidos dos ajustes foram constantes de velocidade ou razões de constantes de velocidade para os fluxos entre estoques (compartimentos). A partir dessas constantes e da concentração extracelular foram calculadas velocidades de fluxos entre estoques e concentrações.

Os resultados obtidos indicam que, para o octanoato, há três estoques cineticamente relevantes no fígado: (1) o estoque extracelular, que coincide com o espaço ocupado pela albumina; (2) um estoque celular que inclui a membrana plasmática e suas adjacências; (3) um outro estoque celular que inclui pelo menos o citossol e as mitocôndrias, onde ocorre a metabolização.

O acesso do octanoato à membrana plasmática e suas adjacências, o primeiro estoque celular, é extremamente rápido e limitado pelo fluxo, sendo que a velocidade de acesso não pode ser determinada. A concentração de octanoato na membrana plasmática depende da concentração livre (octanoato não ligado à albumina) no espaço extracelular. A relação entre a concentração de octanoato na membrana e a concentração livre no espaço extracelular é parabólica. O acesso rápido à membrana plasmática está de acordo com dados físico-químicos acerca da velocidade com que o octanoato passa da albumina para membranas artificiais.

A passagem do octanoato do primeiro (membrana plasmática) para o segundo estoque celular (citossol mais mitocôndrias) é lenta, sendo que a velocidade de transferência correlaciona com a concentração na membrana plasmática. A relação apresenta um fenômeno de saturação ou de pseudo-saturação. A metabolização correlaciona com a concentração no segundo estoque celular, mas a dispersão dos dados não permite distinguir com exatidão o tipo de relação. A concentração do octanoato no estoque que compreende o citossol mais as mitocôndrias é alta, bem maior do que a do palmitato em condições comparáveis. Isto explica a maior velocidade de metabolização do octanoato em termos absolutos. Por unidade de concentração, no entanto, a velocidade de metabolização do octanoato é menor que a do palmitato.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da função hepática com relação aos ácidos graxos

A passagem de diferentes substâncias através da membrana plasmática dos hepatócitos tem sido objeto de muitos estudos nos últimos 20 anos, já que o fígado tem importante papel na remoção dos mais diversos compostos da circulação sanguínea. Para desempenhar esta função, a superfície dos hepatócitos é provida de vários carreadores específicos, principalmente na região sinusoidal, que é a superfície em contato direto com o sangue portal. Mais de 70% da superfície dos hepatócitos está em contato com essa região (Tiribelli *et al.*, 1990). Muita atenção tem sido dada à regulação e aos mecanismos dos sistemas de transporte o que, com frequência, leva a um aprofundamento nos aspectos físico-químicos.

Entre o grande número de substâncias captadas pelo fígado destacam-se os ácidos graxos. Estes compostos, que são importantes fontes de energia (catabolismo) e precursores em processos biossintéticos (anabolismo), são absorvidos no trato digestivo ou liberados pelo tecido adiposo e, na corrente sanguínea, são transportados pela soroalbumina (Spector, 1975). Qualquer que seja o destino do ácido graxo na célula, a primeira reação é sempre a formação de um tioéster com a coenzima A (acil-CoA), reação esta que, nas condições celulares, é praticamente irreversível, a ponto de Goresky *et al.* (1978) terem utilizado o termo "sequestração" para esta etapa. Para servirem de fontes de energia os acil-CoA são oxidados a acetil-CoA e depois a CO₂ no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Tudo isto supre a cadeia respiratória de equivalentes redutores que fluem

em direção ao oxigênio com a correspondente fosforilação do ADP. O acetil-CoA, além disto, pode tanto ser transformado em corpos cetônicos, que migram para outros tecidos, como também ser utilizado para a síntese de novos ácidos graxos ou colesterol. Outros processos de biossíntese independem de uma degradação dos acil-CoA em acetil-CoA. Sempre há a possibilidade de ocorrer síntese de triacilgliceróis e fosfolipídeos, precedida ou não de processos de alongamento ou dessaturação da cadeia carbônica.

No meio extracelular o papel da albumina é importante. Ela é a mais abundante das proteínas presentes no soro e no espaço intersticial dos mamíferos. Sua concentração situa-se entre 3 e 4 g por 100 ml (450 a 600 μ M), dependendo da espécie. Ela liga uma gama enorme de substâncias com uma combinação de alta afinidade e especificidade. No fígado, ela desfruta de acesso direto à membrana plasmática de células parenquimatosas através de poros presentes na parede sinusoidal. Além de funcionar como tampão, a albumina aumenta a solubilidade das substâncias no plasma, previne a toxicidade nos tecidos e facilita o intercâmbio de substâncias entre os tecidos. Estas importantes tarefas são desempenhadas pelos seus múltiplos sítios de ligação. Estes sítios parecem ter flexibilidade a ponto de suas configurações poderem adaptar-se aos ácidos graxos no momento da ligação (Spector, 1975).

No fígado, as fenestrações conectando o sinusóide com o espaço de Disse permitem livre contato entre o complexo albumina-ácido graxo e a superfície hepatocelular (ver Figura 1). As células parecem não internalizar albumina com velocidade significativa e por isto, a dissociação do complexo deve preceder a permeação do ácido graxo ou de qualquer outra substância.

A albumina é uma das proteínas mais estudadas nas últimas décadas. Embora tenha influência destacada na distribuição e

remoção de drogas e metabólitos, ainda permanecem muitas incertezas sobre o seu papel no transporte, principalmente de ácidos graxos.

1.2. Os sistemas enzimáticos responsáveis pela sequestração dos ácidos graxos

Como já foi dito, a transformação dos ácidos graxos em tioésteres da coenzima A (acil-coenzima A) é sempre a primeira etapa na metabolização. Esta etapa é catalisada pelas acil-coenzima A sintetases, das quais existem diversos tipos, localizadas também em compartimentos celulares diferentes. Estas enzimas têm sido costumeiramente agrupadas de acordo com suas preferências para os ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia. Há, primeiramente, a **acil-CoA sintetase para cadeias curtas** (E. C. 6.2.1.1) que ativa ácidos graxos de 2 e 3 carbonos e que está presente nas mitocôndrias e no citossol. Para os ácidos graxos de 4 a 10 carbonos há a **acil-CoA sintetase para cadeias médias** (E. C. 6.2.1.2) que está presente na matriz mitocondrial. E, finalmente, há a **acil-CoA sintetase para cadeias longas** (E. C. 6.2.1.3), que ativa ácidos graxos com mais de 12 carbonos e que está associada à membrana externa das mitocôndrias, ao retículo endoplasmático e aos peroxissomos (Marinetti, 1970; Sugden e Williamson, 1982; Schulz, 1991). Ácidos graxos de cadeia curta e média (2 a 10 carbonos) podem permear a membrana mitocondrial na forma livre sendo transformados em ésteres acil-CoA na matriz mitocondrial (Aas, 1971). A passagem destes ácidos graxos através da membrana mitocondrial não requer, portanto, um mecanismo de transporte dependente de carnitina (McGarry *et al.*, 1975).

Embora haja um consenso geral sobre a existência dos três

tipos de acil-CoA sintetases mencionados no parágrafo anterior, não há muita concordância sobre o exato papel de cada tipo e sobretudo sobre as reais atividades e afinidades para cada ácido graxo nas condições celulares. É muito difícil mesmo imitar o microambiente celular dos ácidos graxos. Para substâncias tão pouco solúveis em água, no entanto, este microambiente deve ser muito importante. **Noy e Zakim (1985)** mediram V_{max} e K_m da acil-CoA sintetase microsomal (para ácidos graxos de cadeia longa) para diversos ácidos graxos num sistema no qual estes compostos estavam presentes como complexos em vesículas unilamelares de fosfatidil-colina. Os autores julgam que esta é a situação no interior da célula, o que pode ser uma boa aproximação. Neste sistema, a velocidade máxima para o octanoato (V_{oct}) é dez vezes menor que a velocidade máxima para o palmitato (V_{pal}), isto é, $V_{oct}/V_{pal} = 0,1$. Em contrapartida o K_m aparente do octanoato é cerca de seis vezes menor que o do palmitato. Em condições saturantes, portanto, a acil-CoA sintetase para cadeias longas, dos microsomos, irá transformar palmitato dez vezes mais rapidamente do que o octanoato. Se as condições não forem saturantes esta relação pode ser diferente. No entanto, ácidos graxos endógenos de cadeia longa podem competir muito efetivamente com o octanoato adicionado exogenamente (**Noy e Zakim, 1985**).

As atividades medidas por outros autores devem ser encaradas com muitas reservas, pois as condições do sistema de incubação podem ter grande influência. Por exemplo, se as concentrações de ácidos graxos e albumina forem fixas, os ácidos graxos que ligam mais fortemente à albumina estarão menos disponíveis e a atividade medida em relação a eles pode ser menor por causa disto. Os dados de **Aas (1971)**, no entanto, merecem ser citados por serem mais completos. No sistema de incubação deste autor os

ácidos graxos foram adicionados em concentrações saturantes (1,0 mM ou acima) juntamente com albumina e Triton X-100. De acordo com Aas (1971) a razão V_{oct}/V_{pal} para a acil-CoA sintetase microsomal está em torno de 0,42, valor maior do que aquele medido por Noy e Zakim (1985), mas de qualquer forma indicando menor atividade com o octanoato em comparação com o palmitato. Para as atividades acil-CoA sintetases da membrana externa das mitocôndrias e da membrana interna das mitocôndrias, as razões V_{oct}/V_{pal} encontradas por Aas (1971) foram, respectivamente, 0,31 e 0,2. Para a atividade acil-CoA sintetase da matriz mitocondrial, finalmente, a razão $V_{oct}/V_{pal} \gg 1$, sendo desprezível a atividade dessa enzima com palmitato. Portanto, apenas a acil-CoA sintetase da matriz mitocondrial apresenta uma atividade maior com octanoato em comparação com o palmitato.

Com relação aos peroxissomos, tem sido observado que, no fígado de rato, estas organelas apresentam atividades de palmitoil-CoA sintetase e de lauroil-CoA sintetase, havendo pouca atividade de octanoil-CoA sintetase (Krisans *et al.*, 1980). A β -oxidação do sistema peroxissomal difere do sistema mitocondrial no tocante à primeira etapa de oxidação. Ao invés da acil-CoA desidrogenase do sistema mitocondrial, os peroxissomos possuem uma oxidase, a acil-CoA oxidase. Esta enzima é eficiente na oxidação de acil-CoA de cadeia longa (12 carbonos para cima), mas pouco eficiente com octanoil-CoA (8 carbonos). Já nas mitocôndrias, a acil-CoA desidrogenase, a enzima que catalisa a primeira etapa da β -oxidação nessas organelas, tem atividade elevada com o octanoil-CoA (Hryb e Hogg, 1979). Para Hryb e Hogg (1979) o sistema de β -oxidação peroxissomal tem um papel secundário em relação ao sistema de β -oxidação mitocondrial no fígado. Somente as mitocôndrias podem oxidar ácidos graxos com cadeia menor que 8 carbonos.

Como se poderia esperar, o fígado metaboliza os diversos ácidos graxos com velocidades diferentes, conforme mostram os seguintes exemplos da literatura. Scholz *et al.* (1984) verificaram no fígado em perfusão isolada que, independente da concentração da albumina, o octanoato é sempre oxidado mais rapidamente do que o oleato. Bracht *et al.* (1990) observaram que a extração do [1-¹⁴C]octanoato numa simples passagem pelo fígado é sempre maior que a extração do [1-¹⁴C]palmitato. Constantin *et al.* (1990) observaram que a produção de CO₂ é maior com octanoato quando comparado com palmitato. Em resumo, nas condições celulares, que são certamente bem diferentes das condições nas quais as acil-CoA sintetases são dosadas, os ácidos graxos de cadeia longa são metabolizados mais lentamente do que os de cadeia média. Isto é confirmado pelas medidas de produção de corpos cetônicos a partir de uma série de ácidos graxos saturados com diferentes comprimentos de cadeia. No fígado em perfusão isolada, a capacidade de gerar corpos cetônicos obedece à seguinte sequência em ordem crescente: estearato (18C) < palmitato (16C) ≈ laureato (12C) < decanoato (10C) < miristato (14C) < octanoato (8C) (Constantin, 1989; Constantin *et al.*, 1990). A mesma sequência é obedecida em relação à capacidade de aumentar o consumo de oxigênio, havendo ainda uma correlação linear entre o aumento na produção de corpos cetônicos e o aumento no consumo de oxigênio.

1.3. Hipóteses sobre os fatores que determinam a velocidade de captação metabólica dos ácidos graxos

1.3.1. A teoria tradicional para a captação metabólica de ácidos graxos

As primeiras idéias sobre a captação metabólica dos ácidos graxos pelo fígado e outros tecidos baseavam-se na natureza

lipídica da membrana plasmática. Assumia-se, quase que tacitamente, que os ácidos graxos de cadeia média e longa difundiam livremente através da membrana plasmática. Isto equivale, na terminologia de hoje, a um mecanismo não-mediado que, naturalmente, seria passivo. Era idéia corrente, também, que a velocidade de difusão era proporcional à concentração da forma não-ligada do ácido graxo.

Sabia-se muito bem que a fração do ácido graxo que não está ligada à albumina é em geral muito pequena, principalmente para os ácidos graxos de cadeia longa. Por isto, para manter uma concentração mais ou menos constante da forma não-ligada, a velocidade de dissociação teria que ser bastante elevada, de modo a que houvesse um equilíbrio ou um quase-equilíbrio entre a forma complexada e a forma livre.

De acordo com este raciocínio, o fator limitante da captação metabólica dos ácidos graxos seria a velocidade de difusão através da membrana, a qual, evidentemente, dependeria da concentração da forma não-ligada (Kuhl e Spector, 1970; Soler-Argilaga *et al.*, 1974). De fato, Goresky *et al.* (1978) mostraram que um deslocamento do equilíbrio que favoreça a dissociação do ácido graxo no plasma, aumenta a velocidade de captação metabólica do [1-¹⁴C]palmitato. O trabalho de Goresky *et al.* (1978), porém, demonstrou que a difusão através da membrana celular, se realmente for simples difusão, não pode ser o único fator limitante para a captação metabólica. Isto porque, ainda segundo Goresky *et al.* (1978), a captação metabólica aumenta se houver um deslocamento no equilíbrio da proteína Z que favoreça a forma não-ligada do ácido graxo no espaço celular. A proteína Z é uma proteína ligante de ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas, presente no citoplasma e acessível a partir da superfície interna da membrana plasmática (Trulzsch e Arias,

1981). Essa observação indica que fatores intracelulares também podem, em parte pelo menos, limitar a velocidade de captação metabólica dos ácidos graxos.

1.3.2. Um receptor para o complexo albumina-ácido graxo

A visão tradicional sobre a captação metabólica dos ácidos graxos somente começou a ser questionada na década de 1980. Quase que simultaneamente, **Weisiger et al.** (1981) e **Forker e Luxon** (1981) publicaram os resultados de experimentos que lançaram dúvidas sobre a correção da teoria tradicional.

Weisiger et al. (1981) mediram a captação metabólica de oleato, calculada a partir da diferença porto-venosa no fígado em perfusão isolada. Aumentando a concentração de oleato (até 500 μM) numa concentração fixa de albumina (150 μM) ocorria um aumento na velocidade de captação metabólica, proporcional à concentração do ácido graxo. Variando simultaneamente as concentrações do ácido graxo e da albumina, numa razão molar fixa de 1:1, a velocidade de captação metabólica revelou uma dependência não-linear da concentração de oleato, sugerindo fortemente um fenômeno de saturação. O mesmo fenômeno de saturação aparecia quando as velocidades eram representadas contra a concentração de albumina complexada. Uma análise cinética dos dados em função da concentração da albumina não-complexada foi interpretada pelos autores como um fenômeno de inibição. Utilizando as constantes de velocidade de dissociação do complexo albumina-oleato disponíveis na época, **Weisiger et al.** (1981) concluíram também, que a velocidade de dissociação não-catalisada do complexo era inferior à velocidade de metabolização. E, finalmente, a velocidade de transformação

metabólica correlacionava muito melhor com a concentração total (livre mais ligada) do ácido graxo do que com a concentração da forma não ligada. De fato, sob determinadas condições, a velocidade de captação metabólica aumentava com aumentos na concentração do complexo oleato-albumina, embora a concentração de oleato livre permanecesse constante.

De posse de todos estes dados, **Weisiger et al.** (1981) descartaram a idéia de uma velocidade de captação metabólica limitada pela difusão que, por sua vez, seria proporcional à concentração da forma não-ligada. Em substituição, sugeriram a participação de um receptor para o complexo albumina-ácido graxo, localizado na superfície hepatocelular. A passagem de oleato para o interior do hepatócito seria dependente da ligação do complexo albumina-ácido graxo com o receptor. Este teria a função de catalisar a dissociação do complexo albumina-ácido graxo ou mesmo de catalisar a passagem do ácido graxo através da membrana celular, liberando a albumina para o espaço sinusoidal.

Forker e Luxon (1981) chegaram a conclusões semelhantes. Eles encontraram que o fígado de rato extrai 97% de taurocolato numa única passagem quando o meio de perfusão contém albumina na concentração de 75 μM . O aumento da concentração de albumina para 750 μM provoca uma redução de 50% na captação metabólica do taurocolato, embora a concentração livre desse composto passe a ser cinco vezes menor. Os autores propuseram que a velocidade de captação metabólica não é dependente somente, nem mesmo predominantemente, da concentração plasmática de taurocolato livre (não-ligado) mas, depende também, de uma interação entre a albumina e a superfície dos hepatócitos. O contato entre a albumina e a superfície celular induziria uma alteração na conformação da proteína o que reduziria sua afinidade para com o taurocolato. Isto favoreceria a dissociação do complexo permi-

tindo a entrada de taurocolato livre no hepatócito.

Contrariando a teoria tradicional sobre os fatores e fenômenos que levam à internalização e à metabolização das substâncias lipofílicas ligadas à albumina, os trabalhos destes autores tiveram o grande mérito de mostrar as suas falhas. E embora eles próprios tenham modificado várias vezes as suas teorias no transcorrer dos anos, as suas propostas tiveram ainda o mérito de despertar o interesse geral sobre o assunto, o que, por outro lado, provocou uma avalanche de trabalhos de 1981 para cá.

Uma crítica que se pode fazer aos trabalhos iniciais e subsequentes de Weisiger e seus colaboradores é o fato de terem sempre medido **captação metabólica**, que é um fenômeno complexo, resultante de pelo menos dois eventos: (a) a passagem através da membrana plasmática, e (b) a transformação intracelular. O primeiro é, evidentemente, um processo bidirecional, conforme já havia sido demonstrado por Goresky *et al.* (1978) para o palmitato no fígado de cão. No entanto, as interpretações de Weisiger *et al.* (1981) e de Forker e Luxon (1981) pressupõem sempre, mesmo que de modo implícito, que a passagem através da membrana é fator limitante da captação metabólica, o que equivale a assumir que ela é unidirecional na prática.

1.3.3. As controvérsias sobre a hipótese do receptor para o complexo albumina-ácido graxo

O modelo do receptor para o complexo albumina-ácido graxo, com poderes catalíticos, gerou um número muito grande de trabalhos. Provocou muita controvérsia e também alguma confusão, além de mal-entendidos. De um modo geral, os pesquisadores mediram captação metabólica e assumiram implícita ou

explicitamente que ela era limitada pela passagem através da membrana, *i.e.*, tomaram captação metabólica como um indicador para a permeação. Convém comentar brevemente alguns trabalhos, que demonstram bem o clima frenético gerado pela hipótese do receptor para o complexo albumina-ligante.

A velocidade de captação de [³H]bilirrubina no fígado perfundido de rato é menor quando ligada à albumina do que quando injetada na forma livre (Stollman *et al.*, 1983). Os autores interpretaram isto como evidência de que a albumina não é necessária para facilitar o influxo, metabolismo e excreção da [³H]bilirrubina pelo fígado.

Em ratos mutantes analbuminêmicos (sem albumina no plasma), a captação metabólica da varfarina — um anticoagulante derivado de cumarina — ligada à albumina não apresenta diferenças significativas em fígados de ratos normais e analbuminêmicos (Tsao *et al.*, 1986). Os autores acreditam que em ratos incapazes de sintetizar albumina, a quantidade do hipotético receptor para o complexo albumina-ligante deveria ser mínima. Com base nisto, eles excluem a necessidade de transporte mediado por receptor para a varfarina. O mesmo comportamento ocorreu com o corante sulfobromoftaleína (Inoue *et al.*, 1983). A falha deste raciocínio está em supor que se há um defeito no gene (ou genes) que codifica a albumina, o mesmo deverá necessariamente acontecer com o gene que codifica o hipotético receptor.

Em hepatócitos isolados, Renaud *et al.* (1985) verificaram que a velocidade de captação metabólica do palmitato ligado à albumina é proporcional à concentração de ácidos graxos livres no meio de incubação. A velocidade de captação do ácido graxo livre permanece inalterada quando se adiciona KCN 2 mM ao meio de incubação. Este fenômeno seria independente de energia e em concordância com a teoria convencional de simples difusão de

ácidos graxos através da membrana plasmática.

Forker e Luxon (1983) afirmam que em fígado de rato em perfusão, o aumento da concentração de albumina não complexada no perfusado resulta em cinética competitiva entre a proteína livre e o complexo albumina-rosa bengala por um número limitado de sítios de ligação na membrana do hepatócito. Estes dados apoiariam a idéia de que a albumina livre também se liga à superfície celular, e que a suposta presença desses sítios específicos mediaría a dissociação do complexo albumina-ânion orgânico (Forker *et al.*, 1985). Esta idéia representa, segundo os autores, um modelo alternativo para explicar os fenômenos cinéticos observados na captação do oleato pelo fígado (Weisiger *et al.*, 1981).

Fleischer *et al.* (1986) realizaram experimentos com monocamadas de hepatócitos isolados. Com base nos seus experimentos eles propõem que sítios localizados na superfície dos hepatócitos catalisariam a dissociação do complexo albumina-palmitato, presumivelmente por causarem uma alteração transitória na conformação da albumina. Deste modo, mais ácido graxo livre estaria disponível para uma imediata entrada na célula. Isto ocorreria estritamente na superfície celular, onde a concentração de ácido graxo livre seria maior do que no restante do espaço extracelular.

A captação hepatocelular de oleato e sulfobromoftaleína, ligados à albumina e em diferentes concentrações e razões molares, foi examinada por Nunes *et al.* (1988) usando um sistema de hepatócitos isolados de rato. Os resultados revelaram que as cinéticas de captação de oleato são idênticas àquelas verificadas no fígado de rato em perfusão isolada (Weisiger *et al.*, 1981). A captação de oleato mostra-se saturável com o aumento da concentração de albumina. Em células isoladas em suspensão não há

fluxo (circulação) e os autores acham que as barreiras de difusão ao redor da superfície celular também são eliminadas. Por isto, os autores acreditam que o fenômeno observado está em concordância com a presença de um receptor para a albumina. Os mecanismos relacionados com a captação de ácidos graxos no hepatócito diriam respeito à cinética de interação entre o ácido graxo e a proteína carreadora, sem necessidade de uma arquitetura lobular intacta ou uma barreira de difusão no espaço de Disse.

Segundo Sorrentino *et al.* (1989), em hepatócitos, cardiomiócitos e adipócitos isolados, as cinéticas de captação metabólica de oleato mostram-se consistentes com a teoria tradicional da difusão simples. Os dados demonstram que, em concentrações fisiológicas do complexo albumina-oleato (600 μM de albumina e razão molar 1:2), a velocidade de captação metabólica é uma função saturável da concentração de oleato livre. No entanto, em concentrações não fisiológicas de albumina-oleato (16 μM de albumina e razão molar 1:0,01), as cinéticas de captação metabólica do ácido graxo desviam para um comportamento diferente, e portanto requerem explicações alternativas.

Os autores proponentes da hipótese do receptor para o complexo albumina-ácido graxo fizeram uma comparação da constante de velocidade da dissociação de oleato da albumina bovina *in vitro* (a 37°C) com a velocidade de captação do oleato pelo fígado de rato em perfusão isolada (Weisiger e Ma, 1987). Para as condições *in vitro*, a constante de velocidade para dissociação foi de 0,14 s^{-1} (ver Tabela 1). Ao expressar a velocidade de captação metabólica do oleato no fígado nestas unidades, os autores obtiveram 0,158 s^{-1} . A inexistência de diferenças significativas entre os dados *in vitro* e no fígado perfundido levaram Weisiger e Ma (1987) a sugerirem que a dissociação de oleato do complexo com a albumina não é catalisada, conclusão

contrária às idéias sobre uma catálise da dissociação pelo microambiente ou pela superfície celular, mas sobretudo, contrária às suas próprias idéias sobre a existência de um receptor para catalisar a dissociação do complexo albumina-ácido graxo. De certa forma, com este trabalho, Weisiger e seus colaboradores abandonam a hipótese do receptor para a albumina. Em contrapartida eles propõem que a saturação observada quando a concentração do complexo albumina-oleato é aumentada poderia ser decorrente de mudança da etapa que limita o transporte (da dissociação para o influxo ou metabolismo; Weisiger, 1985). A crítica que se pode fazer a este trabalho de Weisiger e Ma (1987) é que, embora a constante de velocidade de dissociação do complexo albumina-oleato *in vitro* tenha se revelado igual à velocidade de captação metabólica quando esta é expressa nas mesmas unidades, esta última pode não ser igual à velocidade de dissociação. Captação metabólica e dissociação somente serão iguais se não houver reassociação, isto é, se todo o ácido graxo que se dissocia for imediatamente removido de modo irreversível, uma condição improvável para a qual Weisiger e Ma (1987) não tinham prova.

Contrariando Weisiger e Ma (1987), Daniels *et al.* (1985) haviam medido *in vitro* uma constante de velocidade para a dissociação do oleato da albumina bovina bem menor, $0,0396 \text{ s}^{-1}$ a 37°C (ver Tabela 1). Evidentemente, estas discrepâncias geram incertezas quanto à velocidade com que o ácido graxo se dissocia da albumina. Se este valor da constante de velocidade de dissociação estiver correto, então a velocidade de captação metabólica do oleato não pode ser explicada sem os mecanismos de facilitação da dissociação.

Que uma cinética de saturação ou pseudo-saturação pode ser produzida por outros fenômenos que não a ligação a proteínas

presentes em quantidades limitadas (receptores ou carreadores, por exemplo), já havia sido demonstrado por Weisiger (1985) no caso da limitação da captação metabólica pela dissociação do complexo com a albumina, conforme mencionado acima. Bass e Pond (1987) acrescentaram mais um fenômeno que, teoricamente, poderia gerar uma cinética de pseudo-saturação. Trata-se da difusão através de uma camada não-agitada (*unstirred layer*) que muitos autores supõem existir junto à membrana plasmática. Após um complexo tratamento teórico os autores fizeram várias simulações do comportamento do oleato no fígado em perfusão. Essas simulações realmente produziram curvas teóricas muito próximas das curvas experimentais de captação metabólica do oleato, não porém, no caso da sulfobromoftaleína. Bass e Pond (1987) assumiram que a passagem através da membrana é estritamente limitante para o metabolismo, o que muito provavelmente é um equívoco. Além disto, nos seus cálculos, a camada não-agitada foi tomada como tendo 1 micron (10^{-3} cm), o que é mais ou menos todo o sinusóide, algo bastante questionável.

Resumindo o que foi visto nesta pequena revisão da literatura nos parágrafos anteriores, uma hipotética facilitação da dissociação poderia ocorrer por diversos mecanismos: (1) um receptor para o complexo albumina-ácido graxo; (2) uma dissociação mediada pela superfície celular; e, (3) uma dissociação facilitada pelo microambiente da superfície celular (por exemplo, pH diferente na superfície da célula). Até o momento não há nenhuma prova conclusiva de que algum destes fenômenos esteja realmente ocorrendo. Na verdade, alguns parecem

bastante improváveis.

1.3.4. Uma proteína que liga especificamente ácidos graxos de cadeia longa

A demonstração de sítios de ligação específicos para ácidos graxos livres na superfície das células hepáticas, resultou em prejuízo para o modelo do receptor para o complexo albumina-ácido graxo. Estes sítios de ligação na membrana seriam de natureza proteica, segundo *Stremmel et al.* (1985), que isolaram uma proteína da membrana plasmática de hepatócitos, capaz de ligar ácidos graxos. A existência desta proteína levou à idéia de um sistema de transporte específico para ácidos graxos livres. A proteína purificada tem peso molecular de 40 kDaltons e sua especificidade foi demonstrada para os ácidos palmítico, oleico, araquidônico e linolêico. Ao contrário da albumina, essa proteína não tem afinidade por sulfobromoftaleína, taurocolato e bilirrubina. A ligação de [³H]oleato à proteína isolada mostrou-se saturável pelo excesso de oleato não marcado e foi revertida pela albumina. Numa suspensão de hepatócitos, a captação do ácido graxo é proporcional à concentração da proteína.

Em experimentos com suspensões de hepatócitos, a concentração das células pode ser muito pequena, a ponto da velocidade de influxo de [³H]oleato ser 100 vezes menor que a dissociação do complexo albumina-ácido graxo (*Stremmel*, 1987), isto calculando-se a velocidade de dissociação com a constante de velocidade determinada por *Svenson et al.* (1974) para o palmitato (ver Tabela 1). O influxo mostra cinética de saturação com K_m aparente de $8,3 \cdot 10^{-8}$ M e V_{max} de $197 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (5 \cdot 10^4 \text{ células})^{-1}$, quando representada contra a concentração livre de oleato. Segundo *Stremmel* (1987) o influxo de oleato mostra-se

dependente de energia, uma vez que o 2,4 dinitrofenol e o KCN têm ação inibidora, ao mesmo tempo em que os níveis de ATP são diminuídos. O influxo de oleato não foi afetado pela presença de outras substâncias aniônicas que se ligam à albumina, tais como sulfobromoftaleína, o ácido cólico e o ácido taurocólico (Stremmel e Theilmann, 1986).

O tratamento de uma cultura de hepatócitos com um anticorpo de coelho preparado contra a proteína isolada, reduz em 65% o influxo de oleato. Este mesmo anticorpo não tem efeito sobre a velocidade de influxo de outras substâncias ligadas à albumina. Estas observações apoiam a hipótese de que o influxo de ácidos graxos de cadeia longa é mediado por uma proteína da membrana celular (Stremmel *et al.*, 1986).

Em apoio à hipótese do grupo de Stremmel há também os dados de Bracht *et al.* (1988) acerca da inibição do influxo de palmitato pelo steviosídeo, um glicosídeo que não permeia a membrana celular com velocidade apreciável. Sistemas de transporte são sempre passíveis de inibição e a existência de inibidores específicos tem sido encarada como uma indicação de sua existência. O steviosídeo de fato inibe o influxo e também o metabolismo do palmitato e de outros ácidos graxos, conforme verificado por Constantin *et al.* (1991). O efeito é reversível. O steviosídeo inibe também o transporte de hexoses no fígado (Ishii *et al.*, 1987), sendo interessante observar que Abumrad *et al.* (1981) observaram uma inibição do influxo de palmitato em adipócitos pela floretina, outra substância que também inibe o transporte de hexoses no fígado. Aliás, em adipócitos, Abumrad *et al.* (1981) concluíram que o transporte de palmitato ocorre em parte por difusão e em parte por um mecanismo mediado. O próprio Stremmel (1988) tem investigado outros tipos de células além dos hepatócitos e os resultados de seus experimentos com cardio-

miócitos também foram interpretados como evidência a favor de um processo de transporte mediado por carreador.

1.3.5. As propriedades físico-químicas e a captação metabólica dos ácidos graxos

Idéias diametralmente opostas às do grupo de Stremmel foram defendidas por Noy *et al.* (1986). Esses autores propõem que a captação metabólica de ácidos graxos pelo fígado procede espontaneamente e é determinada pelas propriedades físico-químicas dos ácidos graxos, da albumina e dos lipídeos da membrana plasmática, sem que haja participação de uma proteína da membrana.

Esses autores calcularam, baseados em parâmetros experimentais e teóricos, as velocidades espontâneas das várias etapas que eles supõem precederem a transformação irreversível dos ácidos graxos em acil-CoA: a dissociação do ácido graxo da albumina no plasma, a passagem através da membrana plasmática com a movimentação através da bicamada lipídica, a entrada no citossol e a difusão até o estoque metabólico. Com base nos seus cálculos os autores concluíram que: (1) a velocidade de captação metabólica dos ácidos graxos pelo fígado em perfusão isolada não é determinada por fatores cinéticos e sim pelo coeficiente de distribuição dos ácidos graxos entre a albumina, no plasma, e os fosfolipídeos, na membrana plasmática; (2) há uma relação entre este coeficiente e a velocidade de captação metabólica de palmitato no fígado de rato em perfusão; e, (3) os dados cinéticos de Weisiger *et al.* (1981) para a captação metabólica de oleato são compatíveis com a idéia de que a velocidade é determinada pela afinidade do ácido graxo para com a albumina e a membrana plasmática. Os autores consideraram a captação dos

ácidos graxos pelo fígado como um processo "físico-químico" (*a physical-chemical model*) e não biológico.

Uma extensão lógica de um postulado deste tipo é a idéia de que teores de estoques intracelulares podem ser determinados através de velocidades de captação e dados termodinâmicos (Cooper *et al.*, 1987). De fato, há uma razoável concordância entre as concentrações de palmitato na membrana plasmática, mitocôndrias, microssomos e citossol medidas experimentalmente e os teores calculados. Baseados em seus dados os autores concluíram que o fator limitante para o metabolismo do palmitato no fígado é a difusão, não se excluindo também uma participação das proteínas ligantes intracelulares (proteína Z ou a proteína ligante de ácidos graxos) nos fluxos do ácido graxo através do citossol.

Dentro desta mesma linha de raciocínio, Cooper *et al.* (1987) examinaram também a interação entre ácidos graxos (palmitato e oleato) e a membrana plasmática de hepatócitos. Os autores alegam que não conseguiram reproduzir os dados obtidos por Stremmel *et al.* (1985) que haviam detectado uma capacidade da membrana plasmática de ligar o [³H]oleato. Com base em seus dados, Cooper *et al.* (1987) concluíram que não há evidências indicando a ligação de [³H]oleato a um sítio específico presente na membrana plasmática do hepatócito. Assim, a avidéz da membrana plasmática pelos ácidos graxos seria uma simples consequência das propriedades físico-químicas do oleato, lipídeos e água. Isto excluiria a idéia de que o influxo e posterior transformação metabólica dos ácidos graxos seriam resultantes de ligação com proteínas ou de catálise na interface membrana-água ou dentro do

plano da membrana plasmática.

1.3.6. Medidas de fluxos unidirecionais de ácidos graxos no fígado inteiro

Já foi mencionado acima que, no fígado em perfusão, a maior parte dos pesquisadores têm medido uma velocidade de captação metabólica em condições de estado estacionário, que é simplesmente a diferença de concentração entre a veia porta e a veia hepática multiplicada pelo fluxo e em geral ainda relacionada ao peso úmido do fígado ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, por exemplo). Este parâmetro, evidentemente, será igual à velocidade com que uma substância permeia a membrana celular apenas se o transporte for estritamente limitante para o metabolismo, isto é, se o influxo em condições de estado estacionário for igual à captação metabólica, sendo que esta última corresponde ao fluxo líquido. Esta condição implica num valor nulo para a velocidade de efluxo, a saída da substância da célula.

Não deixa de ser um pouco surpreendente que a captação líquida tenha sido utilizada como indicador do transporte em tantos trabalhos, quando se sabe que Goresky *et al.* (1978) já haviam mostrado que, para o palmitato, o efluxo era significativo, ao menos no fígado de cães anestesiados, praticamente nas condições *in vivo*, portanto. Talvez a complexidade da análise dos experimentos realizados por Goresky *et al.* (1978) seja um dos motivos pelos quais a maioria dos autores tenha preferido simples medidas de diferenças porto-venosas. Os resultados de Goresky *et al.* (1978), no que concerne ao palmitato, sugerem que a passagem através da membrana não é o único fator limitante para a captação metabólica, mas que o sistema enzimático intracelular também tem influência.

A técnica utilizada por Goresky *et al.* (1978) para estudar o transporte e o metabolismo de palmitato no fígado foi a técnica da diluição de indicadores múltiplos. Nesta técnica, vários traçadores são injetados simultaneamente na veia porta e o sangue (ou perfusado) efluente é fracionado em microfrações (0,5 segundo, por exemplo). Em geral são injetados três traçadores marcados com isótopos diferentes: a substância a ser estudada, uma referência para o espaço extracelular e a água triciada, esta última como referência para o espaço aquoso total. Uma análise matemática permite obter as constantes de velocidade para influxo, efluxo e a transformação metabólica em condições de estado estacionário (ver adiante *Bases matemáticas da análise de experimentos de diluição de indicadores*). Esta técnica tem sido utilizada com êxito no estudo do transporte e metabolismo de várias substâncias hidrofílicas (Bracht *et al.*, 1981; Ishii *et al.*, 1987) e lipofílicas (Goresky *et al.*, 1978; Bracht *et al.*, 1990; Ferraresi-Filho *et al.*, 1992; Kelmer-Bracht *et al.*, 1993).

Ferraresi-Filho *et al.* (1992) mediram os fluxos unidirecionais e a transformação metabólica do palmitato no fígado de rato em perfusão isolada. O estudo de Goresky *et al.* (1978) não permitiu o cálculo dos fluxos unidirecionais, pois o palmitato marcado foi injetado como traçador nas condições *in vivo*, onde há uma mistura circulante de ácidos graxos, sendo que a concentração de palmitato não pôde ser determinada. Resumidamente, os resultados obtidos por Ferraresi-Filho *et al.* (1992) são os seguintes: (1) o influxo e a captação metabólica de palmitato não variam proporcionalmente um em relação ao outro quando as concentrações da albumina e do palmitato são variadas; (2) o efluxo de palmitato é significativo para todas as concentrações de albumina na faixa entre 1,5 a 500 μM ; (3) com albumina 150 μM , as velocidades de captação metabólica são proporcionais à

concentração extracelular total (livre mais ligada) na faixa até 500 μM ; a dependência do influxo da concentração de palmitato é parabólica; (4) quando as concentrações da albumina e do palmitato são variadas simultaneamente numa razão equimolar, ocorre uma pseudo-saturação tanto no influxo como na captação metabólica; as velocidades de influxo, no entanto tendem a diminuir novamente em altas concentrações; (5) como seria de se esperar, a concentração intracelular de palmitato depende da albumina; em concentrações muito baixas da proteína (1,5 μM) a concentração intracelular é praticamente igual à extracelular; em concentrações fisiológicas de albumina, no entanto, a concentração intracelular é menos de 2% da concentração extracelular; (6) as velocidades de captação metabólica são aproximadamente proporcionais à concentração intracelular, não havendo portanto saturação; (7) a relação entre o influxo e a concentração de palmitato livre (não-ligado), supondo condições de equilíbrio, não é independente da concentração da albumina, embora para certas condições haja uma cinética de saturação. No que tange à captação metabólica, esses resultados são semelhantes aos obtidos por Weisiger *et al.* (1981) com oleato. Porém, quando se examina os dados de influxo e suas relações com a captação metabólica, fica claro que o uso de velocidades de captação metabólica para estudar fenômenos de transporte é totalmente desaconselhável, podendo levar a conclusões errôneas, já que a cinética dos dois processos pode ser completamente diferente.

Há dados preliminares, também, sobre os fluxos unidirecionais e a captação metabólica do octanoato (Bracht *et al.*, 1990). Ao que tudo indica, o octanoato passa através da membrana plasmática com velocidade maior que o palmitato ou pelo menos tem acesso mais rápido à camada fosfolipídica da membrana. A sua

metabolização é também mais rápida. Os dados preliminares sugerem que a metabolização mais rápida do octanoato em relação ao palmitato se deve à maior velocidade de acesso aos sistemas enzimáticos e à maior concentração intracelular (Bracht *et al.*, 1990).

1.3.7. Análise crítica das hipóteses sobre os mecanismos de captação metabólica dos ácidos graxos

Analisando os trabalhos da última década sobre o problema da captação metabólica de ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas pelo fígado é inevitável a conclusão de que a quantidade de problemas levantados e de fatos mal explicados suplanta consideravelmente a quantidade de soluções efetivamente encontradas. Nada para lamentar, pois assim o campo é fértil para a investigação.

Por um lado, há a discussão sobre se a dissociação do complexo albumina-ácido graxo é facilitada (ou catalisada) ou se a velocidade com que ela ocorre espontaneamente é suficiente. Esta é uma dúvida que irá persistir até que se conheça com precisão tanto a velocidade de dissociação nas condições *in vitro* como aquela no interior dos sinusóides (capilares do fígado). Como mostra a Tabela 1, os valores das constantes de velocidade para a dissociação dos complexos albumina-ácidos graxos, encontrados por vários pesquisadores, apresentam diferenças ponderáveis. Indispensável também é conhecer a velocidade de influxo na célula e não apenas a velocidade de metabolização. Enquanto estas indagações não forem totalmente respondidas, a questão da dissociação facilitada ou espontânea ainda não terá uma resposta definitiva.

Superpondo-se à questão da dissociação dos complexos está a

questão da passagem através da membrana, que também poderia ser catalisada por um sistema de transporte, ou depender exclusivamente das propriedades físico-químicas das substâncias e estruturas envolvidas. Em vista dos argumentos das duas partes, é forçoso dizer que esta questão também ainda não foi definitivamente resolvida, embora os dados disponíveis tendam a favorecer a hipótese de carreador.

A cinética de saturação observada por Ferraresi-Filho *et al.* (1992), bem como a inibição do influxo de palmitato pelo steviosídeo (Bracht *et al.*, 1988) são dados que apoiam a hipótese do grupo de Stremmel (Stremmel e Theilmann, 1986; Stremmel *et al.*, 1986) sobre a existência de um carreador para ácidos graxos de cadeia longa. No entanto, no fígado em perfusão, não há uma correlação incondicional entre a concentração extracelular livre de palmitato, calculada supondo condições de equilíbrio, e o influxo, como encontrado por Stremmel (1987) em hepatócitos e Abumrad *et al.* (1981) em adipócitos. Isto pode ter várias causas, sendo que duas devem ser ressaltadas: (a) a concentração livre de equilíbrio pode não ser sempre uma boa estimativa para a verdadeira concentração livre de palmitato ao longo dos sinusóides; e, (b) se houver participação de um carreador, efeitos trans, *i.e.*, trans-aceleração ou trans-inibição dos fluxos unidirecionais através da membrana podem ocorrer, causados pela presença de soluto no lado oposto da membrana (Silverman e Goresky, 1965; Lieb, 1982). Nos dois casos uma hipotética curva de saturação Michaeliana seria distorcida.

1.4. Diferenças entre o octanoato e os ácidos graxos de cadeia longa: uma hipótese de trabalho

Nos trabalhos que têm sido feitos até agora com os ligantes

da albumina, os ácidos graxos de cadeia longa têm merecido a preferência. Quantitativamente eles são de fato mais importantes. Já foi mencionado nesta *Introdução*, no entanto, que o octanoato, um ácido graxo de cadeia média, é metabolizado mais rapidamente e presumivelmente também tem acesso mais rápido ao espaço intracelular. Além disto, sempre está presente na circulação mesmo que em menores concentrações na maioria das vezes. A sua concentração pode, no entanto, aumentar muito no caso de certas dietas. Despertam muito a atenção, por outro lado, as diferenças entre o octanoato e os ácidos graxos de cadeia longa no tocante aos parâmetros físico-químicos de suas interações com a albumina. As Tabelas 1 e 2 permitem avaliar quantitativamente estas diferenças. A Tabela 1, à qual já foi feita alguma referência nos itens anteriores, relaciona as constantes de velocidade de dissociação (k_{d1ee} , com a dimensão segundo^{-1}) dos complexos equimolares albumina-ácidos graxos disponíveis na literatura especializada. A Tabela 2, relaciona as constantes de dissociação dos diversos complexos albumina-ácido graxo para o octanoato, oleato, palmitato e o ácido niflúmico, um ácido carboxílico com cadeias aromáticas.

Os valores de k_{d1ee} na Tabela 1 referem-se à dissociação do primeiro complexo, aquele formado pela ligação no sítio de maior afinidade (menor valor da constante de dissociação). Diferentes autores mediram valores de k_{d1ee} a diferentes temperaturas e com albuminas de diferentes espécies (bovina ou humana), e sobretudo, utilizando diferentes aceptores do ácido graxo dissociado. Interessa particularmente a constante de velocidade para a transferência a fosfolipídeos (foi usada a dimiristoil-fosfatidil-colina). Conforme mostra a Tabela 1, a 37°C , os valores de k_{d1ee} para transferência a fosfolipídeos para os ácidos graxos de cadeia longa são relativamente pequenos. A

Tabela 1

Constantes de velocidade de dissociação do complexo albumina-ácido graxo para diversos ácidos graxos sob diversas condições. Estão relacionadas as constantes de dissociação dos complexos albumina-ácido graxo coletadas na literatura. O "acceptor" refere-se à substância ou meio utilizado para fixar o ácido graxo dissociado. *Lipidex* é marca registrada para um hidróxi-alcóxi-propil-dextrano, onde a cadeia alcóxi tem em média 15 carbonos.

Temperatura	Aceptor utilizado	Origem da albumina	Octanoato	Decanoato	Miristato	Palmitato	Estearato	Oleato
°C					k _{diss} (segundo ⁻¹)			
25	Albumina-agarose	Humana	-	-	-	0,042 ^a	-	-
30	Dimiristoil-fosfatidilcolina	Bovina	-	-	0,098 ^b	0,0186 ^b	0,0069 ^b	0,02 ^b
33	Dimiristoil-fosfatidilcolina	Bovina	354 ^c	20 ^c	-	-	-	-
37	Dimiristoil-fosfatidilcolina	Bovina	-	-	0,120 ^b	0,036 ^b	0,0098 ^b	0,0396 ^b
	Albumina-agarose	Bovina	-	-	-	-	-	0,142 ^d
	<i>Lipidex</i>	Bovina	-	-	-	-	-	0,140 ^d
	Albumina-agarose	Humana	-	-	-	0,120 ^a	-	-
42	Dimiristoil-fosfatidilcolina	Bovina	1410 ^c	64 ^c	-	-	-	-

^aSvenson *et al.* (1974).

^bDaniels *et al.* (1985).

^cHamilton (1989).

^dWeisiger e Ma (1987).

Tabela 2

Comparação das constantes de equilíbrio para a ligação do niflumato e vários ácidos graxos de cadeia média e longa à albumina de soro bovino. As constantes foram ordenadas em ordem crescente de afinidade dos sítios de ligação. Todas elas foram medidas a 37°C, em meio salino e a pH 7,4.

Constante	Niflumato ^a	Octanoato ^b	Palmitato ^c	Oleato ^c
	M			
K _{a1}	2,82 · 10 ⁻⁶	2,94 · 10 ⁻⁵	3,00 · 10 ⁻⁸	6,10 · 10 ⁻⁸
K _{a2}	1,69 · 10 ⁻⁵	1,03 · 10 ⁻⁴	1,33 · 10 ⁻⁷	3,38 · 10 ⁻⁷
K _{a3}	1,79 · 10 ⁻⁵	2,22 · 10 ⁻⁴	2,72 · 10 ⁻⁷	5,65 · 10 ⁻⁷
K _{a4}	2,28 · 10 ⁻⁵	6,25 · 10 ⁻⁴	8,15 · 10 ⁻⁷	2,89 · 10 ⁻⁶
K _{a5}	8,76 · 10 ⁻⁵	7,14 · 10 ⁻⁴	1,81 · 10 ⁻⁶	4,74 · 10 ⁻⁶
K _{a6}	9,82 · 10 ⁻⁵	8,62 · 10 ⁻⁴	1,89 · 10 ⁻⁶	2,30 · 10 ⁻⁵
K _{a7}	4,98 · 10 ⁻³	1,36 · 10 ⁻³	8,64 · 10 ⁻⁶	2,34 · 10 ⁻⁵
K _{a8}	4,98 · 10 ⁻³	2,27 · 10 ⁻³	4,05 · 10 ⁻⁵	3,06 · 10 ⁻⁵
K _{a9}	4,98 · 10 ⁻³	6,06 · 10 ⁻³	-	4,31 · 10 ⁻⁵

^aKelmer-Bracht *et al.* (1990).

^bAshbrook *et al.* (1972).

^cSpector *et al.* (1971).

julgar pelos valores obtidos com oleato para a transferência a outros aceptores, a transferência a fosfolipídeos é mais lenta do que para outros aceptores como a própria albumina presa à agarose ou ao material sintético *Lipidex*. O valor da constante de velocidade para a dissociação aumenta quando diminui o tamanho da cadeia. A k_{diss} para o palmitato a 37°C é quatro vezes maior que a k_{diss} do estearato; e, por sua vez, a k_{diss} do miristato supera em quatro vezes a do palmitato. Infelizmente não existem medidas para o decanoato e o octanoato a 37°C, mas apenas a 33 e a 42°C. No entanto, os valores de k_{diss} para estes dois ácidos graxos são tão superiores aos de cadeia mais longa — e também diferem tão acentuadamente entre si — que se pode raciocinar em termos de um hipotético valor médio entre 33 e 42°C. Atribuindo-se um peso 20% menor ao valor medido a 42°C por causa de sua maior distância dos 37°C, obtém-se para o octanoato k_{diss} igual a 741 segundo⁻¹ e para o decanoato 35,6 segundo⁻¹. Esses valores são muito maiores que para os ácidos graxos de cadeia longa. Em relação ao palmitato e ao oleato, o octanoato passa da albumina para os fosfolipídeos cerca de 20000 vezes mais rapidamente, uma diferença de quatro ordens de grandeza. No tocante à velocidade de dissociação, a diferença entre o octanoato e o palmitato ou oleato é maior do que em relação às constantes de dissociação. Conforme revela a Tabela 2, a diferença neste caso se mantém em três ordens de grandeza. A afinidade da albumina pelo octanoato chega a ser um pouco menor do que a afinidade pelo ácido niflúmico. De qualquer forma, pode-se afirmar que os valores de k_{diss} da Tabela 1 e das constantes de equilíbrio da Tabela 2 para octanoato, palmitato e oleato são compatíveis.

Com uma constante de velocidade para entrada em fases fosfolipídicas de 741 s⁻¹, o acesso do octanoato ao interior da célula deveria ser da mesma ordem de grandeza, fato já ressaltado

por Hamilton (1989). Em outros termos, no fígado perfundido, a sua distribuição deveria ser limitada apenas pelo fluxo a qualquer concentração de albumina, a exemplo do que ocorre com o ácido niflúmico (Kelmer-Bracht *et al.*, 1993). Não é o que ocorre, no entanto, conforme revelado pelos experimentos de diluição de indicadores múltiplos realizados por Bracht *et al.* (1990). Neste estudo, as curvas de diluição do octanoato com altas concentrações de albumina se assemelham bastante às do palmitato, cuja distribuição no espaço celular não é limitada pelo fluxo. Uma hipótese que talvez concilie os dados físico-químicos com a realidade biológica seria que o octanoato tem acesso muito rápido à membrana plasmática e suas adjacências, mas não ao restante da célula. Neste caso a sua distribuição nesta fina camada seria limitada pelo fluxo. O acesso para o interior da célula, onde efetivamente ocorre a metabolização, poderia ser mais lento. A detecção de um estoque (*pool*) de octanoato na membrana plasmática e adjacências irá depender do tamanho deste estoque, isto é, da quantidade de octanoato efetivamente localizada nesse local da célula. Se a quantidade for muito pequena ela não poderá ser detectada. Esta questão, no entanto, somente poderá ser respondida com base em dados experimentais.

Trabalhar com uma hipótese deste tipo equivale também a assumir o ônus de desenvolver o tratamento matemático indispensável para a análise dos experimentos. Sem este tratamento matemático será impossível obter os parâmetros necessários. Embutidos nas fórmulas estarão, não apenas os parâmetros referentes à entrada na membrana celular, mas também parâmetros de entrada no restante da célula e parâmetros de metabolização. O tratamento, portanto, deverá permitir a obtenção de um quadro mais ou menos completo sobre o metabolismo e a distribuição do octanoato no fígado.

1.5. Os objetivos deste trabalho

Em vista do que foi exposto acima com relação ao octanoato, os objetivos deste trabalho seriam, portanto, os seguintes:

1. Desenvolver um tratamento matemático, baseado no modelo de Goresky (Goresky *et al.*, 1970), para a descrição adequada do comportamento do octanoato no fígado, analisando inclusive situações-limite, casos especiais e formulando critérios de diferenciação;

2. Obter curvas experimentais de diluição com [1-¹⁴C]octanoato e indicadores adequados no fígado em perfusão isolada;

3. Ajustar as equações desenvolvidas às curvas experimentais, utilizando procedimentos de otimização de parâmetros;

4. Analisar os parâmetros otimizados e calcular, com eles, tamanhos de estoques (*pools*) e velocidades de metabolização e de passagem de um compartimento para outro;

5. Comparar os parâmetros do octanoato com os de ácidos graxos de cadeia longa, principalmente palmitato.

2. BASES MATEMÁTICAS DA ANÁLISE DE EXPERIMENTOS DE DILUIÇÃO DE INDICADORES

Somente uma análise matemática das curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato permitirá extrair as informações que elas encerram. Para realizar esta análise matemática, por outro lado, é indispensável definir os parâmetros com clareza e desenvolver o formulário pertinente. É exatamente isto que se pretende nesta secção. A análise pretende ser bastante completa, e deverá servir de base não apenas para este estudo, mas também para estudos futuros com outras substâncias de comportamento igualmente complexo.

2.1. O fígado: generalidades sobre a microcirculação

O fígado é um órgão com intensa atividade metabólica, o que torna necessário um eficiente sistema microcirculatório, seja para supri-lo de oxigênio, seja para fornecer os substratos e hormônios necessários. A unidade estrutural do órgão é o lóbulo hepático. Ele é composto por um sistema contínuo de lâminas anastomóticas de células parenquimatosas que perfazem 92,5% do volume celular total do órgão. Estas células agrupam-se em lâminas separadas pelos sinusóides (capilares), circundados pelo espaço de Disse. A Figura 1 mostra esquematicamente estas relações.

Em termos de circulação, o fígado tem aporte duplo: a artéria hepática, que supre o fígado com cerca de 25% do sangue e a veia porta, que traz os 75% restantes. Antes de atingir o fígado, o sangue da veia porta já passou pelos leitos capilares do trato

alimentar, do baço, do pâncreas e, por conseguinte, é rico em hormônios e substâncias nutritivas. É relativamente pobre, no entanto, em oxigênio, sendo que a artéria hepática, que conduz sangue arterial, tem papel importante na oxigenação.

A circulação portal hepática ocorre pelos seguintes caminhos: (1) pelos ramos da veia porta, que se ramificam várias vezes formando os vasos interlobulares; (2) pelas veias interlobulares, das quais partem ramos que se dirigem aos lóbulos, onde se subdividem transformando-se em sinusóides, e (3) pelos sinusóides, que se dirigem radialmente para o centro do lóbulo terminando na veia centrolobular. A medida que caminha ao longo do lóbulo, esta veia recebe sinusóides de todos os lados, aumentando de calibre e terminando na base do lóbulo em veias mais calibrosas (intercalares). Estas se fundem constituindo as grandes veias que se abrem para a veia cava inferior. A artéria hepática, por sua vez, ramifica-se em arteríolas que acabam desembocando nos sinusóides. Uma certa fração destas arteríolas banha as células do plexo biliar antes de atingir os sinusóides. No rato, a região do sinusóide onde as arteríolas confluem varia: uma certa fração converge com os sinusóides logo no início; e outra fração um pouco além, de modo que nem todas as células do parênquima hepático recebem sangue arterial.

Os sinusóides ou capilares hepáticos, têm como característica fundamental o fato de possuírem paredes revestidas pelas células endoteliais que apresentam grande número de fenestrações (ver Figura 1). Estas fenestrações permitem a passagem de macromoléculas, porém não de eritrócitos. Esta livre passagem torna mais fácil o intercâmbio de substâncias entre o sangue e os tecidos. No espaço de Disse, a membrana celular torna-se uma barreira tanto para as macromoléculas como também para moléculas pequenas.

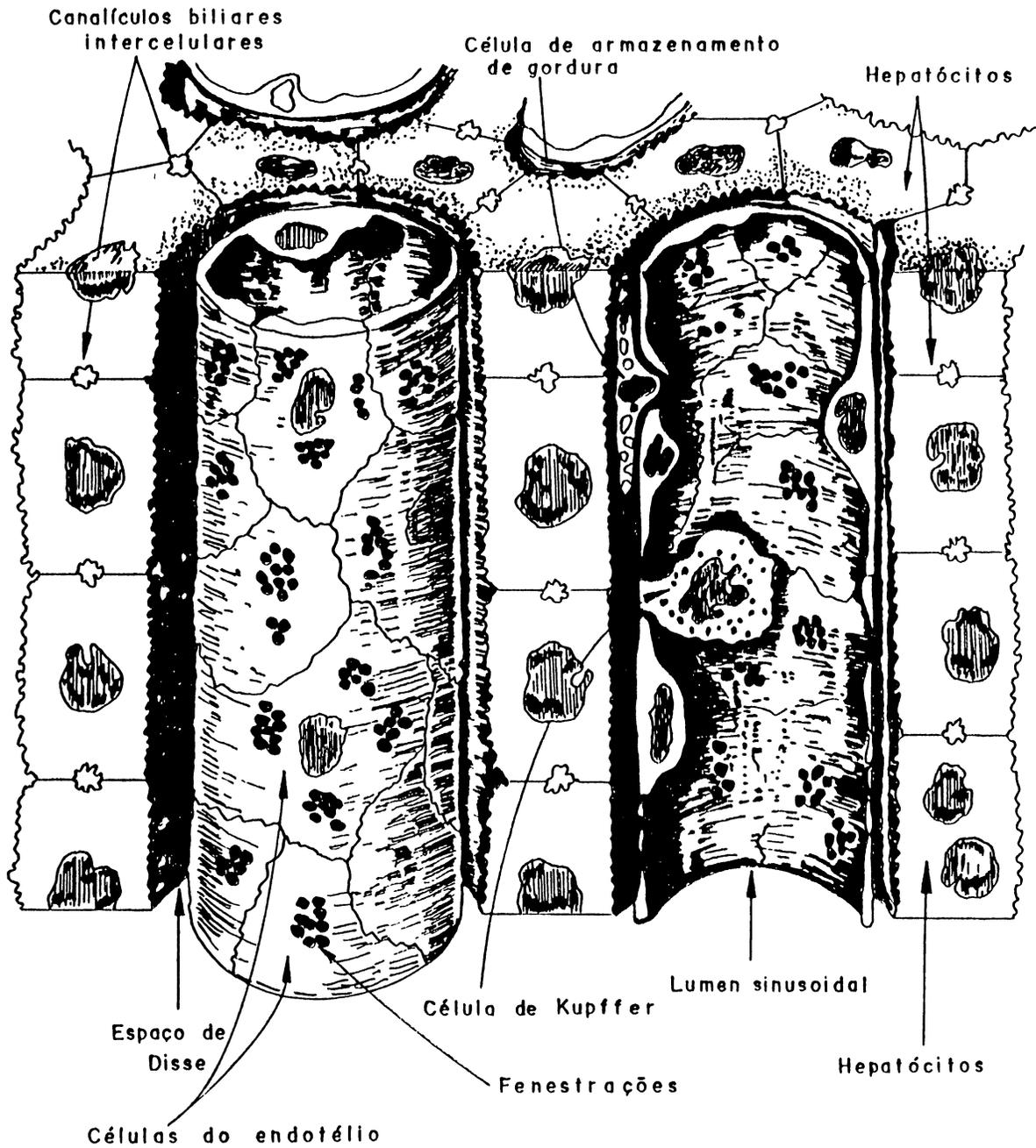


Figura 1. *As células hepáticas e suas adjacências.* Representação tridimensional semi-esquemática de um agrupamento de hepatócitos e sinusóides com o correspondente espaço de Disse. Note-se as células do endotélio com as fenestrações e os canálculos biliares intercelulares. O sinusóide da direita está desenhado em corte para mostrar o lúmen onde se vê uma célula de Kupffer. Peri-sinusoidalmente pode-se ver também uma célula de armazenamento de gordura. Modificado a partir de um original de Elias (1955).

2.2. Mecanismos de dois estoques celulares

2.2.1. Aspectos gerais e definições

Num órgão inteiro, medidas simultâneas dos fluxos unidirecionais de substâncias através da membrana celular e do metabolismo intracelular podem ser feitas através da técnica da diluição de indicadores múltiplos, associada a uma análise baseada em modelos matemáticos (Goresky *et al.*, 1973). Esta técnica — conforme já mencionado na *Introdução* — consiste na injeção simultânea de vários traçadores no vaso de entrada no órgão (veia porta, por exemplo) seguida de um fracionamento do sangue ou perfusado efluente. As curvas de diluição obtidas desta maneira refletem os eventos a que o traçador esteve submetido no interior do órgão. Esta técnica tem sido usada com sucesso para o estudo simultâneo do transporte e metabolismo da galactose no fígado de cão (Goresky *et al.*, 1973), do palmitato no fígado de cão (Goresky *et al.*, 1978) e no fígado de rato (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992), do lactato no fígado de rato (Bracht *et al.*, 1980), da glicose no fígado de rato (Ishii *et al.*, 1987), do ácido niflúmico no fígado de rato (Kelmer-Bracht *et al.*, 1993) e de vários outros.

O modelo matemático a ser adotado deve considerar o movimento ao longo do sinusóide (*i.e.*, o fluxo), a passagem através da membrana celular, a metabolização no espaço celular e, também, uma eventual compartimentalização intracelular. Isto porque a substância em estudo pode distribuir-se em mais de um compartimento ou estoque intracelular. A Figura 2 mostra, esquematicamente, o comportamento hipotético de um traçador no fígado, submetido a eventos relativamente complexos. O espaço extracelular (espaço sinusoidal + espaço de Disse) é representado

por V_e . O espaço intracelular está representado por V_i . O fluxo está restrito ao espaço extracelular. Intracelularmente, o traçador pode se distribuir em dois estoques ou compartimentos. Em cada um dos compartimentos, o traçador se apresenta em duas formas: livre e ligada. Como não é possível distinguir as formas livre e ligada, as constantes de velocidade para os diversos processos (k_1 e k_2 para a troca com o espaço celular; k_3 e k_4 para entrada e saída do segundo estoque, respectivamente) são, na verdade, constantes compostas, funções das frações livres do traçador em cada um dos compartimentos (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992). O mesmo ocorre com as constantes de velocidade, k_5 e k_6 , para a metabolização irreversível em cada um dos estoques. Além disto, as constantes de velocidade para permeação, k_1 , k_2 , k_3 e k_4 , podem ainda ser funções das constantes cinéticas dos sistemas de transporte, caso eles existam (Goresky *et al.*, 1973). Se os experimentos forem feitos em condições de estado estacionário não isotópico (apenas o traçador não está em estado estacionário; Bracht *et al.*, 1980), as constantes poderão ainda ser função das concentrações das formas não-marcadas. No que tange às constantes de velocidade para a metabolização, k_5 e k_6 , devem também ser funções das constantes cinéticas dos sistemas enzimáticos envolvidos e das concentrações das formas não-marcadas.

2.2.2. Descrição matemática do comportamento de um traçador ao longo de um sinusóide

Convém tentar descrever inicialmente os eventos ao longo de um único sinusóide, para depois integrar as respostas de todos os sinusóides e obter, assim, a resposta do órgão inteiro (Goresky *et al.*, 1970).

Para descrever matematicamente os eventos esquematizados na

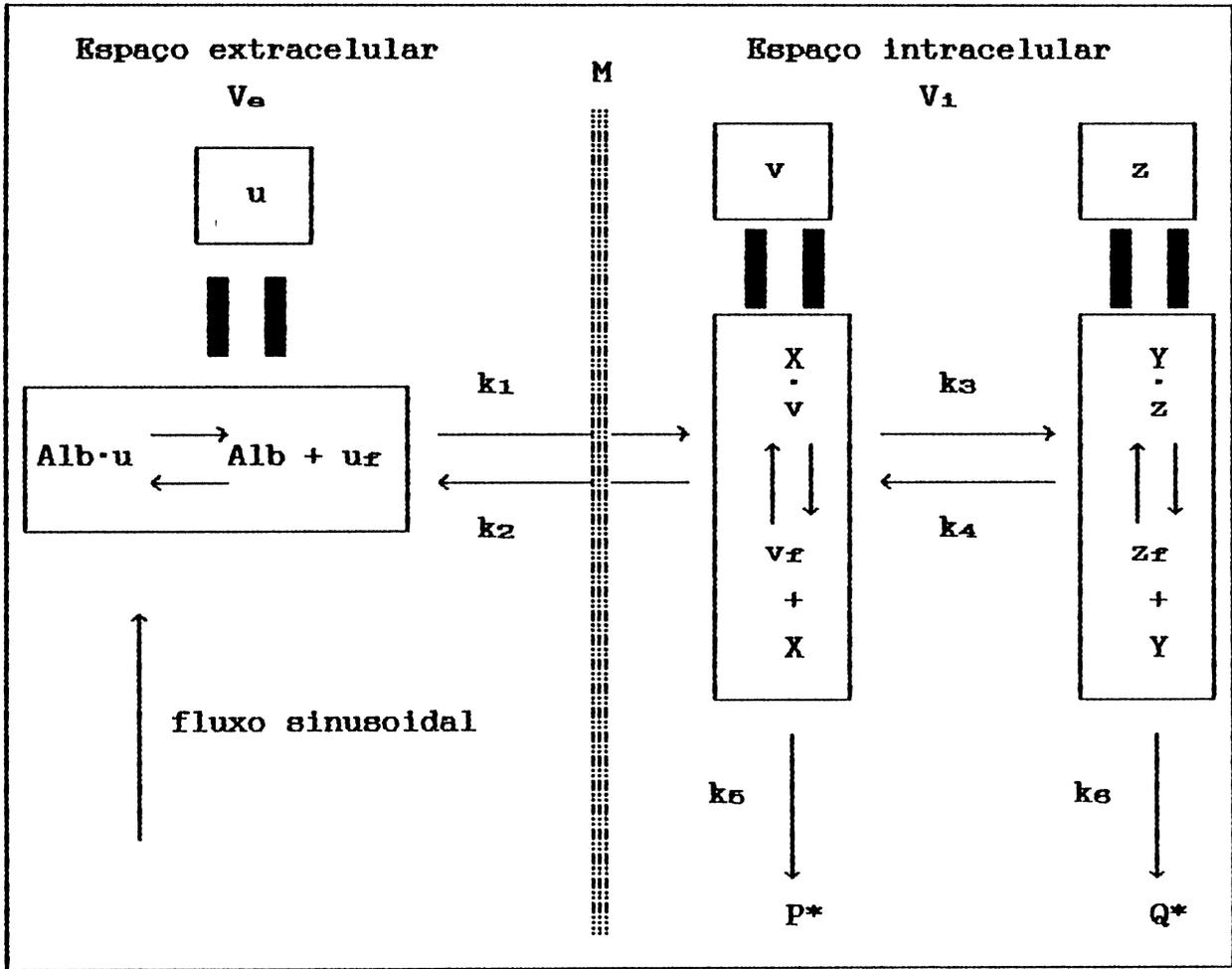


Figura 2. *Esquema dos movimentos de um traçador ligado a componentes extra- e intracelulares, com distribuição em dois estoques intracelulares, podendo ainda sofrer transformações metabólicas irreversíveis.* Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; u_f , traçador livre no espaço extracelular; Alb·u, traçador complexado com a albumina no espaço extracelular; u, traçador livre mais complexado no espaço extracelular; X, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no primeiro estoque; Y, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no segundo estoque; v_f , traçador livre no primeiro estoque intracelular; z_f , traçador livre no segundo estoque intracelular; X·v, traçador complexado no primeiro estoque; Y·z, traçador complexado no segundo estoque; v, traçador livre mais complexado no primeiro estoque intracelular; z, traçador livre mais complexado no segundo estoque; M, membrana celular; P* e Q*, produtos de metabolização marcados no primeiro e segundo estoques, respectivamente. As constantes de velocidade compostas podem ser definidas como (ver Figura 9): $k_1 = f_1(C_{ef}/C_e)$; $k_2 = f_2(C_{11f}/C_{11})$; $k_3 = f_3(C_{11f}/C_{11})$; $k_4 = f_4(C_{12f}/C_{12})$; $k_5 = f_5(C_{11f}/C_{11})$; e, $k_6 = f_6(C_{12f}/C_{12})$.

Figura 2, será necessário levar em conta duas variáveis independentes: o espaço a ser percorrido em virtude do fluxo e o tempo que transcorre desde a entrada do traçador no sinusóide. Além disto, convém assumir ainda que (Goresky *et al.*, 1970): (1) o fluxo sanguíneo ou de perfusado está restrito ao espaço extracelular; (2) os traçadores injetados são impulsionados como um *bolus* pelo fluxo ao longo dos sinusóides; e, (3) a difusão paralela ao sinusóide é negligenciável em comparação com a grande velocidade do fluxo (convexão) e os movimentos das moléculas restringem-se a uma rápida difusão perpendicular ao sinusóide.

Com base nessas premissas e seguindo a idéia original de Sangren e Sheppard (1953), os eventos que descrevem o comportamento de um traçador num único sinusóide hepático e suas células adjacentes podem ser descritos por um sistema de equações diferenciais parciais. A primeira equação descreve a convexão no sinusóide e a conservação da matéria:

$$\frac{\partial u}{\partial t} + W \frac{\partial u}{\partial x} + \theta' \frac{\partial v}{\partial t} + \theta' \frac{\partial z}{\partial t} + k_s \theta' v + k_s \theta' z = 0 \quad [1]$$

Os símbolos u , v e z , representam as concentrações dos traçadores no espaço extracelular, no primeiro estoque celular e no segundo estoque celular, respectivamente, conforme esquematizado na Figura 2. A posição ao longo do sinusóide está representada por x e o tempo por t . W é a velocidade aparente de convexão, expressa em distância por unidade de tempo, de uma substância no sinusóide que troca com velocidade infinita com o espaço de Disse adjacente (Bracht *et al.*, 1980). O termo θ' é a razão do espaços aquosos intra- para extracelulares, *i.e.*, $\theta' = V_i/V_e$ (ver Figura 2).

As duas equações restantes, descrevem a variação da concentração do traçador nos dois estoques celulares:

$$\frac{\partial v}{\partial t} = k_{1u} - k_{2v} - k_{3v} - k_{5v} + k_{4z} \quad [2]$$

$$\frac{\partial z}{\partial t} = k_{3v} - k_{4z} - k_{6z} \quad [3]$$

A solução para estas equações requer o estabelecimento de condições iniciais. Assumindo que no tempo zero uma quantidade q_e do traçador atinge o sinusóide na forma de um pulso e que o fluxo através do sinusóide (volume/tempo) é igual a F_e , pode-se escrever para o espaço extracelular:

$$u(0,t) = (q_e/F_e)\delta(t) \quad [4]$$

onde $\delta(t)$ é uma função impulso (ou função delta de Dirac; Sangren e Sheppard, 1953). Para os dois estoques intracelulares, tem-se como condição inicial:

$$v(x,0) = 0, \text{ e} \quad [5]$$

$$z(x,0) = 0. \quad [6]$$

Sistemas de equações do tipo das [1] a [3] têm sido tradicionalmente resolvidos utilizando a transformação de Laplace com relação ao tempo (Sangren e Sheppard, 1953; Sheppard, 1962),

$$L[f(x,t)] = \int_0^{\infty} f(x,t) \exp[-st]dt = \bar{F}(x,s)$$

sendo s um número complexo. Aplicando a transformação de Laplace nas equações [1] a [3] obtém-se:

$$s\bar{U} + W \frac{d\bar{U}}{dx} + s\theta'\bar{V} + s\theta'\bar{Z} + k_5\theta'\bar{V} + k_5\theta'\bar{Z} = \bar{U}(0,s) \quad [7]$$

$$s\bar{V} = k_1\bar{U} - k_2\bar{V} - k_3\bar{V} - k_5\bar{V} + k_4\bar{Z} \quad [8]$$

$$s\bar{Z} = k_3\bar{V} - k_4\bar{Z} - k_5\bar{Z} \quad [9]$$

As equações [7] a [9] podem agora ser resolvidas como se fossem equações diferenciais simples. Eliminando \bar{Z} em [8] e \bar{V} em [9] e isolando para \bar{V} e \bar{Z} , obtém-se as seguintes expressões:

$$\bar{V} = \frac{k_1\bar{U}}{(s + k_2 + k_3 + k_5) - \frac{k_3k_4}{s + k_4 + k_5}} \quad [10]$$

$$\bar{Z} = \frac{k_3k_1\bar{U}}{(s + k_4 + k_5) \left[(s + k_2 + k_3 + k_5) - \frac{k_3k_4}{s + k_4 + k_5} \right]} \quad [11]$$

As equações [10] e [11] podem agora ser substituídas para \bar{V} e \bar{Z} na equação [7], do que resulta:

$$s\bar{U} + W \frac{d\bar{U}}{dx} + \left[\frac{k_1\bar{U}\theta'(s + k_5)}{(s + k_2 + k_3 + k_5) - \frac{k_3k_4}{s + k_4 + k_5}} \right] \quad [12]$$

$$+ \left[\frac{k_1k_3\bar{U}\theta'(s + k_5)}{(s + k_4 + k_5) \left[(s + k_2 + k_3 + k_5) - \frac{k_3k_4}{s + k_4 + k_5} \right]} \right] = \bar{U}(0,s)$$

A equação [12] pode ser rearranjada de maneira mais simpli-

ficada:

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s + \frac{k_1\theta'(s + k_5)(s + k_4 + k_5) + k_1\theta'k_3(s + k_5)}{s^2 + (k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_5)s + k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5 + k_4k_5 + k_5k_5} \right]$$

$$= \bar{U}(0, s)/W \quad [13]$$

Subtraindo e adicionando o termo $k_1\theta'[k_2s + k_2k_4 + k_2k_5]$ no numerador do segundo termo em colchetes e rearranjando o numerador e o denominador obtém-se:

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s + k_1\theta' - \frac{k_1\theta'k_2(s + k_4 + k_5)}{s^2 + (k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_5)s + k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5 + k_4k_5 + k_5k_5} \right]$$

$$= \bar{U}(0, s)/W \quad [14]$$

O último termo em colchetes pode ser quebrado em duas frações parciais (Rose *et al.*, 1977):

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s + k_1\theta' - \frac{k_1\theta'k_2(\alpha + k_4 + k_5)}{(\alpha - \beta)(s - \alpha)} - \frac{k_1\theta'k_2(\beta + k_4 + k_5)}{(\beta - \alpha)(s - \beta)} \right] = \frac{\bar{U}(s, 0)}{W}$$

$$[15]$$

onde α e β são as raízes da equação do segundo grau: $s^2 + (k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_5)s + (k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5 + k_4k_5 + k_5k_5) = 0$.

Resolvendo a equação [15], juntamente com as condições iniciais dadas pelas equações [4] a [6], tem-se:

$$\bar{U}(x, s) = \frac{q_s}{F_s} \exp(-sx/W) \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)]$$

$$\cdot \exp\{[k_1\theta'k_2(x/W)(\alpha + k_4 + k_5)]/[(\alpha - \beta)(s - \alpha)]\} \quad [16]$$

$$\cdot \exp\{[k_1\theta'k_2(x/W)(\beta + k_4 + k_5)]/[(\beta - \alpha)(s - \beta)]\}$$

Para ter alguma utilidade a equação [16] terá que ser invertida para o domínio do tempo. Uma forma mais favorável pode ser obtida expandindo as duas últimas funções exponenciais na série de Taylor (Rose *et al.*, 1977). Fazendo-se isto obtém-se a expressão:

$$\begin{aligned} \bar{U}(x,s) = & \frac{q_e}{F_e} \exp(-sx/W) \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \\ & + \frac{q_e}{F_e} \cdot \exp(-sx/W) \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \end{aligned} \quad [17]$$

$$\cdot \left[\sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\alpha+k_4+k_8)]^n}{(\alpha-\beta)^n(\varepsilon-\alpha)^n n!} + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\beta+k_4+k_8)]^n}{(\beta-\alpha)^n(\varepsilon-\beta)^n n!} \right. \\ \left. + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\alpha+k_4+k_8)]^n}{(\alpha-\beta)^n(\varepsilon-\alpha)^n n!} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\beta+k_4+k_8)]^n}{(\beta-\alpha)^n(\varepsilon-\beta)^n n!} \right]$$

A inversão da equação [17] pode ser feita com base numa boa tabela de transformações de Laplace (Sheppard, 1962):

$$\begin{aligned} u(x,t) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_1\theta'(x/W)] \delta(t-x/W) \\ & + \frac{q_e}{F_e} \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \end{aligned} \quad [18]$$

$$\cdot \left[\exp[\alpha(t-x/W)] \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\alpha+k_4+k_8)]^n (t-x/W)^{n-1}}{(\alpha-\beta)^n n! (n-1)!} S(t-x/W) \right. \\ \left. + \exp[\beta(t-x/W)] \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\beta+k_4+k_8)]^n (t-x/W)^{n-1}}{(\beta-\alpha)^n n! (n-1)!} S(t-x/W) \right. \\ \left. + \int_{x/W}^t \exp[\alpha(\varepsilon-x/W)] \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\alpha+k_4+k_8)]^n (\varepsilon-x/W)^{n-1}}{(\alpha-\beta)^n n! (n-1)!} \right]$$

$$\cdot \exp[\beta(t-\epsilon)] \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(x/W)(\beta+k_4+k_8)]^n (t-\epsilon)^{n-1}}{(\beta-\alpha)^n n! (n-1)!} d\epsilon \quad [18]$$

No primeiro termo da equação [18], $\delta(t-x/W)$ é uma função impulso que descreve o deslocamento do pulso de traçador ao longo do sinusóide. A quantidade de traçador no pulso vai sendo atenuada gradativamente pelo fator $\exp[-k_1\theta'(x/W)]$ à medida que ele avança no sinusóide. O primeiro termo da equação [18] (na primeira linha da equação) representa o traçador que, ao longo do sinusóide, não chega a penetrar no espaço celular. Esta fração pode ser chamada de fração não-trocada (*throughput*, Goresky et al., 1970). O segundo termo, que descreve o comportamento do traçador que entrou no espaço celular e retornou ao sinusóide (fração trocada) é muito complexo. $S(t-x/W)$ é uma função degrau, que é igual a zero quando $(t-x/W) < 0$ e igual à unidade quando $(t-x/W) > 0$. ϵ é a variável de integração da integral de convolução (Sheppard, 1962).

A equação [18] descreve os eventos da Figura 2 para um único sinusóide. É uma equação, sem dúvida, bastante complexa. Para algumas condições especiais, no entanto, pode-se chegar a expressões mais simples. As condições especiais de interesse para este trabalho serão analisadas a seguir.

2.2.2.1. A condição $k_1 = 0$ e $k_2 = 0$

Uma condição especial que conduz a uma expressão muito simples é aquela na qual k_1 e k_2 são nulos, i.e., quando a substância não tem acesso ao espaço celular. Deduz-se facilmente que a equação [15] reduz-se a

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}s}{W} = \frac{\bar{U}(0,s)}{W} \quad [19]$$

cuja solução, juntamente com a condição inicial dada pela equação [4] é:

$$\bar{U}(x,s) = \frac{q_e}{F_e} \exp(-sx/W) \quad [20]$$

A inversão da equação [20] para o domínio do tempo (Sheppard, 1962) produz:

$$u(x,t) = \frac{q_e}{F_e} \delta(t - x/W) \quad [21]$$

A equação [21] revela o que se pode também prever intuitivamente, *i.e.*, que um traçador que não tem acesso ao espaço celular, se for introduzido na forma de um pulso, movimenta-se ao longo do sinusóide na forma de um pulso e emerge no final também na forma de um pulso não atenuado, desde que a difusão longitudinal seja pequena.

2.2.2.2. k_1 e k_2 tendem ao infinito

Se a membrana celular não for barreira para o traçador, *i.e.*, se k_1 e k_2 tendem ao infinito, ter-se-á uma situação bem mais complexa que a anterior. Esquemáticamente esta situação pode ser representada como na Figura 3. Haverá sempre equilíbrio entre o espaço extracelular e o primeiro estoque celular, mas não entre o primeiro e o segundo estoques celulares se k_3 e k_4 forem finitos. Por outro lado, k_1 e k_2 não poderão mais ser determinados, mas sim apenas a razão k_1/k_2 .

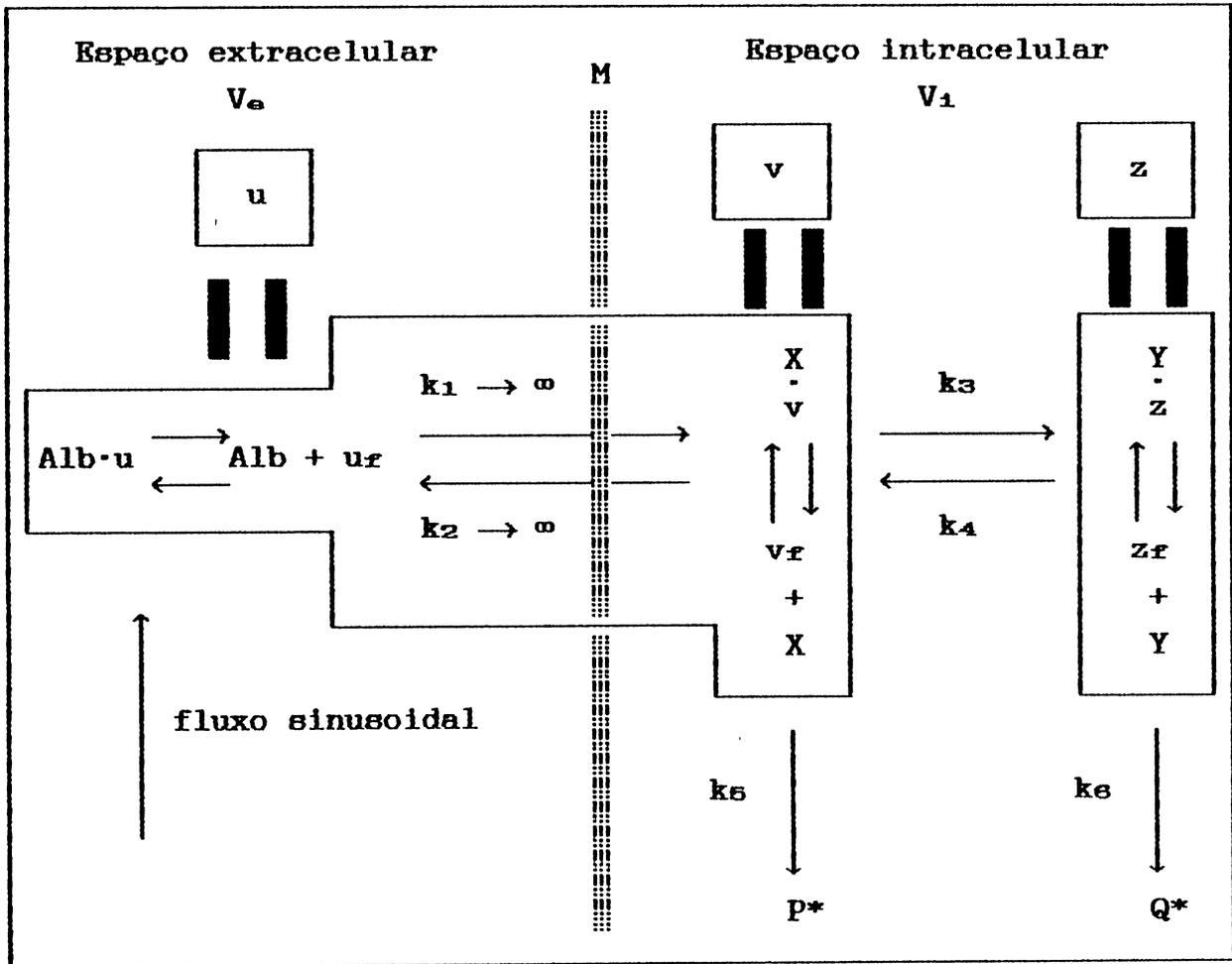


Figura 3. Esquema dos movimentos de um traçador ligado a componentes extra- e intracelulares, metabolizável, com distribuição em dois estoques intracelulares, mas para o qual a membrana celular não representa uma barreira efetiva. Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; u_f , traçador livre no espaço extracelular; $Alb \cdot u$, traçador complexado com a albumina no espaço extracelular; u , traçador livre mais complexado no espaço extracelular; X, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no primeiro estoque; Y, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no segundo estoque; v_f , traçador livre no primeiro estoque intracelular; z_f , traçador livre no segundo estoque intracelular; $X \cdot v$, traçador complexado no primeiro estoque; $Y \cdot z$, traçador complexado no segundo estoque; v , traçador livre mais complexado no primeiro estoque intracelular; z , traçador livre mais complexado no segundo estoque; M, membrana celular; P^* e Q^* , produtos de metabolização marcados no primeiro e segundo estoques, respectivamente.

Matematicamente esta situação pode ser analisada a partir da equação [13]. Dividindo o numerador e o denominador do segundo termo entre colchetes por k_2 , assumindo $k_1 = \infty$ e $k_2 = \infty$, eliminando todos os termos não significativos divididos por k_2 , e definindo $\Omega' = k_1/k_2$, obtém-se a expressão:

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s + \frac{\Omega'(\theta)(s + k_4 + k_5) + \Omega'k_3(s + k_5)}{s + k_4 + k_5} \right] = \frac{\bar{U}(0, s)}{W} \quad [22]$$

Uma forma equivalente à equação [22], obtida por manobras algébricas, é mais conveniente para a inversão da transformada de Laplace para o domínio do tempo:

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s(1 + \Omega\theta') + (k_3 + k_5)\Omega\theta' - \frac{k_3k_4\Omega\theta'}{s + k_4 + k_5} \right] = \frac{\bar{U}(0, s)}{W} \quad [23]$$

A solução da equação diferencial [23], juntamente com a condição inicial dada pela equação [4], é:

$$\begin{aligned} \bar{U}(x, s) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-s(x/W)(1 + \Omega\theta')] \cdot \exp[-(k_3 + k_5)\Omega\theta'(x/W)] \\ & \cdot \exp\{[(k_3\Omega\theta'k_4)/(s+k_4+k_5)](x/W)\} \end{aligned} \quad [24]$$

Para inversão no domínio do tempo, convém novamente expandir a última função exponencial na série de Taylor (Sheppard, 1962):

$$\begin{aligned} \bar{U}(x, s) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-s(x/W)(1 + \Omega\theta')] \cdot \exp[-(k_3 + k_5)\Omega\theta'(x/W)] \\ & + \frac{q_e}{F_e} \left[\exp[-s(x/W)(1 + \Omega\theta')] \cdot \exp[-(k_3 + k_5)\Omega\theta'(x/W)] \right. \end{aligned} \quad [25]$$

$$\cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[(k_3 k_4 \Omega \theta')(x/W)]^n}{n! (s + k_4 + k_5)^n} \quad [25]$$

A inversão da equação [25] para o domínio do tempo produz:

$$\begin{aligned} u(x,t) = & \frac{q_0}{F_0} \exp[-(k_3+k_5)\Omega\theta'(x/W)] \cdot \delta\left[t - \frac{x}{W}(1 + \Omega\theta')\right] \\ & + \frac{q_0}{F_0} \exp[-(k_3+k_5)\Omega\theta'(x/W)] \cdot \exp[(k_4+k_5)(t-x/W)] \\ & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_3 k_4 \Omega \theta'(x/W)]^n (t-x/W)^{n-1}}{n! (n-1)!} \cdot S\left[t - \frac{x}{W}(1 + \Omega\theta')\right] \end{aligned} \quad [26]$$

onde $\delta[t-x/W(1+\Omega\theta')]$ é uma função impulso, retardada pelo fator $(1 + \Omega\theta')$ e $S[t-x/W(1+\Omega\theta')]$ é uma função degrau. Note-se que a equação [26] está simplificada em relação à equação [18], embora ainda possa ser considerada bastante complexa. O primeiro termo (primeira linha) descreve o pulso do traçador que agora caminha num espaço expandido (espaço extracelular e o espaço do primeiro estoque intracelular). Este pulso é atenuado progressivamente pela função exponencial $\exp[-(k_3+k_5)\Omega\theta'(x/W)]$, que descreve a metabolização (k_5) e a entrada no segundo estoque (k_3). O segundo termo descreve o traçador que teve acesso ao segundo estoque, escapou à metabolização e agora retorna ao espaço extracelular.

Se o primeiro estoque consistir na membrana plasmática e suas circunvizinhanças, o esquema da Figura 3 pode ser modificado para aquele que aparece na Figura 4. Este esquema interessa particularmente no caso do octanoato pelas razões já expostas na *Introdução*. No mecanismo da Figura 4 torna-se inverossímil a ligação a algum componente adicional no primeiro estoque, uma

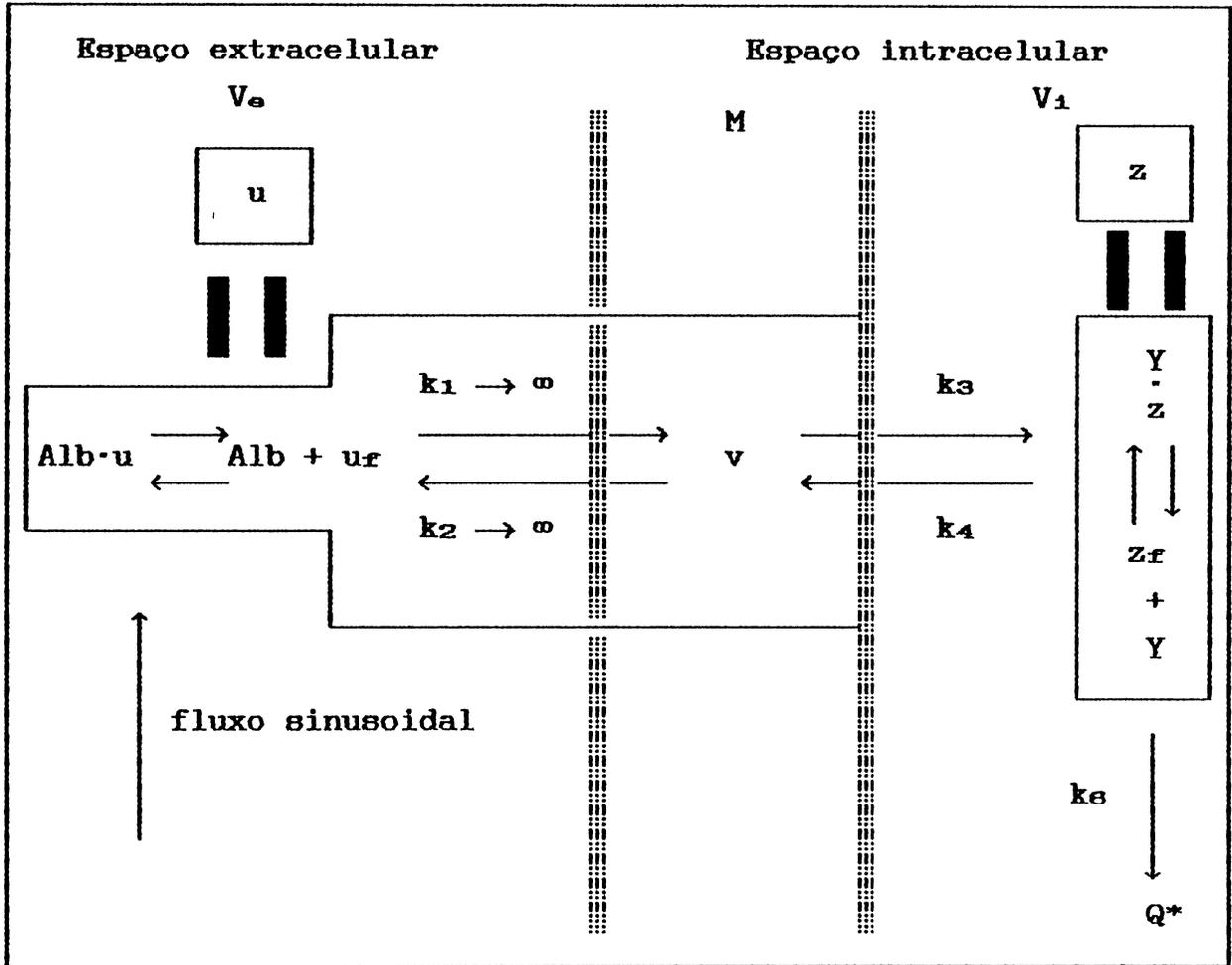


Figura 4. *Esquema dos movimentos de um traçador ligado a componentes extra- e intracelulares, metabolizável, com distribuição rápida na membrana celular.* Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; u_r , traçador livre no espaço extracelular; Alb·u, traçador complexado com a albumina no espaço extracelular; u, traçador livre mais complexado no espaço extracelular; v, traçador na membrana plasmática; Y, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no espaço celular; Y-z, traçador complexado no segundo estoque; z, traçador livre mais complexado no segundo estoque; M, membrana celular; Q^* , produto de metabolização marcado no espaço celular. V_e , espaço extracelular; V_i , espaço celular.

vez que se trata de uma espécie de dissolução num ambiente ou solvente não-aquoso. É improvável, também, uma transformação metabólica direta na fase lipídica da membrana, motivo pelo qual, k_5 pode ser considerado como igual a zero. A passagem para o restante da célula pode ser lenta e reversível, o que fará com que k_3 e k_4 sejam pequenos em comparação com k_1 e k_2 . A equação que descreve os eventos da Figura 4 é igual àquela que descreve os eventos da Figura 3 (equação [26]), exceto pelo fato de que k_5 é igual a zero. Como se pode verificar facilmente, se na equação [26] k_5 for igual a zero, a sua forma geral não se altera. Ainda no caso de uma distribuição na fase lipídica da membrana, pode ser que Ω seja muito pequeno, já que este parâmetro é, na verdade, a razão do espaço aparente do traçador na membrana e suas adjacências para o espaço extracelular. Se Ω for muito pequeno, pode ocorrer que $\Omega\theta' \ll 1$. Em termos matemáticos, as condições $k_5 = 0$ e $\Omega\theta' \ll 1$ transformam a equação [26] na seguinte expressão:

$$\begin{aligned}
 u(x,t) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_3\Omega\theta'(x/W)] \cdot \delta[t - x/W] \\
 & + \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_3\Omega\theta'(x/W)] \cdot \exp[(k_4+k_5)(t-x/W)] \\
 & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_3k_4\Omega\theta'(x/W)]^n (t-x/W)^{n-1}}{n! (n-1)!} \cdot S[t - x/W]
 \end{aligned}
 \tag{27}$$

2.2.2.3. k_3 e k_4 tendem ao infinito

Esta condição está esquematizada na Figura 5. Intuitivamente, nesta situação torna-se impossível distinguir experimen-

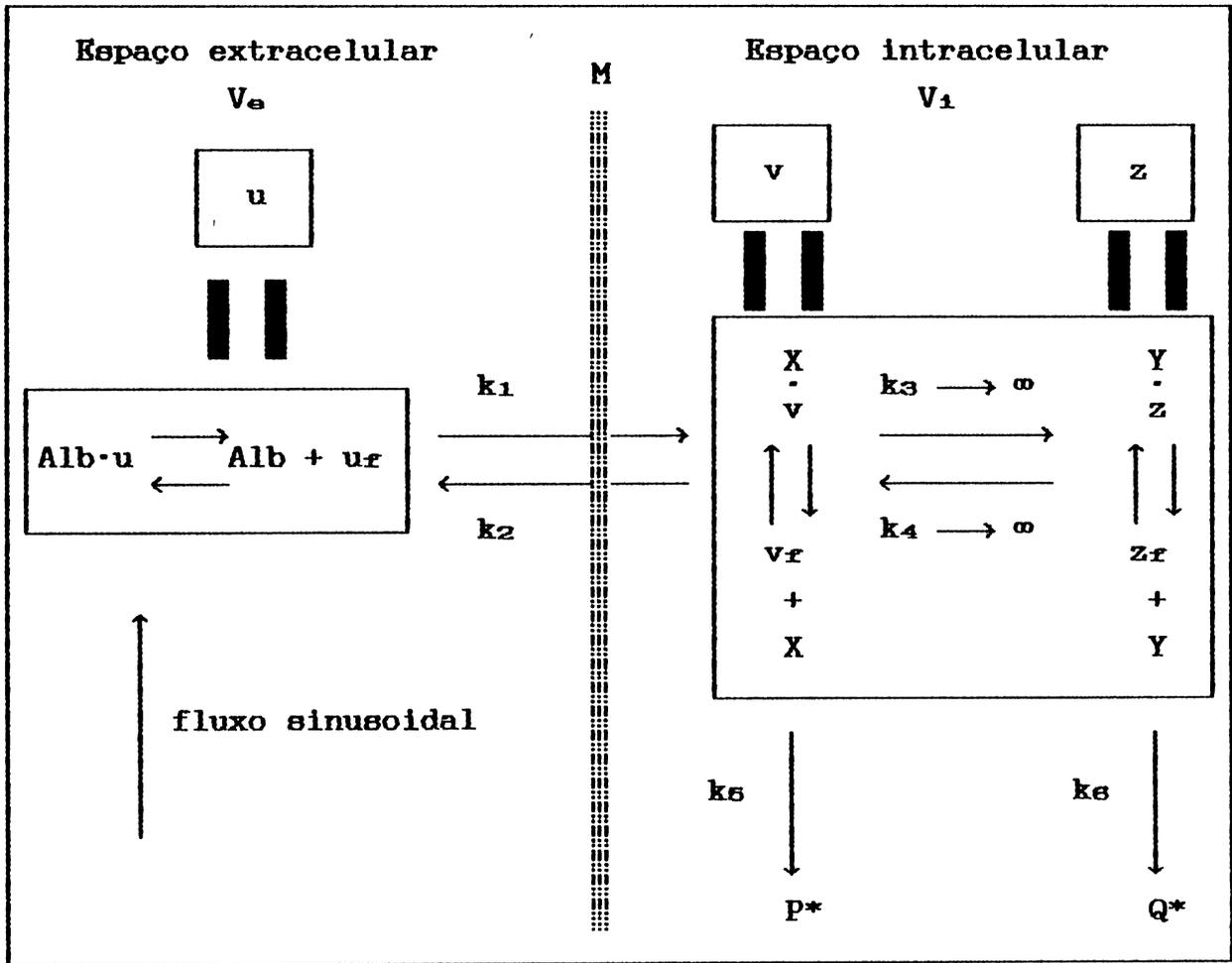


Figura 5. *Esquema dos movimentos de um traçador ligado a componentes extra- e intracelulares, metabolizável e com acesso muito rápido a um segundo estoque intracelular.* Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; u_f , traçador livre no espaço extracelular; Alb·u, traçador complexado com a albumina no espaço extracelular; u, traçador livre mais complexado no espaço extracelular; X, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no primeiro estoque; Y, componente(s) intracelular(es) que liga(m) a substância no segundo estoque; v_f , traçador livre no primeiro estoque intracelular; z_f , traçador livre no segundo estoque intracelular; X·v, traçador complexado no primeiro estoque; Y·z, traçador complexado no segundo estoque; v, traçador livre mais complexado no primeiro estoque intracelular; z, traçador livre mais complexado no segundo estoque; M, membrana celular; P* e Q*, produtos de metabolização marcados no primeiro e segundo estoques, respectivamente.

talmente os dois estoques celulares, pois eles estarão sempre em equilíbrio. Matematicamente pode-se analisar esta condição, partindo da equação [14]. Dividindo o numerador e o denominador do terceiro termo em colchetes por k_4 , assumindo $k_3 = \infty$ e $k_4 = \infty$, eliminando os termos não significativos, e rearranjando, obtém-se:

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s + k_1\theta' - \frac{k_1k_2\theta'/(1+k_3/k_4)}{s + [k_2 + k_5 + (k_3/k_4)k_6]/(1+k_3/k_4)} \right] = \frac{\bar{U}(0,s)}{W} \quad [28]$$

A solução desta equação diferencial, juntamente com a condição inicial dada pela equação [4] é:

$$\begin{aligned} \bar{U}(x,s) = & \frac{q_e}{F_s} \exp[-s(x/W)] \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \\ & \cdot \exp \left[\frac{[(k_1k_2\theta')/(1+k_3/k_4)](x/W)}{s + [k_2 + k_5 + (k_3/k_4)k_6]/(1+k_3/k_4)} \right] \end{aligned} \quad [29]$$

Mais uma vez, convém expandir a última função exponencial na série de Taylor (Sheppard, 1962):

$$\begin{aligned} \bar{U}(x,s) = & \frac{q_e}{F_s} \exp[-s(x/W)] \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \\ & + \frac{q_e}{F_s} \left[\exp[-s(x/W)] \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \right. \\ & \cdot \left. \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\{[(k_1k_2\theta')/(1+k_3/k_4)](x/W)\}^n}{n! \{s + [k_2 + k_5 + (k_3/k_4)k_6]/(1+k_3/k_4)\}^n} \right] \end{aligned} \quad [30]$$

Com a inversão da equação [30] para o domínio do tempo obtém-se:

$$\begin{aligned}
 u(x,t) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_1\theta'(x/W)] \delta[t - x/W] \\
 & + \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_1\theta'(x/W)] \\
 & \cdot \exp\{[(k_2 + k_5 + k_3k_5/k_4)/(1+k_3/k_4)][t - x/W]\} \\
 & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\{[k_1k_2\theta'(x/W)/(1+k_3/k_4)](x/W)\}^n (t - x/W)^{n-1}}{n! (n-1)!} S(t - x/W)
 \end{aligned}
 \tag{31}$$

Deve-se comentar com relação à equação [31] que, experimentalmente, k_2 , k_5 e k_5 não poderão ser determinados, mas sim apenas $k_2(1 + k_3/k_4)$ como constante aparente de efluxo; e, $(k_5 + (k_3/k_4)k_5)/(1 + k_3/k_4)$, como constante aparente de metabolização. Isto porque, cineticamente, o espaço celular só pode ser visto como um único estoque.

2.2.2.4. A condição $k_4 = 0$

Se $k_4 = 0$, não há retorno do segundo estoque, o que leva à situação esquematizada na Figura 6. Não havendo traçador que retorne do segundo estoque ao espaço extracelular, k_5 também não poderá ser determinado. Matematicamente pode-se derivar a expressão correspondente partindo da equação [12]. Se, na equação [12], k_4 for igual a zero, ela se reduz a:

$$s\bar{U} + W \frac{d\bar{U}}{dx} + \left[\frac{k_1\bar{U}\theta'(s + k_5)}{(s + k_2 + k_3 + k_5)} \right] + \left[\frac{k_1k_3\bar{U}\theta'}{(s + k_2 + k_3 + k_5)} \right] = \bar{U}(0,s)
 \tag{32}$$

Rearranjando nos moldes já vistos anteriormente, obtém-se:

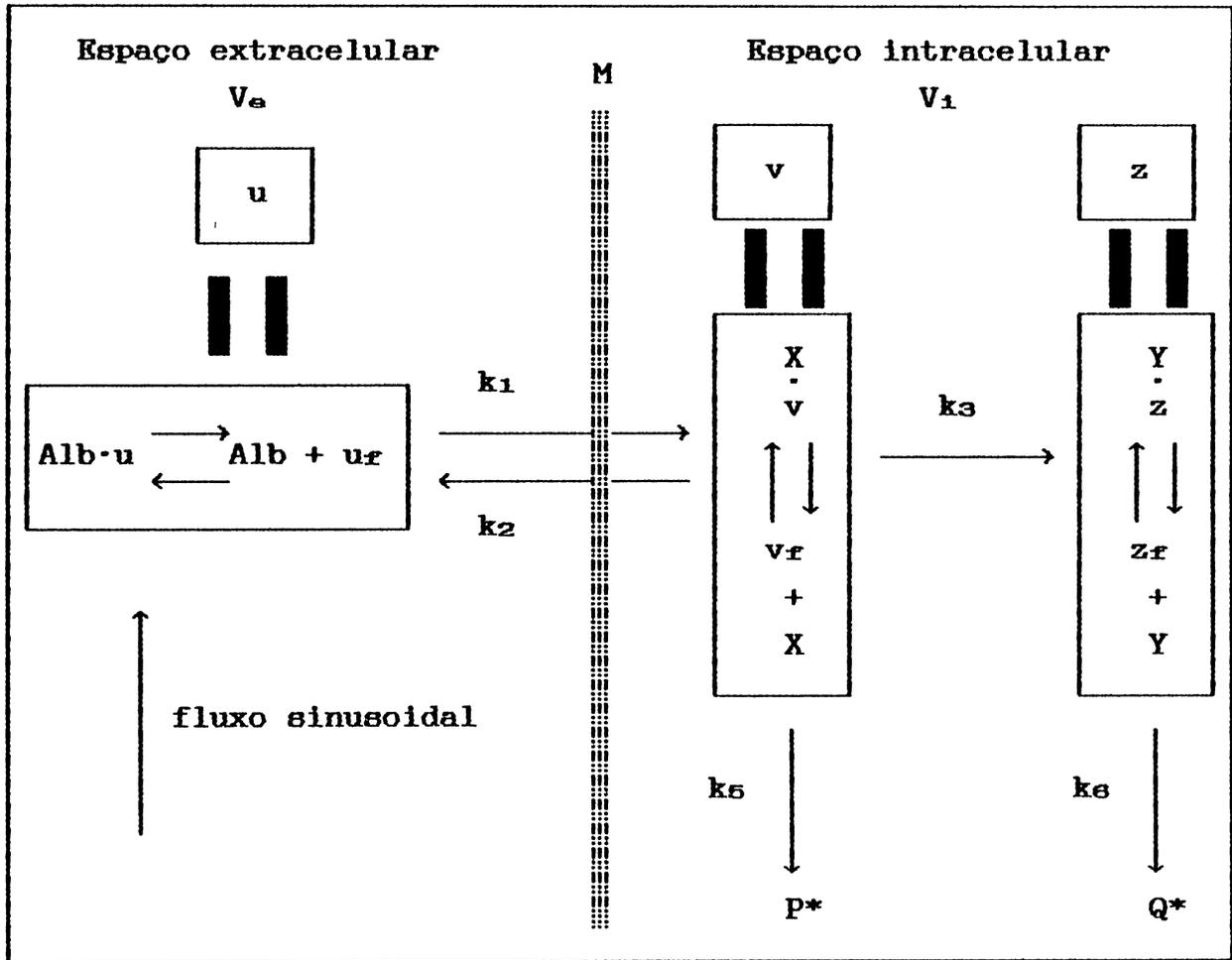


Figura 6. *Esquema dos movimentos de um traçador ligado a componentes extra- e intracelulares, com entrada irreversível num segundo estoque intracelular, podendo ainda sofrer transformações metabólicas irreversíveis.* Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; u_r , traçador livre no espaço extracelular; Alb-u, traçador complexado com a albumina no espaço extracelular; u, traçador livre mais complexado no espaço extracelular; X, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no primeiro estoque; Y, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no segundo estoque; v_r , traçador livre no primeiro estoque intracelular; z_r , traçador livre no segundo estoque intracelular; X-v, traçador complexado no primeiro estoque; Y-z, traçador complexado no segundo estoque; v, traçador livre mais complexado no primeiro estoque intracelular; z, traçador livre mais complexado no segundo estoque; M, membrana celular; P* e Q*, produtos de metabolização marcados no primeiro e segundo estoques, respectivamente.

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s + k_1\theta' - \frac{k_1\theta'k_2}{(s + k_2 + k_3 + k_5)} \right] = \frac{\bar{U}(0,s)}{W} \quad [33]$$

A solução para a equação diferencial [33] é:

$$\begin{aligned} \bar{U}(x,s) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-s(x/W)] \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \\ & \cdot \exp\left[\frac{k_1k_2\theta'(x/W)}{s + k_2 + k_3 + k_5} \right] \end{aligned} \quad [34]$$

Expandindo na série de Taylor, como as anteriores:

$$\begin{aligned} U(x,s) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-s(x/W)] \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \\ & + \frac{q_e}{F_e} \left[\exp[-s(x/W)] \cdot \exp[-k_1\theta'(x/W)] \right. \\ & \cdot \left. \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[(k_1k_2\theta')(x/W)]^n}{n!(s + k_2 + k_3 + k_5)^n} \right] \end{aligned} \quad [35]$$

E, finalmente, invertendo para o domínio do tempo, obtém-se a expressão final:

$$\begin{aligned} u(x,t) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_1\theta'(x/W)] \delta[t - x/W] \\ & + \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_1\theta'(x/W)] \exp[(k_2 + k_3 + k_5)(t - x/W)] \\ & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[(k_1k_2\theta')(x/W)]^n (t - x/W)^{n-1}}{n! (n-1)!} S(t - x/W) \end{aligned} \quad [36]$$

Note-se que, experimentalmente, k_3 e k_5 não poderão ser determinados. Apenas a sua soma, *i.e.*, $(k_3 + k_5)$, poderá ser

determinada, o que corresponde a uma constante aparente de metabolização. Deve-se notar ainda que, em termos de parâmetros determináveis, a equação [36] não difere das equações [27] e [31], o que, em casos experimentais concretos, gera problemas para a distinção entre os possíveis mecanismos.

2.2.2.5. A condição $k_3 = 0$

A condição $k_3 = 0$ significa ausência de um segundo estoque, conforme esquematizado na Figura 7. Esta é, na verdade, a situação mais simples possível para um traçador que troca com o espaço celular e é metabolizado irreversivelmente. Com $k_3 = 0$, a equação [12] reduz-se a

$$s\bar{U} + W \frac{d\bar{U}}{dx} + \left[\frac{k_1\bar{U}\theta'(s + k_5)}{(s + k_2 + k_5)} \right] = \bar{U}(0, s), \quad [37]$$

o que equivale a:

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s + k_1\theta' - \frac{k_1\theta'k_2}{(s + k_2 + k_5)} \right] = \frac{\bar{U}(0, s)}{W} \quad [38]$$

A equação [38] é muito semelhante à equação [33]. Sua forma final, após integração, expansão em série do termo pertinente e inversão para o domínio do tempo, fica sendo:

$$\begin{aligned} u(x, t) = & \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_1\theta'(x/W)] \delta[t - x/W] \\ & + \frac{q_e}{F_e} \exp[-k_1\theta'(x/W)] \exp[(k_2 + k_5)(t - x/W)] \\ & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[(k_1k_2\theta')(x/W)]^n (t - x/W)^{n-1}}{n! (n-1)!} S(t - x/W) \end{aligned} \quad [39]$$

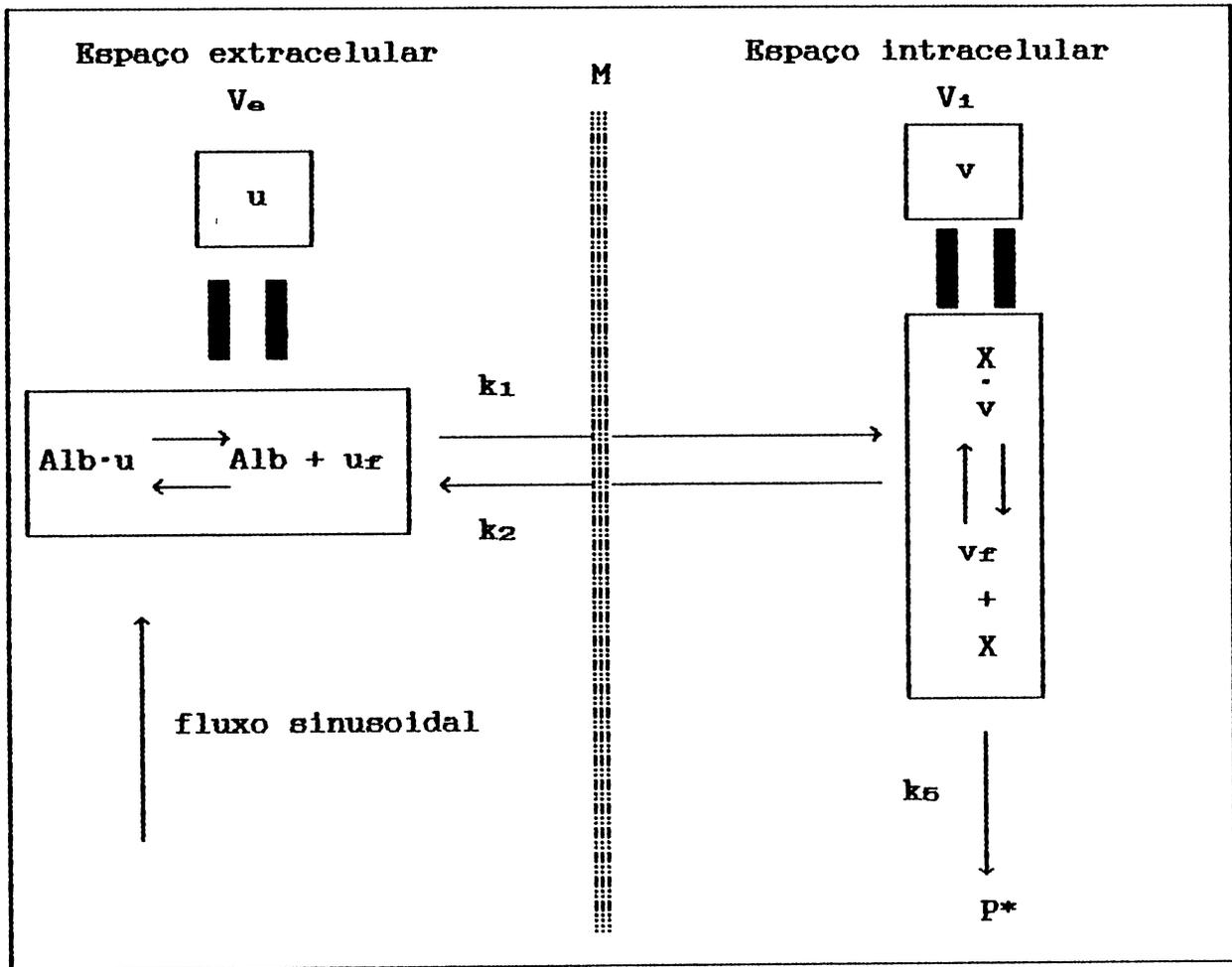


Figura 7. Esquema dos movimentos de um traçador ligado a componentes extra- e intracelulares, que se distribui intracelularmente num único estoque e que pode ainda sofrer transformação metabólica irreversível. Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; ur, traçador livre no espaço extracelular; Alb·u, traçador complexado com a albumina no espaço extracelular; u, traçador livre mais complexado no espaço extracelular; X, componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador intracelularmente; vr, traçador livre no espaço intracelular; X·v, traçador complexado no espaço intracelular; v, traçador livre mais complexado no espaço intracelular; M, membrana celular; P*, produto de metabolização marcado.

A equação [39] apresenta a mesma forma que as equações [27], [31] e [36]. Isto significa que, a distinção entre os mecanismos das Figuras 5, 6 e 7 e o da Figura 4 no caso de $\Omega\theta' \ll 1$, necessita de critérios adicionais que não o simples ajuste da equação aos dados experimentais.

2.2.2.6. k_1, k_2, k_3 e k_4 tendem ao infinito

A condição em que todas as constantes de velocidade para acesso e saída de todos os compartimentos são muito grandes (Figura 8), é o que se denomina normalmente de **distribuição limitada pelo fluxo** (Goresky *et al.*, 1970). Matematicamente, a expressão que descreve o fenômeno é simples em comparação com a maioria dos casos anteriores. Pode-se partir da equação [22], que já é válida para $k_1 = \infty$ e $k_2 = \infty$. Multiplicando e dividindo o segundo termo em colchetes por k_4 , assumindo $k_3 = \infty$ e $k_4 = \infty$, definindo $k_3/k_4 = \Phi$, e rearranjando, obtém-se:

$$\frac{d\bar{U}}{dx} + \frac{\bar{U}}{W} \left[s(1 + \Omega\theta' + \Omega\theta'\Phi) + \Omega\theta'(k_5 + \Phi k_5) \right] = \frac{\bar{U}(0, s)}{W} \quad [40]$$

A solução para a equação [40], considerando a condição inicial da equação [4], é:

$$\bar{U}(x, s) = \frac{q_e}{F_e} \exp[-s(1 + \Omega\theta' + \Omega\theta'\Phi)x/W] \cdot \exp[-\Omega\theta'(k_5 + \Phi k_5)x/W] \quad [41]$$

A inversão para o domínio do tempo (Sheppard, 1962) produz:

$$u(x, t) = \frac{q_e}{F_e} \exp[-\Omega\theta'(k_5 + \Phi k_5)x/W] \delta[t - x/W(1 + \Omega\theta' + \Omega\theta'\Phi)] \quad [42]$$

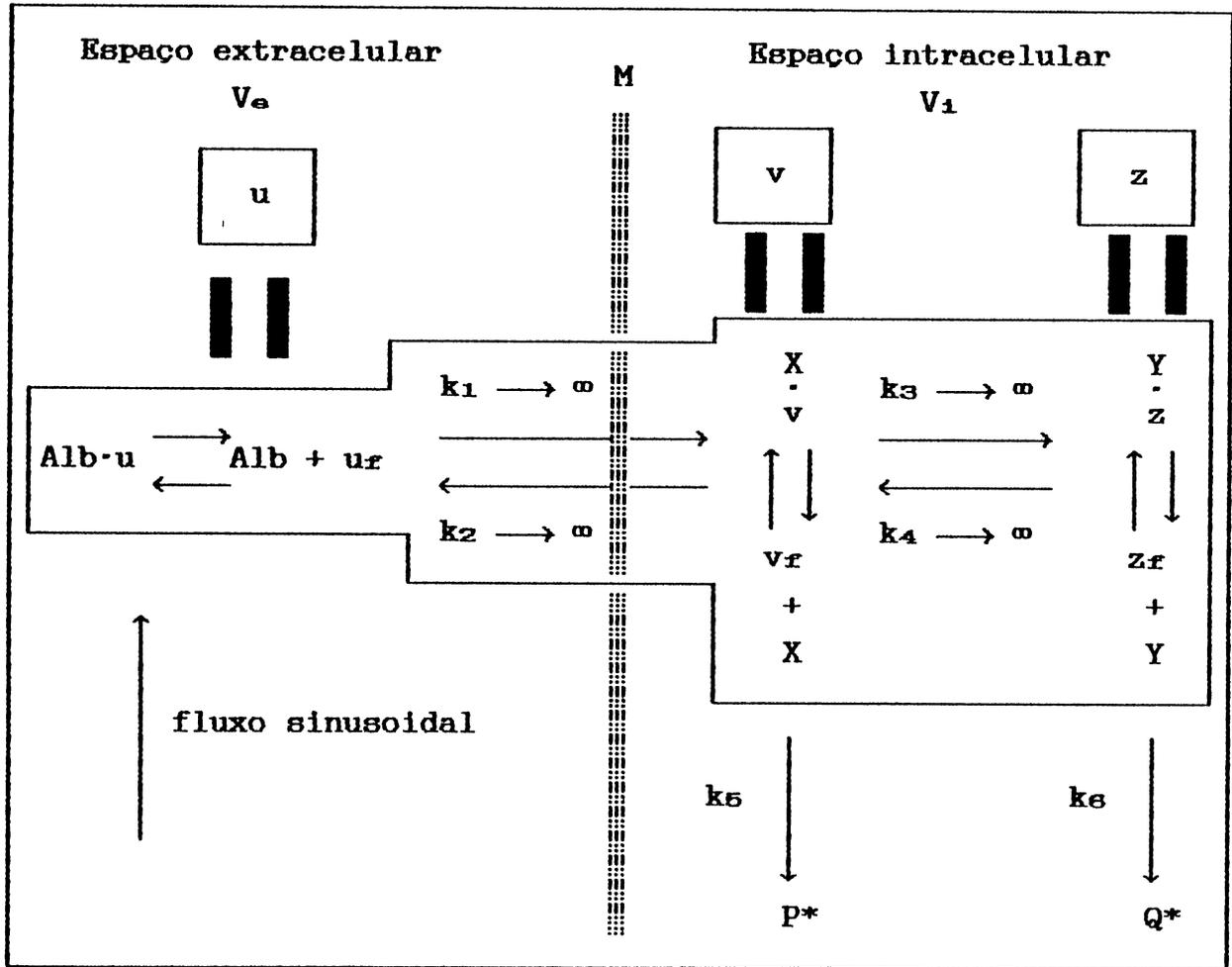


Figura 8. Esquema dos movimentos de um traçador ligado a componentes extra- e intracelulares, metabolizável e com acesso muito rápido a todos os estoques intracelulares. Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; u_f , traçador livre no espaço extracelular; $Alb \cdot u$, traçador complexado com a albumina no espaço extracelular; u , traçador livre mais complexado no espaço extracelular; X , componente(s) intracelular(es) que liga(m) o traçador no primeiro estoque; Y , componente(s) intracelular(es) que liga(m) a substância no segundo estoque; v_f , traçador livre no primeiro estoque intracelular; z_f , traçador livre no segundo estoque intracelular; $X \cdot v$, traçador complexado no primeiro estoque; $Y \cdot z$, traçador complexado no segundo estoque; v , traçador livre mais complexado no primeiro estoque intracelular; z , traçador livre mais complexado no segundo estoque; M , membrana celular; P^* e Q^* , produtos de metabolização marcados no primeiro e segundo estoques, respectivamente.

De acordo com a equação [42], um traçador que se distribui de maneira limitada pelo fluxo em todo o espaço celular, se for introduzido no sinusóide na forma de um pulso, move-se como um pulso ao longo do sinusóide, sendo a quantidade de traçador atenuada exponencialmente pela transformação metabólica.

Se não houver transformação metabólica, *i.e.*, se k_3 e k_4 forem nulos, o termo exponencial na equação [42] desaparece. É o que ocorre, por exemplo com a água triciada ($[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$). Além disto, para a água triciada $k_1 = k_2$, o que significa, para este traçador, que $\Omega\theta' = k_1\theta'/k_2 = \theta' = V_1/V_e$. O parâmetro Φ , que é igual a k_3/k_4 , pode ser considerado como nulo, pois para a água triciada $k_3 = 0$, já que ela se distribui homogeneamente por todo o espaço celular. Desta forma, para o caso particular da água triciada, a equação [42] torna-se:

$$u(x,t) = \frac{q_e}{F_e} \cdot \delta[t - (x/W)(1+\theta')] \quad [43]$$

Como se verá logo adiante, a equação [43], na forma ampliada para o fígado inteiro, tem considerável interesse prático na determinação do parâmetro θ' .

2.2.2.7. A condição $k_3 = 0$ e/ou $k_4 = 0$

Pode ser que em qualquer dos mecanismos mostrados nas Figuras 2 a 8, (1) ambas, ou (2) uma das constantes de velocidade de metabolização tenham valor nulo. O caso (1) significa ausência total de metabolismo; no caso (2), o metabolismo se restringe a um dos estoques. Qualquer que seja a situação, a forma fundamental da equação correspondente não é alterada. Apenas

serão eliminados os termos em que, conforme o caso, apareçam k_s ou k_e .

**2.2.3. A resposta do órgão inteiro à injeção de um traçador:
integração da resposta de todos os sinusóides**

Nunca é demais enfatizar que todas as equações derivadas no item 2.2.2. descrevem os eventos ao longo de um único sinusóide. O fígado, no entanto, é formado por um número muito grande de sinusóides e a resposta total do órgão será necessariamente a soma de todos eles. A maneira de fazer isto foi descrita originalmente por Goresky *et al.* (1970) para o fígado do cão *in vivo*. O raciocínio é válido, no entanto, também para o fígado de rato perfundido isoladamente com meio livre de hemoglobina, conforme demonstrado por Bracht *et al.* (1980). Na formulação de Goresky *et al.* (1970) assume-se que o tempo de trânsito pelos grandes vasos é uniforme e que a resposta do órgão decorre basicamente da heterogeneidade dos tempos de trânsito pelos sinusóides. Com base nisto e definindo: q , a quantidade do traçador injetado na veia porta; $Q'(t)$, a quantidade do traçador que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo; τ , o tempo de trânsito variável pelos sinusóides; t_0 , o tempo de trânsito uniforme pelos grandes vasos, ou, no caso do fígado em perfusão isolada, o tempo de trânsito entre o local de injeção dos traçadores e a entrada nos sinusóides mais o tempo entre a saída do espaço sinusoidal e o local de coleta do perfusado; $W\tau$, o comprimento dos sinusóides (ver item 2.2.2. para definição de W); $f(\tau)d\tau$, a fração dos sinusóides com tempo de trânsito entre τ e $\tau + d\tau$, com $\int_0^{\infty} f(\tau) d\tau = 1$; pode-se somar as respostas de todos os sinusóides da maneira como segue (Goresky *et al.*, 1970):

$$Q'(t) = q \int_0^{\infty} \frac{F_e}{q_e} u(W\tau, t-t_0) f(\tau) d\tau \quad [44]$$

$u(W\tau, t-t_0)$ é a função que descreve o comportamento do traçador num único sinusóide.

Se F é o fluxo total pelo órgão, pode-se considerar que a razão q/F (quantidade total injetada/fluxo total) é igual à razão q_e/F_e , pois a quantidade de traçador que atinge cada sinusóide é diretamente proporcional ao fluxo por cada sinusóide. Assim sendo, pode-se substituir $q(F_e/q_e)$, na equação [44], por F :

$$Q'(t) = F \int_0^{\infty} u(W\tau, t-t_0) f(\tau) d\tau \quad [45]$$

Analisando a equação [45] verifica-se que, na função que descreve a resposta do sinusóide, o tempo t foi encurtado em t_0 . Além disto, a variável x , que é qualquer ponto ao longo do sinusóide, foi substituída pelo produto da velocidade linear ao longo do sinusóide (W ; espaço/tempo) com o tempo de trânsito pelo sinusóide (τ , tempo).

A função $f(\tau)$, pelas definições feitas acima, corresponde à distribuição de frequência dos tempos de trânsito pelos sinusóides. Esta função deve variar de fígado para fígado, sendo função do tamanho, fluxo e outras variáveis de difícil previsão. Pode-se demonstrar, no entanto, que esta função coincide com a curva de diluição de uma substância que não tem acesso ao espaço celular, como é o caso da albumina, por exemplo. A resposta de um único sinusóide à entrada de um pulso de albumina marcada pode ser descrita pela equação [21]. Substituindo-se na equação [45] o valor da função $u(W\tau, t-t_0)$ dado pela equação [21], obtém-se

$$Q'_{alb}(t) = F \int_0^{\infty} \frac{q_{alb}}{F} \delta(t - t_0 - W\tau) f(\tau) d\tau, \quad [46]$$

sendo $Q'_{a1b}(t)$ a quantidade do traçador que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo. Note-se que q_e/F_e foi substituído por q_{a1b}/F (sendo q_{a1b} a quantidade de albumina marcada injetada), t foi substituído por $t - t_0$ e x/W por $W\tau$. A integração da equação [46], de acordo com as particularidades da função impulso (Sheppard, 1962) produz

$$Q'_{a1b}(t) = q_{a1b} f(\tau), \quad [47]$$

o que significa que

$$f(\tau) = Q'_{a1b}(t)/q_{a1b} = Q_{a1b}(t), \quad [48]$$

sendo $Q_{a1b}(t)$ a fração do traçador injetado que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo. A equação [48] mostra que a função de distribuição de frequência dos tempos de trânsito pelos sinusóides pode ser obtida experimentalmente através da curva de diluição normalizada de uma substância, que como a albumina marcada, não tem acesso ao espaço celular.

A equação [46] pode agora ser reescrita numa forma mais adequada que é

$$Q'(t) = F \int_0^{\infty} u(W\tau, t-t_0) Q_{a1b}(\tau+t_0) d\tau \quad [49]$$

Resolvido o problema da função de distribuição de frequência dos tempos de trânsito, pode-se agora introduzir para $u(W\tau, t-t_0)$, na equação [49], as diversas expressões derivadas no item anterior para cada situação particular. Para o caso do esquema da Figura 2, a função pertinente é a equação [18]. Novamente, fazendo $q_e/F_e = q/F$ e $x/W = W\tau$, encurtando t em t_0 , fazendo $Q(t) =$

$Q'(t)/q$, substituindo e integrando, obtém-se:

$$\begin{aligned}
 Q(t) &= Q_{a1b}(t) \cdot \exp[-k_1\theta'(t-t_0)] \\
 &+ \int_0^{t-t_0} \exp[-k_1\theta'\tau] Q_{a1b}(\tau + t_0) \left[\exp[\alpha(t-t_0-\tau)] \right. \\
 &\cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(\alpha+k_4+k_8)\tau]^n (t-t_0-\tau)^{n-1}}{(\alpha-\beta)^n n!(n-1)!} + \exp[\beta(t-t_0-\tau)] \\
 &\cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(\beta+k_4+k_8)\tau]^n (t-t_0-\tau)^{n-1}}{(\beta-\alpha)^n n!(n-1)!} + \int_{\tau}^{t-t_0} \exp[\alpha(\epsilon-\tau)] \\
 &\cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(\alpha+k_4+k_8)\tau]^n (\epsilon-\tau)^{n-1}}{(\alpha-\beta)^n n!(n-1)!} \cdot \exp[\beta(t-t_0-\tau)] \\
 &\left. \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{[k_1\theta'k_2(\beta+k_4+k_8)\tau]^n (t-t_0-\epsilon)^{n-1}}{(\beta-\alpha)^n n!(n-1)!} d\epsilon \right] d\tau \quad [1A]
 \end{aligned}$$

Os símbolos têm todos os mesmos significados já definidos anteriormente. A equação [1A] é a descrição adequada de uma curva de diluição de um traçador injetado na veia porta e que esteja sujeito aos eventos esquematizados na Figura 2. A função é bastante complexa, sem dúvida, mas pode ser calculada com os modernos microcomputadores. Ela é útil, porque se for feito um ajuste de mínimos quadrados da equação aos dados experimentais, existe a possibilidade da obtenção dos valores das constantes de velocidade (ver *Materiais e Métodos*).

Conforme foi visto no item anterior, há quatro condições especiais para as quais a equação que descreve a passagem de um pulso pelo sinusóide tem a mesma forma em termos de parâmetros determináveis. Recapitulando, são elas: (1) quando $k_1 \rightarrow \infty$, $k_2 \rightarrow \infty$ e $\Omega\theta' \ll 1$ (equação [27], Figuras 3 e 4); (2) quando $k_3 \rightarrow \infty$ e $k_4 \rightarrow \infty$ (equação [31] e Figura 5); (3) quando $k_4 = 0$ (equação [36] e Figura 6); e, (4) quando $k_3 = 0$ (equação [39], Figura 7). Para derivar a resposta total do fígado nestes quatro

casos, convém renomear as constantes de velocidade determináveis. Assim a constante de velocidade de influxo fica sendo k_{in} , a de efluxo k_{ef} e a de metabolização k_{met} . O significado destas novas constantes, em termos das constantes de velocidade dos esquemas das Figuras 3 a 7, está mostrado na Tabela 3. Note-se que k_{in} só não coincide com k_1 no caso (1), o mesmo não ocorrendo com k_{ef} e k_{met} , cujos significados podem ser mais complexos, principalmente k_{met} . Introduzindo as equações [27], [31], [36] ou [39], com as constantes redefinidas, na equação [49] e integrando obtém-se:

$$\begin{aligned}
 Q(t) = & Q_{a1b}(t) \cdot \exp[-k_{in}\theta'(t-t_0)] \\
 & + \exp[-(k_{ef}+k_{met})(t-t_0)] \\
 & \cdot \int_0^{t-t_0} \exp[(k_{ef}+k_{met}-k_{in}\theta')\tau] \cdot Q_{a1b}(t+t_0) \\
 & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(k_{in}k_{ef}\theta'\tau)^n (t-t_0-\tau)^{n-1}}{n! (n-1)!} d\tau
 \end{aligned} \tag{2A}$$

A equação [26], que descreve as condições da Figura 3, *i.e.*, k_1 e $k_2 \rightarrow \infty$, k_3 e k_4 finitos e $\Omega\theta'$ significativo, quando introduzida na equação [49] produz, após integração:

$$\begin{aligned}
 Q(t) = & \frac{1}{1+\Omega\theta'} Q_{a1b} \left[\frac{(t-t_0)}{(1+\Omega\theta')} + t_0 \right] \cdot \exp[-\Omega\theta'(k_3+k_5)(t-t_0)] \\
 & + \int_0^{t-t_0} \exp[-(k_4+k_5)(t-t_0-\tau)] \\
 & \cdot \exp[-\Omega\theta'(k_3+k_5)\tau] \cdot \frac{1}{1+\Omega\theta'} Q_{a1b} \left[\frac{\tau}{1+\Omega\theta'} + t_0 \right] \\
 & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(k_3k_4\Omega\theta'\tau)^n (t-t_0-\tau)^{n-1}}{n! (n-1)!} d\tau
 \end{aligned} \tag{3A}$$

Tabela 3

Significado dos parâmetros determináveis das condições especiais delineadas nas Figuras 4, 5, 6 e 7, respectivamente, em termos das constantes de velocidade. As relações podem ser deduzidas das equações [27], [31], [36] e [39], respectivamente.

Condição	Parâmetro determinável	Significado dos parâmetros
$k_1 \rightarrow \infty,$ $k_2 \rightarrow \infty,$ $k_5 = 0$ e $\Omega\theta' \ll 1$	k_{in}	Ωk_3
	k_{ef}	k_4
	k_{met}	k_6
$k_3 \rightarrow \infty$ e $k_4 \rightarrow \infty$	k_{in}	k_1
	k_{ef}	$\frac{k_2}{1 + k_3/k_4}$
	k_{met}	$\frac{k_5}{1+k_3/k_4} + \frac{(k_3/k_4)k_6}{1+k_3/k_4}$
$k_4 = 0$	k_{in}	k_1
	k_{ef}	k_2
	k_{met}	$k_3 + k_5$
$k_3 = 0$	k_{in}	k_1
	k_{ef}	k_2
	k_{met}	k_5

Na forma, a equação [3A] é semelhante à equação [2A], porém há uma importante diferença que é a curva da referência. Como, neste caso, o espaço ao qual o traçador tem acesso limitado pelo fluxo não se restringe ao espaço extracelular, a referência adequada não é a curva de diluição da albumina marcada ou de qualquer outro indicador para o espaço extracelular. A referência adequada seria um traçador não metabolizável, com acesso limitado pelo fluxo ao primeiro estoque e que não entra no segundo estoque (*i.e.*, para a qual $k_3 = 0$). Achar tal substância é tarefa muito difícil. Pode-se, no entanto, conforme prevê a equação [3A], utilizar a curva de diluição da própria albumina marcada, porém transformada. Assim, os termos $\frac{1}{1+\Omega\theta'} Q_{a1b} \left[\frac{t - t_0}{1+\Omega\theta'} + t_0 \right]$ e

$\frac{1}{1+\Omega\theta'} Q_{a1b} \left[\frac{\tau}{1+\Omega\theta'} + t_0 \right]$ representam esta curva de diluição trans-

formada da albumina. O primeiro é a curva da albumina no tempo $[(t-t_0)/(1+\Omega\theta') + t_0]$ dividida pelo fator $(1+\Omega\theta')$; e a segunda, é a curva da albumina no tempo $[\tau/(1+\Omega\theta') + t_0]$, também dividida por $(1+\Omega\theta')$. A curva transformada da albumina pode ser calculada através de métodos numéricos (ver *Materiais e Métodos*).

Uma análise cuidadosa da equação [3A] revela que há quatro coeficientes e cinco constantes. Por isto, apenas $\Omega (= k_1/k_2)$, $(k_3 + k_5)$, $(k_4 + k_6)$ e (k_3k_4) podem ser determinados, desde que θ' e t_0 sejam conhecidos (ver adiante). Para determinar cada uma das constantes seria necessário obter uma estimativa independente de pelo menos uma delas, ou ainda, ter uma curva de diluição de um dos produtos de metabolização.

O caso da situação em que o primeiro estoque é o traçador que entra rapidamente na membrana plasmática é mais simples. Neste

caso $k_5 = 0$, pois é improvável que haja metabolismo no interior da membrana plasmática. A resposta de um único sinusóide é dado pela equação [27], que se for introduzida na equação [49] produz, por integração:

$$\begin{aligned}
 Q(t) = & \frac{1}{1+\Omega\theta'} Q_{a1b} \left[\frac{(t-t_0)}{(1+\Omega\theta')} + t_0 \right] \cdot \exp[-\Omega\theta'k_3(t - t_0)] \\
 & + \int_0^{t-t_0} \exp[-(k_4 + k_5)(t - t_0 - \tau)] \\
 & \cdot \exp[-\Omega\theta'k_3\tau] \cdot \frac{1}{1+\Omega\theta'} Q_{a1b} \left[\frac{\tau}{1+\Omega\theta'} + t_0 \right] \\
 & \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(k_3k_4\Omega\theta'\tau)^n (t - t_0 - \tau)^{n-1}}{n!(n-1)!} d\tau
 \end{aligned} \tag{4A}$$

Na equação [4A] todos os parâmetros podem ser determinados. Para o caso em que $k_4 = 0$ ou mesmo $k_4 \ll k_5$, a equação [4A] torna-se:

$$Q(t) = \frac{1}{1+\Omega\theta'} Q_{a1b} \left[\frac{(t-t_0)}{(1+\Omega\theta')} + t_0 \right] \cdot \exp[-\Omega\theta'k_3(t - t_0)] \tag{5A}$$

Neste caso, apenas Ω e k_3 poderão ser determinados. Note-se que a equação [5A] descreve também o caso em que a metabolização, irreversível, ocorre apenas no estoque ao qual o traçador tem acesso limitado pelo fluxo (Kelmer-Bracht *et al.*, 1993) mesmo que se trate da membrana plasmática. Neste caso, k_3 passa a significar a constante de metabolização (k_{met}).

A equação que descreve distribuição limitada pelo fluxo em todo o espaço intracelular (equação [42]), quando introduzida na equação [49], produz, por integração:

$$Q(t) = \frac{1}{1 + \Omega\theta' + \Omega\theta'\Phi} Q_{a1b} \left[\frac{t - t_0}{1 + \Omega\theta' + \Omega\theta'\Phi} + t_0 \right] \exp[-\Omega\theta'(k_5 + \Phi k_6)(t - t_0)]$$

[6A]

Note-se que a forma da equação [6A] é idêntica à da equação [5A]. Mais uma vez, a referência adequada é uma curva de diluição transformada da albumina marcada. Nenhuma constante pode ser determinada, e sim, apenas as combinações $(\Omega\theta' + \Omega\theta'\Phi)$ e $\Omega\theta'(k_5 + \Phi k_6)$.

A equação [43], que descreve o comportamento de um pulso de água triciada num único sinusóide, quando introduzida na equação [49] produz, por integração:

$$Q(t) = \frac{1}{1 + \theta'} Q_{a1b} \left[\frac{t - t_0}{1 + \theta'} + t_0 \right]$$

[7A]

De acordo com a equação [7A], deveria ser possível transformar linearmente a curva de diluição da água triciada de modo a que esta se sobreponha à da albumina marcada (ou vice-versa), desde que isto seja feito com valores otimizados de θ' e t_0 . Disto resulta que a equação [7A] possibilita a obtenção dos parâmetros θ' e t_0 , embutidos nas equações [1A] a [6A], o que é indispensável para o cálculo das constantes de velocidade.

2.2.4. O modelo de dois estoques em condições de estado estacionário

Experimentos com traçadores são um meio, portanto, de obter constantes de velocidade. Deve-se ter em mente, porém, que os traçadores (substâncias marcadas) são introduzidos num sistema no

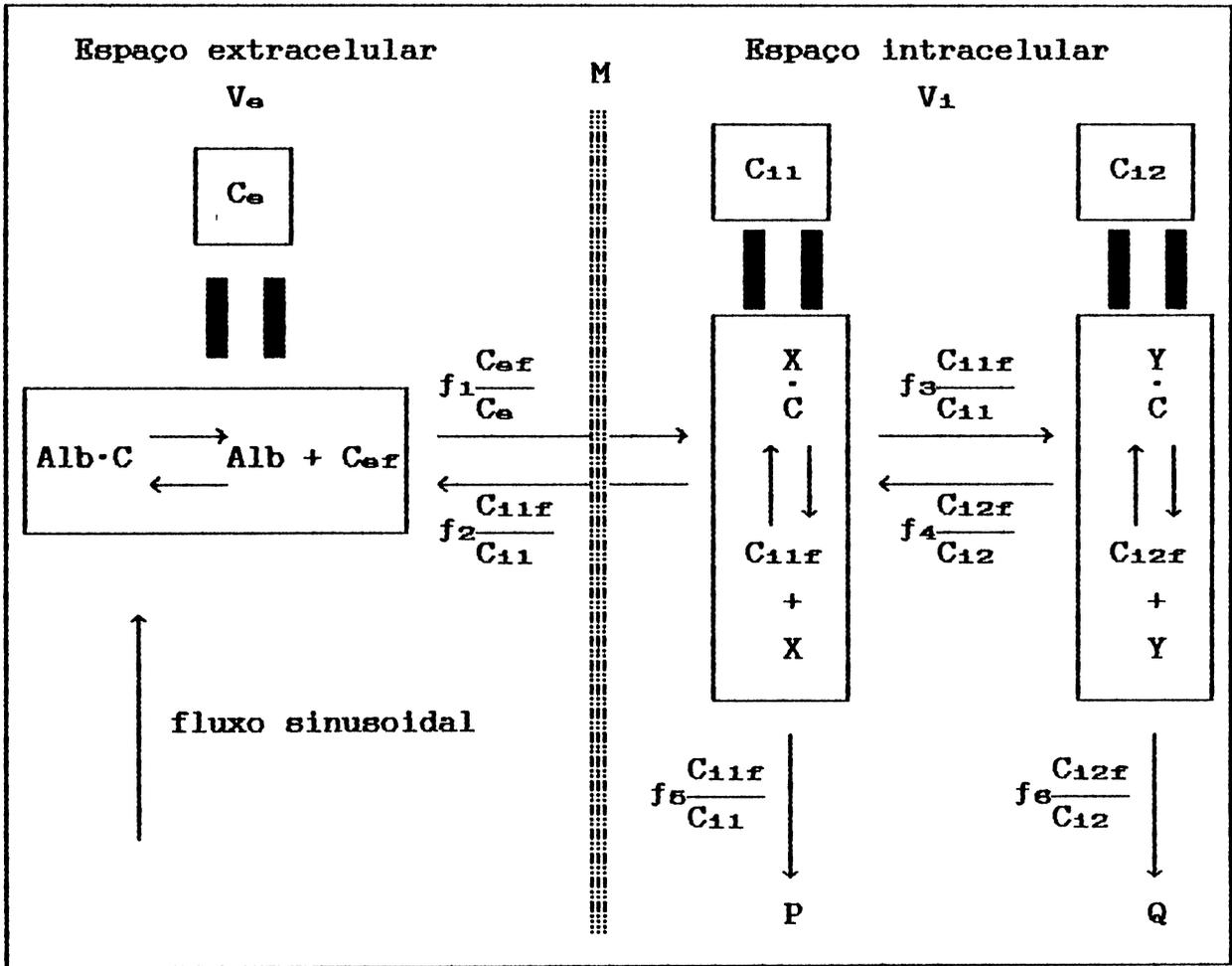


Figura 9. Esquema dos movimentos de uma substância metabolizável, ligada a componentes extra- e intracelulares e que se distribui intracelularmente em dois estoques. Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; C_{ef} , substância livre no espaço extracelular; Alb-C, substância complexada com a albumina no espaço extracelular; C_e , substância livre mais complexada no espaço extracelular; X, componente(s) intracelular(es) que liga(m) a substância no primeiro estoque; Y, componente(s) intracelular(es) que ligam a substância no segundo estoque; C_{i1f} , substância livre no primeiro estoque intracelular; C_{i2f} , substância livre no segundo estoque intracelular; X-C, substância complexada no primeiro estoque; Y-C, substância complexada no segundo estoque; C_{i1} , substância livre mais complexada no primeiro estoque intracelular; C_{i2} , substância livre mais complexada no segundo estoque intracelular; f_1 e f_2 , constantes de velocidade para influxo e efluxo, respectivamente, das formas livres; f_3 e f_4 , constantes de velocidade para entrada e saída do segundo estoque, respectivamente, das formas livres; f_5 e f_6 , constantes de velocidade para metabolização das formas livres no primeiro e segundo estoques, respectivamente; M, membrana celular; P e Q, os produtos de metabolização no primeiro e segundo estoques, respectivamente.

qual as substâncias não-marcadas estão em estado estacionário (*steady-state*). Como são traçadores, *i.e.*, estão presentes em quantidades-traço, eles não alteram significativamente as concentrações e o estado estacionário estabelecido anteriormente. Assim, os traçadores, excluído apenas um mínimo efeito isotópico, comportam-se exatamente como as substâncias não-marcadas. Os valores das constantes de velocidade determinadas com traçadores, conseqüentemente, são válidos também para as substâncias não-marcadas, nas concentrações e demais condições específicas dos experimentos. O comportamento das substâncias não-marcadas em estado estacionário pode ser esquematizado da mesma maneira que o comportamento dos traçadores. A Figura 9, por exemplo, esquematiza o modelo de dois estoques intracelulares para a substância não-marcada. Os movimentos são os mesmos daquele do traçador (Figura 2), mas a simbologia utilizada é diferente. A concentração da substância no espaço extracelular é representada por C_e , a concentração no primeiro estoque é C_{i1} e a concentração no segundo estoque é C_{i2} . A diferença entre C_e (Figura 9) e u (Figura 2) é que u é função do tempo, enquanto que C_e , justamente porque o traçador somente é introduzido quando o sistema tiver atingido o estado estacionário, não é função do tempo. O mesmo vale para as demais concentrações. A Figura 9 mostra também o significado das constantes de velocidade, já que a substância pode estar na forma ligada em cada um dos compartimentos. Assim, f_1 , f_2 , f_3 , f_4 , f_5 e f_6 são as constantes de velocidade para as formas livres da substância. Elas coincidem com k_1 , k_2 , etc. apenas se toda a substância estiver na forma livre (*i.e.*, $C_{eF} = C_e$, etc.). Raramente se pode determinar as constantes de velocidade das formas livres. Isto somente será possível se a concentração livre for conhecida, o que para os estoques intracelulares quase nunca é o caso. Já para o espaço

extracelular isto é possível desde que se conheçam as constantes de dissociação dos complexos proteína-ligante (ver *Materials e Métodos*).

Pode-se escrever para a substância não-marcada o mesmo sistema de equações parciais diferenciais já utilizado para descrever o comportamento do traçador:

$$\frac{\partial C_e}{\partial t} + W \frac{\partial C_e}{\partial x} + \theta \frac{\partial C_{11}}{\partial t} + \theta \frac{\partial C_{12}}{\partial t} + k_5 \theta C_{11} + k_6 \theta C_{12} = 0 \quad [50]$$

$$\frac{\partial C_{11}}{\partial t} = k_1 C_e - k_2 C_{11} - k_3 C_{11} - k_5 C_{11} + k_4 C_{12} \quad [51]$$

$$\frac{\partial C_{12}}{\partial t} = k_3 C_{11} - k_4 C_{12} - k_6 C_{12} \quad [52]$$

Em condições de estado estacionário, no entanto, $\partial C_{11}/\partial t = 0$ e $\partial C_{12}/\partial t = 0$. Portanto,

$$k_1 C_e - k_2 C_{11} - k_3 C_{11} - k_5 C_{11} + k_4 C_{12} = 0 \quad e \quad [53]$$

$$k_3 C_{11} - k_4 C_{12} - k_6 C_{12} = 0 \quad [54]$$

Examinando as equações [53] e [54] verifica-se que elas contêm três variáveis: C_e , C_{11} e C_{12} . C_e é a concentração extracelular, variável que pode ser medida diretamente. Restam duas incógnitas, que podem ser calculadas caso as constantes de velocidade tenham sido determinadas. Assim, a solução de estado estacionário pode ser obtida independentemente do tempo e do espaço. Por isto mesmo, as equações [50] a [52], válidas a princípio apenas para um único sinusóide, podem ser estendidas para o fígado inteiro.

Um exame das equações [53] e [54] revela que cada termo é um produto de uma concentração e uma constante de velocidade, o que

resulta em velocidade de transformação ou passagem de um compartimento para outro. Pode-se, portanto, rearranjando as equações [53] e [54], e desde que se esteja de posse do valor das constantes de velocidade, calcular as velocidades com que ocorrem os movimentos e transformações esquematizados na Figura 9.

Seguindo este raciocínio, a velocidade de passagem do espaço extracelular para o primeiro estoque celular (F_{in1}) é dada por

$$F_{in1} = k_1 \cdot C_e \quad [8A]$$

A velocidade de retorno do primeiro estoque celular para o espaço extracelular (F_{ef1}), por sua vez, pode ser calculada como

$$F_{ef1} = k_2 \cdot C_{11} \quad [9A]$$

Da mesma forma, as velocidades de passagem do primeiro para o segundo estoque (F_{in2}) e retorno do segundo para o primeiro estoque (F_{ef2}) são iguais a

$$F_{in2} = k_3 \cdot C_{11} \quad e \quad [10A]$$

$$F_{ef2} = k_4 \cdot C_{12}, \quad [11A]$$

respectivamente.

A velocidade de metabolização (F_{met}), por outro lado, é dada por

$$F_{met} = F_{ef1} - F_{in1} \quad [12A]$$

pois em condições de estado estacionário a velocidade de metabo-

lização coincide com o fluxo líquido através da membrana. Porém, F_{met} também é dado por

$$F_{met} = k_5 \cdot C_{11} + k_6 \cdot C_{12} \quad [13A]$$

Para calcular todas as velocidades, exceto F_{1n1} , é necessário derivar expressões para o cálculo de C_{11} e C_{12} , ou, derivar expressões que relacionem as velocidades diretamente com C_e . Se for adotada a segunda alternativa, chega-se às seguintes expressões para o cálculo das velocidades:

$$F_{er1} = \frac{k_1 k_2 (k_4 + k_6) C_e}{k_2 k_4 + k_2 k_6 + k_3 k_6 + k_4 k_5 + k_5 k_6} \quad [14A]$$

$$F_{1n2} = \frac{k_1 k_3 (k_4 + k_6) C_e}{k_2 k_4 + k_2 k_6 + k_3 k_6 + k_4 k_5 + k_5 k_6} \quad [15A]$$

$$F_{er2} = \frac{k_1 k_3 k_4 C_e}{k_2 k_4 + k_2 k_6 + k_3 k_6 + k_4 k_5 + k_5 k_6} \quad e \quad [16A]$$

$$F_{met} = \frac{k_1 k_5 (k_4 + k_6) C_e + k_1 k_3 k_6 C_e}{k_2 k_4 + k_2 k_6 + k_3 k_6 + k_4 k_5 + k_5 k_6} \quad [17A]$$

Isto decorre do fato de que C_{11} e C_{12} são dados por

$$C_{11} = \frac{k_1 (k_4 + k_6) C_e}{k_2 k_4 + k_2 k_6 + k_3 k_6 + k_4 k_5 + k_5 k_6} \quad e \quad [18A]$$

$$C_{12} = \frac{k_1 k_3 C_e}{k_2 k_4 + k_2 k_6 + k_3 k_6 + k_4 k_5 + k_5 k_6} \quad [19A]$$

As equações [14A]-[17A] foram obtidas resolvendo algebricamente as equações [53] e [54] para C_{11} e C_{12} e introduzindo os resultados nas equações [9A]-[13A].

As equações [14A]-[17A] modificam-se quando apenas três parâmetros puderem ser determinados. Conforme foi visto anteriormente (ver Figuras 4 a 7 e Tabela 3), isto ocorre quando (1) k_1 e k_2 tendem ao infinito e $\Omega\theta' \ll 1$, (2) quando k_3 e k_4 tendem ao infinito, (3) quando k_3 tende para zero e (4) quando k_4 tende para zero. Em cada um destes casos, apenas uma velocidade de influxo aparente (F_{inap}) e uma velocidade de efluxo aparente (F_{efap}) poderão ser determinadas, além, naturalmente, da velocidade de metabolização (F_{met}). Para qualquer destes quatro casos a velocidade de influxo possível de ser determinada será dada por:

$$F_{inap} = k_{in} \cdot C_e \quad [20A]$$

A velocidade de efluxo será igual a:

$$F_{efap} = \frac{k_{met}k_{ef}}{k_{ef} + k_{met}} C_e \quad [21A]$$

E, finalmente, a velocidade de metabolização será igual a:

$$F_{met} = \frac{k_{in}k_{met}}{k_{ef} + k_{met}} C_e \quad [22A]$$

A Tabela 4 resume o significado de F_{inap} e F_{efap} em termos das constantes de velocidade k_1 , k_2 , k_3 , etc. e em termos de F_{in1} , F_{ef1} , F_{in2} e F_{ef2} para cada um dos casos especiais. O significado de F_{met} em termos das constantes de velocidade também está mostrado. A Tabela 4 mostra também o significado da expressão $k_{in}C_e/(k_{ef} + k_{met})$ para os quatro casos especiais. Para $k_3 = 0$ e $k_4 = 0$ a expressão é igual a C_{11} , a concentração do primeiro estoque. Para k_3 e k_4 muito grandes, no entanto, a expressão dará a soma das concentrações nos dois estoques, sendo

Tabela 4

Significado das velocidades determináveis para as condições especiais delineadas nas Figuras 4, 5, 6 e 7, respectivamente, em termos das constantes de velocidade e em termos dos fluxos entre o espaço extracelular e os estoques intracelulares. As relações podem ser deduzidas das equações [14A] a [19A]. Os símbolos ϕ_1 e ϕ_2 representam as combinações $(1 + k_3/k_4)$ e $k_3k_4/(1 + k_3/k_4)$, respectivamente.

Condição	Velocidade determinável	Significado em termos das constantes de velocidade	Significado em termos dos fluxos entre os estoques	Significado de $[k_{in}/(k_{out} + k_{net})]C_0$
$k_1 \rightarrow \infty,$ $k_2 \rightarrow \infty,$ $k_3 = 0$ e $\theta\theta' \ll 1$	F_{inap}	$\Omega k_3 C_0$	F_{in2}	
	F_{outap}	$\Omega k_4 k_6 C_0 / (k_4 + k_6)$	F_{out2}	C_{12}
	F_{net}	$\Omega k_3 k_6 C_0 / (k_4 + k_6)$	F_{net}	
$k_3 \rightarrow \infty$ e $k_4 \rightarrow \infty$	F_{inap}	$k_1 C_0$	F_{in1}	
	F_{outap}	$k_1 (k_2/\phi_1) C_0 / [k_2/\phi_1 + k_6/\phi_2 + k_3/\phi_1]$	F_{out1}	$C_{11}(1 + k_3/k_4) =$
	F_{net}	$[k_1(k_3/\phi_1) + k_1(k_6/\phi_2)] C_0 / [k_2/\phi_1 + k_6/\phi_2 + k_3/\phi_1]$	F_{net}	$C_{11} + C_{12}$
$k_4 = 0$	F_{inap}	$k_1 C_0$	F_{in1}	
	F_{outap}	$k_1 k_2 C_0 / (k_2 + k_3 + k_5)$	F_{out1}	C_{11}
	F_{net}	$k_1 (k_3 + k_5) C_0 / (k_2 + k_3 + k_5)$	F_{net}	
$k_3 = 0$	F_{inap}	$k_1 C_0$	F_{in1}	
	F_{outap}	$k_1 k_2 C_0 / (k_2 + k_5)$	F_{out1}	C_{11}
	F_{net}	$k_1 k_5 C_0 / (k_2 + k_5)$	F_{net}	

impossível determinar C_{11} para essas condições. Note que para a condição em que k_1 e k_2 tendem ao infinito, $\Omega\theta' \ll 1$ e $k_5 = 0$, os parâmetros calculados utilizando as fórmulas [20A] e [21A] referem-se na verdade ao segundo estoque celular, o que é compreensível, pois este estoque compreende quase que todo o espaço celular.

Para a situação em que k_1 e k_2 tendem ao infinito, mas sem que $\Omega\theta' \ll 1$, F_{in1} e F_{er1} também tendem ao infinito. F_{in2} , F_{er2} e F_{met} , no entanto, podem ser calculados. Como esta é uma situação potencialmente bastante provável para o octanoato, a Figura 10 esquematiza os movimentos em condições de estado estacionário, a exemplo do que já foi feito para o traçador na Figura 4. As expressões para o cálculo das velocidades podem ser obtidas das equações [15A], [16A] e [17A], dividindo o numerador e o denominador por k_2 , e desprezando os termos não-significativos. Se o primeiro estoque consistir basicamente na membrana plasmática e adjacências, pode-se ainda considerar $k_5 = 0$, pelas razões já expostas anteriormente. Com isto tem-se as seguintes equações:

$$F_{in2} = \Omega k_3 C_e, \quad [23A]$$

$$F_{er2} = \Omega k_3 k_4 C_e \quad e \quad [24A]$$

$$F_{met} = \frac{\Omega k_3 k_5 C_e}{k_4 + k_5} \quad [25A]$$

C_{11} e C_{12} são dados por

$$C_{11} = \Omega C_e \quad e \quad [26A]$$

$$C_{12} = \frac{\Omega k_3 C_e}{k_4 + k_5} \quad [27A]$$

Todas as velocidades calculadas usando as equações acima estarão referidas ao espaço aquoso celular. Isto é decorrência das dimensões das constantes de velocidade (Goresky *et al.*, 1970; Ishii *et al.*, 1987). Assim, as dimensões de $k_1\theta'$ são (volume do perfusado) \cdot tempo $^{-1}$ \cdot (volume do perfusado) $^{-1}$. Se θ' é (volume aquoso celular)/(volume do perfusado), k_1 terá como dimensões (volume do perfusado) \cdot tempo $^{-1}$ \cdot (volume aquoso celular) $^{-1}$. C_e , evidentemente tem como dimensões (quantidade) \cdot (volume perfusado) $^{-1}$. Todas as demais constantes, por outro lado têm as dimensões (volume celular) \cdot tempo $^{-1}$ \cdot (volume celular) $^{-1}$.

As equações [8A] a [27A] foram consideradas válidas para qualquer local ao longo de qualquer sinusóide, *i.e.*, para todo o fígado. Implícita nisto está, no entanto, a suposição de que um único valor de C_e é válido para qualquer local ao longo de qualquer sinusóide. Isto não é rigorosamente exato. Para analisar um pouco melhor esta questão convém retomar as equações [50] a [52]. Aplicando à equação [50] a condição de estado estacionário, na qual $\partial C_e / \partial t = 0$, $\partial C_{11} / \partial t = 0$ e $\partial C_{12} / \partial t = 0$, e ainda, substituindo os valores de C_{11} e C_{12} isolados das equações [51] e [52], ela se transforma em,

$$W \frac{\partial C_e}{\partial x} + \frac{k_1 \theta' k_5 (k_4 + k_5) + k_1 \theta' k_3 k_5}{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5 + k_4 k_5 + k_5 k_5} C_e = 0 \quad [55]$$

Considerando que no início de qualquer sinusóide (*i.e.*, quando $x = 0$) a concentração extracelular é igual a C_p (concentração portal) e no final do sinusóide ela é igual a C_v (concentração venosa), pode-se escrever a seguinte integral:

$$\int_{C_p}^{C_v} \frac{\partial C_e}{C_e} = \frac{1}{W} \int_0^{W\tau} - \frac{k_1 \theta' k_5 (k_4 + k_5) + k_1 \theta' k_3 k_5}{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5 + k_4 k_5 + k_5 k_5} \partial x \quad [56]$$

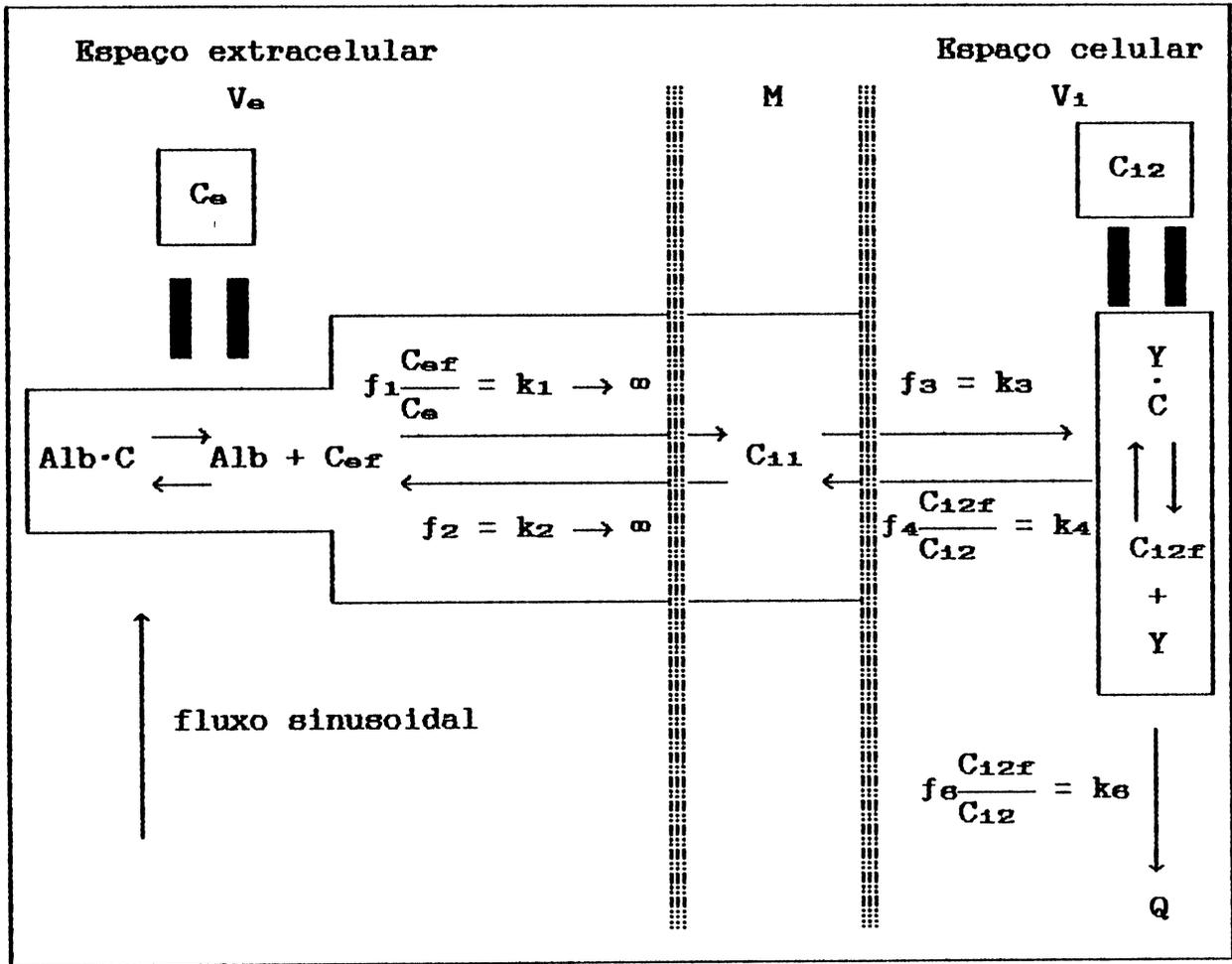


Figura 10. Esquema dos movimentos de uma substância ligada a componentes extra- e intracelulares, metabolizável, com distribuição rápida na membrana celular. Os símbolos utilizados têm os seguintes significados: Alb, albumina livre no espaço extracelular; Caf, substância livre no espaço extracelular; Alb-C, substância complexada com a albumina no espaço extracelular; Ca, substância livre mais complexada no espaço extracelular; C11, substância na membrana plasmática e adjacências; C12, substância livre mais complexada no estoque celular; Y, componente(s) intracelular(es) que liga(m) a substância no estoque celular; C12r, substância livre no estoque celular; Y-C, substância complexada no estoque celular; f1 e f2, constantes de velocidade para entrada e saída da membrana plasmática, respectivamente, das formas livres; f3 e f4, constantes de velocidade para entrada no estoque celular e para a saída deste estoque, respectivamente, das formas livres; f5, constante de velocidade para metabolização da forma livre no estoque celular; M, membrana celular; Q, o produto de metabolização no estoque celular.

Integrando a equação [56] entre os limites dados obtém-se:

$$C_v = C_p \exp \left[- \frac{k_1 \theta' k_5 (k_4 + k_8) + k_1 \theta' k_3 k_8}{k_2 k_4 + k_2 k_8 + k_3 k_8 + k_4 k_5 + k_5 k_8} \tau \right] \quad [57]$$

A equação [58] revela que há um gradiente de natureza exponencial ao longo de cada sinusóide e que este gradiente será tanto maior quanto maior for o tempo de trânsito (τ). Está claro que C_e não é realmente constante para qualquer sinusóide e para qualquer local ao longo do sinusóide. Como, no entanto, há um número infinito de locais possíveis, é preciso encontrar um meio de determinar um valor médio da concentração extracelular que possa ser encarado como representativo. Levando em conta a natureza exponencial do gradiente, Goresky *et al.* (1983) propuseram uma média logarítmica que tem sido utilizada com alguma frequência (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992; Kelmer-Bracht *et al.*, 1993). Esta média pode ser expressa como:

$$C_e = \frac{C_p - C_v}{\ln C_p - \ln C_v} \quad [28A]$$

No transcorrer deste trabalho, todos os valores de C_e referem-se ao valor calculado de acordo com a equação [28A].

2.3. Os tempos médios de trânsito e a determinação de volumes e da velocidade de metabolização

O tempo médio de trânsito de um traçador por qualquer sistema ou órgão tem sido utilizado há décadas para a determinação de volumes de distribuição (Sheppard, 1962). O conceito do tempo

médio de trânsito é perfeitamente geral e não faz nenhuma suposição sobre a geometria do órgão (Meier e Zierler, 1954). Requer-se apenas que entre o ponto de entrada e o de coleta não haja perda de traçador, seja por metabolização, seja por algum desvio causado pela circulação. Matematicamente o tempo médio de trânsito de um traçador (\bar{t}) injetado na forma de um pulso é dado pela integral

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} t \cdot Q(t) dt \quad [29A]$$

onde t é o tempo a partir da injeção e $Q(t)$ é a curva normalizada de diluição. O volume de distribuição (V) é simplesmente o produto do tempo médio de trânsito com o fluxo através do órgão (F):

$$V = F \cdot \bar{t} \quad [30A]$$

Assim, o volume aquoso de um órgão pode ser calculado com o fluxo e o tempo médio de trânsito da água triciada; o espaço extracelular pode ser obtido como o produto do fluxo com o tempo médio de trânsito da albumina marcada. A diferença entre os dois é o espaço aquoso celular.

A possibilidade de calcular o espaço aquoso celular torna possível também expressar a velocidade de metabolização de uma substância, calculada pela diferença porto-venosa, em função do espaço aquoso celular (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992). A fórmula para isto é:

$$F_{met}^* = \frac{F \cdot (C_p - C_v)}{F \cdot (\bar{t}_{\text{água}} - \bar{t}_{\text{alb}})} = \frac{C_p - C_v}{\bar{t}_{\text{água}} - \bar{t}_{\text{alb}}} \quad [31A]$$

$\bar{t}_{\text{água}}$ e \bar{t}_{alb} são os tempos médios de trânsito da água triciada e

da albumina marcada, respectivamente. Os demais símbolos já foram definidos. Tanto F_{met}^* (calculado pela equação [31A]) como F_{met} (calculado pelas equações [17A], [22A] ou [25A]) correspondem à velocidade de metabolização, ou ainda, ao fluxo líquido através da membrana celular. O primeiro é calculado independentemente de qualquer modelo do fígado e não leva em conta a heterogeneidade dos tempos de trânsito pelos sinusóides. Por isto, quanto mais intensa a extração (transformação) metabólica, maior tenderá a ser a discrepância entre os dois valores calculados independentemente, já que os sinusóides que estiverem vazios antes da substância chegar às células localizadas na região perivenosa — limitação do metabolismo pelo fluxo — não serão levados em conta pela equação [19A]. No caso das equações [17A], [22A] e [25A], no entanto, aquele fenômeno estará embutido nos valores das constantes de velocidade e de C_e .

Pode-se determinar também o tempo médio de trânsito de uma curva transformada, como por exemplo, a curva transformada da albumina marcada incluída nas equações [3A] e [4A]. O fator de transformação é o produto $\Omega\theta'$, que por sua vez, é igual a $C_{11}\theta'/C_e$, conforme se pode deduzir da equação [26A]. Se \bar{t}_{nref} é o tempo médio de trânsito da curva transformada da albumina, a nova referência, pode-se escrever a seguinte relação:

$$\frac{C_{11}\theta'}{C_e} = \Omega\theta' = \frac{\bar{t}_{nref} - \bar{t}_{a1b}}{\bar{t}_{a1b} - t_0} \quad [32A]$$

A razão dos tempos de trânsito da equação [32A] corresponde ao espaço extra (aparente ou real) que a nova referência ocupa, dividido pelo espaço sinusoidal, o que é também um dos significados da razão $C_{11}\theta'/C_e$ (Bracht *et al.*, 1981; Kelmer-

Bracht *et al.*, 1993). Desta forma C_{11} pode ser calculado também a partir de tempos médios de trânsito e o resultado comparado com o valor calculado através da equação [26A]. O valor desta comparação não é tão grande, no entanto, como no caso de F_{met} , pois a equação [32A] não é totalmente independente do modelo de Goresky, já que a curva transformada também depende dos valores de Ω e θ' . A comparação serve, no entanto, para avaliar a correção dos procedimentos numéricos adotados nos cálculos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os compostos marcados, [³H]água (NET 001D, 25 mCi/mmol) e [1-¹⁴C]octanoato (NEC-092H, 25 mCi/mmol) foram adquiridos da New England Nuclear Products. A [¹³¹I]albumina humana foi adquirida da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

Albumina de soro bovino, essencialmente livre de ácidos graxos, hemoglobina, β-hidróxi-butirato desidrogenase, NAD⁺ e NADH foram adquiridos da Sigma Chemical Co. O ácido octanóico e demais produtos químicos foram adquiridos da Merck, Reagen e J. T. Baker.

3.2. Animais

Ratos machos albinos Wistar foram utilizados nos experimentos. Os animais foram alimentados com ração balanceada Purina^R. Recebiam água *ad libitum* e pesavam entre 200 e 280 g. Para remoção cirúrgica do fígado, os ratos foram anestesiados com injeções intraperitoneais de Thiopental^R (50 mg/kg de peso corporal).

3.3. O líquido de perfusão

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato, cujo pH é de 7,4 quando saturado com mistura carbogênica (O₂:CO₂ . . . 95:5%). A composição salina do tampão foi a seguinte: NaCl 115 mM; NaHCO₃ 25 mM; KCl 5,9 mM; Na₂SO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 1,18 mM; NaH₂PO₄ 1,24 mM; CaCl₂ 2,5 mM

(Scholz *et al.*, 1973). O líquido de perfusão continha, também, albumina de soro bovino livre de ácidos graxos nas concentrações de 50 a 450 μM e octanoato nas concentrações de 50 a 500 μM .

3.4. Preparo da mistura contendo os traçadores

A mistura dos traçadores continha sempre [^{131}I]albumina, [^3H]água e [$1\text{-}^{14}\text{C}$]octanoato. O resíduo de aproximadamente 10 μl de uma solução etanólica de ácido [$1\text{-}^{14}\text{C}$]octanóico (5 μCi), após secagem a 50°C , era dissolvido em 500 μl de uma solução salina fisiológica, à temperatura ambiente, com auxílio de uma pequena barra magnética. Após neutralização com NaOH, albumina livre de ácidos graxos era adicionada em quantidade suficiente para uma concentração final igual à do líquido de perfusão. A seguir adicionava-se [^{131}I]albumina (1,0 μCi) e [^3H]água (15 μCi) para um volume final de 700 μl . A solução era então centrifugada para eliminar eventuais partículas em suspensão.

3.5. O sistema de perfusão do fígado

A técnica de perfusão utilizada é essencialmente aquela descrita por Scholz *et al.* (1973). O aparelho de perfusão utilizado foi construído nas oficinas da Universidade de Maringá (Kelmer-Bracht *et al.*, 1984). Ele é formado por duas bombas peristálticas com a função de sugar e impulsionar o líquido de perfusão; um banho-maria com bomba para promover a circulação externa da água aquecida; um oxigenador de membrana para oxigenar e aquecer o líquido de perfusão (37°C); um registrador potenciométrico; uma câmara de contenção do fígado; um cilindro contendo a mistura carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2 \dots 95:5\%$) e, finalmente, um coletor de frações.

O coletor de frações foi construído nas oficinas da Universidade de Maringá e é indispensável para os experimentos de diluição de indicadores múltiplos, pois permite coletar frações de até 0,5 segundo. O coletor possui um motor que faz girar, com uma velocidade de 2 rotações por minuto, um disco de acrílico com cavidades cônicas de diferentes diâmetros dispostas em três círculos. Isto permite fracionar o líquido de perfusão em intervalos de 0,5 a 2 segundos. O coletor de frações está conectado a um comando específico (*pulse starter*), que inicia o movimento do disco coletor no instante exato da injeção das substâncias marcadas. A injeção da mistura radioativa é efetuada com o auxílio de uma microseringa conectada ao comando (para detalhes, ver Kelmer-Bracht *et al.*, 1984).

O líquido de perfusão é impulsionado pela primeira bomba peristáltica em direção ao oxigenador, onde ocorre simultaneamente a oxigenação e o aquecimento para 37°C. A entrada de CO₂ também diminui o pH de 7,6 para 7,4. O líquido de perfusão alcança a câmara de contenção do fígado, e entra no órgão através da cânula inserida na veia porta. Entre o oxigenador e o fígado existe um dispositivo (capta-bolhas) que impede a entrada de bolhas de ar no fígado. Após a passagem pelo órgão, o líquido de perfusão sai pela veia cava superior, alcança o coletor de frações e após a coleta das amostras é sugado pela segunda bomba peristáltica.

3.6. A preparação cirúrgica do fígado

O rato, previamente anestesiado com Thiopental^R, tem o seu abdômen aberto e o tecido conjuntivo que cerca o fígado, é seccionado. O esôfago é separado do estômago, a veia esplênica é fechada e a veia porta é canulada sob fluxo baixo do líquido de

perusão (10 ml/min). Após completo dessangramento do órgão, a veia cava inferior é seccionada, o tórax é aberto com cortes do diafragma e costelas para exposição completa do coração. A veia hepática é canulada através da veia cava. O fluxo é aumentado para cerca de 20 ml/minuto e o fígado é removido, cortando-se por baixo do diafragma, e colocado na câmara de contenção do aparelho de perusão. O fluxo através do fígado é ajustado para valores que permitam oxigenação adequada (cerca de 35 ml/minuto), o que pode ser avaliado através da concentração venosa de oxigênio (nunca inferior a 0,2 mM).

3.7. Teste da homogeneidade da perusão do fígado

Os experimentos de diluição de indicadores só podem ser avaliados se a perusão do fígado for homogênea para todos os lóbulos. Isto pode ser testado injetando, na entrada da veia porta, cerca de 200 μ l de uma solução de hemoglobina (20 mg/ml). A curva de diluição da hemoglobina pode ser medida espectrofotometricamente. Para isto, o líquido efluente era desviado para uma cubeta de fluxo, colocada num espectrofotômetro com comprimento de onda fixado em 550 nm. Um registrador potenciométrico acoplado ao espectrofotômetro registrava as variações de absorbância que correspondem à curva de diluição.

A hemoglobina, de maneira semelhante à albumina, não permeia a membrana celular e, provavelmente, as curvas de diluição das duas proteínas são idênticas. Essas curvas correspondem à distribuição de frequência dos tempos de trânsito pelos sinusóides (ver *Bases matemáticas da análise de experimentos de diluição de indicadores*, equação [48]).

A Figura 11 mostra curvas de diluição da hemoglobina obtidas com 2 fígados. O fígado A apresenta uma curva de diluição homogê-

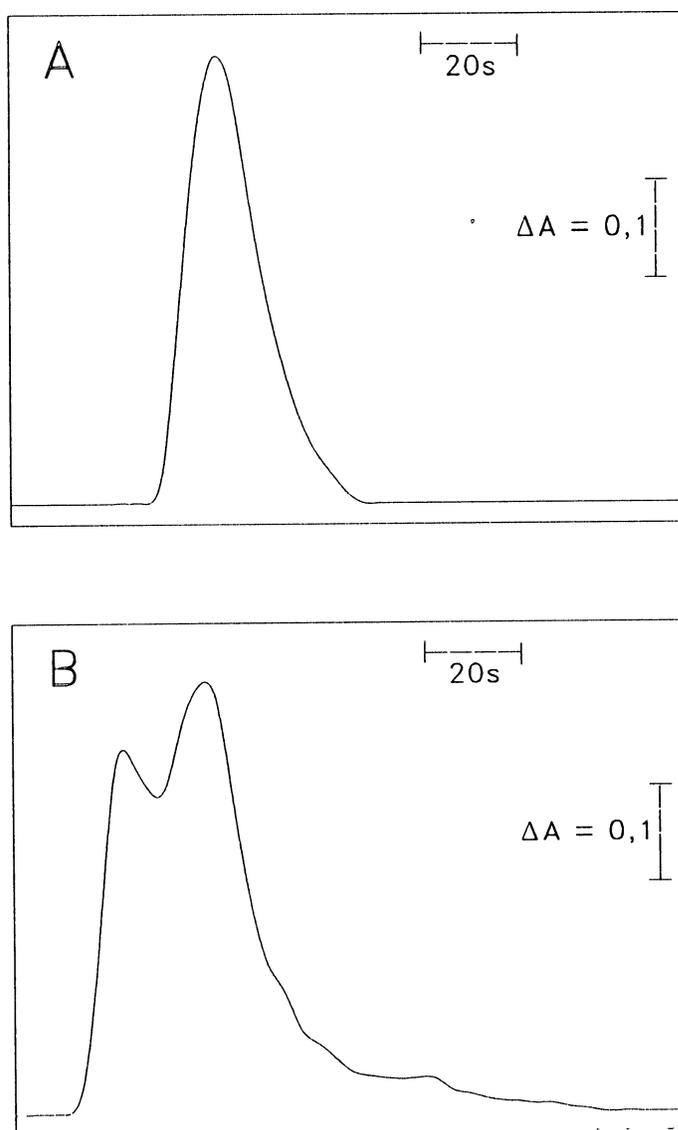


Figura 11. *Curvas de diluição da hemoglobina em dois fígados de rato em perfusão isolada.* Os fígados, de ratos alimentados, foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4). Cerca de 200 μ l de uma solução de hemoglobina contendo 20 mg/ml foram injetados na entrada da veia porta. O efluente foi desviado para uma cubeta de fluxo posicionada num espectrofotômetro conectado a um registrador potenciométrico. A variação da absorbância a 550 nm foi registrada. A: fígado com distribuição homogênea da frequência dos tempos de trânsito; B: fígado com distribuição anormal da frequência dos tempos de trânsito.

nea, isto é, apenas um pico, sem ombros e irregularidades. Em alguns casos, em decorrência de alterações ocorridas durante a remoção cirúrgica ou a problemas inerentes ao próprio fígado, as curvas de diluição da hemoglobina apresentam defeitos, como é o caso do fígado B da Figura 11, que apresenta ombros e irregularidades. Isto provavelmente significa que um ou mais lóbulos estão sendo perfundidos imperfeitamente. Fígados nestas condições não eram utilizados.

3.8. Os experimentos de diluição de indicadores múltiplos com traçadores

A técnica da diluição de indicadores múltiplos consiste na injeção rápida, na entrada da veia porta, de uma mistura de quantidades-traço de substâncias marcadas com isótopos radioativos, seguida da coleta de microfrações do material efluente, com auxílio do coletor de microfrações. As frações são analisadas para cada substância.

No presente trabalho a mistura injetada em todos os experimentos continha as seguintes substâncias: (1) [^{131}I]albumina (0,5 μCi), macromolécula que não tem acesso ao espaço celular numa simples passagem, sendo por isto um indicador do espaço extracelular; (2) [^3H]água (7,5 μCi), que tem rápido acesso ao espaço intracelular, o que faz dela um indicador do espaço aquoso total (celular + extracelular); e, (3) [$1\text{-}^{14}\text{C}$]octanoato (2,5 μCi), o traçador da substância metabolizável em estudo.

Os traçadores eram injetados depois do estabelecimento de condições de estado estacionário (*steady-state*), o que era decidido com base na estabilização do consumo de oxigênio. Isto ocorria, em geral, entre 6 e 8 minutos após o início da infusão

de octanoato (em concentrações entre 50 e 500 μM , dependendo do protocolo experimental). O volume injetado era em geral 350 μl . Simultaneamente com a injeção começava o fracionamento do perfusado efluente durante 90 segundos em frações entre 0,5 e 2,0 segundos. Alíquotas eram pipetadas das frações para a determinação de cada um dos isótopos e para a extração do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, pois o ^{14}C no perfusado efluente se distribui em mais de uma substância ($^{14}\text{CO}_2$ e $[^{14}\text{C}]$ corpos cetônicos, basicamente).

3.9. Analítica

3.9.1. Determinação da $[^{131}\text{I}]$ albumina e da $[^3\text{H}]$ água

Para determinação da $[^{131}\text{I}]$ albumina e da $[^3\text{H}]$ água, alíquotas de 100 μl de cada amostra eram adicionadas a 5 ml de líquido de cintilação (toluol/Antarox CO-630^R [3:1] contendo 5,0 g/litro de 2,5 difeniloxazol e 0,1 g/litro de 2,2 p-fenil-bis-5-fenileno oxazol) e medidas num contador de cintilações para amostras líquidas de três canais (Beckman LS 6800). A radioatividade correspondente a cada isótopo era obtida por discriminação isotópica.

3.9.2. Extração e determinação do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato

A determinação do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato recuperado em cada fração exige uma extração seletiva (Dole e Meinertz, 1960). Uma alíquota de 200 μl de cada amostra era extraída com 1 ml da mistura HCl 0,5 N (0,1 volume) + isopropanol (4 volumes) + n-heptano (1 volume). Após agitação vigorosa por 30 segundos e repouso por 5 minutos eram adicionados 0,4 ml de água e 0,6 ml de heptano. Procedida nova agitação e repouso, 0,7 ml da fase orgânica,

contendo o [1-¹⁴C]octanoato eram adicionados a 5 ml do líquido de cintilação descrito acima e a radioatividade era contada.

3.9.3. A discriminação dos isótopos

Os isótopos ³H, ¹⁴C e ¹³¹I eram contados simultaneamente utilizando os três canais do cintilador. A janela do canal 1 foi fixada entre 0 e 330 na escala arbitrária de energia do aparelho; a do canal 2 entre 330 e 600; e a do canal 3 entre 600 e 1000. Estes limites foram determinados após a análise dos espectros de cada isótopos como mostra a Figura 12. Um sistema de equações permitia a discriminação dos isótopos. O sistema de equações é o seguinte:

$$C_1 = a_1I + b_1C + c_1H \quad [1B]$$

$$C_2 = a_2I + b_2C + (1 - c_1)H \quad [2B]$$

$$C_3 = (1 - a_2 - a_1)I + (1 - b_2 - b_1)C \quad [3B]$$

onde: C_1 , C_2 e C_3 são as contagens (em cpm) nos canais 1, 2 e 3, respectivamente. I , C e H representam as cpm dos isótopos ¹³¹I, ¹⁴C e ³H, respectivamente, enquanto que a_1 , a_2 , b_1 , b_2 e c_1 , representam as frações de cada isótopo nos respectivos canais. Estes últimos coeficientes precisam ser determinados experimentalmente. Isto foi feito utilizando o procedimento descrito a seguir.

Triplicatas de padrões de [¹³¹I]albumina, [1-¹⁴C]octanoato e [³H]água eram contadas primeiramente com a janela do aparelho totalmente aberta (isto é, de 0 a 1000 na escala arbitrária; cpm totais de cada isótopo). Os canais eram então ajustados (0 a 330;

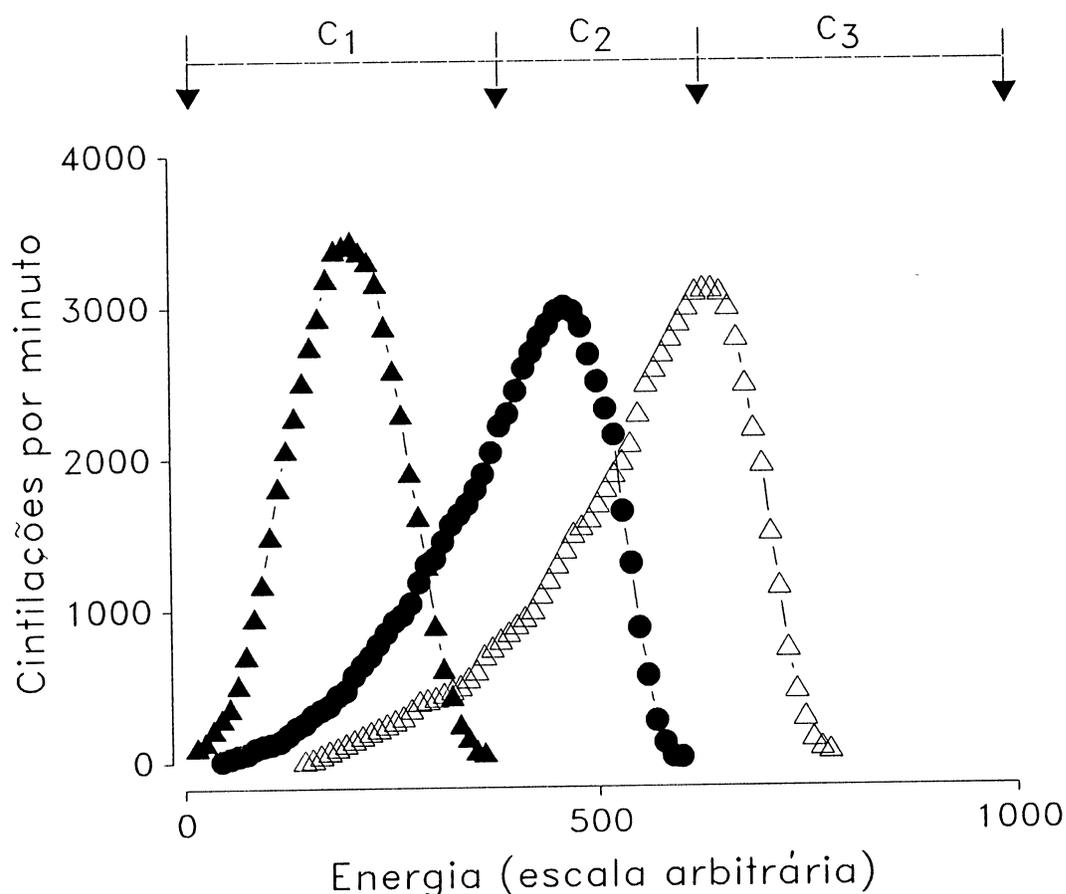


Figura 12. *Espectros de energia dos radioisótopos utilizados nos experimentos.* Amostras de [^3H]água (\blacktriangle — \blacktriangle), [^{14}C]octanoato (\bullet — \bullet) e [^{131}I]albumina (\triangle — \triangle) foram adicionadas a 5 ml de líquido de cintilação contendo toluol/Antarox CO-630^R [3:1], 5,0 g/litro de 2,5 difeniloxazol e 0,1 g/litro de 2,2 p-fenil-bis-5-fenileno oxazol. As amostras foram analisadas individualmente através do programa *spectrum search* do contador de amostras líquidas Beckman LS 6800. Todo o espectro (escala arbitrária de 0 a 1000) foi analisado. Os resultados foram expressos em cintilações por minuto (cpm) e representados contra a escala arbitrária de energia. No topo da figura estão indicadas as posições das janelas (C₁, C₂ e C₃) utilizadas na discriminação dos três isótopos, quando presentes simultaneamente nas amostras.

330 a 600; 600 a 1000) e as amostras eram novamente contadas. Com base nos valores obtidos nas duas contagens os coeficientes das equações [1B]-[3B] eram calculados utilizando as seguintes relações:

$$a_1 = (\text{cpm de } ^{131}\text{I em } C_1)/(\text{cpm totais de } ^{131}\text{I}) \quad [4B]$$

$$a_2 = (\text{cpm de } ^{131}\text{I em } C_2)/(\text{cpm totais de } ^{131}\text{I}) \quad [5B]$$

$$b_1 = (\text{cpm de } ^{14}\text{C em } C_1)/(\text{cpm totais de } ^{14}\text{C}) \quad [6B]$$

$$b_2 = (\text{cpm de } ^{14}\text{C em } C_2)/(\text{cpm totais de } ^{14}\text{C}) \quad [7B]$$

$$c_1 = (\text{cpm de } ^3\text{H em } C_1)/(\text{cpm totais de } ^3\text{H}) \quad [8B]$$

Resolvendo o sistema de equações [1B]-[3B] pode-se obter a contagem de cada isótopo, sendo que

$$H = \frac{a_2 S_4 C_3 - S_3 S_4 C_2 + a_2 S_5 C_1 - a_1 S_5 C_2}{S_1 S_5 - S_2 S_4} \quad [9B]$$

$$C = \frac{a_2 C_3 + S_2 H - S_3 C_2}{S_5} \quad [10B]$$

e

$$I = \frac{C_1 - b_1 C - c_1 H}{a_1} \quad [11B]$$

Os termos S_1 , S_2 , S_3 , S_4 e S_5 , por sua vez, significam

$$S_1 = a_2 c_1 - a_1 (1 - c_1) \quad [12B]$$

$$S_2 = (1 - a_2 - a_1)(1 - c_1) \quad [13B]$$

$$S_3 = 1 - a_2 - a_1 \quad [14B]$$

$$S_4 = a_1b_2 - a_2b_1 \quad [15B]$$

$$S_5 = a_2(1 - b_2 - b_1) - b_2(1 - a_2 - a_1) \quad [16B]$$

A determinação dos coeficientes era feita para cada uma das diferentes condições de contagem. Correções de eficiência de contagem foram feitas utilizando o método do padrão interno.

3.9.4. Determinação da quantidade injetada de [1-¹⁴C]octanoato

A determinação exata da quantidade injetada de [1-¹⁴C]-octanoato é essencial para a correta análise dos experimentos. Pode-se, simplesmente, utilizar o volume acusado pela seringa de injeção. Infelizmente, a experiência prévia tem revelado que o erro é considerável. É melhor utilizar um método baseado nas razões [¹³¹I]albumina/[1-¹⁴C]octanoato da solução injetada e do perfusado efluente. A quantidade recuperada de [¹³¹I]albumina é igual à quantidade injetada, pois esta proteína não sofre transformação significativa numa simples passagem pelo fígado. Isto implica na seguinte igualdade:

$$R = \frac{\text{cpm } [^{131}\text{I}]\text{albumina injetada}}{\text{cpm } [1-^{14}\text{C}]\text{octanoato injetado}} = \frac{\text{cpm } [^{131}\text{I}]\text{albumina recuperada}}{\text{cpm } [1-^{14}\text{C}]\text{octanoato injetado}} \quad [17B]$$

As cpm recuperadas, tanto da [¹³¹I]albumina como do [1-¹⁴C]octanoato, podem ser obtidas avaliando a área sob a curva de cpm versus tempo. Com base nas cpm recuperadas e no valor de R pode-se calcular as cpm do [1-¹⁴C]octanoato injetado:

$$\text{cpm [1-}^{14}\text{C]octanoato injetado} = \frac{\text{cpm [}^{131}\text{I]albumina recuperada}}{R}$$

[18B]

3.9.5. Determinação do consumo de oxigênio

A viabilidade do fígado e o estabelecimento de condições de estado estacionário foram deduzidos do consumo de oxigênio. O consumo de oxigênio foi monitorado através de um eletrodo de platina (Kelmer-Bracht *et al.*, 1984). Apenas a concentração venosa de oxigênio foi registrada, pois a concentração arterial é mantida constante (0,86 $\mu\text{mol/ml}$ a 37°C). A velocidade de consumo de oxigênio (v_{O_2}) foi expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ e ela pode ser calculada de acordo com a relação

$$v_{\text{O}_2} = \frac{F(0,86 - C_{v\text{O}_2})}{p} \quad [19B]$$

sendo p o peso úmido do fígado (g), F o fluxo (ml/min) e $C_{v\text{O}_2}$ a concentração venosa de oxigênio ($\mu\text{mol/ml}$).

3.9.6. Dosagens enzimáticas

O acetoacetato e o β -hidróxi-butirato foram dosados por métodos enzimáticos baseados na variação de absorbância devida ao NADH a 340 nm, usando β -hidróxi-butirato desidrogenase (Mellamby e Williamson, 1974). Amostras de 1,0 ml do perfusado foram coletadas em tubos Eppendorff contendo 0,2 ml de ácido perclórico 2 M. Os tubos foram agitados e mantidos em banho de gelo para minimizar a descarboxilação espontânea do acetoacetato. Para melhor formação do precipitado (proteínas desnaturadas) as

amostras foram colocadas em freezer por 10 minutos e centrifugadas em microcentrífuga a 8000 rpm durante 10 minutos. Para precipitação do ácido perclórico, 2 ml do sobrenadante foram adicionados a tubos contendo 100 μ l de K_2CO_3 5 M e 25 μ l de trietanolamina 1 M.

Para a dosagem de acetoacetato 0,8 ml do neutralizado foram pipetados em 0,4 ml do meio de reação contendo trietanolamina 0,5 M pH 7,0, NADH 0,24 mM e β -hidróxi-butilato desidrogenase (1 unidade). Após incubação a 37°C por aproximadamente 50 minutos foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 340 nm.

Para dosagem do β -hidróxi-butilato, 0,8 ml do neutralizado foram pipetados em 0,4 ml do meio de reação contendo tampão glicina 0,5 M mais hidrazina 0,4 M, pH 8,5, NAD^+ 7 mM e β -hidróxi-butilato desidrogenase (1 unidade). Após incubação a 37°C por aproximadamente 100 minutos foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro a 340 nm.

As velocidades de produção de acetoacetato (v_{acet}) e β -hidróxi-butilato (v_{but}) foram calculadas com base na concentração venosa dos metabólitos (C_{acet} e C_{but} ; em μ mol/ml), do fluxo através do fígado (F ; ml/min) e do peso úmido do fígado (p ; gramas) de acordo com as equações:

$$v_{acet} = \frac{F \cdot C_{acet}}{p} \quad [20B]$$

$$v_{but} = \frac{F \cdot C_{but}}{p} \quad [21B]$$

Quando calculados desta maneira v_{acet} e v_{but} têm as unidades μ mol \cdot min⁻¹ \cdot (g de peso úmido do fígado)⁻¹.

3.9.7. Quantificação da produção de $^{14}\text{CO}_2$

O $^{14}\text{CO}_2$ era captado em feniletilamina (base orgânica) após acidificação das amostras em frasco hermeticamente fechado. Nos experimentos de pulso, 0,1 ml do perfusado efluente foram pipetados em frascos de 5 ml. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha das quais pendiam internamente pequenos recipientes de plástico contendo 200 μl de feniletilamina. Após vedação hermética dos frascos, o perfusado contido no fundo dos frascos era acidificado com a introdução de 0,2 ml de HCl 1N, através de uma seringa. Após 24 a 28 horas os recipientes eram removidos e transferidos para frascos de cintilação contendo 5 ml de líquido de cintilação, seguindo-se a contagem.

Nos experimentos de infusão contínua de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, todo o perfusado efluente era coletado em frações de dois minutos em frascos de Erlenmeyer. Logo a seguir os frascos eram fechados com rolha de borracha da qual pendia um frasco de cintilação contendo 1 ml de feniletilamina. Após a vedação seguia-se a adição de 1 ml de HCl 1 N. Após 24-28 horas os frascos de cintilação eram removidos e adicionava-se líquido de cintilação, para a contagem da radioatividade. A velocidade de produção de $^{14}\text{CO}_2$ (v_{CO_2}) era calculada a partir das cpm das amostras de dois minutos (A ; $\text{cpm} \cdot 2 \text{ min}$), da atividade específica do octanoato infundido por unidade de carbono (a_{esp} ; $\text{cpm} \cdot [\mu\text{mol de unidade de carbono}]^{-1}$), do fluxo (F ; ml/min) e do peso úmido do fígado (p ; gramas):

$$v_{\text{CO}_2} = \frac{F \cdot A}{2 \cdot a_{\text{esp}} \cdot p} \quad [22B]$$

Calculada desta maneira, a velocidade de formação de $^{14}\text{CO}_2$ tem as

dimensões $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.10. Métodos numéricos

Os resultados dos experimentos de diluição de indicadores múltiplos foram sempre expressos como fração do traçador que aparecia no perfusado venoso por unidade de tempo. Esta é a unidade prevista nas equações [1A]–[7A].

Os parâmetros t_0 , θ' , k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_6 , k_{in} , k_{ef} , k_{met} e Ω , foram obtidos fazendo ajustes iterativos não-lineares de mínimos quadrados das equações [1A] a [7A] aos dados experimentais (Björck e Dahlquist, 1972). As integrais das equações [1A] a [4A] foram calculadas através do algoritmo de Romberg (Björck e Dahlquist, 1972). Como se pode deduzir de uma análise das equações [1A] a [7A], o seu cálculo requer interpolações entre os pontos experimentais das curvas da albumina. Estas interpolações foram feitas utilizando uma função *spline* modificada (Björck e Dahlquist, 1972). As derivadas parciais das diversas funções em relação a k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_6 , θ' , t_0 e Ω foram calculadas numericamente pelo método das diferenças finitas. As derivadas parciais da equação [2A] em relação a k_{in} , k_{ef} e k_{met} , no entanto, foram determinadas analiticamente.

Os tempos médios de trânsito (equação [29A]) e as integrais das curvas cpm versus tempo foram avaliadas utilizando a regra do trapézio (Björck e Dahlquist, 1972).

Os ajustes não-lineares de mínimos quadrados foram feitos com programas escritos especialmente para cada caso. Esses programas foram escritos em Turbo-Basic ou Turbo-Pascal. Simples análises de correlação linear e testes estatísticos convencionais foram feitos utilizando o programa *Primer* versão 1.0 (McGraw

Hill, Inc. 1988).

As concentrações das formas livre e ligada à albumina do octanoato, foram calculadas utilizando o algoritmo de Abumrad (Abumrad *et al.*, 1981). As constantes de dissociação obtidas por Ashbrook *et al.* (1972), estão relacionadas na Tabela 2. O algoritmo é:

$$C_e = C_{ef} + Alb_t \frac{\sum_{i=1}^m i N_i C_{ef}}{1 + \sum_{i=1}^m N_i C_{ef}} \quad [23B]$$

onde C_e é a concentração total de octanoato (livre mais ligado), Alb_t a concentração total de albumina, C_{ef} a concentração de octanoato livre e m é o número de sítios de ligação. N_i é igual a $\prod_{j=1}^i 1/K_{aj}$ e K_{aj} são as constantes de dissociação dos diversos sítios de ligação do octanoato à albumina. A determinação do valor de C_{ef} foi feita através de um programa escrito em Turbo-Basic. O programa permite a introdução de valores progressivamente mais corretos de C_{ef} até que não haja diferença significativa entre o valor calculado e o valor experimental de C_e .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspectos gerais do metabolismo do octanoato: o estabelecimento de condições de estado estacionário

A reação de um fígado em perfusão à infusão de octanoato está ilustrada na Figura 13. Esta figura mostra os resultados médios de três experimentos de perfusão, com fígados retirados de animais em jejum de 24 horas. O tempo zero é arbitrário indicando o instante no qual foi iniciada a coleta de amostras do perfusado venoso. Apesar de arbitrário, no entanto, este tempo coincide mais ou menos com a estabilização do consumo de oxigênio que se segue à instalação do órgão na câmara de perfusão. Entre zero e 10 minutos o fígado foi perfundido com meio livre de substratos. Toda a atividade metabólica do órgão, portanto, se dá às expensas de substratos endógenos, basicamente ácidos graxos. A velocidade de consumo de oxigênio está em torno de $2,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ e o fígado produz corpos cetônicos (β -hidróxi-butilato + acetoacetato; mais ou menos $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), o que testemunha a β -oxidação de ácidos graxos endógenos. O $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato $300 \mu\text{M}$ foi introduzido aos 10 minutos e sua infusão foi mantida constante até os 52 minutos. Juntamente com o octanoato foi infundida também albumina bovina livre de ácidos graxos $150 \mu\text{M}$.

As mudanças que o octanoato provoca ocorrem rapidamente. Nos experimentos da Figura 13 as amostras foram coletadas de dois em dois minutos. Por isto, pode-se dizer que no máximo aos quatro minutos após a introdução do octanoato, o metabolismo já atingiu um novo estado estacionário (*steady-state*), pelo menos no que toca ao consumo de oxigênio e à liberação de corpos cetônicos, sendo que ambos aumentam. Embora haja um pequeno decréscimo na

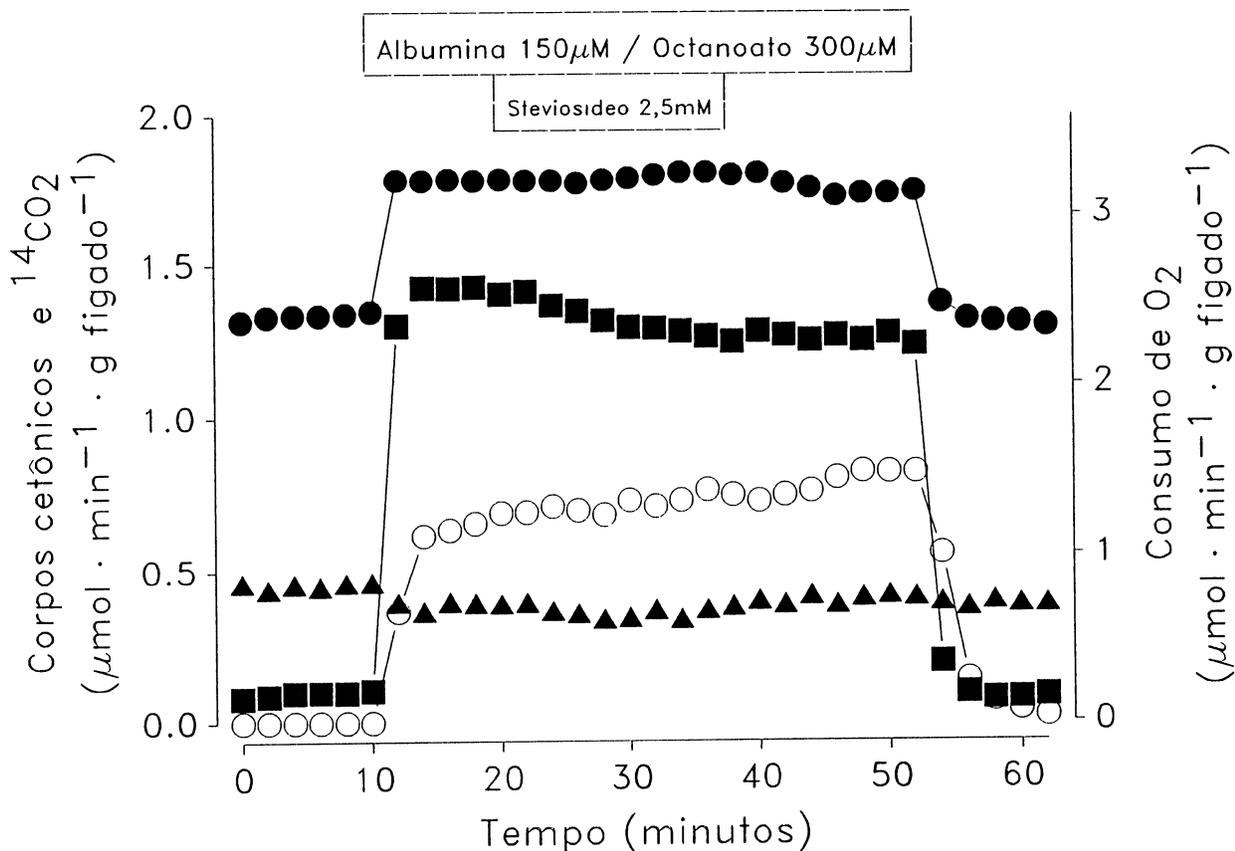


Figura 13. *Resposta metabólica do fígado à infusão de octanoato 300 μM .* Fígados de ratos mantidos em jejum de 24 horas foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4). O consumo de oxigênio foi monitorado polarograficamente. Amostras do perfusado começaram a ser coletadas após estabilização do consumo de oxigênio e em intervalos de 2 minutos. A escala de tempo foi zerada a partir do tempo de coleta da primeira amostra. Entre os 10 e 52 minutos, o líquido de perfusão continha [1- ^{14}C]-octanoato 300 μM (3 $\mu\text{Ci/litro}$) e albumina 150 μM , e entre os 20 e 38 minutos continha adicionalmente steviosídeo 2,5 mM, conforme indicado pelas barras horizontais. β -Hidróxi-butilato e acetoacetato foram dosados enzimaticamente. O $^{14}\text{CO}_2$ formado foi captado em feniletilamina e a radioatividade contada. Todos os valores foram expressos como $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Os resultados são a média de três experimentos de perfusão. Legendas: consumo de oxigênio, ●—●; produção de β -hidróxi-butilato, ■—■; produção de acetoacetato, ▲—▲; produção de $^{14}\text{CO}_2$, o—o.

produção de acetoacetato, a produção de β -hidróxi-butirato aumenta de $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para $1,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, o que acaba se traduzindo num aumento muito grande na produção de corpos cetônicos. Com a infusão de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato passa a haver também produção de $^{14}\text{CO}_2$, que vem especificamente do octanoato marcado. Quando a infusão de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato é interrompida, aos 52 minutos, cessa a produção de $^{14}\text{CO}_2$ bem como as ativações do consumo de oxigênio e da produção de corpos cetônicos.

Note-se que nos experimentos da Figura 13 foi infundido steviosídeo durante 18 minutos, entre os 20 e 38 minutos de perfusão. O composto não chega a provocar alterações significativas, bem ao contrário do que ocorre em experimentos semelhantes com ácidos graxos de cadeia longa, palmitato por exemplo (Constantin *et al.*, 1991). No caso do palmitato, o steviosídeo inibe o aumento no consumo de oxigênio, o aumento na produção de corpos cetônicos e a produção de $^{14}\text{CO}_2$. Isto tem sido interpretado como uma consequência da inibição do transporte de palmitato (Bracht *et al.*, 1988). A ausência de efeitos do steviosídeo sobre o metabolismo do octanoato, portanto, já indica que, no tocante ao transporte, palmitato e octanoato têm comportamentos diferentes.

Para os experimentos de diluição de indicadores, que são o objetivo principal deste trabalho, os dados da Figura 13 fornecem um dado muito importante: o de que o novo estado estacionário após o início da infusão de octanoato é atingido muito rapidamente, demorando no máximo 4 minutos. Portanto, a injeção de traçadores poderá se dar a qualquer tempo depois dos quatro minutos iniciais da infusão de octanoato.

4.2. Experimentos de diluição de indicadores com $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato

Nos experimentos da Figura 13 o octanoato marcado foi infun-

didado simultaneamente à infusão do octanoato não-marcado. Nos experimentos de diluição de indicadores infunde-se primeiramente o octanoato não-marcado nas concentrações desejadas e, após o tempo necessário para atingir condições de estado estacionário, injeta-se uma mistura contendo quantidades-traço de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, $[^{131}\text{I}]$ albumina e $[^3\text{H}]$ água. Assim, apenas o traçador não estará no estado estacionário (ver item 2.: *Bases matemáticas da análise de experimentos de diluição de indicadores*). Neste trabalho, foram feitos experimentos de diluição de indicadores com octanoato na faixa entre 50 e 500 μM com três diferentes concentrações de albumina: 50, 150 e 450 μM . Esta última concentração está dentro da faixa fisiológica.

4.2.1. Os experimentos com albumina 450 μM

Os resultados de quatro experimentos com albumina 450 μM e octanoato 100, 200, 300 e 500 μM estão mostrados nas Figuras 14 e 15. A Tabela 5 relaciona alguns dos parâmetros que foram obtidos dos experimentos dessa série.

Nos gráficos da Figura 14, a fração de cada traçador que apareceu no perfusado venoso por segundo (que também poderia ser chamada de velocidade de efluxo dos traçadores) foi representada contra o tempo após a injeção. Trata-se, portanto, de curvas normalizadas, sendo que a área sob cada curva será igual à unidade caso não haja nenhuma perda ou transformação do traçador, o que é verdadeiro para a $[^{131}\text{I}]$ albumina e para a $[^3\text{H}]$ água. Já para o $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, a área será menor que a unidade, pois uma certa fração desse composto sempre é transformada metabolicamente. Como se vê na Figura 14, os fenômenos ocorrem na faixa dos segundos, principalmente no tocante à $[^{131}\text{I}]$ albumina e ao $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, que aparecem mais cedo que a $[^3\text{H}]$ água. A

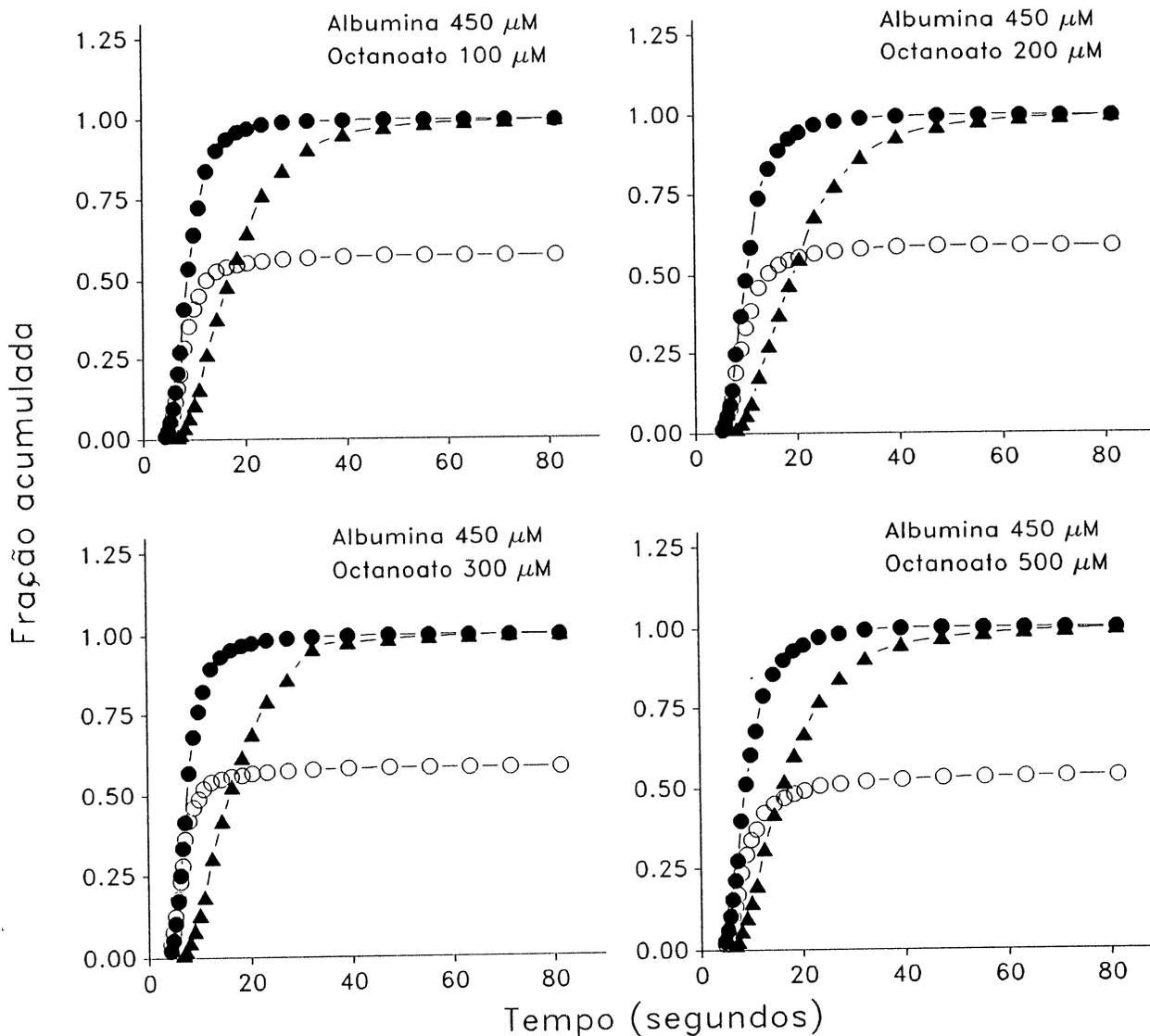


Figura 15. *Frações acumuladas das curvas de diluição da Figura 14.* Os dados experimentais são os mesmos da Figura 14. Para cada ponto experimental de cada uma das curvas da Figura 14 foi feita uma integração entre o tempo zero e o tempo desse ponto experimental. O método de integração utilizado foi a regra do trapézio. As frações acumuladas foram representadas contra o tempo após a injeção. Legendas: [1-¹⁴C]octanoato, o—o; [1³¹I]albumina, ●—●; [³H]água, ▲—▲.

Tabela 5

Parâmetros experimentais de uma série de experimentos de diluição de indicadores com [1-¹⁴C]octanoato, realizados com albumina 450 μ M no perfusado. Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo albumina 450 μ M, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Octanoato foi infundido na faixa de 100 a 500 μ M. Após o estabelecimento de condições de estado estacionário, uma mistura contendo os traçadores [1-¹⁴C]octanoato, [¹³¹I]albumina e [³H]água foi injetada na entrada da veia porta e o perfusado venoso foi fracionado e analisado conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A concentração extracelular média, C_e , foi calculada de acordo com a equação [28A]. A concentração extracelular livre de octanoato, C_{ef} , foi determinada usando o algoritmo de *Abumrad et al.* (1981; equação [23B]). \bar{t}_{alb} e $\bar{t}_{água}$ foram determinados usando a equação [29A]. A velocidade de metabolização, F_{met}^* , foi calculada de acordo com a equação [31A].

NO	Octanoato na veia porta (μ M)	Extração numa única passagem (%)	C_e (μ M)	C_{ef} (μ M)	\bar{t}_{alb} (segundos)	$\bar{t}_{água}$ (segundos)	F_{met}^* (μ mol \cdot min ⁻¹ \cdot ml ⁻¹)
1	100 (n=3)	39,4 \pm 2,5	77,0 \pm 0,2	5,1 \pm 0,1	10,4 \pm 0,3	20,1 \pm 0,8	0,24 \pm 0,005
2	200 (n=3)	38,7 \pm 1,2	156,0 \pm 1,5	10,5 \pm 0,5	11,6 \pm 0,3	22,4 \pm 0,6	0,43 \pm 0,02
3	300 (n=3)	42,0 \pm 3,0	228,0 \pm 6,0	16,5 \pm 0,5	9,7 \pm 0,3	19,8 \pm 0,4	0,77 \pm 0,06
4	400 (n=3)	42,1 \pm 2,4	304,0 \pm 6,0	24,0 \pm 0,6	10,8 \pm 0,6	20,6 \pm 1,2	1,04 \pm 0,01
5	500 (n=3)	47,4 \pm 1,1	362,0 \pm 4,0	30,0 \pm 0,4	11,6 \pm 0,7	19,9 \pm 0,7	1,69 \pm 0,11

amplitude também é maior quando comparada com a água triciada, porém, as curvas do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato têm o pico bastante atenuado, o que nas condições dos experimentos da Figura 14 se deve, basicamente, à transformação metabólica que o ácido graxo sofre. Note-se, além do mais, que as curvas do octanoato estão sempre incluídas no envelope da curva da $[^{131}\text{I}]$ albumina. Uma análise cuidadosa revela também que a curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato tende a ser mais e mais comprimida à medida que aumenta a concentração e também, que o seu pico tende a se deslocar mais em direção ao pico da $[^{131}\text{I}]$ albumina à medida que aumenta a concentração.

Uma forma alternativa de apresentar os dados de experimentos de diluição com injeção única de traçadores é aquela mostrada na Figura 15. Os gráficos da Figura 15 resultam dos mesmos experimentos mostrados na Figura 14. A diferença está em que a Figura 15 mostra as integrais das curvas de diluição da Figura 14. Isto equivale a representar a fração acumulada do traçador efluente em função do tempo. Se nos experimentos os traçadores tivessem sido infundidos continuamente ao invés de terem sido injetados num único pulso, as curvas resultantes seriam exatamente aquelas mostradas na Figura 15. Em outras palavras, as curvas resultantes de uma infusão contínua correspondem às integrais das curvas resultantes da injeção única; e, logicamente também, as curvas de diluição resultantes de injeção única correspondem à derivada primeira das curvas de diluição resultantes de infusão contínua (Meier e Zierler, 1954).

Mas, o tipo de representação da Figura 15 permite visualizar melhor a recuperação da $[^{131}\text{I}]$ albumina e da $[^3\text{H}]$ água: ambas as curvas sempre tendem assintoticamente à unidade. A $[^3\text{H}]$ água sempre aparece um pouco mais tarde que a $[^{131}\text{I}]$ -albumina. Já as curvas do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato têm suas fases ascen-

dentes iniciais, sempre próximas às curvas da [^{131}I]albumina. No entanto, ao redor dos 10 segundos após a injeção elas se diferenciam bastante e as curvas do [$1\text{-}^{14}\text{C}$]octanoato aproximam-se assintoticamente de valores bem abaixo da unidade, o que denota a transformação metabólica.

Outras informações sobre a série de experimentos com albumina 450 μM podem ser obtidas da Tabela 5. Esta tabela relaciona os valores médios dos experimentos com albumina 450 μM e octanoato na faixa de 100 a 500 μM . Além da concentração portal de octanoato, estão relacionadas a concentração extracelular média (C_e), a concentração extracelular média livre (C_{eF}), os tempos médios de trânsito da [^{131}I]albumina e da [^3H]água, a fração de octanoato extraída numa única passagem e a velocidade de metabolização calculada de acordo com a equação [31A] (F_{met}^*). Vários desses parâmetros serão úteis numa fase posterior da análise dos resultados deste trabalho. É necessário, no entanto, fazer alguns comentários sobre algumas particularidades desses parâmetros.

Pode-se verificar que a fração extraída aumenta um pouco quando se aumenta a concentração portal de octanoato na faixa entre 100 e 500 μM com a albumina fixa em 450 μM . Se a fração extraída fosse constante haveria um aumento diretamente proporcional à concentração na velocidade de metabolização. Como a fração extraída aumenta um pouco, a velocidade de metabolização, F_{met}^* , tende a acelerar. Para um aumento de 5 vezes na concentração portal de octanoato (100 a 500 μM), a velocidade de metabolização aumenta em cerca de 7 vezes. A diferença persiste mesmo que se considere a concentração média livre, C_{eF} , a qual aumenta em cerca de 6 vezes na mesma faixa.

Note-se ainda que C_e , a concentração extracelular média, calculada de acordo com a equação [28A], é sempre bem menor do

que a concentração portal. Na verdade, C_a será tanto mais próxima da concentração portal quanto menor for a fração extraída numa única passagem pelo fígado.

4.2.2. Os experimentos com albumina 150 μM

Resultados representativos da série de experimentos com albumina 150 μM estão mostrados nas Figuras 16 e 17. Médias de vários parâmetros obtidos de todos os experimentos estão relacionadas na Tabela 6.

A Figura 16 mostra curvas de diluição obtidas com octanoato 100, 200, 330 e 490 μM . Comparando essas curvas com aquelas obtidas com albumina 450 μM nota-se logo que a amplitude dos picos das curvas do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato com albumina 150 μM está bem menor, e tende a diminuir quando se aumenta a concentração entre 100 e 490 μM . Além da amplitude diminuir, a curva se desloca progressivamente para a direita à medida que a concentração aumenta. Com octanoato 490 μM , o pico da curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato situa-se numa posição intermediária entre os picos das curvas da $[^{131}\text{I}]$ albumina e da $[^3\text{H}]$ água.

A integração das curvas de diluição da Figura 16, mostrada na Figura 17, revela muito bem o progressivo deslocamento da curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato em direção à curva da $[^3\text{H}]$ água. As curvas integradas da Figura 17 revelam também que, à medida que aumenta a concentração de octanoato, as curvas do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato tendem assintoticamente a valores maiores, *i.e.*, a fração extraída numa única passagem tende a diminuir com a concentração.

Este último fenômeno é melhor apreciado nos valores listados na Tabela 6. Com octanoato 100 μM a fração extraída foi de $65,5 \pm 3,6\%$; com octanoato 490 μM ela baixou para $55,5 \pm 5,4\%$. Não é um decréscimo muito grande, mas ele está em contraste com o que

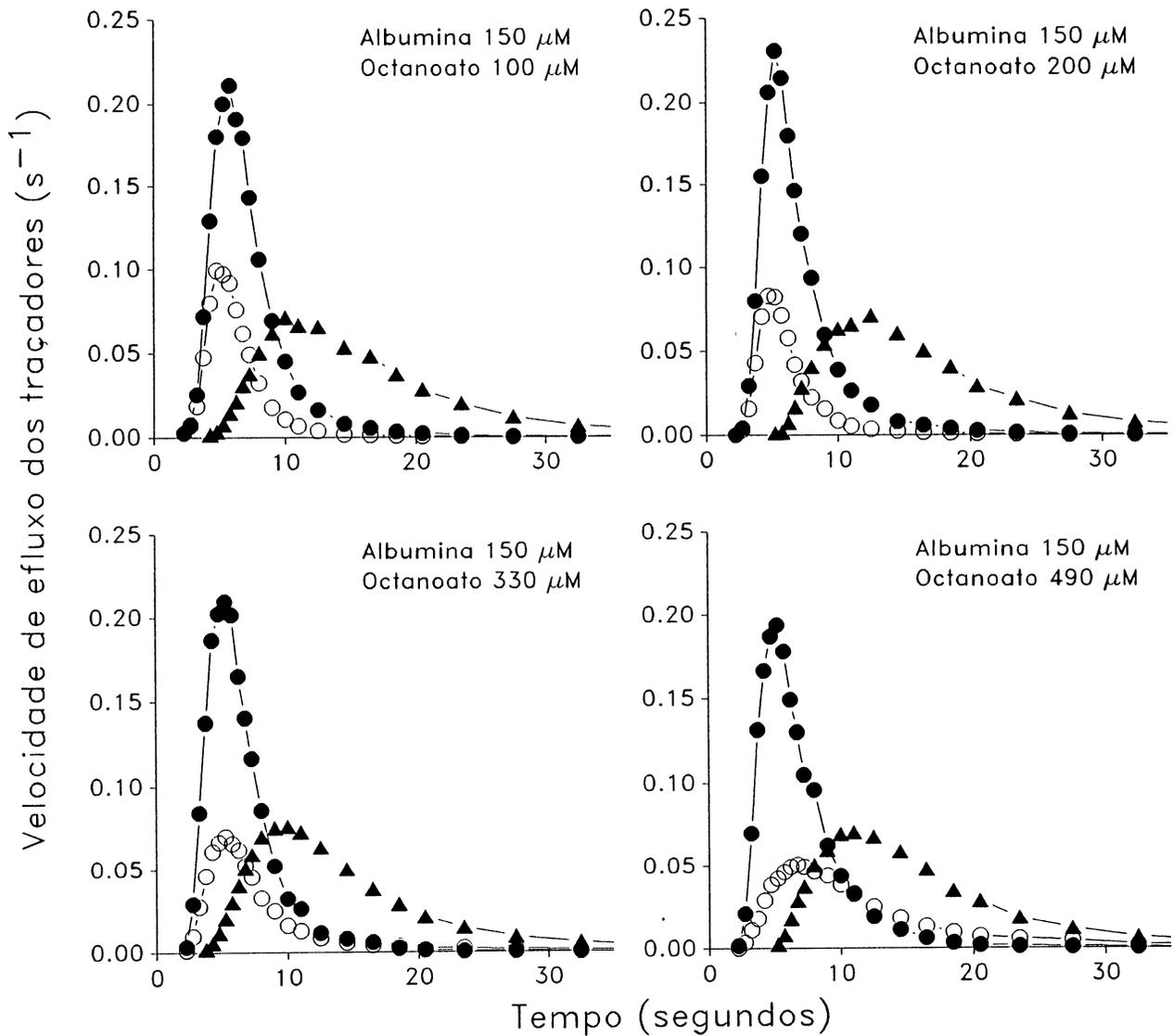


Figura 16. *Curvas de diluição de [1-¹⁴C]octanoato mais referências com várias concentrações de octanoato e com albumina 150 μM.* Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) contendo albumina 150 μM e octanoato nas concentrações indicadas em cada gráfico. Em cada experimento, quantidades-traço de [1-¹⁴C]octanoato (o—o), [¹³¹I]albumina (●—●) e [³H]água (▲—▲) foram injetadas simultaneamente na entrada da veia porta. O perfusado efluente foi coletado em frações de 0,5 a 2,0 segundos. As frações da radioatividade injetada que apareceram por segundo foram representadas contra o tempo após a injeção.

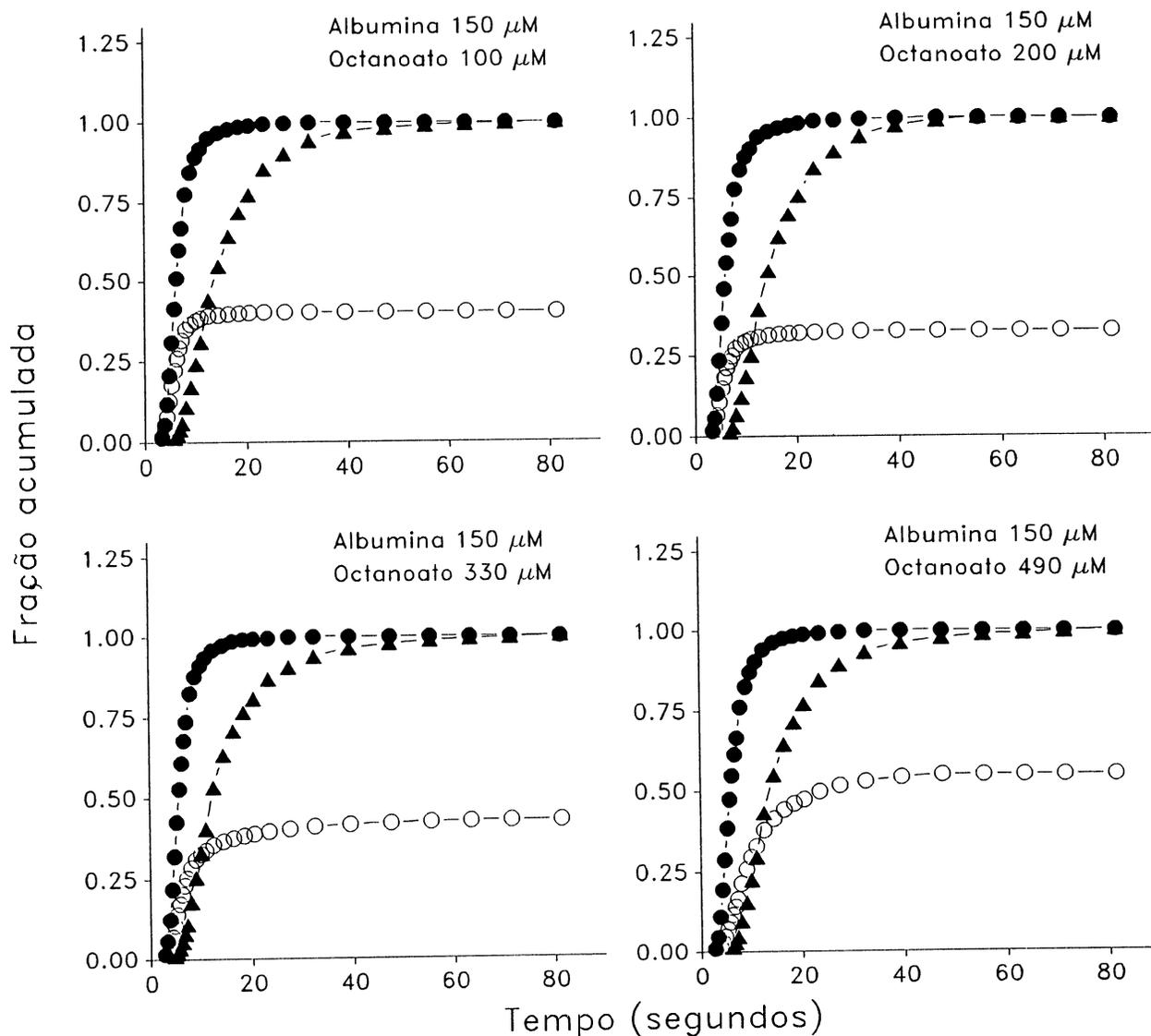


Figura 17. *Frações acumuladas das curvas de diluição da Figura 16.* Os dados experimentais são os mesmos da Figura 16. Para cada ponto experimental de cada uma das curvas da Figura 16 foi feita uma integração entre o tempo zero e o tempo desse ponto experimental. O método de integração utilizado foi a regra do trapézio. As frações acumuladas foram representadas contra o tempo após a injeção. Legendas: $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, o—o; $[^{131}\text{I}]$ albumina, ●—●; $[^3\text{H}]$ água, ▲—▲.

Tabela 6

Parâmetros experimentais de uma série de experimentos de diluição de indicadores com [1-¹⁴C]octanoato, realizados com albumina 150 μ M no perfusado. Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo albumina 150 μ M, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Octanoato foi infundido na faixa de 50 a 490 μ M. Após o estabelecimento de condições de estado estacionário, uma mistura contendo os traçadores [1-¹⁴C]octanoato, [¹³¹I]albumina e [³H]água foi injetada na entrada da veia porta e o perfusado venoso foi fracionado e analisado conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A concentração extracelular média, C_e , foi calculada de acordo com a equação [28A]. A concentração extracelular livre de octanoato, C_{ef} , foi determinada usando o algoritmo de *Abumrad et al.* (1981; equação [23B]). \bar{t}_{alb} e $\bar{t}_{água}$ foram determinados usando a equação [29A]. A velocidade de metabolização, F_{met}^* , foi calculada de acordo com a equação [31A].

Nº	Octanoato na veia porta (μ M)	Extração numa única passagem (%)	C_e (μ M)	C_{ef} (μ M)	\bar{t}_{alb} (segundos)	$\bar{t}_{água}$ (segundos)	F_{met}^* (μ mol \cdot min ⁻¹ \cdot ml ⁻¹)
1	50	59,9	31,7	5,5	7,2	17,8	0,18
2	100 (n=3)	65,5 \pm 3,6	60,5 \pm 2,2	11,2 \pm 0,5	8,3 \pm 0,5	19,4 \pm 0,9	0,35 \pm 0,002
3	200	67,5	114,0	23,2	7,5	18,0	0,78
4	250	69,9	137,2	29,1	13,9	25,2	0,90
5	330 (n=3)	55,7 \pm 3,3	217,0 \pm 5,0	53,6 \pm 1,4	7,9 \pm 0,7	16,6 \pm 0,1	1,46 \pm 0,18
6	400 (n=5)	56,4 \pm 0,02	263,0 \pm 6,0	68,3 \pm 2,4	9,4 \pm 0,1	18,7 \pm 0,1	1,47 \pm 0,1
7	490 (n=4)	55,5 \pm 5,4	341,0 \pm 17,0	99,6 \pm 7,1	7,5 \pm 0,3	17,8 \pm 0,3	1,45 \pm 0,19

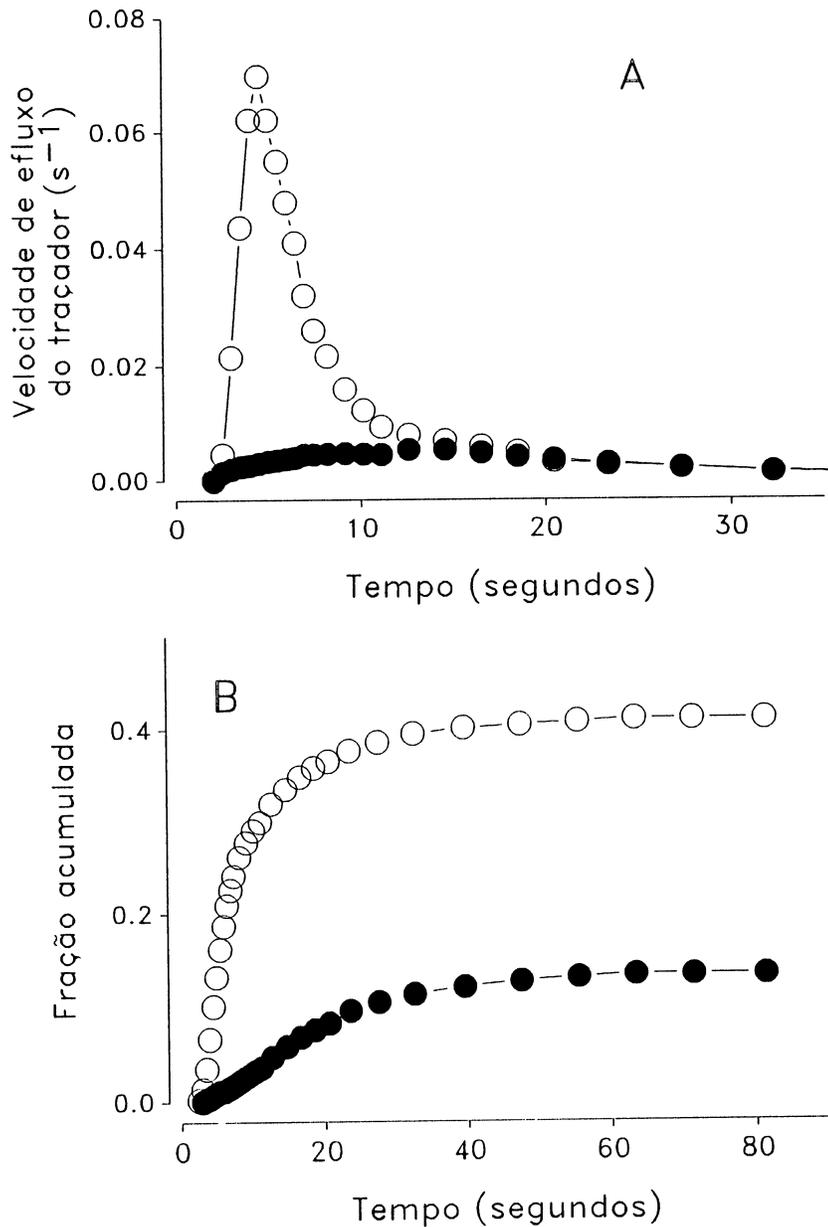


Figura 18. Comparação da curva de diluição de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato com a curva de aparecimento do $^{14}\text{CO}_2$. Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) contendo albumina $150\ \mu\text{M}$ e octanoato $100\ \mu\text{M}$. Quantidades-traço de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato (o—o), $[^{131}\text{I}]$ albumina (não mostrada) e $[^3\text{H}]$ água (não mostrada) foram injetadas simultaneamente na entrada da veia porta. O perfusado efluente foi coletado em frações de 0,5 a 2,0 segundos. O $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato (o—o) foi extraído das amostras conforme descrito em *Materiais e Métodos*. O $^{14}\text{CO}_2$ (●—●) foi captado em feniletilamina, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A: frações da radioatividade injetada que apareceram por segundo; B: frações acumuladas.

ocorre na série de experimentos com albumina 450 μM , onde houve um pequeno aumento na fração extraída. Isto se reflete na relação entre a concentração portal e as velocidades de metabolização. De acordo com a Tabela 6, enquanto a concentração portal de octanoato aumentou em 9,8 vezes (de 50 a 490 μM) a velocidade de metabolização aumentou em 8,06 vezes. Maior ainda é a diferença quando se compara o aumento da metabolização com o aumento na concentração livre média ($C_{e,r}$). Esta última aumentou de 5,5 para 99,6 μM , isto é, 18,1 vezes.

Em alguns dos experimentos da série com albumina 150 μM mediu-se, além da curva de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, a produção de $^{14}\text{CO}_2$. Como se verá adiante, a curva de aparecimento do $^{14}\text{CO}_2$ não terá utilidade nos cálculos dos parâmetros de transporte e metabolismo. Porém, não deixa de ser interessante uma comparação da cinética de aparecimento do $^{14}\text{CO}_2$ com a curva de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato. Os resultados de um experimento típico estão mostrados na Figura 18. O $^{14}\text{CO}_2$ aparece bem mais tarde que o $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, o que de certa forma é esperado, pois se trata de um produto deste último. O pico da curva do $^{14}\text{CO}_2$ está em torno de 15 segundos, enquanto que o pico do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato está em torno de 5 segundos. Quanto à fração da radioatividade injetada que aparece como $^{14}\text{CO}_2$, ela está em torno de 18%, conforme revelado pela tendência assintótica da curva integrada na Figura 18B. Isto é bastante, pois como a fração de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato extraída pelo fígado se situa em torno 60%, isto significa que 30% do octanoato metabolizado acaba sendo transformado em CO_2 . Estes números, naturalmente, são válidos apenas para octanoato

portal 100 μM e albumina 150 μM .

4.2.3. Os experimentos com albumina 50 μM

Uma outra série de experimentos foi realizada com albumina 50 μM . Resultados representativos podem ser vistos nas Figuras 19 e 20 e valores médios de vários parâmetros estão listados na Tabela 7.

O comportamento do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato com albumina 50 μM segue a mesma tendência já verificada com albumina 450 e 150 μM : com aumentos na concentração de octanoato portal a curva tende a ficar comprimida e progressivamente deslocada para a direita. Como mostra a Figura 19, no entanto, com albumina 50 μM , esta tendência é muito mais acentuada. Com octanoato 90 μM o pico da curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato situa-se à esquerda do pico da $[^{131}\text{I}]$ -albumina. Com octanoato portal 300 μM , o pico passa a se situar entre os picos da $[^{131}\text{I}]$ albumina e da $[^3\text{H}]$ água. E, finalmente, com octanoato portal 470 μM , o pico da curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato passa a se situar à direita do pico da curva da $[^3\text{H}]$ água. O retardamento do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato acentua-se muito, portanto, o que significa que o seu espaço aparente aumenta muito, a ponto de superar o espaço aquoso.

A área sob as curvas do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato é bem pequena, o que significa que a fração extraída é bastante alta. Isto pode ser melhor avaliado na Figura 20, que mostra as integrais das curvas da Figura 19. Como se pode deduzir das curvas da Figura 20, a fração extraída diminui quando se aumenta a concentração de octanoato portal, fato também observado com albumina 150 μM . Na Figura 20 fica também evidente o deslocamento da curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato em relação às curvas das referências. Com octanoato 470 μM a curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato está praticamente toda situada

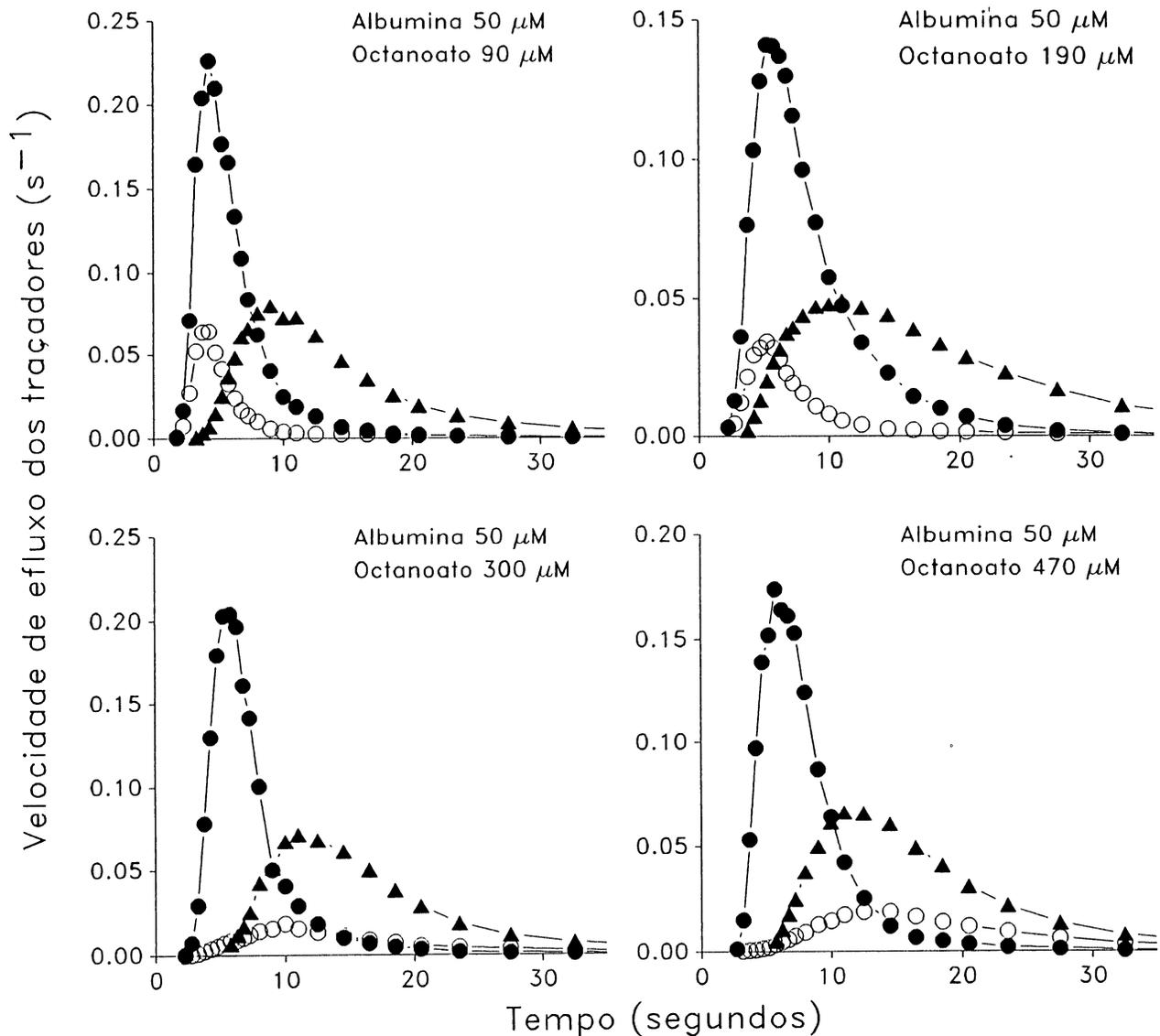


Figura 19. *Curvas de diluição de [1-¹⁴C]octanoato mais referências com várias concentrações de octanoato e com albumina 50 μM.* Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) contendo albumina 50 μM e octanoato nas concentrações indicadas em cada gráfico. Em cada experimento, quantidades-traço de [1-¹⁴C]octanoato (o—o), [¹³¹I]albumina (●—●) e [³H]água (▲—▲) foram injetadas simultaneamente na entrada da veia porta. O perfusado efluente foi coletado em frações de 0,5 a 2,0 segundos. As frações da radioatividade injetada que apareceram por segundo foram representadas contra o tempo após a injeção.

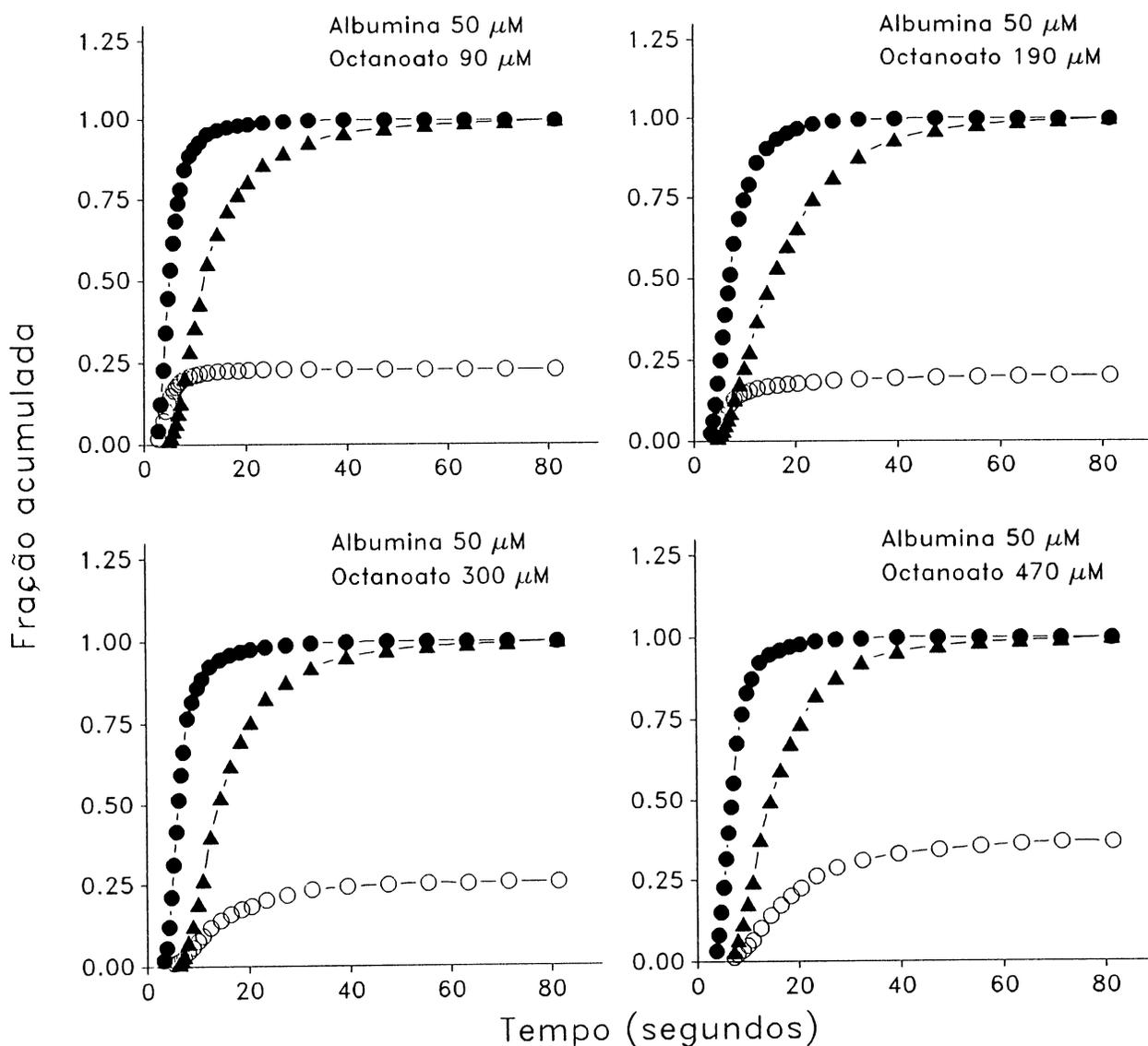


Figura 20. *Frações acumuladas das curvas de diluição da Figura 19.* Os dados experimentais são os mesmos da Figura 19. Para cada ponto experimental de cada uma das curvas da Figura 19 foi feita uma integração entre o tempo zero e o tempo desse ponto experimental. O método de integração utilizado foi a regra do trapézio. As frações acumuladas foram representadas contra o tempo após a injeção. Legendas: [1-¹⁴C]octanoato, o—o; [¹³¹I]albumina, ●—●; [³H]água, ▲—▲.

Tabela 7

Parâmetros experimentais de uma série de experimentos de diluição de indicadores com [1-¹⁴C]octanoato, realizados com albumina 50 μ M no perfusado. Fígados de ratos alimentados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo albumina 50 μ M, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Octanoato foi infundido na faixa de 50 a 470 μ M. Após o estabelecimento de condições de estado estacionário, uma mistura contendo os traçadores [1-¹⁴C]octanoato, [¹³¹I]albumina e [³H]água foi injetada na entrada da veia porta e o perfusado venoso foi fracionado e analisado conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A concentração extracelular média, C_e , foi calculada de acordo com a equação [28A]. A concentração extracelular livre de octanoato, C_{ex} , foi determinada usando o algoritmo de *Abumrad et al.* (1981; equação [23B]). \bar{t}_{a1b} e \bar{t}_{a2ua} foram determinados usando a equação [29A]. A velocidade de metabolização, F_{met}^* , foi calculada de acordo com a equação [31A].

NO	Octanoato na veia porta (μ M)	Extração numa única passagem (%)	C_e (μ M)	C_{ex}	\bar{t}_{a1b} (segundos)	\bar{t}_{a2ua}	F_{met}^* (μ mol \cdot min ⁻¹ \cdot ml ⁻¹)
1	50	86,8	18,2	7,1	8,2	19,7	0,23
2	90 (n=3)	85,3 \pm 5,7	37,0 \pm 7,8	15,5 \pm 3,6	7,3 \pm 1,1	17,9 \pm 1,3	0,45 \pm 0,04
3	190 (n=5)	84,3 \pm 1,8	81,0 \pm 7,0	37,1 \pm 3,8	8,6 \pm 0,8	18,3 \pm 0,8	1,01 \pm 0,09
4	300 (n=4)	61,7 \pm 4,3	191,0 \pm 5,1	106,9 \pm 6,5	11,1 \pm 1,1	21,9 \pm 1,2	1,05 \pm 0,12
5	370 (n=3)	62,5 \pm 4,2	233,0 \pm 20,0	136,6 \pm 15,0	8,6 \pm 0,9	18,4 \pm 0,2	1,39 \pm 0,07
6	470 (n=5)	49,6 \pm 3,4	356,0 \pm 13,0	231,5 \pm 10,9	8,8 \pm 0,4	17,9 \pm 0,1	1,26 \pm 0,06

à direita da curva da [^3H]água. O [1- ^{14}C]octanoato chega, portanto, a se comportar de modo semelhante ao ácido niflúmico, droga lipofílica cujas curvas de diluição se situam sempre à direita da curva da [^3H]água (Kelmer-Bracht *et al.*, 1993).

A Tabela 7 permite avaliar melhor a variação da fração extraída com a concentração portal de octanoato. Ela varia de 86,8% com octanoato portal 50 μM para 49,6% com octanoato portal igual a 470 μM . Como a fração extraída cai de modo acentuado, a variação da velocidade de metabolização, naturalmente, deve ser bem menor do que a variação da concentração. De fato, a velocidade de metabolização (F_{met}^*) aumentou em 5,5 vezes na faixa de octanoato portal de 50 a 470 μM . O aumento na concentração portal, como é fácil de calcular, é de 9,4 vezes. A concentração média livre aumentou muito mais, exatamente 32,6 vezes.

4.3. O ajuste de um modelo às curvas de diluição do [1- ^{14}C]octanoato

4.3.1. Considerações preliminares

Tudo o que se pode obter das curvas de diluição do [1- ^{14}C]octanoato sem uma análise matemática mais sofisticada, está relacionado nas Tabelas 5 a 7. Não é muita coisa. É verdade que se pode obter a velocidade de metabolização, mas não há nenhuma informação quantitativa sobre as velocidades de transporte e sobre a distribuição intracelular do octanoato. Pode-se apenas deduzir pela forma das curvas do [1- ^{14}C]octanoato que o seu espaço aparente de distribuição tende a aumentar quando se aumenta a razão octanoato/albumina.

Na busca do mecanismo que descreve o comportamento do

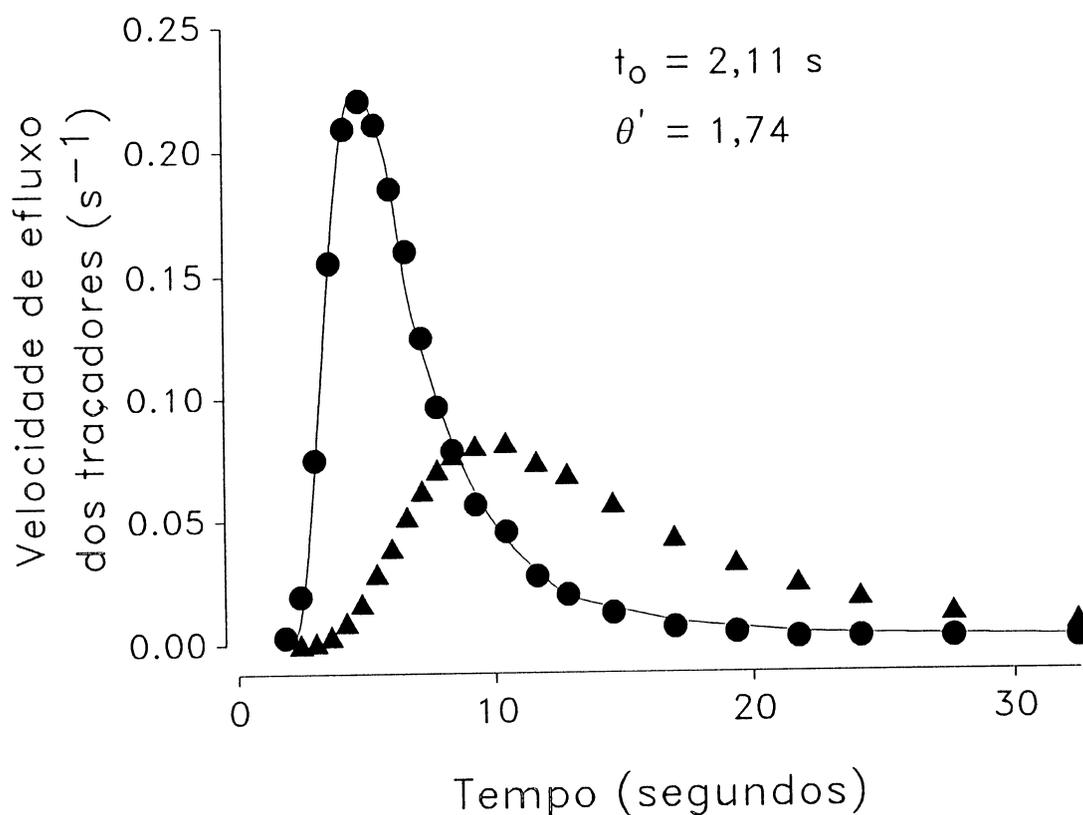


Figura 21. *Sobreposição da curva da $[^3H]$ -água à curva da $[^{131}I]$ -albumina.* Os valores experimentais das curvas da $[^{131}I]$ -albumina (\bullet) e da $[^3H]$ -água (\blacktriangle) de um experimento de diluição de indicadores estão representados. A curva que une os pontos da curva da $[^{131}I]$ -albumina foi calculada de acordo com a equação [7A] com os valores otimizados de t_0 e θ' indicados. Os valores otimizados foram obtidos por um ajuste de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

[1-¹⁴C]octanoato deve-se levar em conta o que já se sabe sobre a velocidade com que esse ácido graxo dissocia da albumina para entrar em fases fosfolipídicas. Conforme foi descrito na *Introdução*, a velocidade de dissociação do octanoato em direção a fosfolipídeos é extremamente elevada (veja Tabela 1), diferindo em pelo menos quatro ordens de grandeza da velocidade de dissociação dos complexos da albumina com ácidos graxos de cadeia longa. De todos os mecanismos discutidos na secção *As bases matemáticas da análise de experimentos de diluição de indicadores*, aquele que descreve uma rápida passagem do octanoato para a membrana celular está esquematizado nas Figuras 4 (apenas traçador) e 10 (estado estacionário). Se o octanoato passar da membrana plasmática para o interior da célula de forma irreversível, a equação [5A] deverá bastar para descrever as curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato. Se, no entanto, houver retorno do espaço celular para a membrana plasmática, a equação [4A], que contém o parâmetro para este retorno, deverá ser a descrição adequada da curva de diluição do [1-¹⁴C]octanoato. Se os dados ajustarem à equação [5A], apenas os parâmetros Ω e k_3 poderão ser obtidos; se a equação [4A] for necessária, k_4 e k_5 também poderão ser determinados. Antes de mais nada, porém, será necessário obter uma estimativa independente de t_0 (o tempo de trânsito pelos grandes vasos) e de θ' (a razão do espaço intracelular para o espaço extracelular).

4.3.2. O cálculo de t_0 e θ'

A equação [7A] fornece as bases quantitativas para a obtenção de t_0 e θ' . Uma análise desta equação revela que deveria ser possível transformar a curva da [³H]água de tal forma que ela se

sobreponha à curva da [^{131}I]albumina, ou vice-versa. A sobreposição será tanto melhor quanto mais corretos estiverem os valores de t_0 e θ' . O método dos mínimos quadrados pode ser usado para otimizar os valores de t_0 e θ' . A Figura 21 ilustra o procedimento com os dados de um experimento escolhido ao acaso. Os pontos representam as curvas experimentais da [^{131}I]albumina (\bullet) e da [^3H]água (\blacktriangle). A linha contínua que passa através dos pontos experimentais da curva da [^{131}I]albumina é a curva transformada da [^3H]água, obtida com $t_0 = 2,11$ segundos e $\theta' = 1,74$. Para a transformação, os tempos da curva da [^3H]água, subtraídos de t_0 , são encurtados pelo fator $(1 + \theta')$ e novamente somados a t_0 ; e, a amplitude é aumentada pelo mesmo fator $(1 + \theta')$. Como se pode ver, a curva traçada cobre bem os pontos experimentais da [^{131}I]albumina.

O procedimento ilustrado pela Figura 21 foi utilizado para todos os experimentos de diluição de indicadores deste trabalho listados nas Tabelas 5 a 7 e os valores de t_0 e θ' obtidos foram inseridos nas equações [4A] ou [5A].

4.3.3. Ajustes de mínimos quadrados das equações [4A] e [5A] aos dados experimentais

As Figuras 22 a 27 ilustram o ajuste das equações [4A] ou [5A] aos dados experimentais. Os dados essenciais de cada experimento estão listados no lado direito superior de cada gráfico, juntamente com os valores otimizados dos parâmetros, t_0 , θ' , Ω , k_3 , k_4 e k_8 . Nas Figuras 22, 24 e 26, as curvas experimentais do [$1\text{-}^{14}\text{C}$]octanoato estão representadas pelos círculos cheios (\bullet) enquanto que a linha contínua que passa pelos pontos é a curva calculada com os valores otimizados dos parâmetros. A linha tracejada (----) é a curva da nova referência, que conforme as

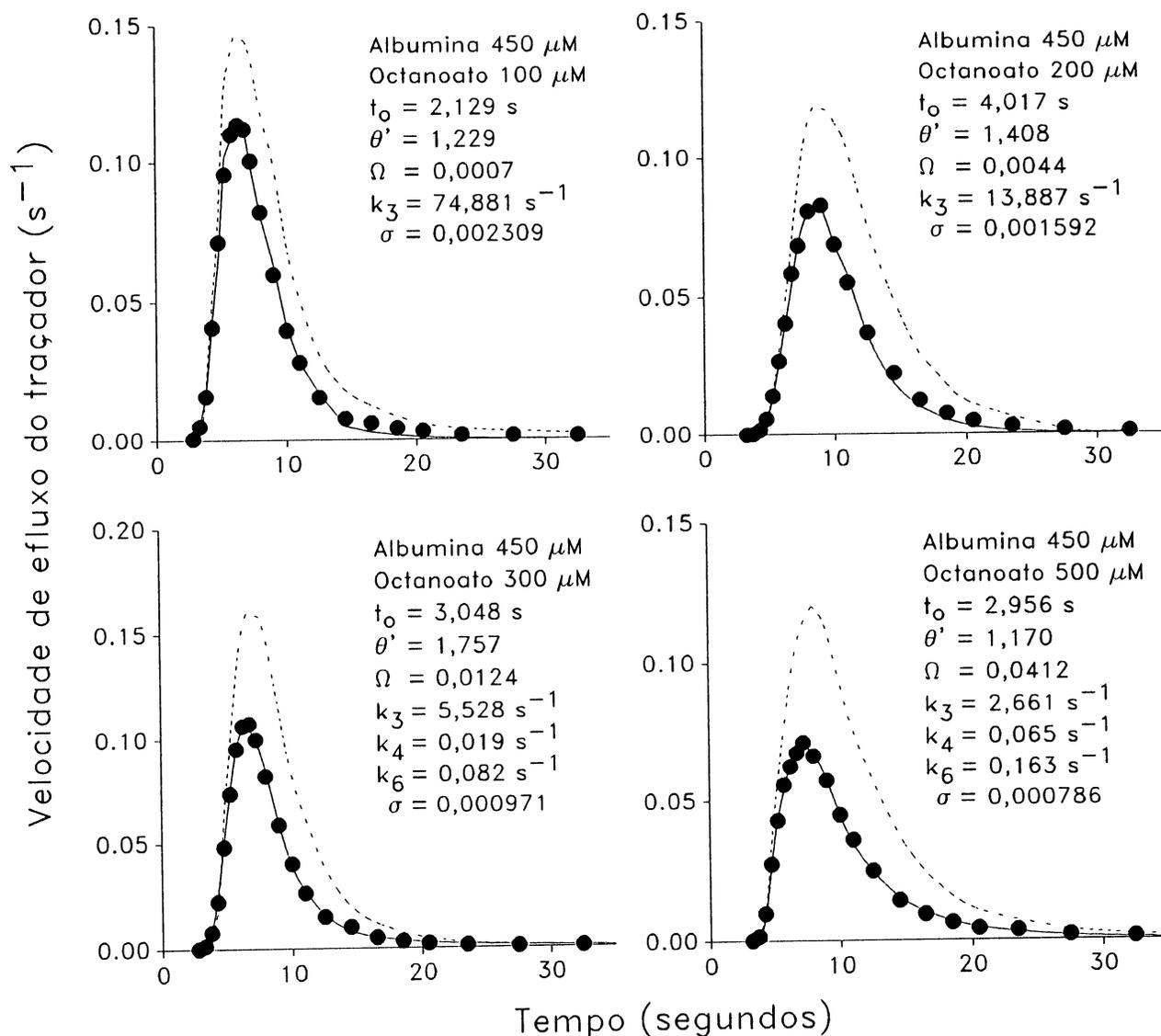


Figura 22. Ajuste das equações [4A] ou [5A] às curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato obtidas com albumina 450 μM no perfusado. As equações foram ajustadas aos dados experimentais através de um procedimento de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As condições experimentais e os valores otimizados obtidos para cada parâmetro estão relacionados em cada gráfico, juntamente com o erro padrão da estimativa (σ). Os valores otimizados de t_0 e θ' foram obtidos da sobreposição das curvas da $[^3\text{H}]$ água e da $[^{131}\text{I}]$ albumina, conforme ilustrado pela Figura 21. Legendas: curva experimental do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, \bullet ; curva calculada do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, —; curva da nova referência, - - - -.

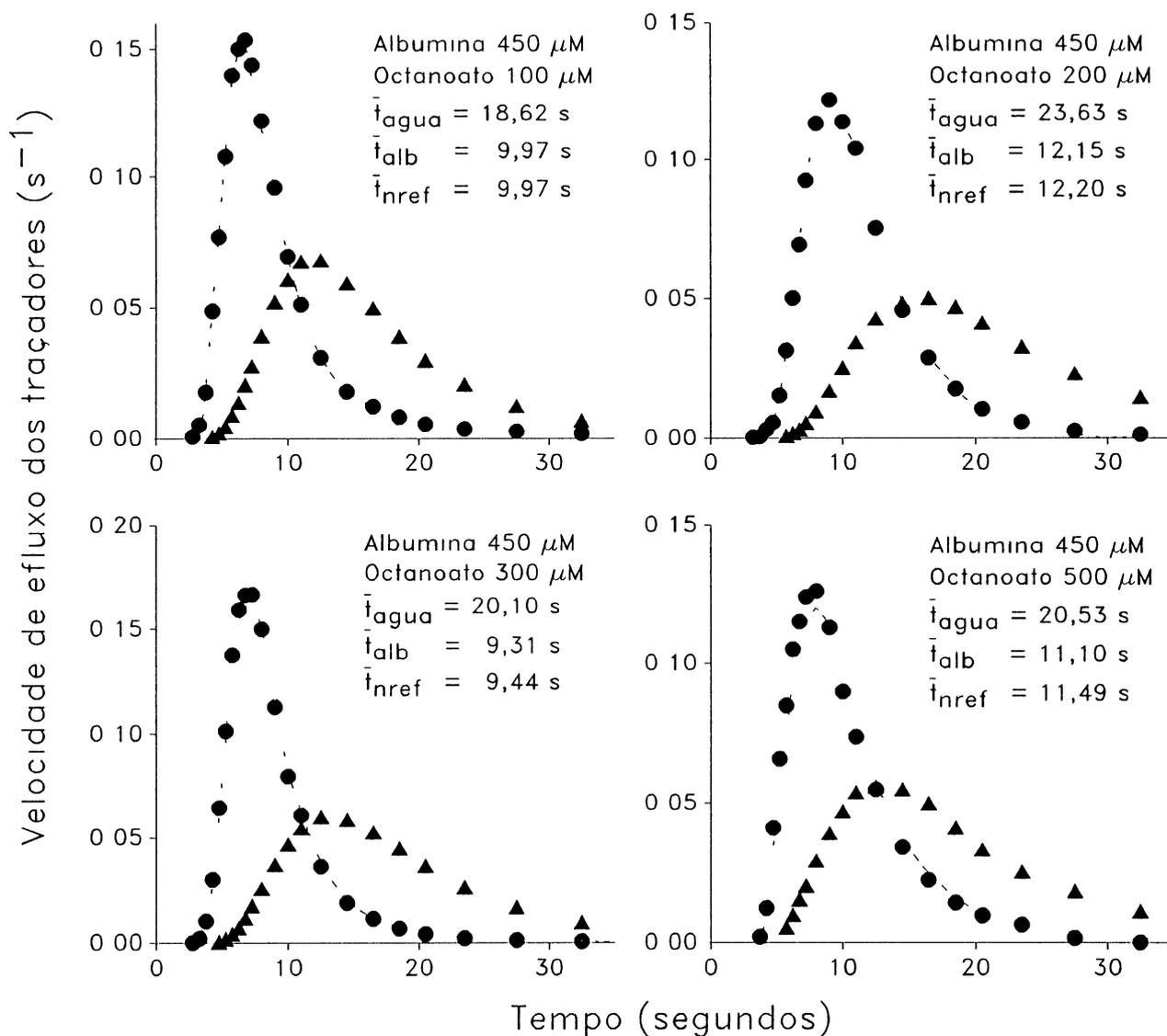


Figura 23. Comparação da curva da nova referência para o $[1-^{14}\text{C}]$ -octanoato com as curvas da $[^3\text{H}]$ água e da $[^{131}\text{I}]$ albumina na série de experimentos com albumina 450 μM. As curvas da nova referência (----) já mostradas nos gráficos da Figura 22 estão representadas ao lado das curvas experimentais da $[^{131}\text{I}]$ albumina (●) e da $[^3\text{H}]$ água (▲). Os valores dos tempos médios de trânsito da $[^{131}\text{I}]$ -albumina (\bar{t}_{alb}), da $[^3\text{H}]$ água ($\bar{t}_{\text{água}}$) e da nova referência (\bar{t}_{nref}) estão listados no canto superior direito de cada gráfico.

equações [4A] e [5A] resulta da transformação da curva da [^{131}I]albumina. Esta transformação é obtida diminuindo a amplitude pelo fator $(1 + \Omega\theta')$ e alongando o tempo subtraído de t_0 pelo fator $(1 + \Omega\theta')$, voltando a adicionar t_0 . Este procedimento é análogo ao que foi feito na sobreposição da curva da [^3H]água à curva da [^{131}I]albumina. As Figuras 23, 25 e 27 permitem comparar as curvas da nova referência com as curvas da [^{131}I]albumina e da [^3H]água. Nestes gráficos estão listados também os valores dos tempos médios de trânsito, que dão uma estimativa quantitativa das diferenças entre as curvas.

4.3.3.1. A série com albumina 450 μM

Na série de experimentos com albumina 450 μM (ver Tabela 5) a equação [5A] é suficiente para descrever as curvas de [1- ^{14}C]-octanoato obtidas com octanoato 100 e 200 μM no perfusado portal. Para concentrações maiores, no entanto, a equação [5A] não é suficiente e é necessário recorrer à equação [4A]. Os quatro gráficos da Figura 22 ilustram isto. Em cada um deles, a curva calculada com os valores otimizados dos parâmetros (—) descreve bem a curva experimental (\bullet), não havendo desvios sistemáticos em nenhuma das extremidades. O valor de k_3 é muito grande com octanoato portal 100 μM e o valor de Ω muito pequeno. A medida que aumenta a concentração portal de octanoato, k_3 decresce e Ω aumenta. O valor de k_4 aumenta na faixa entre 300 e 500 μM , mas ainda assim permanece muito abaixo do valor de k_3 (ver Figuras 4 e 10 para os significados de Ω , k_3 , k_4 e k_5). A julgar por estas tendências, com octanoato portal 100 e 200 μM a diferença entre k_3 e k_4 deve ser muito maior, o que justifica o fato de as correspondentes curvas de diluição de [1- ^{14}C]octanoato ajustarem muito bem à equação [5A], sendo k_4 muito pequeno para ser

determinado. Isto significa que para octanoato portal até 200 μM e com albumina 450 μM , daquela fração do traçador que deixa a membrana celular em direção ao restante da célula, praticamente nada consegue escapar da transformação metabólica. Com octanoato portal acima de 300 μM , no entanto, já começa a haver algum retorno do traçador.

Em termos relativos, o valor de Ω aumenta bastante à medida que a concentração portal de octanoato é aumentada, mas mesmo na maior concentração, 500 μM , o seu valor absoluto é baixo. Convém lembrar que Ω é igual a k_1/k_2 , isto é, a razão das constantes de velocidade de influxo e efluxo. O parâmetro $\Omega\theta'$, por outro lado, corresponde à razão do espaço aparente do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato na membrana celular e adjacências para o espaço extracelular, conforme revelado pela equação [32A]. Como Ω é pequeno na série de experimentos com albumina 450 μM , a curva da nova referência não deve diferir muito da curva da $[^{131}\text{I}]$ albumina, o que é confirmado pelos gráficos da Figura 23. A linha tracejada (----), que descreve a curva da nova referência, somente se diferencia visualmente da curva da $[^{131}\text{I}]$ albumina nas maiores concentrações portais de octanoato. Isto também está patente nos valores dos tempos médios de trânsito da nova referência (\bar{t}_{ref}) quando comparados com os tempos médios de trânsito da $[^{131}\text{I}]$ albumina (\bar{t}_{alb}).

4.3.3.2. A série com albumina 150 μM

A Figura 24 permite avaliar a concordância entre teoria e experimento na série de experimentos com albumina 150 μM . Ao contrário do que ocorreu na série com albumina 450 μM , k_4 pôde ser determinado já na faixa de octanoato portal que vai de 100 a

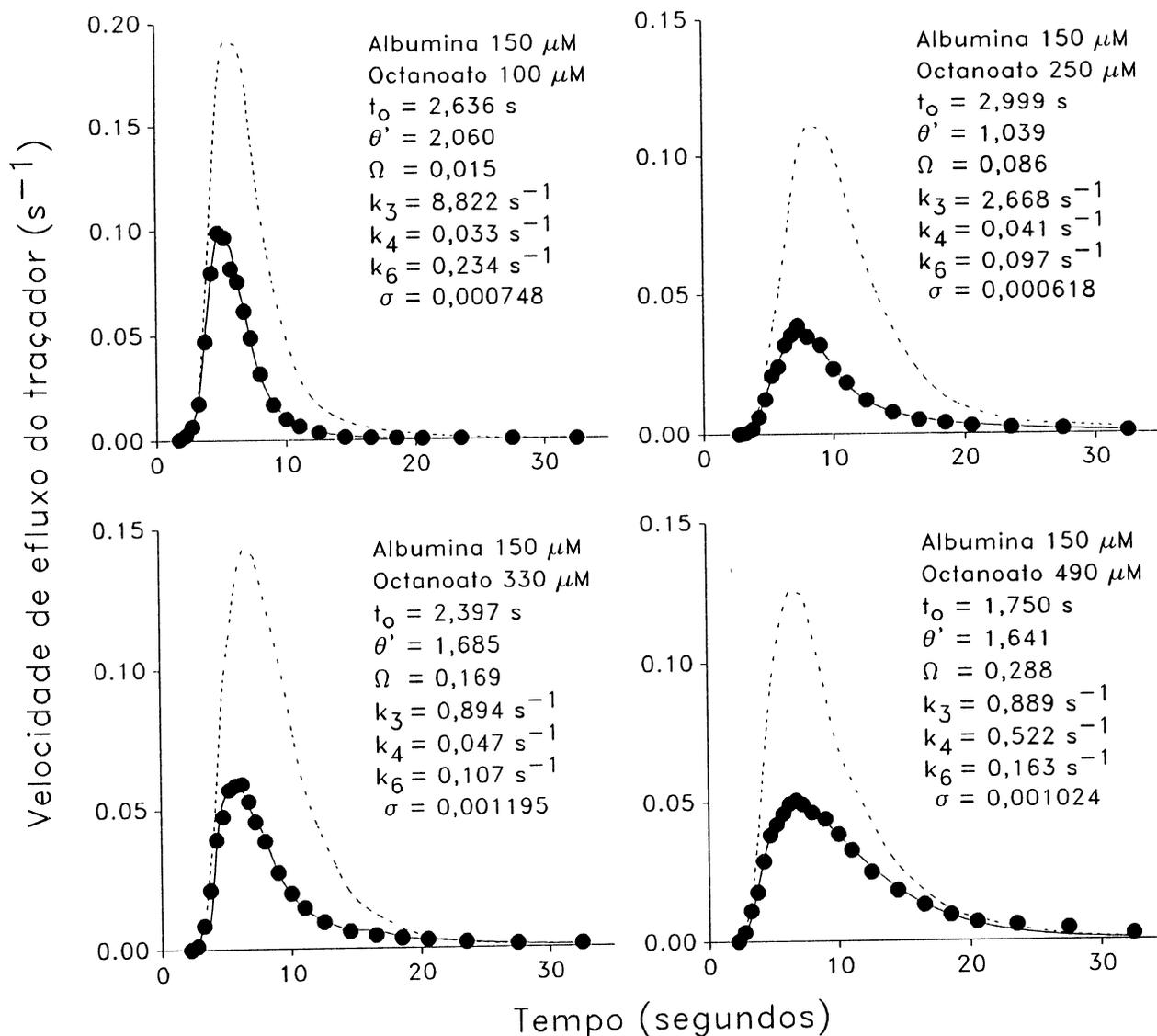


Figura 24. Ajuste da equação [4A] às curvas de diluição do [1- ^{14}C]octanoato obtidas com albumina 150 μM no perfusado. A equação foi ajustada aos dados experimentais através de um procedimento de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As condições experimentais e os valores otimizados obtidos para cada parâmetro estão relacionados em cada gráfico, juntamente com o erro padrão da estimativa (σ). Os valores otimizados de t_0 e θ' foram obtidos da sobreposição das curvas da [^3H]água e da [^{131}I]albumina, conforme ilustrado pela Figura 21. Legendas: curva experimental do [1- ^{14}C]octanoato, \bullet ; curva calculada do [1- ^{14}C]octanoato, —; curva da nova referência, -----.

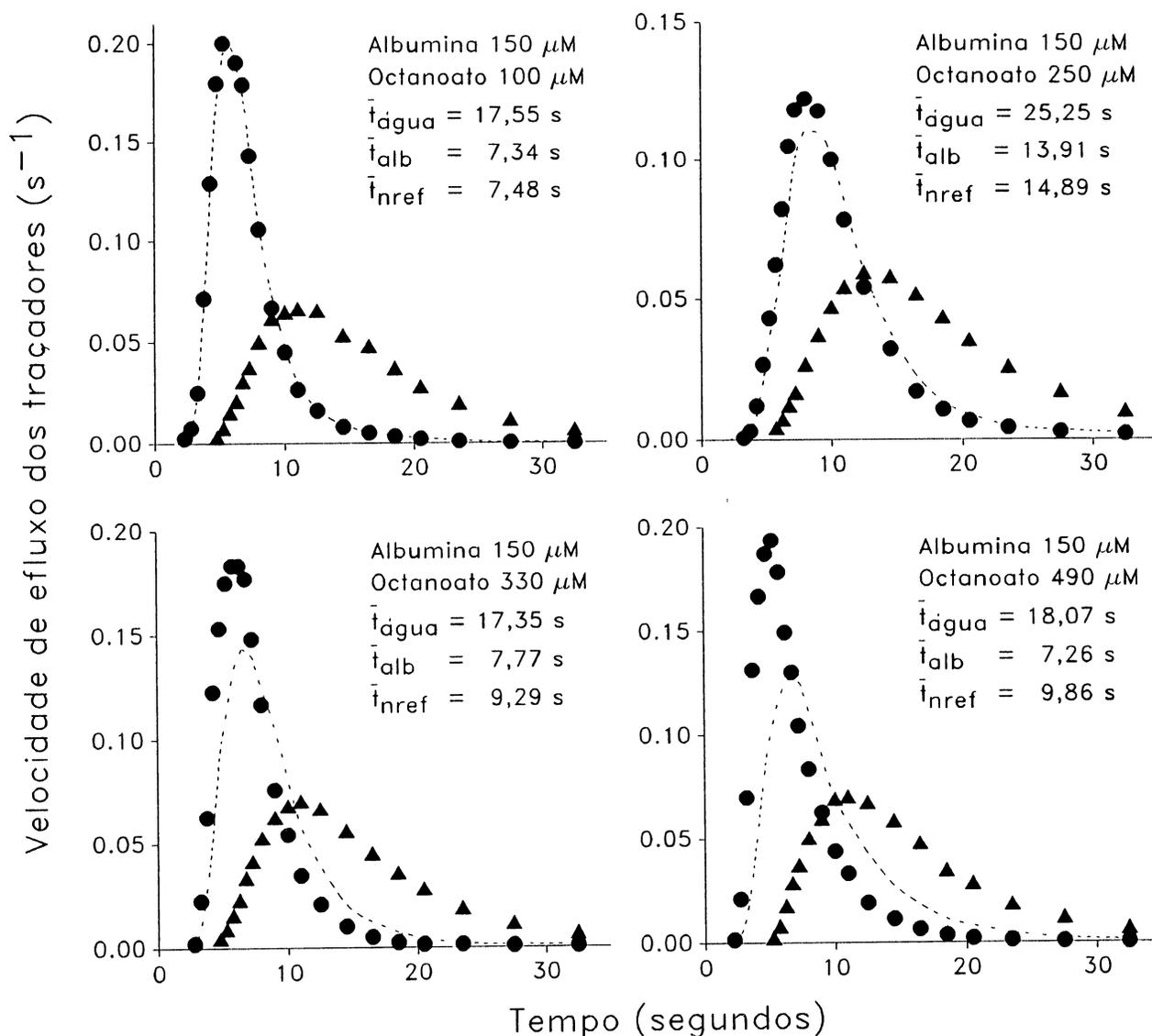


Figura 25. Comparação da curva da nova referência para o $[1-^{14}C]$ -octanoato com as curvas da $[^3H]$ água e da $[^{131}I]$ albumina na série de experimentos com albumina $150 \mu M$. As curvas da nova referência (----) já mostradas nos gráficos da Figura 24 estão representadas ao lado das curvas experimentais da $[^{131}I]$ albumina (\bullet) e da $[^3H]$ água (\blacktriangle). Os valores dos tempos médios de trânsito da $[^{131}I]$ -albumina (\bar{t}_{alb}), da $[^3H]$ água ($\bar{t}_{\text{água}}$) e da nova referência (\bar{t}_{nref}) estão listados no canto superior direito de cada gráfico.

490 μM . Apenas com octanoato 50 μM (não mostrado) não foi possível determinar k_4 .

Da mesma forma que na série com albumina 450 μM , também com albumina 150 μM há uma boa concordância entre teoria e experimento: as curvas calculadas com os valores otimizados dos parâmetros descrevem bem as curvas experimentais.

Em termos dos valores das constantes de velocidade pode-se dizer que à medida que a concentração portal de octanoato aumenta, o valor de k_4 torna-se cada vez mais significativo em relação a k_3 .

A tendência de variação dos valores de Ω é a mesma já verificada na série de experimentos com albumina 450 μM : Ω tende a aumentar quando se aumenta a concentração portal de octanoato. Isto acaba se refletindo na posição da curva da nova referência, que se afasta progressivamente da curva da [^{131}I]albumina, conforme revelado pelos gráficos da Figura 25. Com octanoato 100 μM , a curva da nova referência mal pode ser distinguida da curva da [^{131}I]albumina. Com octanoato portal 490 μM , no entanto, a curva da nova referência foi deslocada para a direita e se situa a meio caminho entre a curva da [^{131}I]albumina e da [^3H]água. Quantitativamente isto pode ser avaliado comparando os tempos médios de trânsito da nova referência com os da [^{131}I]albumina em cada caso.

4.3.3.3. A série com albumina 50 μM

Ajustes da equação [4A] aos dados experimentais, representativos daqueles obtidos com albumina 50 μM no perfusado, podem ser vistos na Figura 26. Novamente, quatro ajustes, com octanoato portal na faixa entre 90 e 470 μM , estão representados. Como era

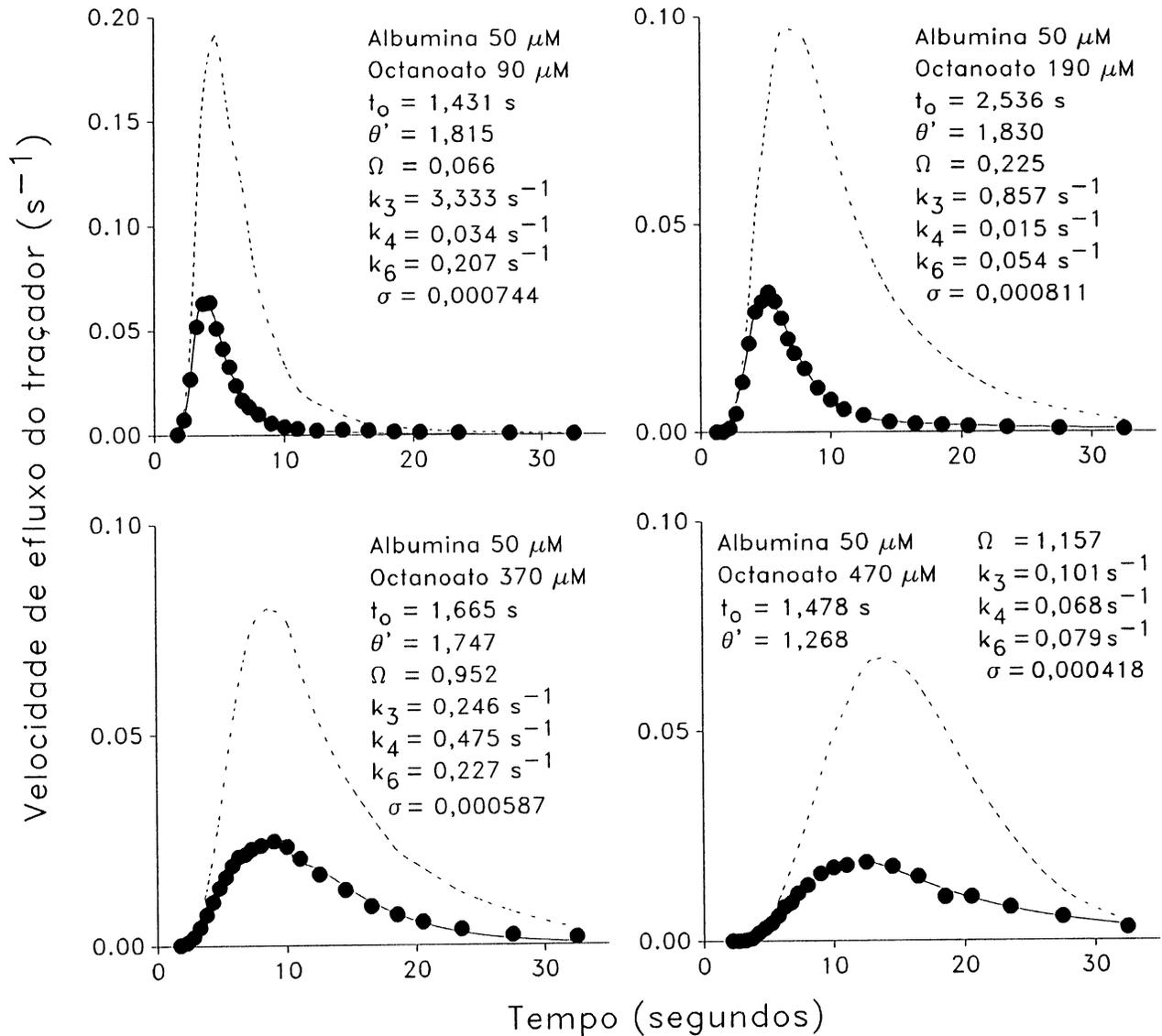


Figura 26. Ajuste da equação [4A] às curvas de diluição do [1- ^{14}C]octanoato obtidas com albumina 50 μM no perfusado. A equação foi ajustada aos dados experimentais através de um procedimento de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As condições experimentais e os valores otimizados obtidos para cada parâmetro estão relacionados em cada gráfico, juntamente com o erro padrão da estimativa (σ). Os valores otimizados de t_0 e θ' foram obtidos da sobreposição das curvas da [^3H]água e da [^{131}I]albumina, conforme ilustrado pela Figura 21. Legendas: curva experimental do [1- ^{14}C]octanoato, ●; curva calculada do [1- ^{14}C]octanoato, —; curva da nova referência, - - - -.

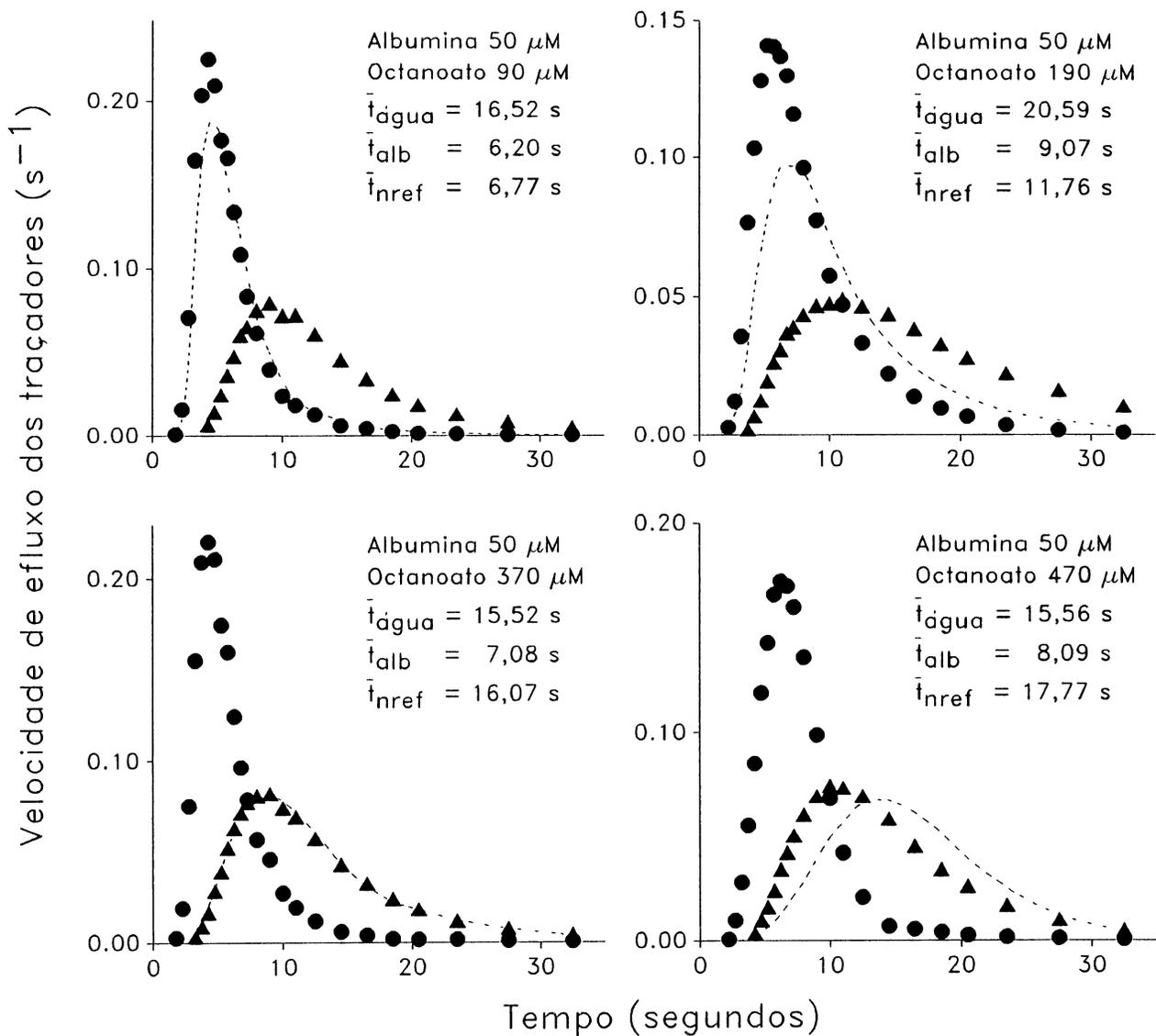


Figura 27. Comparação da curva da nova referência para o $[1-^{14}\text{C}]$ -octanoato com as curvas da $[^3\text{H}]$ água e da $[^{131}\text{I}]$ albumina na série de experimentos com albumina $50 \mu\text{M}$. As curvas da nova referência (----) já mostradas nos gráficos da Figura 26 estão representadas ao lado das curvas experimentais da $[^{131}\text{I}]$ albumina (●) e da $[^3\text{H}]$ água (▲). Os valores dos tempos médios de trânsito da $[^{131}\text{I}]$ -albumina (\bar{t}_{alb}), da $[^3\text{H}]$ água ($\bar{t}_{\text{água}}$) e da nova referência (\bar{t}_{nref}) estão listados no canto superior direito de cada gráfico.

de esperar, em virtude do que ocorreu na série com albumina 150 μM , a equação [4A] descreve muito bem os dados experimentais, independente da concentração de octanoato. A tendência geral da variação dos valores dos parâmetros é a mesma que nas séries com albumina 450 e 150 μM . O valor de k_4 torna-se cada vez mais significativo em relação a k_3 , e este último apresenta uma tendência de queda à medida que o octanoato portal aumenta.

O valor de Ω aumenta muito com o aumento do octanoato portal o que, mais uma vez se reflete no deslocamento para a direita da curva da nova referência, conforme revelado pela Figura 27. Com octanoato 90 μM , o pico da nova referência ainda aparece no mesmo tempo em que aparece o pico da curva da [^{131}I]albumina. Com octanoato portal 190 μM , no entanto, o pico da nova referência já se deslocou significativamente em direção ao pico da curva da [^3H]água. Com octanoato 370 μM , os picos da curva da nova referência e da curva da [^3H]água praticamente coincidem. E, com octanoato 470 μM o pico da curva da nova referência está à direita do pico da curva da [^3H]água. Isto faz com que o tempo médio de trânsito da nova referência, neste último caso, supere o tempo médio de trânsito da [^3H]água em dois segundos. Em termos de espaço aparente do octanoato na membrana plasmática, isto significaria que este ácido graxo tem um espaço aparente na membrana plasmática superior mesmo ao espaço aquoso total do fígado. É bom enfatizar desde já que se trata de um *espaço aparente* e não de um espaço real.

4.4. Testes de consistência do modelo de troca rápida do octanoato com a membrana plasmática

4.4.1. Considerações preliminares

Embora seja essencial que a equação que descreve um deter-

minado mecanismo possa ser ajustada às curvas experimentais, isto não é prova suficiente de que o mecanismo realmente está correto. Quando se trata de equações tão complexas como a equação [4A] e outras descritas neste trabalho, a concordância pode ser meramente casual, assim como será meramente casual um ajuste de um polinômio ou uma soma de funções exponenciais a uma curva qualquer (Björck e Dahlquist, 1972). Por isto, há necessidade de outros testes que não a mera concordância entre as curvas experimentais e as calculadas. Quanto maior for o número de testes que puderem ser feitos, melhor. E se os dados teóricos passarem em todos os testes tanto maior será a confiança que se poderá ter neles.

No caso dos experimentos com octanoato, vários testes podem ser feitos.

Um dos testes mais importantes será o de verificar se as velocidades de metabolização calculadas a partir das constantes de velocidade (F_{met}), através da equação [25A], concordam com as velocidades de metabolização calculadas a partir da diferença porto-venosa e dos tempos médios de trânsito da [^{131}I]albumina e da [3H]água (F_{met}^*), conforme dado pela equação [31A]. Como já foi discutido anteriormente, estas duas maneiras de calcular a velocidade de metabolização são completamente independentes uma da outra. É de se esperar também, que para cada concentração de albumina haja correlações, sejam de que tipo for, entre F_{met} ou F_{in2} e a concentração extracelular (C_e).

Outra concordância que deve ser esperada é entre a razão $C_{11\theta}/C_e$, calculada a partir das constantes de velocidade (basicamente a equação [26A]), e a mesma razão calculada a partir de tempos médios de trânsito (equação [32A]). Esta última não é totalmente independente de um ajuste da equação [4A] aos dados

experimentais, mas mesmo assim, uma eventual concordância pode ser utilizada como critério de consistência.

Há várias correlações que são esperadas, independentemente da concentração de albumina no espaço extracelular. Assim, se a dissociação do complexo albumina-octanoato é realmente muito rápida e, ainda, se a entrada subsequente na membrana plasmática também for muito rápida, requisitos nos quais se baseia a equação [4A], deveria haver uma correlação entre C_{11} e C_{ex} (concentração livre de octanoato), independentemente da maneira pela qual esta última é estabelecida. Isto equivale a dizer que C_{11} deveria correlacionar com C_{ex} independente da concentração de albumina e de octanoato total (C_e), pois tanto o valor de C_{ex} , como também o de C_{11} , são valores de equilíbrio se a velocidade de dissociação para a entrada na membrana for muito rápida.

Há ainda mais duas correlações que podem ser esperadas e que são independentes da concentração de albumina no espaço extracelular. A primeira delas é a relação entre a velocidade de entrada no estoque celular (F_{in2}) e a concentração de octanoato na membrana plasmática (C_{11}). F_{in2} deveria depender apenas de C_{11} , independentemente de como esta última é estabelecida. A segunda diz respeito à velocidade de metabolização (F_{met}) que deveria correlacionar com a concentração no estoque celular (C_{12}).

Outro procedimento válido é o de tentar ajustar as curvas do [1-¹⁴C]octanoato a outras equações, especialmente à equação [2A], que é o caso limite de vários mecanismos (ver Tabela 4). Se não for possível ajustar outras equações aos dados experimentais, fica claro que a equação [4A] é a única correta. Se for possível ajustar outras equações, no entanto, mesmo que apenas numa determinada faixa de concentrações, será necessário, também neste caso, realizar testes adequados para verificar se o ajuste é meramente casual ou não.

4.4.2. *Variação de parâmetros calculados com as constantes de velocidade em função de C_e*

As Figuras 28 a 30 mostram a variação de F_{met} , F_{met}^* , F_{in2} , $C_{11}\theta'/C_e$ e $C_{11}\theta'$ com a concentração média extracelular de octanoato (C_e) para cada uma das concentrações de albumina utilizadas neste trabalho. F_{met} é a velocidade de metabolização, que corresponde ao fluxo líquido através da membrana celular, calculada a partir de C_e , de Ω e das constantes de velocidade, de acordo com a equação [25A]. F_{met}^* é a velocidade de metabolização calculada a partir da diferença porto-venosa e dos tempos médios de trânsito da [3H]água e da [^{131}I]albumina, de acordo com a equação [31A]. Este parâmetro está relacionado nas Tabelas 5 a 7. F_{in2} é o fluxo unidirecional de entrada no segundo estoque celular (ver Figura 10), e foi calculado através da equação [23A]. A concentração de octanoato no primeiro estoque (C_{11}), conforme dado pela equação [26A], foi multiplicada por θ' , para referi-la ao espaço extracelular, com vistas principalmente ao cálculo de $C_{11}\theta'/C_e$.

4.4.2.1. *A série de experimentos com albumina 450 μM*

A Figura 28 mostra a variação dos parâmetros em função de C_e , quando a concentração de albumina no perfusado foi igual a 450 μM . Os erros padrões estão representados pelos traços verticais, sendo que o significado dos símbolos está definido na figura. A relação entre F_{in2} e C_e é parabólica, o mesmo ocorrendo com F_{met} e C_e . Para as duas menores concentrações, os valores de F_{in2} e F_{met} são idênticos, o que decorre do fato de que, para aquelas condições, a equação [5A] foi suficiente para descrever as curvas de [$1-^{14}C$]octanoato. A medida que C_e aumenta, no entanto, F_{in2} e

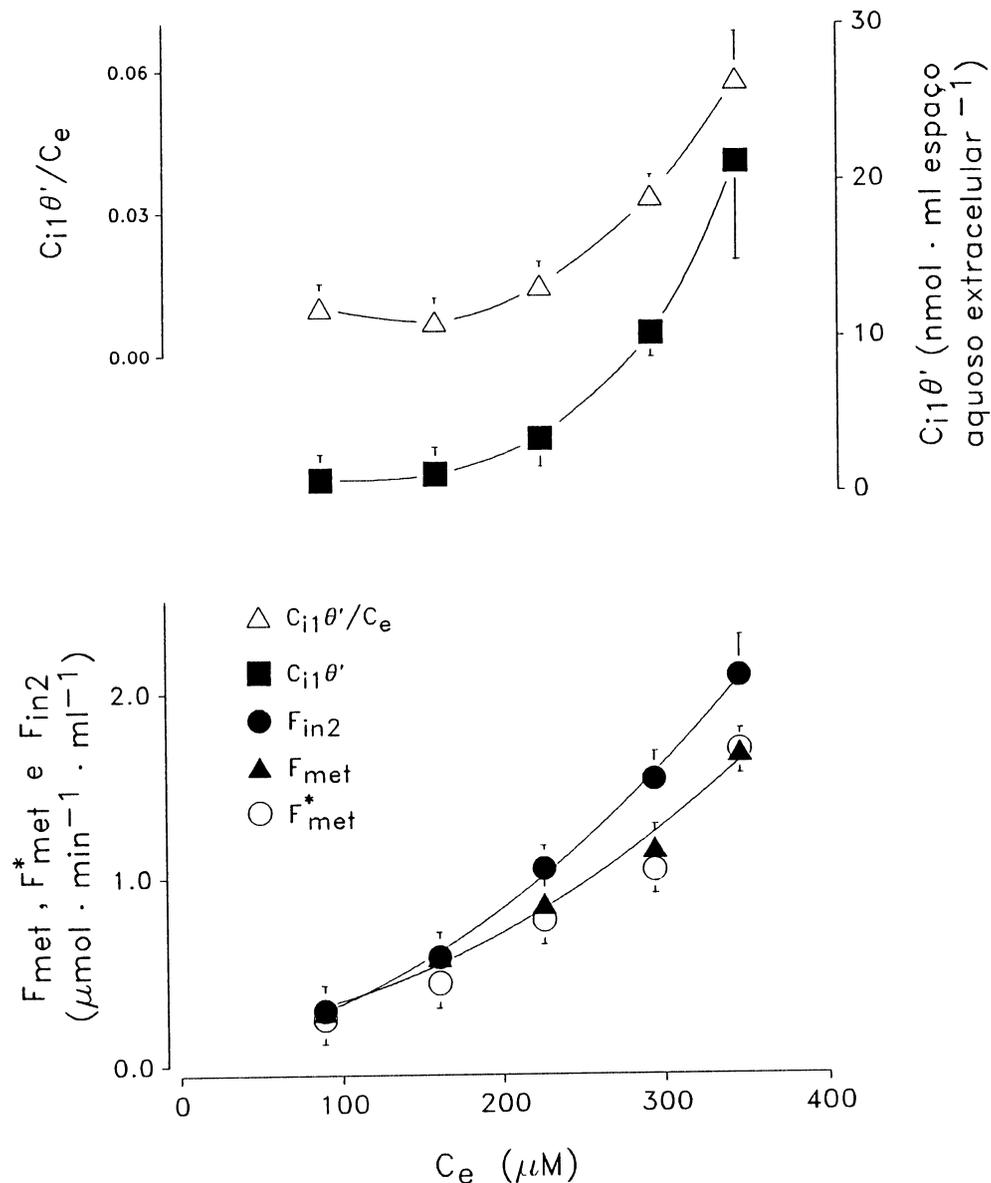


Figura 28. *Parâmetros calculados a partir de constantes de velocidade em função da concentração média extracelular de octanoato de experimentos realizados com albumina 450 μM no perfusado.* Os parâmetros foram calculados a partir das constantes de velocidade k_3 , k_4 e k_5 , e dos valores de Ω obtidos do ajuste das equações [4A] ou [5A] às curvas de diluição do [1-¹⁴C]-octanoato. C_e é a média das concentrações porto-venosas, calculada de acordo com a equação [28A]. F_{met} , F_{met}^* e F_{in2} foram calculados pelas equações [25A], [31A] e [23A], respectivamente. A concentração de octanoato na membrana plasmática, C_{i1} , foi calculada pela equação [26A]. Este parâmetro foi multiplicado por θ' para referi-lo ao espaço extracelular.

F_{met} afastam-se progressivamente, o que significa que o efluxo (que é igual a $F_{met} - F_{in2}$) se torna cada vez mais significativo. Deve-se mencionar aqui, que uma relação parabólica semelhante à da Figura 28 foi encontrada também para a entrada do palmitato no estoque celular em experimentos realizados com albumina 150 μ M no perfusado (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992). F_{met} para o palmitato, no entanto, variou linearmente com C_e . Note-se na Figura 28, a razoável concordância que há entre os valores de F_{met} e F_{met}^* , havendo uma diferença muito pequena entre eles (15% em média, conforme pode ser visto na Tabela 8, que mostra a média das razões F_{met}/F_{met}^* nessa série experimental). Esse era justamente um dos critérios de consistência a ser satisfeito pelos dados calculados a partir do mecanismo da Figura 10. Ao menos por enquanto o esquema da Figura 10 passa pelo teste.

A concentração de octanoato na membrana plasmática, $C_{11\theta'}$, também aumenta parabolicamente com a concentração extracelular. Embora esta última aumente bastante na faixa de concentração estudada, relativamente à concentração extracelular ela é bastante pequena, haja visto que a razão $C_{11\theta'}/C_e$ máxima está em torno de 0,05. Isto reflete, na verdade, os baixos valores de Ω nesta série experimental, pois $C_{11\theta'}/C_e$ é, de acordo com a equação [32A], igual a $\Omega\theta'$. A equação [32A] também prevê que $C_{11\theta'}/C_e = \Omega\theta' = (\bar{t}_{nref} - \bar{t}_{a1b})/(\bar{t}_{a1b} - t_0)$, sendo esta igualdade mais um dos critérios a serem preenchidos, conforme discutido acima. A Tabela 8 mostra que $\Omega\theta'$ e $(\bar{t}_{nref} - \bar{t}_{a1b})/(\bar{t}_{a1b} - t_0)$ diferem em menos de 10%, em média, o que é uma concordância muito boa.

Deve-se mencionar que, apesar da complexidade dos experimentos e dos fenômenos descritos pela equação [4A], os erros padrões dos diversos parâmetros representados na Figura 28 são,

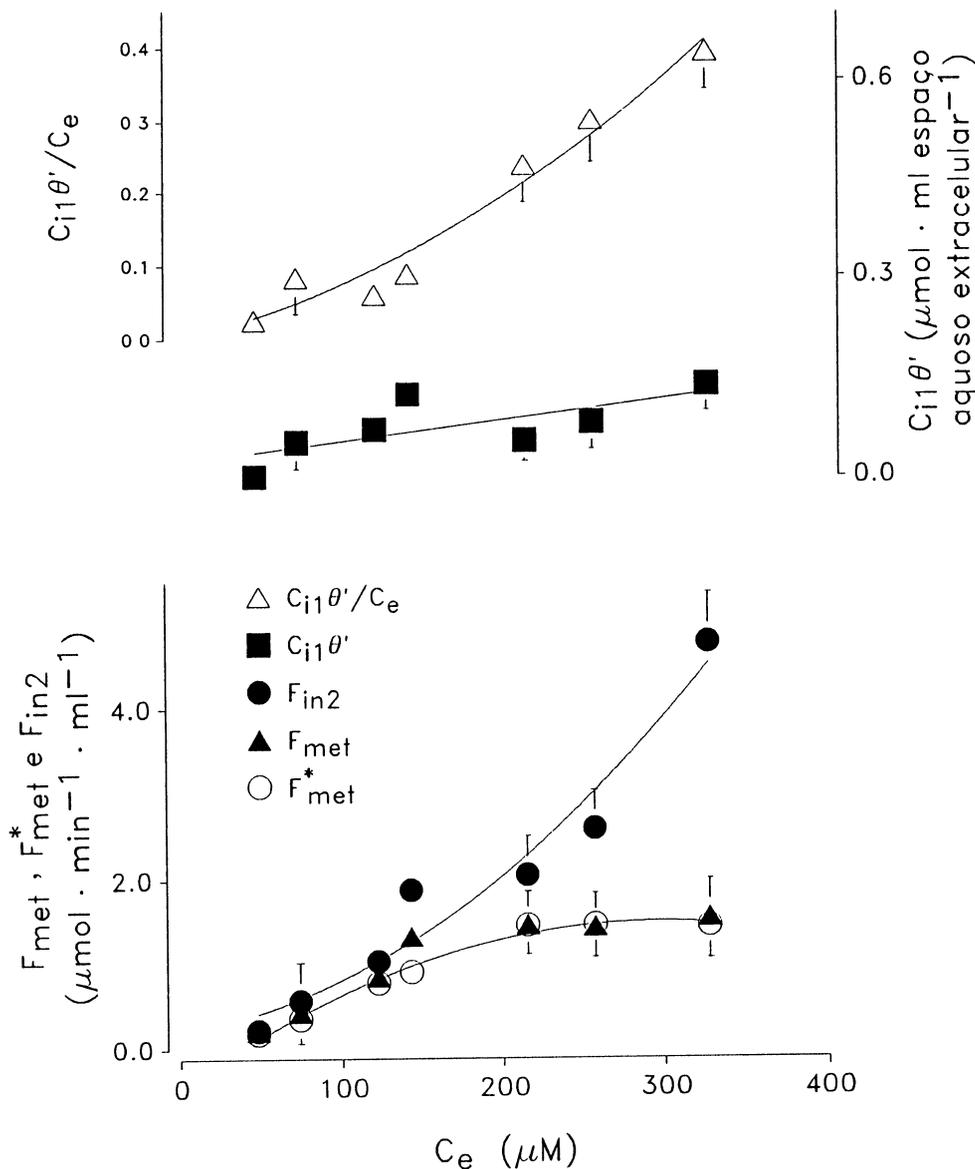


Figura 29. *Parâmetros calculados a partir de constantes de velocidade em função da concentração média extracelular de octanoato de experimentos realizados com albumina 150 μM no perfusado.* Os parâmetros foram calculados a partir das constantes de velocidade k_3 , k_4 e k_5 , e dos valores de Ω obtidos do ajuste das equações [4A] ou [5A] às curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ -octanoato. C_e é a média das concentrações porto-venosas, calculada de acordo com a equação [28A]. F_{met} , F_{met}^* e $F_{\text{in}2}$ foram calculados pelas equações [25A], [31A] e [23A], respectivamente. A concentração de octanoato na membrana plasmática, C_{11} , foi calculada pela equação [26A]. Este parâmetro foi multiplicado por θ' para referi-lo ao espaço extracelular.

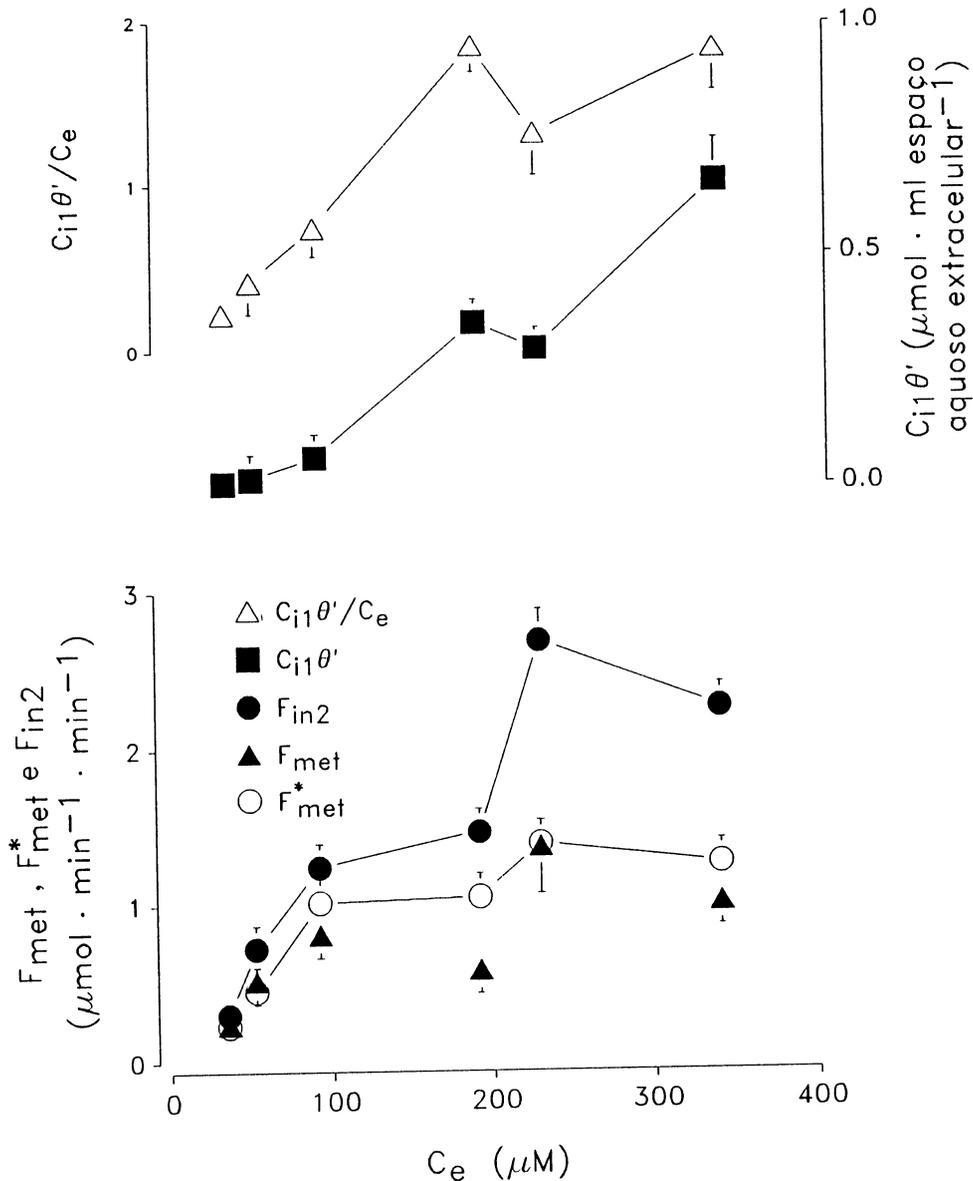


Figura 30. *Parâmetros calculados a partir de constantes de velocidade em função da concentração média extracelular de octanoato de experimentos realizados com albumina 50 μM no perfusado.* Os parâmetros foram calculados a partir das constantes de velocidade k_3 , k_4 e k_5 , e dos valores de Ω obtidos do ajuste das equações [4A] ou [5A] às curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ -octanoato. C_e é a média das concentrações porto-venosas, calculada de acordo com a equação [28A]. F_{met} , F_{met}^* e F_{in2} foram calculados pelas equações [25A], [31A] e [23A], respectivamente. A concentração de octanoato na membrana plasmática, C_{i1} , foi calculada pela equação [26A]. Este parâmetro foi multiplicado por θ' para referí-lo ao espaço extracelular.

com poucas exceções, relativamente pequenos, o que atesta a boa reprodutibilidade, ao menos nesta série.

4.4.2.2. A série de experimentos com albumina 150 μM

Na Figura 29 estão representados os parâmetros calculados a partir das constantes de velocidade obtidas para a série de experimentos realizados com albumina 150 μM no perfusado. Os traços verticais representam os erros padrões. Quando estão ausentes é porque são experimentos isolados.

Uma comparação dos gráficos das Figuras 29 e 28 revela semelhanças, mas também algumas diferenças. F_{12} é novamente uma função parabólica de C_a , inclusive mais acentuada. F_{met} , no entanto, apresenta um nítido fenômeno de saturação ou pseudo-saturação. Note-se, novamente, a boa concordância entre F_{met} e F_{met}^* , o que é corroborado pela razão média F_{met}/F_{met}^* bem próxima da unidade, conforme mostrado na Tabela 8. Deve-se mencionar ainda, que também com albumina 150 μM , a diferença entre F_{12} e F_{met} tende a aumentar à medida que aumenta a concentração de octanoato.

A concentração de octanoato na membrana plasmática, $C_{11\theta'}$, também aumenta quase que linearmente com C_a , ao contrário do que ocorreu na série com albumina 450 μM , na qual $C_{11\theta'}$ aumentou parabolicamente. A razão $C_{11\theta'}/C_a$, no entanto, aumenta parabolicamente. O seu valor máximo nesta série experimental (em torno de 0,4) é muito maior que o valor máximo encontrado na série com albumina 450 μM (em torno de 0,05). Isto reflete, na verdade, o progressivo deslocamento para a direita da curva do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato na série de experimentos com albumina 150 μM , muito maior do que na série com albumina 450 μM (compare as Figuras 14 e 16).

Tabela 8

Razões F_{met}/F_{met}^* e $\Omega\theta' / [(\bar{t}_{nref} - \bar{t}_{alb}) / (\bar{t}_{alb} - t_0)]$ para cada uma das séries de experimentos de diluição de $[1-^{14}C]$ octanoato realizadas com diferentes concentrações de albumina no perfusado.

A razão F_{met}/F_{met}^* está representada tanto para o ajuste da equação [4A] (ou eventualmente [5A]) aos dados, como para o ajuste da equação [2A] às curvas de diluição. Para maiores detalhes, vide o texto.

Concentração da albumina no perfusado (μM)	Ajuste da equação [4A] aos dados		Ajuste da equação [2A] aos dados
	$\frac{F_{met}}{F_{met}^*}$	$\frac{\Omega\theta'}{(\bar{t}_{nref} - \bar{t}_{alb}) / (\bar{t}_{alb} - t_0)}$	$\frac{F_{met}}{F_{met}^*}$
450 (n = 15)	1,15±0,04	1,089±0,044	1,14±0,04
150 (n = 18)	1,10±0,05	1,009±0,005	1,48±0,07
50 (n = 19)	0,85±0,06	1,000±0,001	1,84±0,08

A concordância entre os valores de $C_{11}\theta'/C_a$ calculados como $\Omega\theta'$ e $(\bar{t}_{nref} - \bar{t}_{alb}) / (\bar{t}_{alb} - t_0)$ é muito boa também para a série de experimentos com albumina 150 μM , conforme revela a Tabela 8. O significado desta concordância já foi comentado acima.

4.4.2.3. A série de experimentos com albumina 50 μM

Os fluxos e as concentrações determinadas para a série de

experimentos com albumina 50 μM no perfusado estão representados na Figura 30. Do ponto de vista da reprodutibilidade esta é a série mais problemática. Em baixas concentrações de octanoato a extração numa simples passagem é muito alta, acima de 80% (veja Tabela 7). Isto faz com que a curva de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato tenha valores pequenos, bastante abaixo da curva da $[^{131}\text{I}]$ albumina. Erros relativamente pequenos nos valores das curvas podem levar a grandes variações nos valores dos parâmetros otimizados, pois as relações são em geral exponenciais. A medida que a concentração de octanoato é aumentada, a extração diminui. Em contrapartida surge o problema do deslocamento da curva para a direita com uma progressiva compressão. Também neste caso os valores da curva de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato são pequenos. O coletor de microfrações utilizado neste trabalho foi planejado para fracionar durante 90 segundos. Com o deslocamento da curva do octanoato para a direita, isto gera alguma imprecisão também na determinação da quantidade de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato recuperada, pois a quantidade recuperada entre 90 segundos e o infinito é estimada por extrapolação exponencial. Se a curva está deslocada para a esquerda a quantidade recuperada entre 90 segundos e o infinito é mínima e não chega a afetar significativamente o resultado final. Quando a curva está deslocada para a direita, no entanto, a quantidade recuperada estimada por extrapolação exponencial torna-se maior, podendo um eventual erro afetar o resultado final. Estas fontes adicionais de erro devem ser levadas em conta quando da análise dos resultados expostos na Figura 30.

Análise da Figura 30 revela logo que as curvas realmente não se apresentam tão bem definidas como nas séries com albumina 450 ou 150 μM . São suficientemente boas, no entanto, para concluir que há algum tipo de variação em todos os parâmetros em função de C_e . F_{met} apresenta saturação ou pseudo-saturação, a exemplo do

que já ocorrera na série com albumina 150 μM . Há também uma saturação ou pseudo-saturação na relação entre F_{1n2} e C_a , o que não ocorria nas séries com albumina 450 e 150 μM . Nestas últimas, a relação era parabólica (ver Figuras 28 e 29). A concordância entre F_{met} e F_{met}^* continua razoável, à exceção de um dos pontos experimentais que deve ser o responsável pela razão $F_{\text{met}}/F_{\text{met}}^*$ média inferior à unidade, o que pode ser visto na Tabela 8. Uma comparação entre F_{1n2} e F_{met} revela, a exemplo do que já vinha ocorrendo em outras concentrações de albumina, que a diferença entre os dois parâmetros aumenta com C_a . Em resumo, nesta série, no tocante aos fluxos, o que há de novo realmente é a saturação ou pseudo-saturação na relação entre F_{1n2} e C_a .

$C_{11}\theta'$ aumenta também com C_a e de forma mais ou menos linear, o que também já ocorreu na série de experimentos com albumina 150 μM . O valor máximo de $C_{11}\theta'$ está em torno 0,6 $\mu\text{mol} \cdot (\text{ml do espaço extracelular})^{-1}$ o que leva a uma razão de concentrações, $C_{11}\theta'/C_a$, em torno de 1,8. Isto significa que a concentração de octanoato na membrana plasmática, referida ao espaço aquoso extracelular, pode ultrapassar a concentração no espaço extracelular. Em relação a isto há que se averiguar se a quantidade de lipídeos que existe na membrana plasmática realmente tem condições de acomodar tal quantidade de octanoato (ver adiante para uma análise deste problema). Os grandes valores de $C_{11}\theta'/C_a$ no entanto, refletem o acentuado deslocamento para a direita das curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato à medida que a concentração do octanoato é aumentada, conforme mostram os gráficos da Figura 19.

A concordância entre $\Omega\theta'$ e $(\bar{t}_{\text{nrer}} - \bar{t}_{\text{a1b}})/(\bar{t}_{\text{a1b}} - t_0)$ é novamente muito boa, a melhor entre todas as séries

experimentais, havendo uma diferença desprezível, conforme revelado pela Tabela 8.

4.4.3. Correlações teoricamente independentes da concentração da albumina

A primeira das correlações que se espera que sejam independentes da albumina no perfusado pode ser analisada pela representação na Figura 31. A concentração de octanoato na membrana plasmática e suas adjacências ($C_{11\theta}$; equação [26A]) está representada contra a concentração livre de octanoato no perfusado (C_{ex}), assumindo condições de equilíbrio. Estão representadas as médias de todos os experimentos realizados, independentemente da concentração da albumina. Os pontos descrevem uma única curva, à qual pôde ser ajustada uma equação do segundo grau. O coeficiente de correlação para este ajuste é igual a 0,97. Não há dúvida de que existe uma correlação entre $C_{11\theta}$ e C_{ex} . Se a relação entre as duas variáveis fosse linear, a inclinação da reta equivaleria a uma constante de partição ou de equilíbrio, válida para toda a faixa de concentrações de C_{ex} entre 0 e 240 μM . A curvatura para cima, por isto mesmo, revela complexidades. A interpretação mais simples para a forma da curva na Figura 31 é que pode estar havendo um aumento na afinidade da membrana plasmática pelo octanoato à medida que a concentração da forma livre aumenta. Isto pode significar, por exemplo, várias maneiras de acomodação do octanoato na membrana plasmática e suas adjacências, umas com maiores, outras com menores coeficientes de partição. Uma análise mais detalhada da interação entre o octanoato e a membrana será feita na *Discussão Final*.

A segunda correlação esperada, aquela entre o influxo no espaço celular, F_{in2} , e a concentração na membrana plasmática,

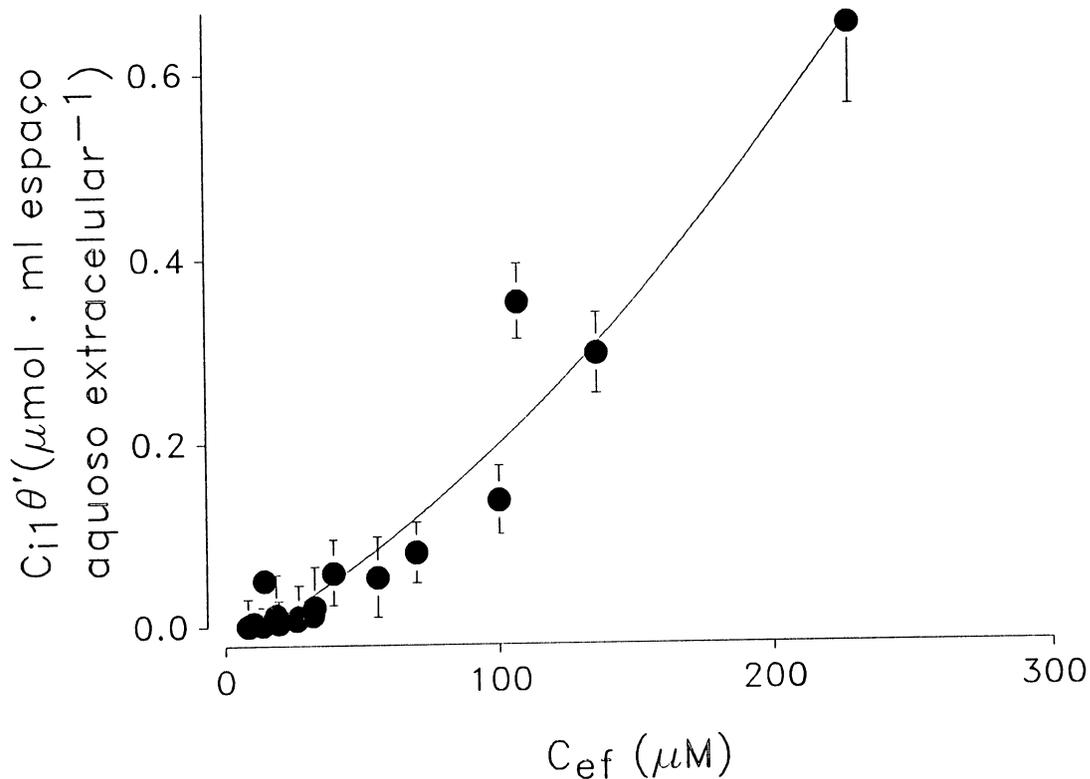


Figura 31. Concentração de octanoato no primeiro estoque (membrana plasmática), $C_{i1}\theta'$, em função da concentração extracelular livre de octanoato, C_{ef} . Estão representados todos os pontos experimentais obtidos nas três séries de experimentos realizados com albumina 450, 150 e 50 μM . Os valores de C_{i1} foram calculados através da equação [26A] e multiplicados por θ' para referí-los ao espaço aquoso extracelular. A concentração extracelular livre de octanoato foi calculada a partir de C_e , da concentração de albumina e das constantes de dissociação listadas na Tabela 2 (Ashbrook *et al.*, 1972), utilizando o algoritmo de Abumrad *et al.* (1981; equação [23B]). A parábola traçada entre os pontos representa a curva de regressão, calculada como $C_{i1}\theta'_{est} = -0,0161 + 0,00155C_{ef} + 0,00000598C_{ef}^2$, sendo o coeficiente de correlação (r) igual a 0,971.

C_{11} , pode ser avaliada pelas representações nas Figuras 32A e 32B. Os dados apresentam alguma dispersão, mas pode-se reconhecer claramente na Figura 32A uma curva de saturação com um fenômeno do tipo "inibição por substrato" no final. Desta curva de saturação, dois pontos desviam consideravelmente. É difícil fazer uma análise quantitativa da correlação entre F_{12} e C_{11} , já que a equação que relaciona as variáveis não é conhecida. Melhor será tentar linearizar de alguma maneira a relação entre elas. Isto foi conseguido de modo relativamente simples, conforme mostra a Figura 32B, através da representação de F_{12} contra o logaritmo de C_{11} . Para evitar números negativos na faixa de valores de $\log C_{11}$, os valores de C_{11} expressos em μM foram multiplicados por dez. Conforme mostra a Figura 32B, os pontos experimentais sugerem uma relação aproximadamente linear. Análise da regressão revela um coeficiente de correlação linear igual a 0,725, altamente significativo ($p = 0,001$). Se aqueles dois pontos que desviam grandemente da sequência saturante da Figura 32A são excluídos da análise da regressão, a reta de regressão tem sua inclinação aumentada, conforme se pode verificar ao comparar a inclinação da linha tracejada (---) com a linha contínua (—). O coeficiente de correlação passa a ser igual a 0,837 e a probabilidade de que não haja correlação diminui mais ainda ($p < 0,001$). Pode-se concluir, portanto, que há uma correlação positiva entre C_{11} e F_{12} , embora a relação entre as duas variáveis seja bastante complexa.

A dispersão da representação de F_{12} contra C_{11} (Figura 32A) é bem maior que aquela da representação de $C_{11}\theta'$ contra C_{er} (Figura 31). Há pelo menos dois fatores contribuindo para isto. Na representação de $C_{11}\theta'$ contra C_{er} , apenas o primeiro parâmetro é calculado a partir de um parâmetro obtido do ajuste da equação [4A] às curvas de diluição de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato. C_{er} é obtido

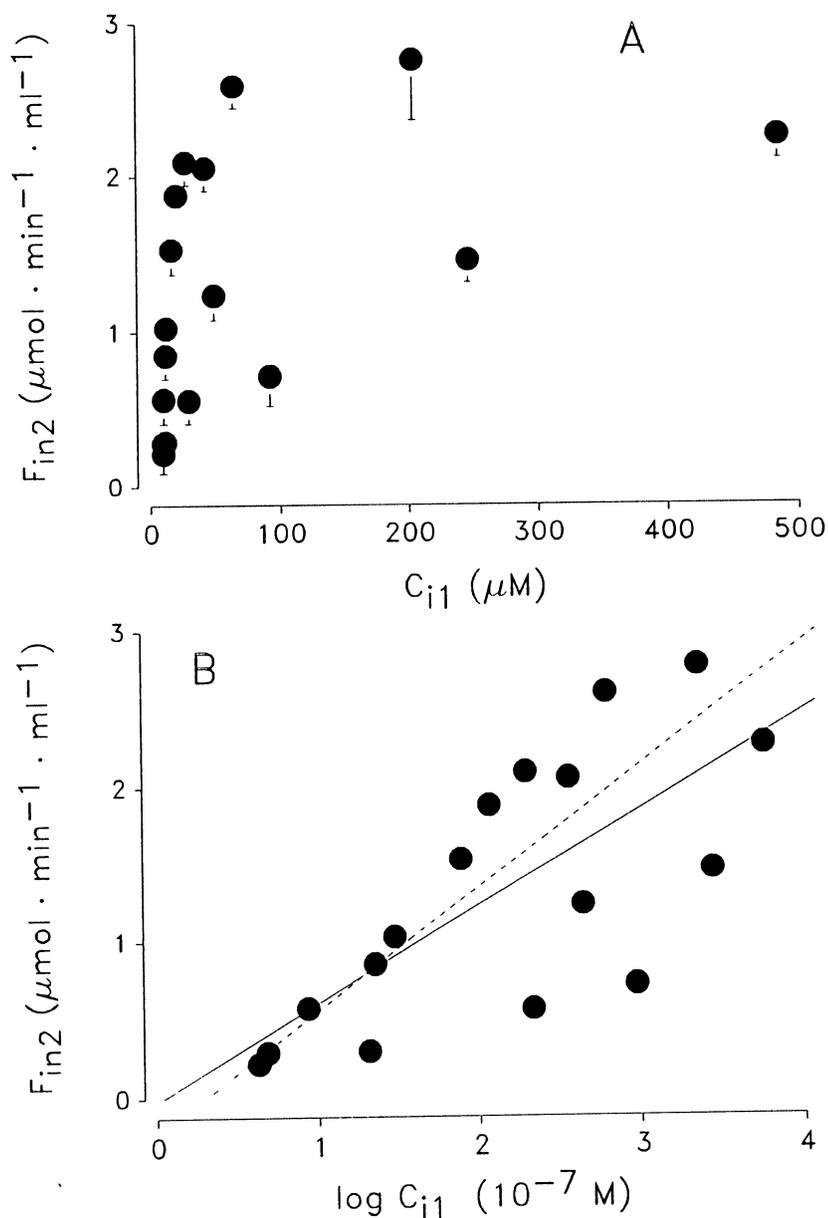


Figura 32. A velocidade de influxo no segundo estoque celular, F_{in2} , em função da concentração de octanoato no primeiro estoque, C_{i1} . Estão representados os dados obtidos nos experimentos realizados com albumina 50, 150 e 450 μM . F_{in2} e C_{i1} foram calculados através das equações [23A] e [26A], respectivamente. Em A, a representação é linear. Em B, F_{in2} foi representada contra o logaritmo de C_{i1} . A linha contínua (—) é a reta de regressão obtida com todos os dados; ela é dada por $F_{in2,est} = -0,07 + 0,65 \cdot (\log C_{i1})$; o coeficiente de correlação linear (r) é igual a 0,725 ($p = 0,001$) e o erro padrão da estimativa (σ) é igual a 0,6. A linha tracejada (----) é a reta de regressão obtida excluindo os dois pontos experimentais que mais desviam da cadeia de saturação no gráfico A; esta reta é dada por $F_{in2,est} = -0,29 + 0,82 \cdot (\log C_{i1})$, com $r = 0,837$ ($p < 0,001$) e $\sigma = 0,5$.

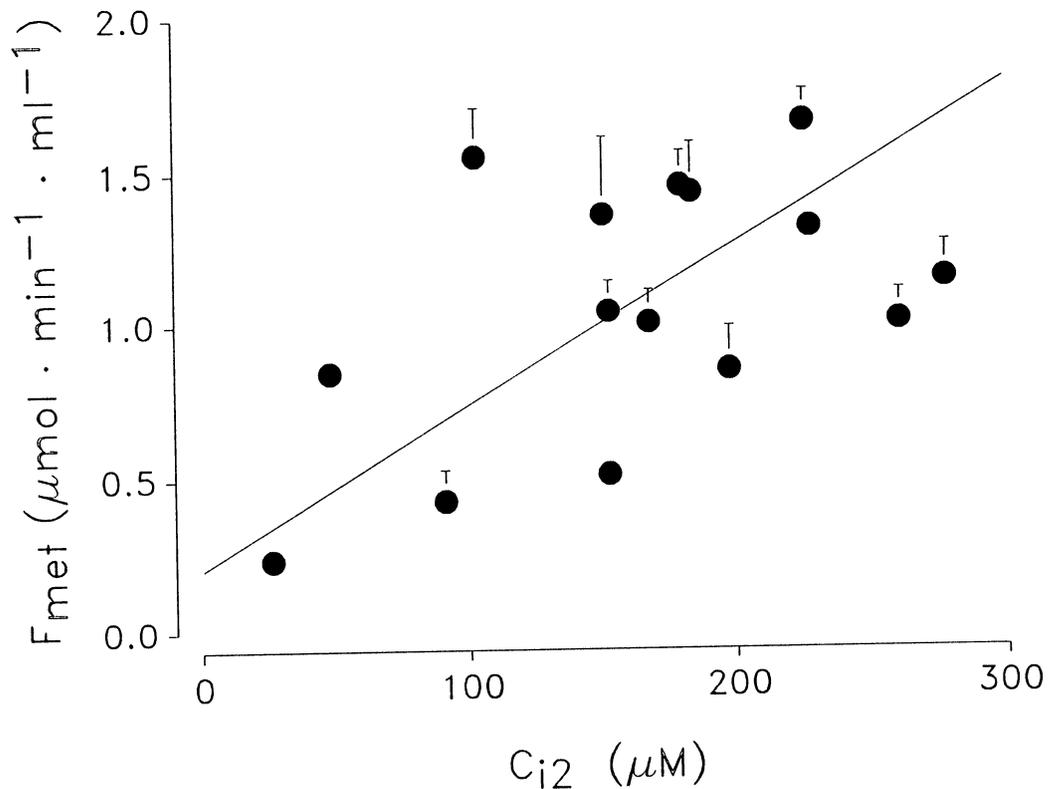


Figura 33. A velocidade de metabolização, F_{met} , em função da concentração de octanoato no segundo estoque celular, C_{12} . Estão representados os dados obtidos nos experimentos realizados com albumina 50, 150 e 450 μM , sempre que foi possível determinar o valor de C_{12} . F_{met} foi calculado a partir de C_e , Ω e das constantes de velocidade utilizando a equação [25A]. C_{12} foi calculado a partir C_e , Ω e das constantes de velocidade utilizando a equação [27A]. A linha traçada por entre os pontos é a reta de regressão, calculada como $F_{met,est} = 0,21 + 0,00123 \cdot C_{12}$. O coeficiente de correlação linear (r) é igual a 0,645 ($p = 0,007$).

independentemente, e o seu cálculo está muito menos sujeito a erros e distorções, pois trata-se apenas da interação entre uma única proteína (albumina) com o seu ligante (octanoato). Já no caso da representação de F_{12} contra C_{11} as duas variáveis são calculadas a partir de parâmetros obtidos da equação [4A]. Os erros e distorções inerentes aos dois parâmetros fazem com que a dispersão seja ampliada no caso de uma representação recíproca como a da Figura 32.

A segunda causa para um aumento da dispersão reside no fato de que quanto maior a distância física entre os eventos e o local das medidas, tanto maior será a imprecisão destas medidas. Por isto, pode-se, *a priori*, esperar maior imprecisão nos parâmetros determinados à medida que eles digam respeito a eventos situados mais para o interior da célula, já que a curva de diluição é medida no espaço extracelular. Isto ocorre inclusive por causa de perturbações causadas por fenômenos não previstos nas premissas utilizadas para derivar a equação [4A].

As considerações do parágrafo anterior se encaixam muito bem na representação de F_{mat} contra C_{12} . Os dois parâmetros referem-se a um compartimento sem contato direto com o compartimento extracelular. Uma comparação da representação de F_{mat} versus C_{12} na Figura 33 com os gráficos das Figuras 31 e 32 revela, desde logo, que a representação da Figura 33 é aquela que apresenta a maior dispersão. A representação de F_{mat} contra C_{12} ainda padece de uma dificuldade adicional, que é o fato de que C_{12} só pode ser determinado se k_4 também for determinável. Conforme foi visto, para as concentrações mais baixas de octanoato na presença de albumina 450 μM e 150 μM , k_4 não pôde ser determinado por ser muito pequeno. Justamente para estas concentrações é que se esperaria valores pequenos de C_{12} . Consequentemente, os menores valores de C_{12} não puderam ser determinados e estão ausentes,

portanto, do gráfico da Figura 33. Isto faz com que a fase inicial ascendente da representação de F_{met} contra C_{12} careça de pontos experimentais. Apesar de todas estas dificuldades, um exame qualitativo sugere uma correlação positiva. A dispersão não permite outra análise de regressão que não seja a linear, embora seja improvável que a relação entre F_{met} e C_{12} seja de fato linear. A reta de regressão calculada está também mostrada na Figura 33. O coeficiente de correlação foi igual a 0,645 e a probabilidade de que não haja correlação é menor que 1% ($p = 0,007$).

Em conclusão, pode-se dizer que as correlações esperadas foram de fato encontradas. Os dados até agora, portanto, apoiam o mecanismo da Figura 10, cuja expressão quantitativa é a equação [4A], como sendo aquele que melhor descreve o comportamento cinético do octanoato no fígado.

4.5. A exclusão de outros possíveis mecanismos para descrição do comportamento do octanoato

Outra maneira de confirmar a validade de um determinado mecanismo é o critério de exclusão. Obter dados provando que uma série de mecanismos alternativos são inconsistentes é uma maneira indireta de encontrar o mecanismo correto. No caso do octanoato, um mecanismo de troca rápida com a membrana plasmática, e com formação de um estoque significativo nessa estrutura, resistiu a várias análises. Assim mesmo, no entanto, não se deveria perder nenhuma oportunidade de reunir mais evidências contra ou a favor, ainda mais que as bases quantitativas para tal empreendimento já foram lançadas.

4.5.1. O ajuste da equação [2A] às curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato

Foi demonstrado no item 2 (*Bases matemáticas da análise de experimentos de diluição de indicadores*), que a equação [2A] é a descrição adequada de uma série de condições-limite de vários mecanismos de dois estoques. Especificamente trata-se dos mecanismos esquematizados nas Figuras 4, 5, 6 e 7. Deve-se lembrar que o da Figura 4 (ou Figura 10) é exatamente o mecanismo de troca rápida com a membrana plasmática. As Tabelas 3 e 4 resumem as condições-limite e as relações entre os parâmetros determináveis e as constantes de velocidade de cada mecanismo. Há, portanto, motivos de sobra para tentar ajustar a equação [2A] às curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato. Se não for possível ajustar a equação [2A] a nenhuma das curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato ela pode ser descartada de imediato bem como as condições-limite que lhe servem de base. Se ela descrever todas as curvas de diluição do octanoato, estará criada uma situação difícil, já que a equação [4A] faz o mesmo. Pode ser, no entanto, também, que apenas uma parte das curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato possa ser descrita pela equação [2A]. No caso do mecanismo de troca rápida com a membrana plasmática (Figura 10), o que se espera é que a equação [2A] descreva tanto melhor as curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato quanto menor for a razão das concentrações octanoato/albumina, ou seja, quanto menor for o valor de Ω (ver Tabela 4).

As Figuras 34 a 36 apresentam ajustes típicos da equação [2A] aos dados experimentais. Na Figura 34 são curvas obtidas com albumina 450 μM no perfusado, na Figura 35 com albumina 150 μM e na Figura 36 com albumina 50 μM . O procedimento utilizado é o mesmo empregado para ajustar a equação [4A] aos dados experi-

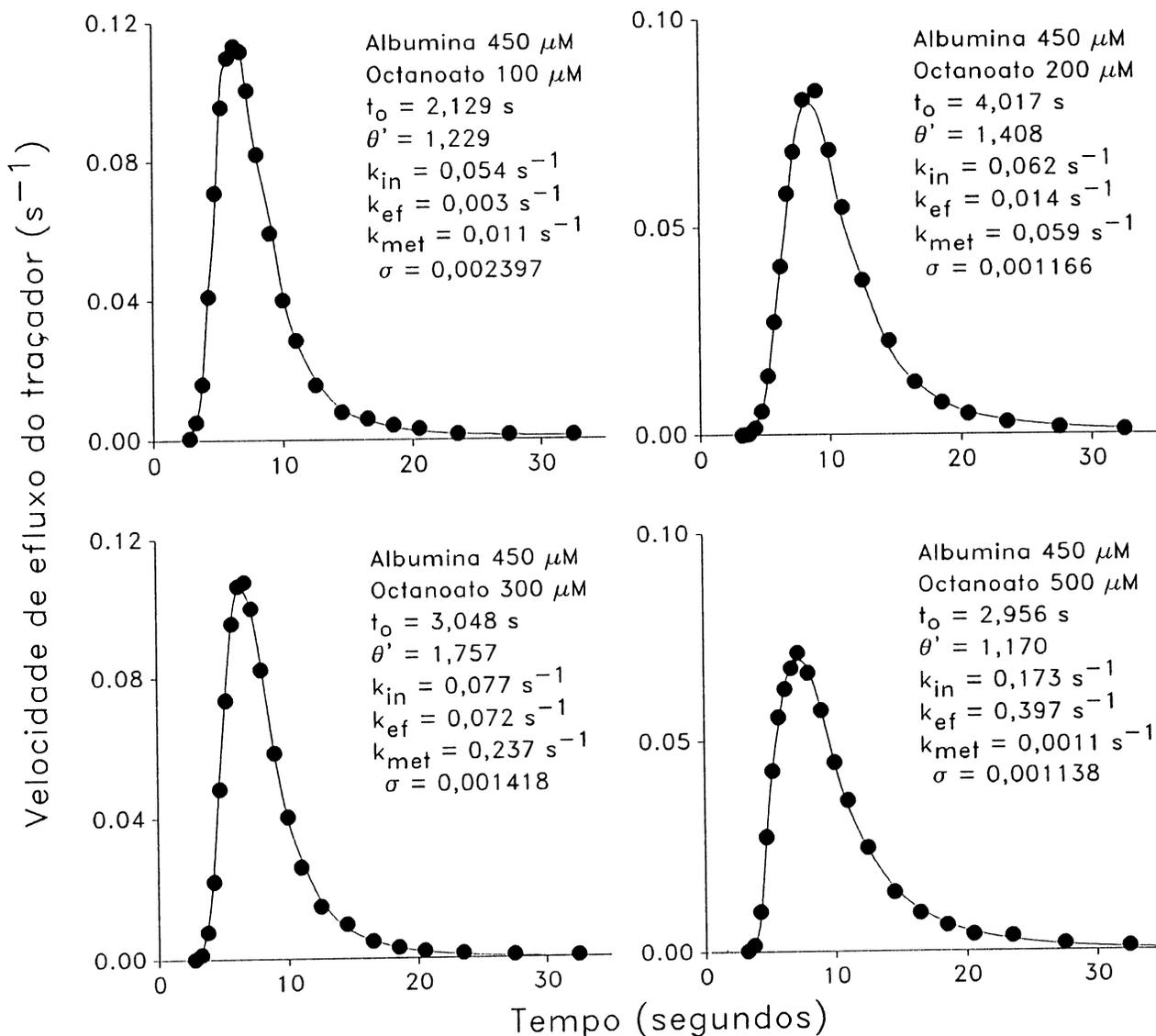


Figura 34. Ajuste da equação [2A] às curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato obtidas com albumina 450 μM no perfusado. A equação foi ajustada aos dados experimentais através de um procedimento de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As condições experimentais e os valores otimizados obtidos para cada parâmetro estão relacionados em cada gráfico, bem como o desvio padrão da estimativa (σ). Os valores otimizados de t_0 e θ' foram obtidos da sobreposição das curvas da $[^3\text{H}]$ água e da $[^{131}\text{I}]$ albumina, conforme ilustrado pela Figura 21. Legendas: curva experimental do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, ●; curva calculada do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, —.

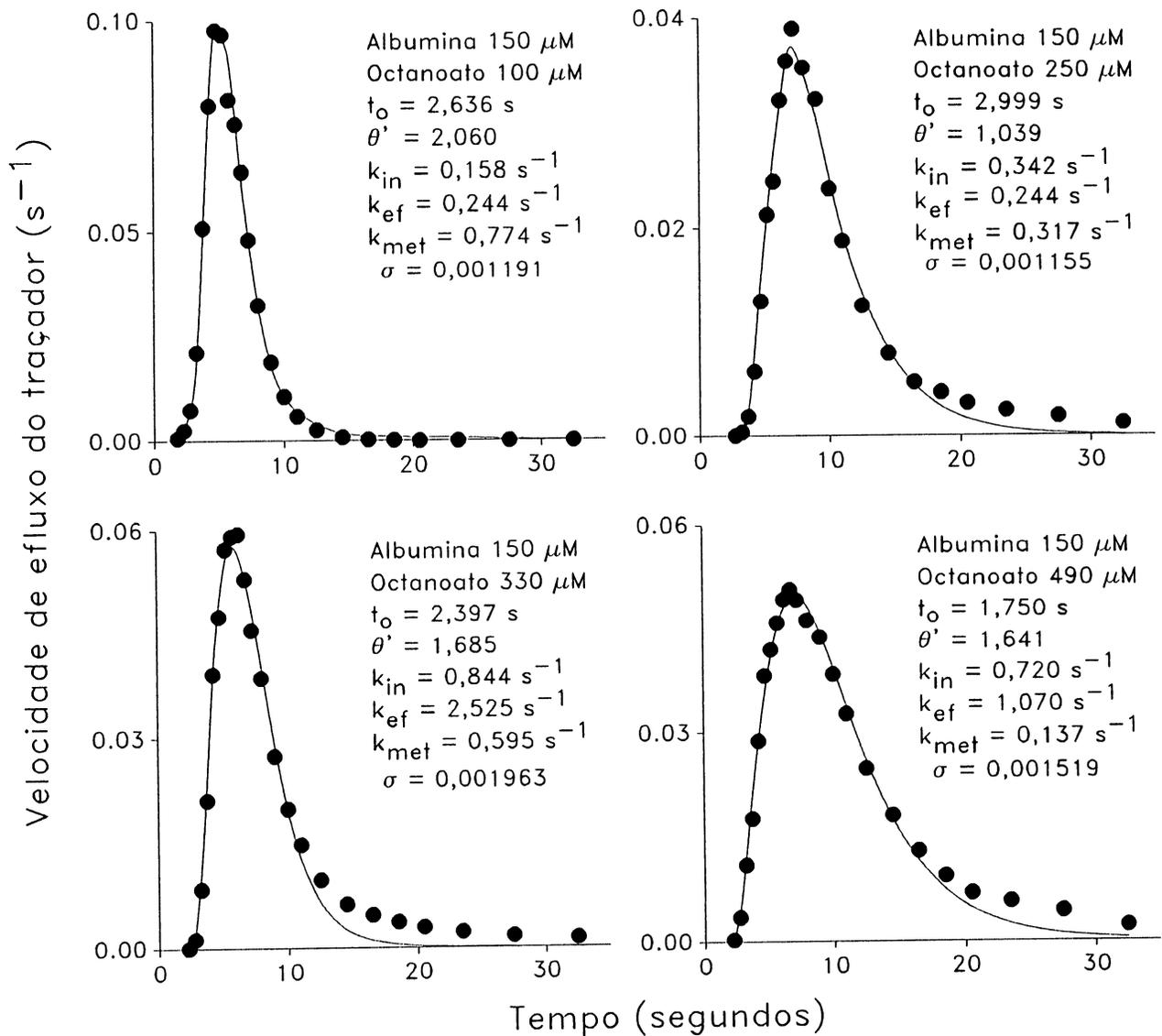


Figura 35. Ajuste da equação [2A] às curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato obtidas com albumina 150 μM no perfusado. A equação foi ajustada aos dados experimentais através de um procedimento de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As condições experimentais e os valores otimizados obtidos para cada parâmetro estão relacionados em cada gráfico, bem como o erro padrão da estimativa (σ). Os valores otimizados de t_0 e θ' foram obtidos da sobreposição das curvas da [³H]água e da [¹³¹I]albumina, conforme ilustrado pela Figura 21. Legendas: curva experimental do [1-¹⁴C]octanoato, ●; curva calculada do [1-¹⁴C]octanoato, —.

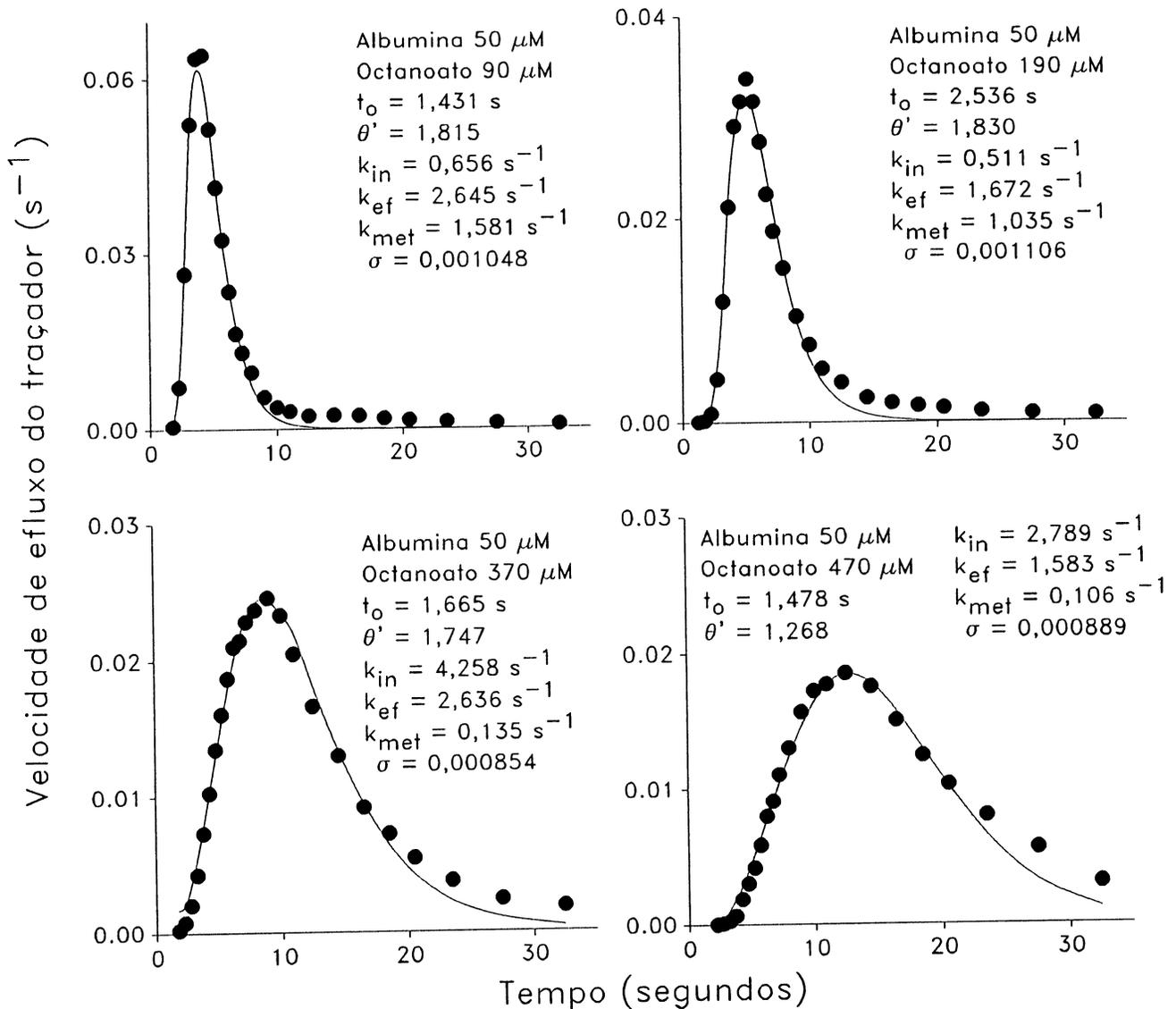


Figura 36. Ajuste da equação [2A] às curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato obtidas com albumina 50 μM no perfusado. A equação foi ajustada aos dados experimentais através de um procedimento de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As condições experimentais e os valores otimizados obtidos para cada parâmetro estão relacionados em cada gráfico, bem como o erro padrão da estimativa (σ). Os valores otimizados de t_0 e θ' foram obtidos da sobreposição das curvas da $[^3\text{H}]$ água e da $[^{131}\text{I}]$ albumina, conforme ilustrado pela Figura 21. Legendas: curva experimental do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, ●; curva calculada do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, —.

mentais, *i.e.*, foi feito um ajuste não-linear de mínimos quadrados (para detalhes ver *Materiais e Métodos*). Constata-se, após uma comparação das curvas calculadas com o caminho traçado pelos pontos experimentais, que na série com albumina 450 μM (Figura 34) a equação [2A] ajusta bem aos dados, de modo comparável ao que ocorre com a equação [4A] (ou [5A]), dependendo das condições (Figura 22). Na série com albumina 150 μM , no entanto, uma boa concordância entre a curva experimental e a curva ajustada ocorre apenas em baixas concentrações de octanoato. Como mostra a Figura 35, quando se aumenta a concentração de octanoato, começa a aparecer um desvio entre a curva calculada e a curva experimental que se manifesta sistematicamente na porção descendente terminal, *i.e.*, à direita do pico. Pode haver uma diferença também em torno do pico, mas nem sempre. Na série com albumina 50 μM não há concordância entre a curva ajustada e a curva experimental em toda a faixa de concentração de octanoato investigada neste trabalho. Deve-se salientar que os desvios, quando aparecem, são sempre para menos, isto é, a curva ajustada corre abaixo da curva experimental.

Esta última constatação significa, também, que a área da curva calculada deve ser inferior à área da curva experimental. Como a área sob as curvas corresponde à fração recuperada, fica claro, também, que a curva ajustada, quando desvia dos dados experimentais, prevê uma transformação metabólica maior do que aquela que ocorre efetivamente. A Tabela 8 ilustra isto muito bem. A Tabela 8, já discutida em parte anteriormente, apresenta as razões $F_{\text{met}}/F_{\text{met}}^*$. Já foi visto que no caso dos parâmetros obtidos com a equação [4A], há uma boa concordância entre F_{met} e F_{met}^* em toda a faixa de concentrações de albumina e octanoato. É o caso de se verificar se o mesmo ocorre com os parâmetros

obtidos com a equação [2A]. Por isto F_{met} foi calculado com os parâmetros obtidos com o ajuste da equação [2A] aos dados, utilizando a equação [22A]. Pode-se ver na última coluna da Tabela 8, que a razão F_{met}/F_{met}^* obtida neste caso está próxima da unidade apenas na série de experimentos com albumina 450 μM , que é quando a equação [2A] é efetivamente capaz de descrever as curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato. Na série com albumina 150 μM a razão F_{met}/F_{met}^* aumenta para 1,48, e chega a 1,84 na série com albumina 50 μM . Estas diferenças estão muito acima do tolerável e é forçoso concluir que, neste caso, não há concordância entre F_{met} e F_{met}^* .

As conclusões que se podem tirar dos ajustes da equação [2A] aos dados experimentais estão diretamente vinculadas ao significado dessa equação. Se fosse possível ajustá-la a todas as curvas experimentais obtidas com albumina na faixa entre 50 e 450 μM e octanoato na faixa entre 50 e 500 μM , forçoso seria concluir que o octanoato se comporta cineticamente como o palmitato, cujo comportamento pôde ser descrito satisfatoriamente pela equação [2A] (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992). Para o palmitato apenas um estoque intracelular pôde ser detectado cineticamente. É preciso que se diga que a equação [2A] não é incompatível com uma troca rápida do octanoato com a membrana plasmática. Conforme foi demonstrado neste trabalho, e está resumido nas Tabelas 3 e 4, se a quantidade de octanoato na membrana plasmática for muito pequena, o parâmetro Ω torna-se muito pequeno e a equação [4A] converge para equação [2A].

No entanto, como se viu, a equação [2A] apenas descreve as curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato quando a razão das concentrações de octanoato para a albumina ($[\text{octanoato}]/[\text{albumina}]$) é baixa. Claramente, esta última condição é uma condição-limite e

uma análise das Tabelas 3 e 4 revela que há vários mecanismos possíveis. Para maior clareza convém recapitulá-los neste ponto: (1) quando k_1 e k_2 tendem ao infinito, mas $k_1/k_2 = \Omega \ll 1$ (Figura 10); esta é a situação limite para a troca rápida com a membrana plasmática; (2) quando k_3 e k_4 tendem ao infinito (Figura 5); existe um segundo estoque, mas a troca com o primeiro estoque torna-se rápida; (3) quando k_4 tende a zero (Figura 6); o retorno do segundo estoque torna-se desprezível; e, (4) quando k_3 tende a zero (Figura 7), isto é, a entrada no segundo estoque torna-se desprezível. Com os dados disponíveis, e a análise matemática prévia, pode-se fazer uma análise de cada uma dessas possibilidades a fim de excluir aquelas que são inconsistentes.

4.5.2. Uma análise da correlação entre F_{met} e $C_{ekin}/(k_{ex} + k_{met})$

Conforme pode ser visto na Tabela 4, a combinação $C_{ekin}/(k_{ex} + k_{met})$ tem significados diferentes, dependendo do mecanismo que gerou a condição-limite que pode ser descrita pela equação [2A]. Esta combinação de parâmetros em geral significa concentração de um único estoque celular. A exceção é a condição-limite k_3 e k_4 tendendo ao infinito, no qual aquela combinação corresponde à soma das concentrações dos dois estoques celulares. A velocidade de metabolização, F_{met} , por outro lado, depende da concentração no estoque em que há metabolismo. Portanto, deve haver uma correlação entre F_{met} e $C_{ekin}/(k_{ex} + k_{met})$, desde que esta última realmente reflita a concentração do estoque metabolizável.

A Figura 37 permite analisar a relação entre F_{met} e $C_{ekin}/(k_{ex} + k_{met})$. Estão representados, para o octanoato, os dados obtidos com albumina 450 μ M. Para efeito comparativo, foram tomados os dados obtidos com palmitato (Ferraresi-Filho *et al.*,

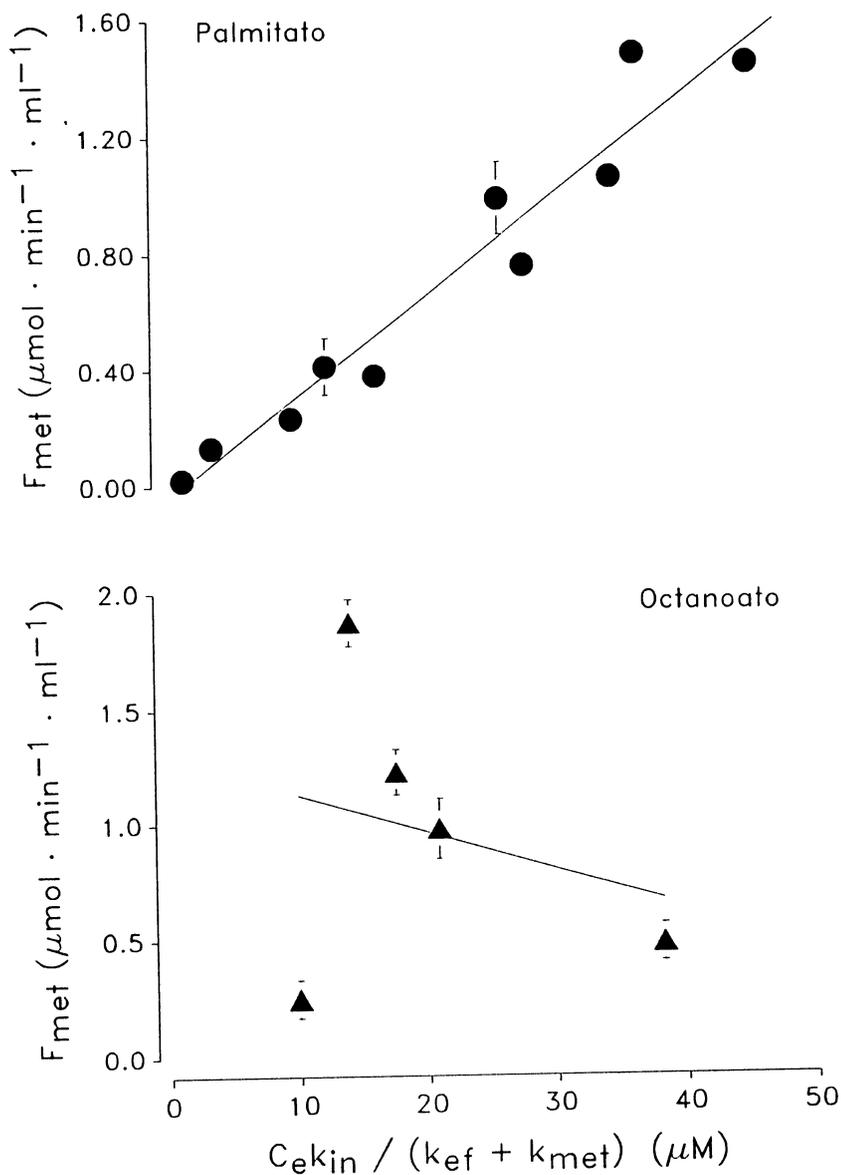


Figura 37. Valores de F_{met} para o palmitato e o octanoato, representados contra $C_{ekin}/(k_{ef} + k_{met})$. F_{met} foi calculado a partir das constantes de velocidade (obtidas ajustando a equação [2A] aos dados experimentais) e da concentração extracelular, de acordo com a equação [22A]. As constantes de velocidade do octanoato utilizadas nos cálculos são as mesmas mostradas na Figura 38 e são, portanto, válidas para uma concentração de albumina igual a $450 \mu\text{M}$. As constantes de velocidade do palmitato foram obtidas de Ferraresi-Filho *et al.* (1992). Elas foram medidas em experimentos de diluição de indicadores realizados com $[1-^{14}\text{C}]$ palmitato e com albumina $150 \mu\text{M}$ no perfusado portal. As linhas traçadas são as retas de regressão. Considerando $x = C_{ekin}/(k_{ef} + k_{met})$, a reta de regressão para o palmitato é dada por $F_{met,est} = -0,021 + 0,034 \cdot x$ ($r = 0,97$; $p < 0,001$); para o octanoato a reta de regressão é dada por $F_{met,est} = 1,293 - 0,00409 \cdot x$ ($r = -0,274$; $p = 0,656$).

1992), obtidos com albumina 150 μM . Deve-se informar que o grau de ligação do palmitato portal na faixa de 50 a 500 μM à albumina 150 μM é muito semelhante ao do octanoato na mesma faixa de concentrações e com albumina 450 μM , já que a afinidade da proteína pelo octanoato é bem menor que a afinidade pelo palmitato. Fica logo claro, após um exame da Figura 37, que F_{met} do palmitato é diretamente proporcional ao parâmetro $C_{\text{ekin}}/(k_{\text{er}} + k_{\text{met}})$, sendo o coeficiente de correlação linear muito próximo da unidade e significativo ao nível de 0,1%. Esta é apenas uma das observações que levaram à proposta de que o palmitato se distribui num único estoque cineticamente detectável nas células hepáticas (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992). Não é o que ocorre com o octanoato, para o qual não existe uma correlação positiva entre F_{met} e $C_{\text{ekin}}/(k_{\text{er}} + k_{\text{met}})$. O coeficiente de correlação linear é negativo e não significativo estatisticamente ($p = 0,656$). Se houver correlação ela não é linear e, de qualquer forma negativa, nunca positiva.

Esta observação é muito importante, pois tem implicações mecanísticas. Será preciso verificar qual dos mecanismos relacionados na Tabela 4 é realmente compatível com o que foi observado na Figura 37. Dois deles podem ser excluídos sem mais delongas: são justamente os mecanismos que admitem uma condição-limite em que k_3 ou k_4 tendem a zero. Para estas situações a combinação $C_{\text{ekin}}/(k_{\text{er}} + k_{\text{met}})$ corresponde a C_{11} . Ausência de correlação positiva entre F_{met} e C_{11} não é admissível.

Restam a condição de troca rápida com a membrana plasmática com Ω muito pequeno e a situação em que k_3 e k_4 tendem ao infinito. No primeiro caso, ausência de correlação positiva entre F_{met} e $C_{\text{ekin}}/(k_{\text{er}} + k_{\text{met}})$ pode ocorrer desde que Ω seja suficientemente pequeno para ainda possibilitar um ajuste da equação [2A] aos dados, porém, ao mesmo tempo, já excessivamente

grande para distorcer em maior ou menor grau os valores otimizados de k_{in} , k_{ef} e k_{met} . Conforme revela a Tabela 3, por exemplo, k_{in} é igual ao produto Ωk_s desde que Ω seja muito pequeno. Se Ω não for suficientemente pequeno, o valor otimizado de k_{in} tenderá a ser maior do que o produto Ωk_s , pois o traçador ocupará um espaço aparente maior que o espaço ocupado pela referência para o espaço extracelular (no caso a $[^{131}I]$ albumina) e este espaço será visto pela equação [2A] como fazendo parte do espaço intracelular. Raciocínio análogo vale para k_{ef} e k_{met} . O valor de k_{in} fica superestimado pois este parâmetro é uma medida da permeação numa direção. Se a velocidade de permeação aumenta numa direção, o lógico é que aumente também na outra. E se k_{ef} aumenta, k_{met} também deve aumentar, caso contrário a área sob a curva irá diminuir. As distorções podem ser tais que a subestimação de $C_0 k_{in}/(k_{ef} + k_{met})$ compensa a superestimação de k_{met} , de modo a permitir um cálculo ainda correto de F_{met} (conforme revelado pela Tabela 8) mas, um cálculo fatalmente incorreto da concentração do estoque metabolizável.

Estas previsões podem ser testadas facilmente com os dados disponíveis. Basta analisar graficamente os pares $k_{in}-\Omega k_s$, $k_{ef}-k_s$ e $k_{met}-k_s$, todos representados contra a concentração extracelular (C_e) de octanoato. Se o aumento "excessivo" do valor de Ω realmente for a causa para a ausência de correlação positiva entre F_{met} e $C_0 k_{in}/(k_{ef} + k_{met})$, a diferença entre os componentes de cada par deverá ser tanto maior quanto maior for o valor de Ω . A Figura 38 permite verificar estas relações. Estão representados os pares mencionados acima e o valor de Ω para cada concentração extracelular média de octanoato (C_e). Em baixas concentrações, o valor de Ω é realmente muito pequeno, conforme já constatado anteriormente. Pode-se verificar que quanto menor for Ω , tanto maior a concordância entre Ωk_s e k_{in} . A medida que Ω aumenta, Ωk_s

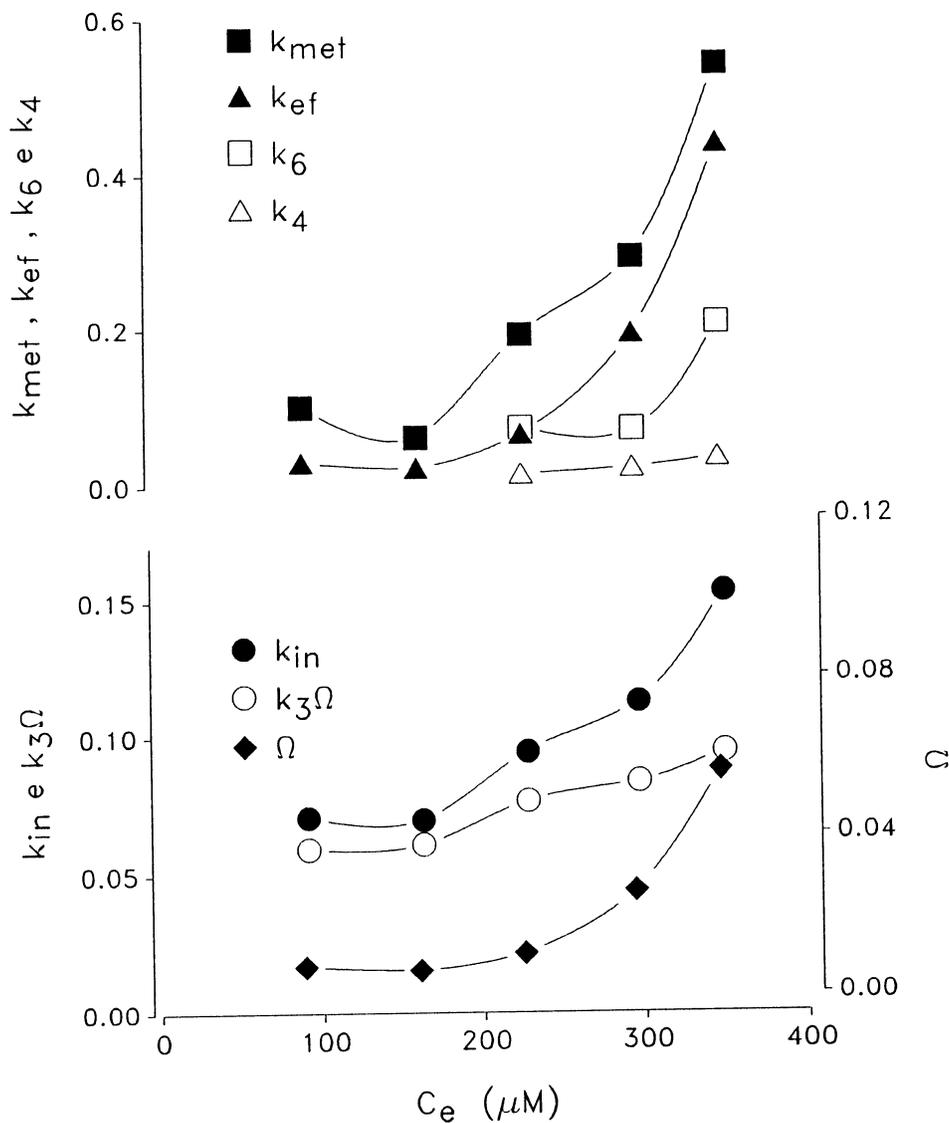


Figura 38. Comparação dos parâmetros obtidos ajustando a equação [2A] (k_{in} , k_{ef} e k_{met}) e a equação [4A] ou [5A] (Ωk_3 , k_4 e k_6) aos dados experimentais obtidos com albumina $450 \mu\text{M}$ no perfusado. Os valores médios dos parâmetros otimizados foram todos representados contra a concentração extracelular média de octanoato. Os valores obtidos ajustando a equação [2A] estão representados por símbolos cheios; os valores obtidos ajustando a equação [4A] (ou [5A] se k_4 não for determinável) estão representados por símbolos vazios. O significado de cada símbolo está listado nos gráficos. O parâmetro Ω também está representado.

e k_{1n} divergem, com este último aumentando progressivamente em relação a Ωk_3 . O mesmo parece estar acontecendo com os outros dois pares, $k_{ex}-k_4$ e $k_{met}-k_5$. Embora não tenha sido possível determinar k_4 e k_5 nas duas menores concentrações de octanoato, pelos motivos já discutidos anteriormente, percebe-se, sem dificuldades, que k_{met} diverge de k_5 e k_4 diverge de k_{ex} de modo ainda mais acentuado do que Ωk_3 de k_{1n} . Isto justifica a diminuição nos valores de $C_0 k_{1n}/(k_{ex} + k_{met})$, quando o que se esperava era exatamente o contrário.

Parece, portanto, que os dados se fecham em torno do mecanismo de troca rápida com a membrana plasmática. É preciso analisar, no entanto ainda, a questão de se a ausência de correlação positiva entre F_{met} e $C_0 k_{1n}/(k_{ex} + k_{met})$ não está refletindo o mecanismo da Figura 5, que é aquele no qual k_3 e k_4 tenderiam ao infinito em baixas razões [octanoato]/[albumina]. Para este mecanismo o parâmetro $C_0 k_{1n}/(k_{ex} + k_{met})$ é igual a $(C_{11} + C_{12})$, isto é, a soma das concentrações de dois estoques metabolizáveis. F_{met} representa a somatória da metabolização em todos os estoques, por isto, em princípio teria que haver correlação positiva entre F_{met} e $(C_{11} + C_{12})$. Somente não haverá correlação positiva em dois casos especialíssimos, resultantes de uma combinação de vários eventos. O primeiro deles é que k_5 seja zero, isto é, que não haja metabolização no segundo estoque (ver Figura 5), que C_{12} seja muito maior que C_{11} , e que a razão k_3/k_4 (que é igual a C_{12}) diminua à medida que C_0 aumente, de tal maneira que a soma $(C_{11} + C_{12})$ diminua ou pelo menos permaneça constante. Neste caso, F_{met} irá correlacionar com C_{11} (que não pode mais ser determinado quando k_3 e k_4 tendem ao infinito), mas não com $(C_{11} + C_{12})$. O outro caso é análogo ao anterior. Se não houver metabolização no primeiro estoque ($k_5 = 0$), se C_{11} for substancialmente maior do que C_{12} e se C_{11} diminuir à medida que

C_o aumentar, neste caso também poderá não haver correlação positiva entre F_{met} e (C₁₁ + C₁₂), embora se espere uma correlação positiva entre F_{met} e C₁₂. É claro que cada uma destas situações é bastante improvável, ainda mais que existem muitos dados em apoio ao mecanismo de uma troca rápida com a membrana plasmática. Assim mesmo, vale à pena investir algum tempo e espaço na análise desta possibilidade, pois, como se verá, esta análise poderá revelar alguns aspectos ainda não mencionados sobre o ajuste de modelos matemáticos às curvas de diluição de substâncias com comportamento complexo, como é o caso do octanoato.

4.5.3. A utilização da equação [1A] para a análise das curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato

Para evitar confusões será conveniente definir com clareza o que ainda está em jogo em termos da decisão sobre o mecanismo que deverá ser adotado como o mais provável para o octanoato. De um lado está o mecanismo que postula uma troca rápida do octanoato com a membrana plasmática e adjacências e uma troca relativamente lenta com o restante da célula, onde ocorre a metabolização (Figuras 4 e 10). Para este mecanismo, k₁ e k₂ sempre tendem ao infinito, e o deslocamento da curva de diluição do [1-¹⁴C]-octanoato para a direita (ver Figuras 14 a 20), à medida que aumenta a razão [octanoato]/[albumina] no perfusado, é consequência de um aumento na concentração do octanoato na membrana plasmática. A equação que descreve este mecanismo — que é a equação [4A] ou a equação [1A] com k₁ e k₂ muito grandes — converge para a equação [2A] apenas quando a concentração de octanoato na membrana plasmática, da qual o parâmetro Ω é uma medida, tende para zero.

O outro mecanismo, para o qual ainda resta alguma

possibilidade, é um mecanismo de dois estoques, com metabolização em apenas um deles, com k_3 e k_4 tendendo ao infinito quando a razão [octanoato]/[albumina] diminui (Figura 5). Este mecanismo, que é descrito pela equação [1A], só poderá explicar o deslocamento da curva de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato para a direita à medida que aumenta a razão [octanoato]/[albumina] (ver Figuras 14 a 20) como sendo o resultado de um grande aumento nos valores de k_1 e k_2 . Para baixas razões [octanoato]/[albumina], k_1 e k_2 deveriam ser pequenos; para altas razões, k_1 e k_2 deveriam ser muito grandes. A equação que descreve tal mecanismo converge para a equação [2A] se k_3 e k_4 tenderem ao infinito. Em resumo, este mecanismo postula que k_3 e k_4 tendem ao infinito quando diminui a razão [octanoato]/[albumina]; e, k_1 e k_2 tendem ao infinito quando aumenta a razão [octanoato]/[albumina]. A única maneira de testar estas previsões é tentar ajustar a equação [1A] a uma série de dados experimentais. Na série com albumina $450 \mu\text{M}$ é improvável que seja possível ajustar a equação [1A] aos dados, pois esta série seria justamente aquela que convergiu para a equação [2A]. Na série com albumina $150 \mu\text{M}$, no entanto, deve ser possível ajustar a equação [1A] na maioria dos casos, exceto para as curvas medidas com octanoato portal igual a 50 e $100 \mu\text{M}$, que também convergem para a equação [2A]. Para as concentrações acima de $100 \mu\text{M}$, no entanto, deverá ser possível ajustar a equação [1A] aos dados, pois as curvas de diluição não podem ser descritas adequadamente pela equação [2A]. É a variação dos valores de k_3 e k_4 que é crítica na análise dos resultados. Se realmente k_3 e k_4 tendem ao infinito quando diminui a razão [octanoato]/[albumina], então esta tendência deve estar presente nos valores otimizados. Caso contrário, pode-se descartar plenamente a possibilidade de um mecanismo de dois estoques que apresente a convergência esquematizada pela Figura 5.

4.5.3.1. Ajuste da equação [1A] às curvas
de diluição do [1-¹⁴C]octanoato

As equações ajustadas às curvas de diluição neste trabalho não podem ser consideradas simples. Tanto a equação [2A], como também a equação [4A], são bastante complexas. Elas parecem simples, no entanto, quando comparadas com a equação [1A]. Além de conter quatro séries infinitas, em comparação com apenas uma nas equações [2A] e [4A], a equação [1A] ainda possui uma integral dupla. Necessariamente, o tempo de cálculo que a equação [1A] requer deverá ser muito maior que o das outras. Além disto, a equação [1A] encerra mais parâmetros a serem otimizados, o que complica o procedimento de ajuste. Nos cálculos envolvendo a equação [1A] foi utilizado um programa escrito na linguagem Turbo-Pascal, que é cerca de duas vezes mais rápida que a linguagem Turbo-Basic. Não é uma diferença muito grande quando o tempo de cálculo é pequeno. Faz grande diferença, no entanto, quando uma única iteração leva 10 ou 20 horas, o que pode ocorrer mesmo utilizando um microcomputador de 40 MHz equipado com co-processador aritmético. O tempo de cálculo da equação [1A] aumenta à medida que k_1 e k_2 aumentam, provavelmente porque as séries infinitas demoram mais para convergir. Isto, aliás, vale também para as equações [2A] e [4A]. Estas últimas, no entanto, podem ser rapidamente ajustadas, com o tempo de cada iteração raramente ultrapassando a marca dos poucos minutos, mesmo utilizando a linguagem Turbo-Basic.

Um outro problema que surge ao lidar com a equação [1A] são as estimativas preliminares. Funções tão complexas como a equação [1A], com 6 parâmetros, podem descrever os dados experimentais com mais de uma combinação de valores, principalmente valores negativos. Estes últimos aparecem com muita frequência, mas não

têm nenhum significado. Por isto, o procedimento de ajuste tem que ser precedido de simulações nas quais valores prováveis dos parâmetros são introduzidos e as curvas são calculadas e comparadas com a curva experimental. Para esta finalidade o programa utilizado oferece também facilidades gráficas, o que ajuda muito na tomada de decisões.

Nas tentativas de ajustar um mecanismo de dois estoques que converge para aquele mostrado na Figura 5, é importante frisar novamente que o deslocamento da curva de diluição do [1-¹⁴C]-octanoato à medida que aumenta a razão [octanoato]/[albumina], neste caso, só pode ser explicado como um aumento paralelo nos valores de k_1 e k_2 . Por isto, para uma dada concentração de albumina, em baixas concentrações de octanoato, k_1 e k_2 devem ser relativamente pequenos e aumentar paralelamente à concentração do octanoato. Outra restrição que deve ser imposta é que a transformação metabólica deve ocorrer apenas no primeiro ou no segundo estoque, nunca nos dois. Assim ou k_3 deve ser nulo, ou k_4 . Com estas restrições em mente, foi possível ajustar a equação [1A] às curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato obtidas com albumina 150 μM e octanoato portal na faixa entre 200 e 490 μM . A Figura 39 mostra exemplos. Não foi possível ajustar as curvas obtidas com octanoato portal abaixo de 200 μM com valores pequenos de k_1 e k_2 . Valores negativos para as diversas constantes apareciam invariavelmente na primeira ou segunda iterações.

Conforme mostra a Figura 39, a equação [1A] consegue descrever muito bem as curvas experimentais de [1-¹⁴C]octanoato. Para provar mais uma vez, no entanto, que concordância entre curva teórica e experimental é apenas *conditio sine qua non* e não uma prova definitiva de que um mecanismo descrito pela equação

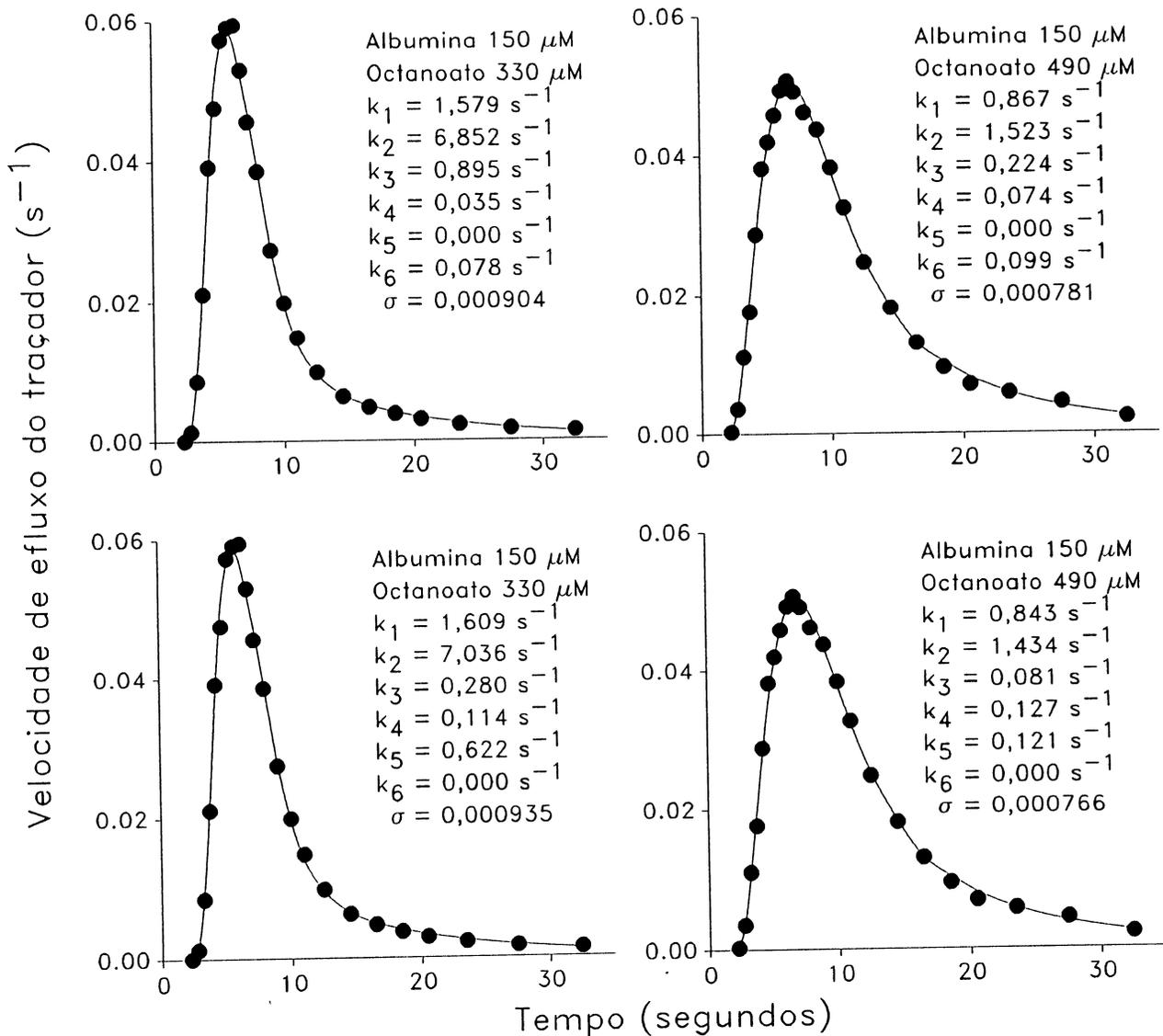


Figura 39. Ajuste da equação [1A] a duas curvas de diluição do [1-¹⁴C]octanoato obtidas com albumina 150 μM no perfusado. A equação foi ajustada aos dados experimentais através de um procedimento de mínimos quadrados, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. As condições experimentais e os valores otimizados obtidos para cada parâmetro estão relacionados em cada gráfico, bem como o erro padrão da estimativa (σ). Nos dois gráficos da parte superior a equação [1A] foi ajustada fixando arbitrariamente k_5 como igual a zero e nos dois gráficos da parte inferior k_5 foi fixado como zero. Os valores otimizados de t_0 e θ' foram obtidos da sobreposição das curvas da [³H]água e da [¹³¹I]-albumina, conforme ilustrado pela Figura 21. Legendas: curva experimental do [1-¹⁴C]octanoato, ●; curva calculada do [1-¹⁴C]octanoato, —.

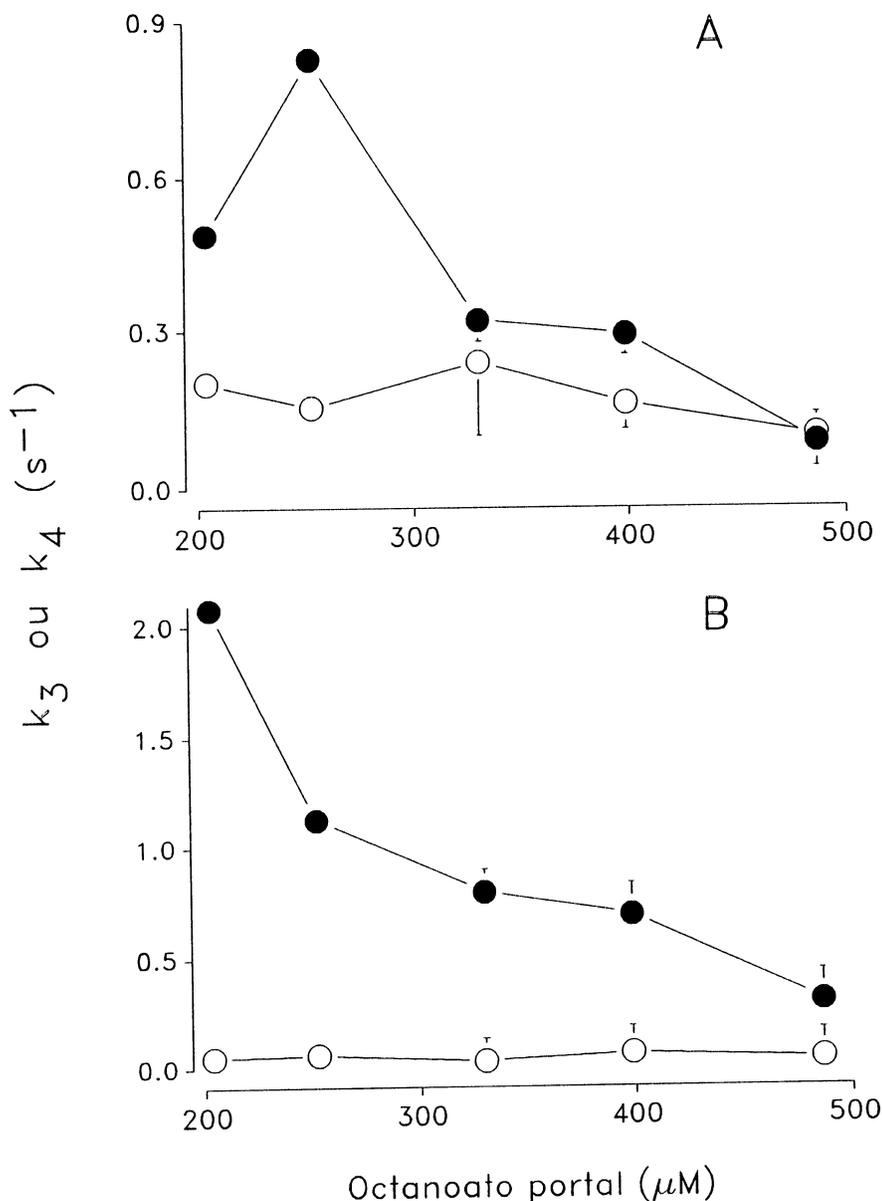


Figura 40. Valores de k_3 e k_4 obtidos do ajuste da equação [1A] a curvas de diluição de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato em função da concentração portal de octanoato. Estão representados os valores de k_3 e k_4 obtidos do ajuste de mínimos quadrados da equação [1A] às curvas de diluição de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato medidas com albumina $150 \mu\text{M}$ no perfusado e com octanoato portal na faixa entre 200 e $490 \mu\text{M}$ (ver Tabela 6). Na Figura 40A o ajuste foi feito considerando k_3 como igual a zero; na Figura 40B, por sua vez, k_4 foi considerado como igual a zero. Símbolos: k_3 , ●—●; k_4 , ○—○.

está correto, diferentes combinações de valores das constantes produzem ajustes similares. No painel superior da Figura 39 a equação [1A] foi ajustada às duas curvas experimentais com k_5 fixado em zero; no painel inferior k_5 foi fixado como zero. Nos dois casos houve um bom ajuste. Estatisticamente ambos são igualmente bons. Embora os valores de k_1 e k_2 sejam semelhantes, com k_5 ou k_6 iguais a zero, k_3 e k_4 são bastante diferentes.

Crucial, no entanto, é a variação de k_3 e k_4 em função da concentração de octanoato, que está mostrada na Figura 40. Conforme já mencionado, com k_5 ou k_6 iguais a zero, tanto k_3 como k_4 devem convergir para o infinito quando a concentração de octanoato diminui. A Figura 40 revela que este não é decididamente o caso. Quando k_5 é fixado em zero (Figura 40B), apenas k_3 tende a aumentar quando a concentração de octanoato diminui, com k_4 permanecendo muito pequeno. Isto significaria no máximo uma convergência para a condição-limite da Figura 6. Já se sabe, no entanto, que esta condição-limite também é incompatível com os dados. Quando k_6 é fixado em zero (Figura 40A), k_3 também aumenta nitidamente, e há uma pequena tendência de aumento em k_4 à medida que a concentração de octanoato diminui. Com octanoato portal 200 μM , no entanto, os valores de ambos são ainda bastante baixos e fica difícil imaginar que eles possam saltar repentinamente destes valores baixos para valores altos na passagem de octanoato 200 para 100 μM . Com simulações pode-se mostrar que tanto k_4 como k_3 teriam que apresentar valores superiores a $1,5 \text{ s}^{-1}$ para que a equação [1A] pudesse convergir para a equação [2A].

É interessante neste ponto comparar os valores de k_3 e k_4 , obtidos ajustando a equação [1A] aos dados assumindo $k_5 = 0$,

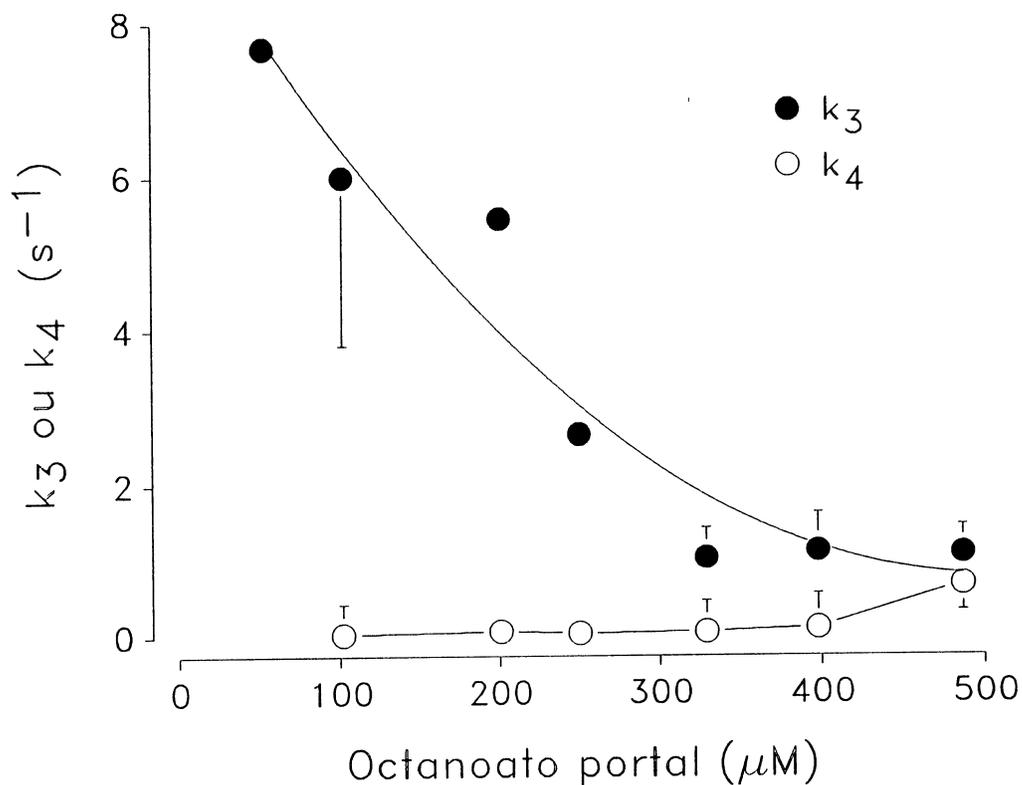


Figura 41. Valores de k_3 e k_4 obtidos do ajuste da equação [4A] a curvas de diluição de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato em função da concentração portal de octanoato. Estão representados os valores de k_3 e k_4 obtidos do ajuste de mínimos quadrados da equação [4A] às curvas de diluição de $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato, medidas com albumina $150 \mu\text{M}$ no perfusado e com octanoato portal na faixa entre 50 e $490 \mu\text{M}$ (ver Tabela 6).

com os valores de k_3 e k_4 obtidos ajustando a equação [4A] (ou [5A]) aos mesmos dados. Esta última relação está mostrada na Figura 41. No caso da equação [4A] (ou [5A]), naturalmente, k_3 também pôde ser obtido para concentrações de octanoato abaixo de 200 μM (50 e 100 μM). O valor de k_4 para octanoato 50 μM , no entanto, não pôde ser obtido, já que para esta concentração, conforme já mencionado, a equação [5A] é suficiente para descrever as curvas de diluição. A dependência de k_3 e k_4 da concentração portal de octanoato nas Figuras 40B e 41 é muito semelhante, assim como os valores. Em linhas gerais a semelhança aumenta quando aumenta a concentração portal de octanoato. Isto pode ser explicado como resultante do fato de que k_1 e k_2 obtidos da equação [1A] também aumentam quando aumenta a concentração portal de octanoato. E, na equação [4A], k_1 e k_2 já são assumidamente, e por princípio, muito grandes.

Em vista dos resultados da Figura 40 pode-se dizer, portanto, que um mecanismo que converge para a situação da Figura 5 em baixas razões [octanoato]/[albumina] é altamente improvável. Na verdade, as tentativas de ajustar a equação [1A] aos dados com baixos valores de k_1 e k_2 aponta, muito mais na direção de um mecanismo de troca rápida com a membrana plasmática do que em direção a qualquer outro mecanismo.

4.5.3.2. Simulações utilizando a equação [1A] com altos valores de k_1 e k_2

Parece, portanto, que a equação [4A] faz uma boa descrição do comportamento do octanoato no fígado. Não se deve deixar de lembrar, no entanto, que esta equação é na verdade uma simplificação da equação [1A]. Esta última, por ser muito complexa, pode descrever várias situações, inclusive aquela em que

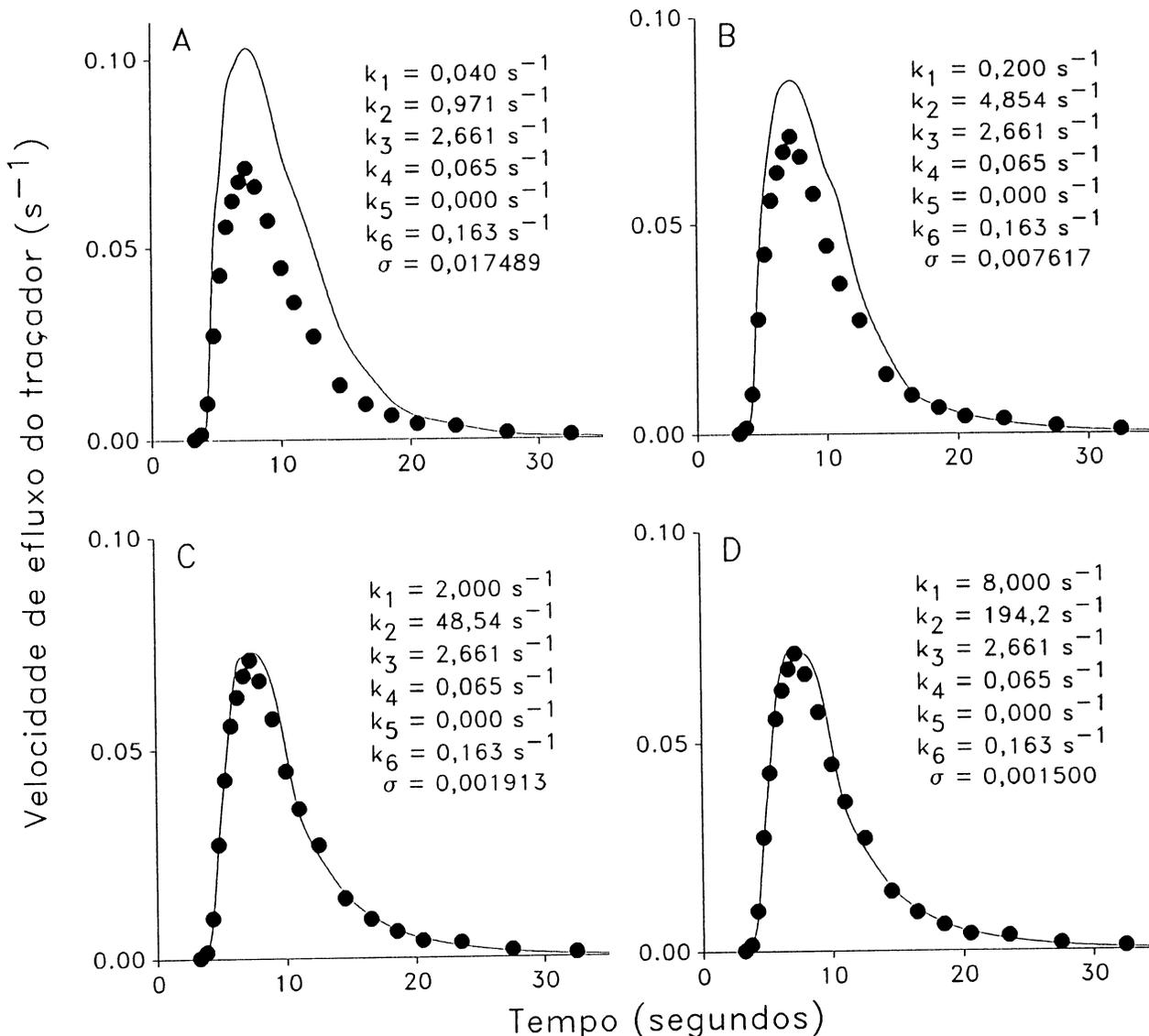


Figura 42. Comparação de curvas calculadas utilizando a equação [1A] e uma curva experimental de $[1-^{14}C]$ octanoato com valores crescentes de k_1 e k_2 mantidos numa razão igual a Ω . Os pontos representam uma curva de $[1-^{14}C]$ octanoato obtida com albumina 450 μM e octanoato portal igual a 500 μM . Os valores de k_3 , k_4 e k_5 são aqueles obtidos ajustando a equação [4A] aos dados experimentais. Eles estão listados em cada gráfico. Os valores de k_1 e k_2 foram aumentados arbitrariamente, porém numa razão fixa igual ao valor de Ω (0,041), que também foi obtido ajustando a equação [4A] aos dados. Os valores de t_0 e θ' foram, respectivamente, 2,956 segundos e 1,17. O símbolo σ representa o erro padrão da estimativa.

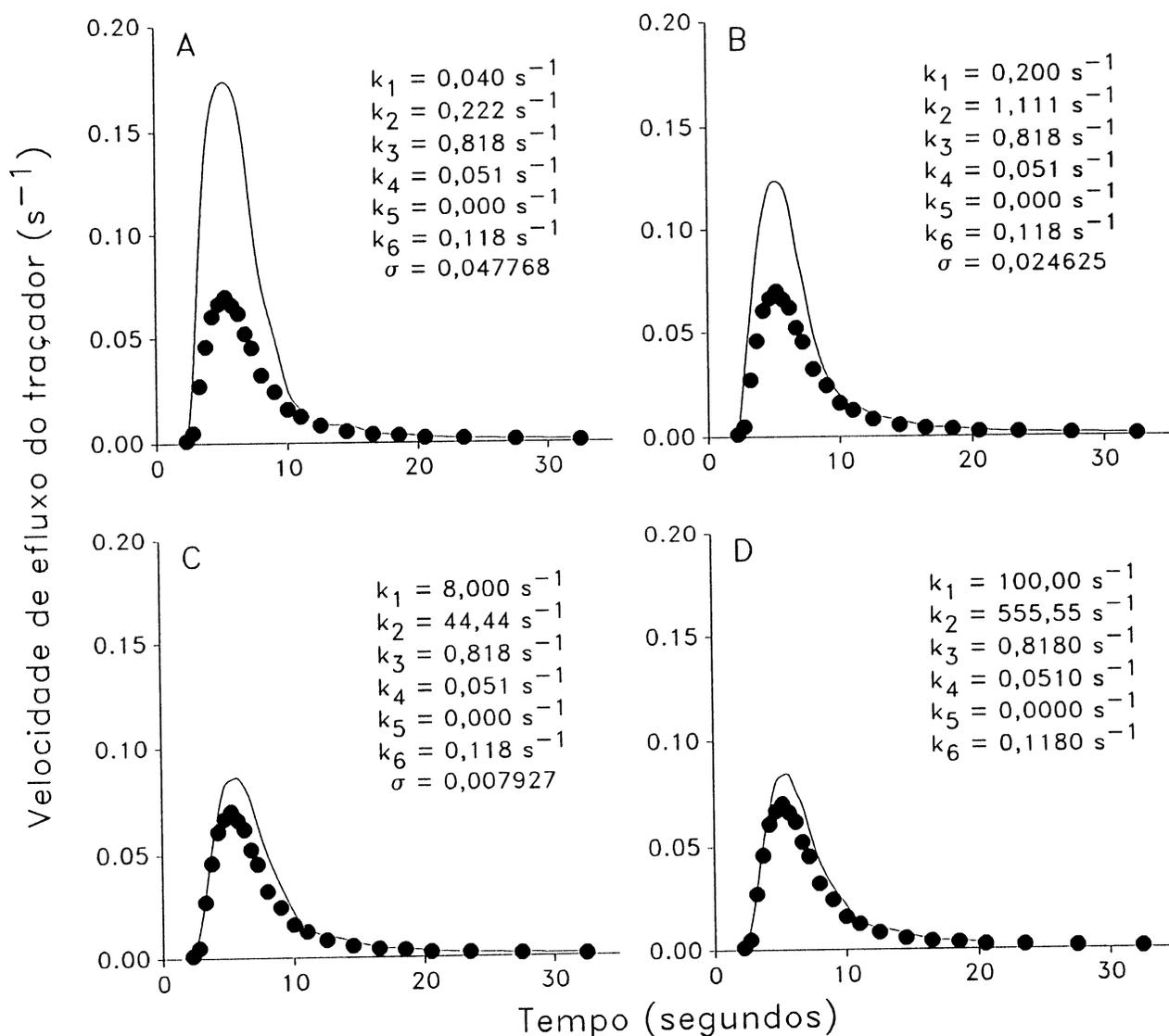


Figura 43. Comparação de curvas calculadas utilizando a equação [1A] e uma curva experimental de [1-¹⁴C]octanoato com valores crescentes de k₁ e k₂ mantidos numa razão igual a Ω. Os pontos representam uma curva de [1-¹⁴C]octanoato obtida com albumina 150 μM e octanoato portal igual a 490 μM. Os valores de k₃, k₄ e k₅ são aqueles obtidos ajustando a equação [4A] aos dados experimentais. Eles estão listados em cada gráfico. Os valores de k₁ e k₂ foram aumentados arbitrariamente, porém numa razão fixa igual ao valor de Ω (0,18), que também foi obtido ajustando a equação [4A] aos dados. Os valores de t₀ e θ' foram, respectivamente, 1,943 segundos e 1,68. O símbolo σ significa o erro padrão da estimativa.

k_1 e k_2 são muito grandes. Em princípio deveria ser possível obter com a equação [1A] os mesmos dados que aqueles obtidos utilizando a equação [4A]. Na prática, no entanto, seria muito difícil, se não impossível, ajustar a equação [1A] com valores muito altos de k_1 e k_2 . O tempo de cálculo seria impraticável com um microcomputador, mesmo com o mais moderno disponível e, mesmo assim, é praticamente certo que apenas a razão k_1/k_2 pudesse ser determinada com precisão além de k_3 , k_4 e k_5 . Isto é exatamente o que a equação [4A] pode fornecer.

No entanto, pode-se fazer algumas simulações introduzindo na equação [1A] os parâmetros k_3 , k_4 e k_5 e valores arbitrários de k_1 e k_2 , estes últimos numa razão igual ao valor otimizado do parâmetro Ω . O que se pode esperar é que, quanto maiores forem os valores de k_1 e k_2 , tanto mais próximas devem estar as curvas calculadas das curvas experimentais. Demonstrar isto equivale a mostrar duas coisas: (1) que a equação [1A] realmente pode descrever as curvas experimentais do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato com valores altos de k_1 e k_2 , mesmo que esta curva tenha um pico na mesma posição da referência para o espaço celular; e, (2) que as deduções algébricas deste trabalho, bem como os procedimentos numéricos, estão corretos.

As Figuras 42 e 43 mostram os resultados de simulações desse tipo. Na Figura 42 o valor de Ω é baixo, 0,0411, pois se trata de um experimento com uma baixa razão [octanoato]/[albumina] (1,11). Fica bastante claro que a curva calculada tende a se aproximar da curva experimental à medida que k_1 e k_2 são aumentados. A curva calculada com $k_1 = 8,0 \text{ s}^{-1}$ e $k_2 = 194,2 \text{ s}^{-1}$ já está bem próxima da curva experimental. Com um valor tão alto de k_2 , o tempo de cálculo, mesmo num microcomputador de 40 MHz equipado com co-processador aritmético, é bastante elevado. Para uma precisão de 0,1% na avaliação das integrais, foram necessárias aproximadamen-

te 20 horas para calcular a curva inteira. A simulação da Figura 43 foi feita com dados experimentais obtidos com uma razão [octanoato]/[albumina] igual a 3,27. Neste caso Ω é maior, 0,18. A curva calculada também tende a se aproximar da curva experimental à medida que k_1 e k_2 aumentam. Não foi possível atingir o mesmo grau de concordância que na Figura 42, no entanto. Isto porque com $k_1 = 100$ e $k_2 = 555,55 \text{ s}^{-1}$, os limites do Turbo-Pascal foram atingidos. Na verdade, com estes valores tão altos de k_1 e k_2 , a curva pôde ser calculada apenas até o tempo de 20,5 segundos. O tempo de cálculo foi superior a 24 horas.

Apesar de altos, mesmo os maiores valores de k_1 e k_2 empregados nas simulações estão ainda muito abaixo do que se pode esperar teoricamente com base nas constantes de velocidade de dissociação do complexo albumina-octanoato para entrar em fosfolipídeos (Hamilton, 1989). A 42°C o valor esperado de k_1 estaria em torno de 940 s^{-1} ; e a 33°C em torno de 236 s^{-1} . Estes valores foram obtidos dividindo as constantes de dissociação da Tabela 1 por um valor médio de θ' igual 1,5. A 37°C , o valor de k_1 teria que ser maior que 236 e menor que 940 s^{-1} . Um valor médio ponderado para a distância entre 37°C e os dois extremos estaria em torno de 500 s^{-1} . Valores tão altos não podem ser fornecidos a um programa em Turbo-Pascal, pois na equação [1A] eles gerariam funções exponenciais com valores superiores a $1,1 \cdot 10^{4932}$ e/ou inferiores a $3,4 \cdot 10^{-4932}$, que são os limites desta linguagem por enquanto.

De qualquer forma pode-se concluir que a equação [1A], com altos valores de k_1 e k_2 pode descrever as curvas de diluição do $[1-^{14}\text{C}]$ octanoato mesmo que o pico se situe em torno do pico da referência para o espaço extracelular. Comprova-se também a correção das soluções algébricas encontradas bem como dos

procedimentos numéricos adotados.

4.6. Um paralelo do comportamento do octanoato, do palmitato e do niflumato

Estudos similares a este foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá com o palmitato (Ferraresi-Filho, 1989; Ferraresi-Filho *et al.*, 1992) e com o niflumato (Kelmer-Bracht, 1993; Kelmer-Bracht *et al.*, 1993). O palmitato é um dos ácidos graxos de cadeia longa (16 carbonos) mais abundantes na natureza. O octanoato e o palmitato têm ambas cadeia alifática, linear. Já o niflumato é uma droga anti-inflamatória da família dos ácidos fenâmicos. O que mais interessa no contexto deste trabalho é que o niflumato é um ácido carboxílico com dois anéis aromáticos ligados por uma amina secundária (Kelmer-Bracht, 1993).

O comportamento de cada uma destas três substâncias no fígado é diferente. O palmitato tem acesso lento, tanto à membrana celular como ao interior da célula. Apenas um estoque celular pôde ser detectado e as curvas de diluição de [1-¹⁴C]palmitato podem ser descritas pela equação [2A] em toda a faixa de concentração de palmitato e albumina (Ferraresi-Filho, 1989; Ferraresi-Filho *et al.*, 1992).

O niflumato difere muito do palmitato. Esta droga tem acesso muito rápido ao espaço celular. O seu espaço aparente de distribuição é grande e, dependendo das condições, pode superar em 71 vezes o espaço aquoso. Por isto as curvas de diluição de niflumato podem ser todas descritas pela equação [6A] (Kelmer-Bracht, 1993; Kelmer-Bracht *et al.*, 1993).

O octanoato tem o comportamento descrito neste trabalho que, como se viu, é diferente do comportamento das outras duas

Tabela 9

Comparação de alguns parâmetros de transporte e metabolismo do octanoato e do palmitato. Os dados do octanoato são todos deste trabalho. Os dados do palmitato foram também obtidos no Laboratório de Metabolismo Hepático através de experimentos de diluição de indicadores e foram coletados em Ferraresi-Filho (1989) e Ferraresi-Filho *et al.* (1992). O símbolo C_{12} representa, tanto para o palmitato como para o octanoato, a concentração do estoque intracelular metabolizável. Para maiores detalhes, vide o texto.

Albumina	Condições			Parâmetros			
	Palmitato portal	Palmitato livre (C_{12})	Octanoato portal	Octanoato livre (C_{12})	F_{met} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{al}^{-1}$)	C_{12} (μM)	F_{met}/C_{12} (min^{-1})
μM							
500	500	0,93			0,37	9,4	39,1
400	400	0,92			0,38	5,3	71,7
450			500	30,0	1,68	226,0	7,4
450			400	24,0	1,15	278,0	4,1
450			300	16,5	0,85	198,0	4,3
150	550	14,10			1,45	36,9	39,3
150	420	6,21			1,11	33,9	32,7
150	300	3,19			0,79	27,6	28,6
150			330	53,6	1,46	180,0	8,1
150			100	11,1	0,43	91,0	4,7
150			50	5,5	0,22	48,1	4,6
15	100	22,69			0,43	25,0	17,2

Tabela 10

Comparação de alguns parâmetros de transporte e metabolismo do octanoato e do niflumato. Os dados do octanoato são todos deste trabalho. Os dados do niflumato foram também obtidos no *Laboratório de Metabolismo Hepático* através de experimentos de diluição de indicadores e foram coletados em **Kelmer-Bracht (1993)** e **Kelmer-Bracht et al. (1993)**. Os valores de F_{met} do niflumato, que são dados em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{grama de fígado})^{-1}$ por **Kelmer-Bracht et al. (1993)** foram convertidos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{ml do espaço aquoso celular})^{-1}$ utilizando o fator $0,605 \text{ ml} \cdot (\text{grama de fígado})^{-1}$. Este fator foi determinado a partir dos tempos médios de trânsito da $[^{131}\text{I}]$ albumina e da $[^3\text{H}]$ água obtidos neste trabalho. O símbolo C_{12} representa, tanto para o niflumato como para o octanoato, a concentração do estoque intracelular metabolizável. Mesmo na ausência de albumina, a concentração de niflumato livre (C_{af}) pode ser menor que a concentração portal porque C_{af} representa a média logarítmica entre a concentração portal e venosa. Para maiores detalhes, vide o texto.

Albumina	Condições		Parâmetros				
	Niflumato portal	Niflumato livre (C_{af})	Octanoato portal	Octanoato livre (C_{af})	F_{met} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$)	C_{12} (μM)	F_{met}/C_{12} (min^{-1})
μM							
			300	16,5	0,85	198,0	4,3
			490	99,6	1,55	103,0	15,0
	176	18,9			0,059	1354,8	0,043
	51	18,6			0,043	1129,0	0,038
			190	37,1	0,808	261,0	3,10
			50	7,1	0,240	26,0	9,20
	10	6,8			0,039	508,0	0,076
	100	99,0			0,012	2766,1	0,004

substâncias lipofílicas: o acesso à membrana plasmática e suas adjacências é muito rápido, mas o acesso ao restante da célula é mais lento.

O que foi dito nos três parágrafos anteriores não esgota as particularidades do comportamento de cada substância que podem ser comparadas. Há outros detalhes mais sutis que merecem ser analisados. Sabe-se, por exemplo, que o fígado metaboliza o octanoato fornecido exogenamente mais rapidamente do que o palmitato. Vários trabalhos atestam isto. Bracht *et al.* (1990), por exemplo, compararam a extração percentual do [1-¹⁴C]palmitato e do [1-¹⁴C]octanoato numa única passagem pelo fígado para várias concentrações de albumina, verificando que a do octanoato era sempre maior.

A Tabela 9 mostra os valores de F_{met} (a velocidade de metabolização) e de C_{12} (a concentração do estoque metabolizável) do palmitato e do octanoato numa série de condições comparáveis para os dois ácidos graxos. Os dados do palmitato foram obtidos de Ferraresi-Filho (1989). O significado de "condições comparáveis" varia. Por um lado pode-se comparar os valores de F_{met} e C_{12} para concentrações portais iguais ou próximas dos ácidos graxos e da albumina; ou, pode-se comparar valores de F_{met} e C_{12} para concentrações próximas ou iguais às concentrações livres (C_{ef}) dos ácidos graxos. Mais informativa talvez, será a comparação das razões F_{met}/C_{12} , *i.e.*, as velocidades de metabolização por unidade de concentração intracelular, as quais realmente são uma medida da capacidade do sistema enzimático em metabolizar cada ácido graxo.

Quando se comparam concentrações semelhantes de albumina e dos ácidos graxos no espaço extracelular verifica-se realmente que a velocidade de metabolização do octanoato é maior do que a do palmitato. Por exemplo, com palmitato portal 400 e 500 μM e

albumina 400 e 500 μM , o valor de F_{met} do palmitato está entre 0,37 e 0,38 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Em condições semelhantes, o octanoato é metabolizado de três a quatro vezes mais rapidamente. Estas condições são fisiológicas. Pode-se dizer, portanto, que em condições fisiológicas o octanoato é metabolizado com maior rapidez que o palmitato. Com albumina 150 μM e palmitato ou octanoato portais na faixa dos 300 μM , a diferença relativa cai um pouco, porém, ainda assim ela é alta a favor do octanoato. Deve-se notar, no entanto, que a concentração livre de palmitato (C_{ef}) tende sempre a ser menor que a do octanoato, já que a albumina tem maior afinidade pelo primeiro. É a concentração livre no perfusado que influencia a concentração intracelular. Por isto, a questão que surge agora é se a aparentemente maior velocidade de metabolização do octanoato se deve de fato a uma maior afinidade do sistema enzimático por este ácido graxo, ou se isto é consequência de uma maior concentração intracelular. Uma comparação dos valores de C_{12} do palmitato e do octanoato logo revela que os do octanoato são sempre maiores. Com isto a razão F_{met}/C_{12} para o octanoato é muito menor que a do palmitato. Isto significa, em princípio pelo menos, que o sistema, ou os sistemas enzimáticos intracelulares são, na realidade, mais ativos com palmitato do que com octanoato. Isto é o contrário do que poderia parecer à primeira vista. Estas conclusões já foram expressas por Bracht *et al.* (1990), embora baseados em uma análise preliminar do comportamento do octanoato, muito menos completa que a análise realizada neste trabalho.

Os dados na Tabela 9 também são compatíveis com a idéia predominante de que a acil-CoA sintetase para cadeias longas microsomal não é a principal responsável pela metabolização do octanoato. De fato, a V_{max} da acil-CoA sintetase para cadeias longas com o octanoato é dez vezes menor que a V_{max} com o

palmitato, conforme já citado na *Introdução* (Noy e Zakim, 1985). Mesmo saturada — o K_m desta enzima para com o octanoato parece ser o menor dentre os ácidos graxos (Noy e Zakim, 1985) e a concentração intracelular de octanoato é alta conforme a Tabela 9 — a sua atividade poderia corresponder no máximo a 10% da atividade com o palmitato. No entanto, a velocidade de transformação metabólica do octanoato exógeno é maior que a do palmitato exógeno, donde se conclui que deve haver outro sistema responsável pela maior parte da metabolização do octanoato. As acil-CoA sintetases da membrana externa e da membrana interna das mitocôndrias são mais ativas com palmitato do que com octanoato e, portanto, não poderiam, em tese, levar a uma metabolização mais rápida do octanoato (ver *Introdução*). Sobra apenas a acil-CoA sintetase da matriz mitocondrial, que é muito mais ativa com octanoato do que com palmitato, que pode ser a responsável pela maior parte do octanoato transformado.

A concentração intracelular de octanoato é bastante elevada, mas o fígado tem uma capacidade ainda maior de acumular niflumato no espaço intracelular. Conforme mostra a Tabela 10, mesmo que a concentração livre no espaço extracelular seja semelhante para os dois compostos, a concentração intracelular do niflumato é sempre muito superior à do octanoato. Por exemplo, tome-se octanoato portal $300 \mu\text{M}$ e albumina $450 \mu\text{M}$, o que produz uma concentração livre (C_{ef}) igual a $16,5 \mu\text{M}$. A concentração intracelular de octanoato é igual a $198,0 \mu\text{M}$. Uma concentração livre comparável de niflumato, igual a $18,6 \mu\text{M}$ consegue-se com albumina $20 \mu\text{M}$ e niflumato portal igual a $51 \mu\text{M}$. A concentração intracelular, no entanto, atinge $1129 \mu\text{M}$, que é 5,7 vezes maior que a concentração intracelular de octanoato. Isto se repete para as outras condições. Por isto, a razão F_{met}/C_{12} para o niflumato é muito menor que para o octanoato, o que significa que o sistema

enzimático do octanoato é mais eficiente que o do niflumato, embora menos eficiente que o do palmitato. É claro que o niflumato é metabolizado por sistemas totalmente distintos daquele dos ácidos graxos. O octanoato e o palmitato, no entanto, são em parte metabolizados pelas mesmas enzimas e sobretudo, estão sujeitos ao mesmo tipo de reações.

5. DISCUSSÃO FINAL

5.1. Aspectos gerais — Conclusões

Convém resumir os principais argumentos que apoiam a conclusão fundamental deste trabalho. Esta conclusão fundamental é que o octanoato se distribui em dois estoques celulares, dispostos em série. O primeiro estoque celular seria formado basicamente pela membrana celular e suas adjacências; a este estoque o octanoato tem acesso muito rápido, limitado apenas pelo fluxo; não há metabolização neste estoque. O segundo estoque seria o espaço celular propriamente dito; a este estoque o octanoato tem acesso relativamente lento e é nele que ocorre a metabolização. Este mecanismo está esquematizado na Figura 10. Estas conclusões encontram apoio em várias evidências produzidas, principalmente neste trabalho, e também em dados da literatura. As evidências mais importantes são:

1. A equação que descreve o comportamento de uma substância com as características acima (equação [4A]), isto é, distribuição em dois estoques, acesso rápido ao primeiro e metabolização no segundo, ajusta aos dados experimentais; isto foi verdadeiro para todas as concentrações de octanoato (50 a 500 μM) e albumina (50 a 450 μM) utilizadas neste trabalho; outros modelos ajustam apenas em determinada faixa de concentração;

2. Há uma concordância muito boa entre as velocidades de metabolização, calculadas a partir das constantes de velocidade obtidas do ajuste da equação [4A] aos dados experimentais e as velocidades de metabolização calculadas a partir de tempos médios de trânsito; estas últimas não têm implicações mecanísticas; esta

concordância vale para qualquer concentração de octanoato e albumina; para outros modelos em geral não há concordância (Tabela 8);

3. Há boa concordância entre os valores do parâmetro $\Omega\theta'$, obtidos ao ajustar o modelo aos dados, e o mesmo parâmetro calculado a partir de tempos médios de trânsito (Tabela 8);

4. Existe uma correlação entre a concentração de octanoato no primeiro estoque (membrana plasmática; $C_{11}\theta'$) e a concentração livre de octanoato no espaço extracelular (C_{ex}) (Figura 31); esta correlação deve existir se o octanoato realmente se comporta de acordo com o mecanismo da Figura 10;

5. Foi possível demonstrar correlação entre a velocidade de influxo no segundo estoque (F_{in2}) e a concentração de octanoato no primeiro estoque (C_{11}); também esta correlação existe teoricamente (Figura 32);

6. Existe ainda uma correlação entre a velocidade de metabolização (F_{met}) e a concentração de octanoato no segundo estoque (C_{12}), correlação esta que é também esperada teoricamente (Figura 33);

7. O ajuste das equações que descrevem outros mecanismos, quando possível, produz parâmetros inconsistentes: (a) certas correlações esperadas não são de fato observadas ou, (b), tendências esperadas teoricamente não são verificadas na prática (Figura 40);

8. Uma comparação dos parâmetros obtidos ao ajustar a equação

que descreve mecanismos que convergem para uma situação de dois estoques quando Ω tende para zero com os parâmetros do mecanismo da Figura 10, também favorece este último; quando Ω tende para zero as constantes de velocidade determinadas ajustando cada um dos mecanismos convergem mutuamente para valores próximos (Figura 38);

9. Finalmente, o mecanismo da Figura 10 também está de acordo com dados na literatura, que dão conta de um acesso rápido do octanoato às estruturas fosfolipídicas (Hamilton, 1989); para ácidos graxos de cadeia longa, palmitato por exemplo, cujo acesso aos fosfolipídeos é lento, um mecanismo correspondente, de acesso lento à membrana plasmática, foi encontrado em estudos similares aos realizados neste trabalho (Ferraresi-Filho *et al.*, 1992).

Os nove pontos acima são, tomados em conjunto, indicações muito fortes de que o octanoato se comporta conforme esquematizado na Figura 10. Porém, é preciso mencionar que as evidências são de natureza cinética e, por isto mesmo, como sempre acontece com evidências cinéticas, o quadro que se pode desenhar inclui apenas aquilo que os métodos cinéticos permitem enxergar. Por isto, o que se deve acrescentar neste ponto da discussão, é que a Figura 10 descreve aquilo que foi possível enxergar com a ajuda da técnica de estudo utilizada. Algumas das possíveis coisas que o método esconde, mas que se sabe, assim mesmo, que podem estar acontecendo, serão discutidas nos próximos itens.

Embora os resultados já tenham sido discutidos à medida que foram apresentados, há ainda dois tópicos que merecem uma discussão mais detalhada. Estes dois tópicos dizem respeito à natureza dos dois estoques de octanoato detectados cineticamente.

No caso do primeiro estoque, que parece ser formado basicamente pela membrana plasmática e suas adjacências, interessa sobretudo saber qual é a relação molar entre o octanoato e os lipídeos.

5.2. A natureza do primeiro estoque de octanoato: há lipídeos suficientes na membrana celular para acomodar o octanoato?

A concentração máxima de octanoato no primeiro estoque ($C_{11\theta'}$) encontrada neste trabalho foi de $656 \text{ nmol} \cdot (\text{ml do espaço aquoso celular})^{-1}$. Isto ocorreu com albumina $50 \mu\text{M}$ e octanoato extracelular médio (C_e) de $356 \mu\text{M}$, ou $356 \text{ nmol} \cdot (\text{ml espaço extracelular})^{-1}$. Este é o valor máximo, encontrado para a maior razão octanoato/albumina empregada neste trabalho. Em geral ele está muito abaixo disto, principalmente quando a albumina está presente em concentrações fisiológicas. Por exemplo, com albumina $450 \mu\text{M}$ e octanoato portal $500 \mu\text{M}$, o valor de $C_{11\theta'}$ é igual a $21,2 \text{ nmol/ml}$. Para o valor máximo de $C_{11\theta'}$ encontrado, a razão $C_{11\theta'}/C_e$ é igual a $1,84$. O número em si deve ser encarado com reservas, pois o real gradiente de concentração é de fato muito maior. Deve-se lembrar que $C_{11\theta'}$ está sendo expresso por unidade de espaço extracelular, pois não se conhece muito bem o espaço que a membrana celular ocupa. Sabe-se, porém, que ele é muito menor que o espaço extracelular, pois a membrana plasmática é muito fina. Por isto, se o octanoato detectado no primeiro estoque realmente está todo imerso na membrana plasmática, a concentração neste espaço deve ser bastante elevada, ao menos quando a concentração de octanoato livre no espaço extracelular é alta. A questão que surge de modo quase natural, diz respeito à capacidade que os lipídeos da membrana plasmática têm em acomodar tal quantidade de octanoato. Será necessário verificar a razão

molar lipídeos da membrana/octanoato e verificar se ela é maior que a unidade. Um valor inferior à unidade significará mais octanoato do que lipídeos, uma situação bastante improvável.

Noy *et al.* (1986) calcularam que, no rato, há 600 nmol de fosfolipídeos sinusoidais por grama de fígado. Eles utilizaram no cálculo as estimativas de Blouin *et al.* (1977), de que a área das membranas plasmáticas no fígado é de 300 cm²/g e que 70% são membranas sinusoidais, o que corresponde a 210 cm²/g. Sabendo a área por mol de fosfolipídeo, (0,35 cm²/nmol, em média), chega-se ao valor acima. Os próprios autores consideram que este valor está superestimado. Além disto eles não levam em conta os outros lipídeos, como triacilgliceróis e colesterol.

É difícil saber porque Noy *et al.* (1986) preferiram o valor encontrado nos seus cálculos aos dados experimentais de Pflieger *et al.* (1968), que já estavam disponíveis. Estes autores mediram o teor em lipídeos das membranas plasmáticas no fígado. De fato, segundo estes autores, há 230 nmol de fosfolipídeos sinusoidais por grama de fígado, assumindo que o peso molecular médio dos fosfolipídeos é igual a 721,9 e que 70% da membrana plasmática é sinusoidal, de acordo com os dados de Blouin *et al.* (1977). Isto é pouco mais que um terço do valor calculado por Noy *et al.* (1986). Como os dados de Pflieger *et al.* (1968) são experimentais, eles devem merecer a preferência. Além do mais, Pflieger *et al.* (1968) também mediram os outros lipídeos da membrana plasmática: colesterol livre (212 nmol/g), triglicerídeos (10,3 nmol/g), ácidos graxos livres (34,4 nmol/g) e colesterol esterificado (7,3 nmol/g). Os valores correspondem aos teores sinusoidais. Com referência aos fosfolipídeos e triglicerídeos, convém expressá-los em termos de cadeias laterais hidrocarbonadas, em geral de ácidos graxos longos. Seriam duas cadeias laterais para cada fosfolipídeo e três para cada triglicerídeo. Além disto, será

necessário expressar o teor em lipídeos na mesma unidade em que foi expressa a concentração de octanoato, quer dizer, em nmol por ml do espaço extracelular. Isto pode ser feito desde que se conheça o espaço extracelular por grama de fígado. Este espaço pode ser calculado como $F(\bar{t}_{a1b} - \bar{t}_o)/p$. F é o fluxo através do órgão, \bar{t}_{a1b} o tempo médio de trânsito da albumina, \bar{t}_o o tempo de trânsito pelos grandes vasos e p o peso úmido do fígado. O valor obtido em 53 experimentos foi igual a $0,43 \pm 0,015$ ml/g. Utilizando este valor para o espaço extracelular chega-se a um número final e total de 1731,4 nmol de cadeias laterais hidrocarbonadas mais colesterol livre e esterificado por ml do espaço extracelular. A maior quantidade de octanoato encontrada no primeiro estoque foi de 656 nmol/ml. A maior razão molar seria então de 2,64 mol de cadeias hidrocarbonadas mais colesterol por mol de octanoato. Na condição fisiológica de albumina 450 μ M e octanoato portal 500 μ M, esta razão é muito maior: 81,7. Deve-se considerar também, que a membrana plasmática contém proteínas, na verdade, segundo Pflieger *et al.* (1968), há 0,88 mg/g de proteínas contra 0,39 mg/g de lipídeos totais. Além disto, deve-se considerar o tamanho do octanoato, 8 carbonos em comparação com os 16 ou mais que as cadeias hidrocarbonadas dos lipídeos das membranas costumam ter. Teoricamente, duas moléculas de octanoato podem alinhar-se ao longo de uma cadeia hidrocarbonada de 16 a 20 carbonos. Parece, portanto, que há espaço suficiente para acomodar as quantidades de octanoato detectadas no primeiro estoque, embora se deva também dizer que os maiores valores encontrados, válidos para altas razões octanoato/albumina, devem provocar alterações significativas nas propriedades das membranas, mesmo que estas sejam reversíveis.

Que o octanoato altera as propriedades da membrana tem alguma

evidência no fato de a representação de $C_{11\theta'}$ contra C_{ef} ser parabólica e não linear (Figura 31), o que significa que a quantidade de octanoato no primeiro estoque não é proporcional a C_{ef} havendo um aumento na afinidade do primeiro estoque pelo octanoato à medida que C_{ef} aumenta. Parece que o octanoato cria novos espaços para si mesmo à medida que sua concentração na membrana aumenta. Se a afinidade não aumentasse, a relação seria linear e poderia ser descrita por uma equação de regressão que prescinde do termo em C_{ef}^2 (ver legenda da Figura 31), isto é, $C_{11\theta'}$ seria igual a $-0,0161 + 0,00155C_{ef}$. Esta relação pode ser usada para calcular a quantidade teórica de octanoato no primeiro estoque, caso não houvesse aumento na afinidade. Para o maior valor de C_{ef} , que é igual a $231 \mu\text{M}$, o valor de $C_{11\theta'}$ calculado é de 197 nmol/ml . Isto é menos de um terço do valor efetivamente medido, que é de 656 nmol/ml , conforme já mencionado acima.

É impossível dizer, com os dados disponíveis, como o octanoato aumenta o seu espaço, aparente ou real, na membrana. Pode ser que a formação de dímeros seja facilitada, por exemplo, já que os ácidos graxos apresentam uma certa tendência neste sentido (Spector *et al.*, 1971). É provável, também, que o octanoato altere a fluidez da membrana, a exemplo do que fazem ácidos graxos de cadeia longa (Rhoads *et al.*, 1983). Neste sentido, deve ser lembrado que o octanoato é líquido a 37°C . A formação de micelas não parece ter nada a ver com o fenômeno, já que a concentração crítica para a formação destas estruturas, para o octanoato, está em torno de $0,4 \text{ M}$, conforme dados da literatura (Klevens, 1948).

Por outro lado, pode ser também que o octanoato tenha acesso a camadas mais profundas, além da membrana plasmática que separa as células dos sinusóides. Por exemplo, o octanoato poderia difundir rapidamente para as membranas celulares baso-laterais e

mesmo ter acesso rápido às porções do retículo endoplasmático ou de outras estruturas membranosas bem próximas à membrana plasmática. Poderia também interagir com proteínas das membranas, sobretudo com as glicoproteínas do glicocálix. Tudo isto são possibilidades que não podem ser descartadas, mas que dependem de experimentação para serem confirmadas ou desmentidas.

Ainda em relação à membrana plasmática, há uma outra questão que pode ser formulada. Algum dos resultados deste trabalho poderia ser encarado como evidência de que o carreador de ácidos graxos de cadeia longa encontrado por Stremmel *et al.* (1985) também exerce algum papel nas interações do octanoato com a membrana plasmática? A resposta é negativa. Não há nenhuma evidência da participação de um carreador, nem entre os dados obtidos neste trabalho e nem existe qualquer indicação neste sentido na literatura especializada. Em tese nem haveria necessidade, pois carreadores ou sistemas de transporte existem para apressar processos que de outra forma seriam lentos demais. E este não parece ser o caso da entrada do octanoato na membrana plasmática.

5.3. A natureza do segundo estoque de octanoato

O segundo estoque de distribuição do octanoato, muito provavelmente, engloba a maior parte do espaço celular, embora uma distribuição homogênea seja altamente improvável. Conforme já foi dito na *Introdução*, dados da literatura dão conta de que a transformação do octanoato em octanoil-CoA deve estar ocorrendo intra- e extramitocondrialmente, embora com um predomínio da reação mitocondrial (Marinetti, 1970; Aas, 1971; Sugden e Williamson, 1982; Noy e Zakim, 1985; Schulz, 1991). Deve-se enfatizar que esta transformação é irreversível nas condições

celulares e, portanto, é exatamente esta reação que corresponde àquilo que neste trabalho foi chamado de transformação (ou sequestração) metabólica e cuja velocidade foi simbolizada por F_{met} . Este parâmetro, portanto, é a somatória de pelo menos duas reações, uma intramitocondrial e outra extramitocondrial. Isto já permite logo a conclusão de que o segundo estoque de octanoato engloba um espaço amplo. Ele deve incluir pelo menos as mitocôndrias e o citossol, que, cineticamente aparecem como um único compartimento.

Uma análise dos valores das concentrações de octanoato no segundo estoque calculados neste trabalho (o parâmetro C_{12}), revela que eles são relativamente altos. A Tabela 9 mostra, por exemplo, que para octanoato total 400 μM e albumina igual a 450 μM , a concentração livre (C_{ex}) é de 24 μM ; o valor de C_{12} calculado para estas condições é igual a 278 μM ou 278 nmol por ml de espaço aquoso celular. Combinações de C_{ex} e C_{12} semelhantes ocorrem para outras condições. Em vista destes gradientes, é improvável que o octanoato esteja todo na forma livre no espaço celular, a menos que haja um sistema de transporte ativo eficiente, coisa bastante improvável devido ao tipo de interação que já se sabe que há entre o octanoato e as membranas. Deve-se explicar aqui que, expressar a concentração intracelular em termos do volume aquoso celular, não implica em assumir que o composto se encontra todo dissolvido no espaço aquoso. O mais provável é que uma parte considerável do octanoato esteja ligada intracelularmente a lipídeos (membranas) e proteínas.

Sabe-se há bastante tempo que existem proteínas no citossol com a função específica de ligar substâncias lipofílicas. A proteína Z foi a primeira destas proteínas a ser descrita (Mishkin *et al.*, 1972). Estes autores isolaram uma fração do tecido hepático à qual chamaram de "fração proteína Z".

Posteriormente, outras proteínas com a propriedade de ligar ácidos graxos e outros ânions orgânicos foram descritas e isoladas por vários autores. Trulzsch e Arias (1981) isolaram três frações com diferentes pH's da assim chamada "fração proteína Z". Eles atribuíram às três um peso molecular de 12.500 Daltons. Ockner e Manning (1982) isolaram, pouco tempo depois, uma proteína que chamaram de proteína ligante de ácidos graxos (FABP, *fatty-acid binding protein*), cujas propriedades (capacidade de ligação, peso molecular, etc.) são muito semelhantes àsquelas da proteína Z de Trulzsch e Arias (1981). Além destas duas foram ainda isoladas outras proteínas, tais como a proteína banda C (Billheimer e Gaylor, 1980), a proteína ligante do corante azo amino (Ketterer *et al.*, 1976) e outras. A idéia que predomina atualmente é a de que se trata basicamente da mesma proteína ou de porções dela. As diferenças seriam consequência dos diferentes métodos de purificação (Storch *et al.*, 1989). Entre as modificações que poderiam ocorrer durante a purificação, por exemplo, pode-se considerar a dissociação em subunidades.

Várias funções têm sido atribuídas à proteína ligante de ácidos graxos, algumas carecendo de confirmação. Kaikaus *et al.* (1990), num artigo de revisão, relacionam estas possíveis funções. Duas destas funções são de interesse para este trabalho. Em primeiro lugar, a proteína ligante poderia estar envolvida no transporte e metabolismo dos ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas. Neste sentido há autores que defendem uma participação bem ampla, incluindo eventualmente passagem através da membrana, translocação no interior da célula e utilização e síntese de ácidos graxos (Kaikaus *et al.*, 1990). A segunda função seria protetora. Ao ligar ácidos graxos ou drogas, a proteína diminui a concentração livre dessas substâncias, impedindo que

elas exerçam alguma ação prejudicial a membranas e proteínas (Kaikaus *et al.*, 1990).

Não há concordância quanto à concentração intracelular da proteína ligante de ácidos graxos. Valores entre 100 e 400 μM têm sido citados (Tipping e Ketterer, 1981; Burnett *et al.*, 1979). De qualquer forma, esta faixa de concentrações é superior aos valores de C_{12} encontrados neste trabalho para o octanoato (entre 25 e 200 μM). Além do mais, há muitas indicações de que a proteína teria mais do que um sítio de ligação de ácidos graxos. Poderiam ser dois ou mesmo três sítios (Wilkinson e Wilton, 1987; Kaikaus *et al.*, 1990), o que aumenta a concentração de sítios ligantes. Portanto, essa proteína ligante pode estar ligando quantidades significativas do octanoato, contribuindo para o efeito concentrativo em relação à concentração livre no espaço extracelular. Isto pode ser dito apesar da ligação entre a proteína ligante de ácidos graxos e o octanoato não ser muito forte. Wilkinson e Wilton (1987) verificaram a capacidade que têm ácidos graxos com diversos comprimentos de cadeia em deslocar o composto fluorescente 11-(dansilamino)undecanoato da proteína ligante de ácidos graxos. Enquanto que o palmitato 1,0 μM deslocou 69,6% do composto fluorescente ligado à proteína ligante (1,0 μM), o octanoato 1,0 μM foi capaz de deslocar apenas 2,7%. A proteína ligante tem afinidade bem menor pelo octanoato do que por ácidos graxos de cadeia mais longa, portanto. Isto não significa, porém, que nos nossos experimentos a fração de octanoato ligada intracelularmente à proteína ligante seja baixa, pois na ausência de ácidos graxos exógenos, o octanoato não deve sofrer muita concorrência no espaço intracelular. Isto porque a concentração dos ácidos graxos de cadeia longa endógenos deve ser muito baixa (Kaikaus *et al.*, 1990) e a do octanoato relativamente alta, sendo que os dados de Wilkinson e Wilton (1987) valem para

concentrações equimolares.

Por outro lado, é altamente provável que certa fração do octanoato esteja ligada a lipídeos, principalmente às membranas. Segundo Cooper *et al.* (1987), uma considerável fração dos ácidos graxos de cadeia longa está ligada aos lipídeos das membranas. O mesmo deve estar ocorrendo com o octanoato, coisa que se pode deduzir inclusive da grande facilidade com que o composto passa da albumina para fosfolipídeos (Hamilton, 1989). Mesmo os dados obtidos neste trabalho, que parecem indicar uma grande velocidade de entrada na membrana plasmática e também uma grande afinidade dos lipídeos da membrana para com o octanoato, levam a crer que no interior da célula, boa parte do octanoato deve estar interagindo com os lipídeos das membranas.

Uma questão paralela às indagações sobre a natureza do segundo estoque é o real significado de F_{1n2} , a velocidade de passagem do primeiro para o segundo estoque. É difícil dizer o que este parâmetro realmente reflete em termos mecanísticos. A interpretação mais simples é que ele reflete a velocidade de difusão do octanoato da membrana plasmática e adjacências em direção ao restante da célula. A difusão no interior da célula pode ser mais lenta do que a troca entre a albumina e a membrana plasmática? A troca entre a albumina e a membrana plasmática se dá em uma solução de eletrólitos, o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato, que por sua vez, corresponde mais ou menos ao plasma sanguíneo. As velocidades de dissociação e reassociação do sistema albumina-octanoato são altas, como também são altas as velocidades de troca entre os diversos sítios de ligação na albumina (Hamilton, 1989). Tudo isto contribui para que, no espaço extracelular, o octanoato e a albumina estejam uniformemente distribuídos transversalmente e, graças à convexão (fluxo), haja uma contínua renovação de material no sentido

longitudinal. No interior da célula, a partir da membrana plasmática, o ambiente é bastante diferente, sendo os obstáculos à difusão muito maiores. Além de estruturas, há muitas proteínas e complexos macromoleculares. Também não há o movimento de convecção. Por isto é bem possível que a difusão seja mais lenta e que haja, inclusive, um certo gradiente no interior da célula, gradiente este que acaba se refletindo no valores de k_3 e k_4 e, conseqüentemente, de F_{12} . Se este gradiente existe, o valor de C_{12} corresponde, naturalmente, a uma média, tanto no sentido transversal, como também no sentido longitudinal, ao contrário de C_a e C_{11} , que correspondem a um valor médio apenas no sentido longitudinal.

A proteína ligante de ácidos graxos pode facilitar a difusão do octanoato no interior da célula? Esta questão tem sido objeto de muitas discussões em relação a todos os ácidos graxos, sendo que não há unanimidade de opinião entre os pesquisadores (Peeters *et al.*, 1988; Stewart *et al.*, 1991; Vork *et al.*, 1991). Os experimentos de Stewart *et al.* (1991) parecem indicar que sim. Esses autores alegam que a proteína ligante de ácidos graxos foi capaz de aumentar a velocidade de difusão de oleato através de um extrato citossólico do músculo branco de um peixe marinho (*Macrozoarces americanus*). Vork *et al.* (1991), no entanto, contestaram o procedimento experimental de Stewart *et al.* (1991), tendo-se estabelecido régia polêmica que ainda está por ser decidida (Stewart, 1991). No caso do octanoato, há alguma indicação da participação da proteína ligante no processo de difusão intracelular. De fato, a relação entre F_{12} e C_{11} apresenta saturação, o que poderia estar indicando a participação de algum componente molecular presente em quantidades limitadas. Isto não é uma prova definitiva, no entanto, pois funções de saturação também podem ser produzidas por outros tipos de

interações ou outros tipos de fenômenos.

Em conclusão, sobre a natureza do segundo estoque, pode-se dizer que o octanoato, muito provavelmente, está distribuído por todo o espaço celular, incluindo o espaço mitocondrial. Uma certa fração deve estar na forma livre, outra fração deve estar ligada a lipídeos e outra fração ainda, deve estar ligada à proteína ligante de ácidos graxos (FAPB). Com os dados disponíveis, no entanto, não é possível determinar a quantidade de cada forma de octanoato no espaço celular.

6. BIBLIOGRAFIA

Aas, M. — Organ and subcellular distribution of fatty acid activating enzymes in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 231:32-47, 1971.

Abumrad, N.A., Perkins, R.C., Park, J.H. e Park, C.R. — Mechanism of long-chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 9183-9191, 1981.

Ashbrook, J. D., Spector, A. A. e Fletcher, J. E. — Medium chain fatty acid binding to human plasma albumin. *The Journal of Biological Chemistry* 247:7038-7042, 1972.

Bass, L. e Pond, S. M. — The puzzle of rates of cellular uptake of protein-bound ligands. In: Pecile, A. e Rescigno, A. (editores) — *Pharmacokinetics: Mathematical and statistical approaches to metabolism and distribution of chemicals and drugs*. Plenum Press, London, pp. 241-265, 1987.

Björck, A. e Dahlquist, G. — *Numerische Methoden, 1*. Oldenburg Verlag, Munich, 1972.

Blouin, A., Bolonder, R. P. e Weibel, E. R. — Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. *The Journal of Cell Biology* 72:441-455, 1977.

Bracht, A., Schwab, A.J. e Scholz, R. — Untersuchung von Flußgeschwindigkeiten in der isolierten perfundierten Rattenleber durch Pulsmarkierung mit radioaktiven Substraten und mathematischer Analyse der Auswaschkinetiken. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 361:357-377, 1980.

Bracht, A., Kelmer-Bracht, A., Schwab, A.J. e Scholz, R. — Transport of inorganic anions in the perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry* 114:471-479, 1981.

Bracht, A., Schwab, A. J., Ferraresi, O., Ferraresi, M. L., Constantin, J. e Ishii, E. L. — Transport and metabolism of palmitate in the intact liver. Net flux and unidirectional fluxes across the cell membrane. *The FASEB Journal* 2:A1524, 1988.

Bracht, A., Ferraresi-Filho, O., Schwab, A.J., Ferraresi, M.L., Ishii-Iwamoto, E.L. e Constantin, J. — Role of membrane transport and enzymatic sequestration in hepatic fatty acid utilization. In: Jacob, A. (ed.) — *Trends in Biomembranes & Bioenergetics, 1* pp. 99-109, Council of Scientific Research Integration, Trivandrum, India, 1990.

Billheimer, J. T. e Gaylor, J. L. — Cytosolic modulators of

activities of microsomal enzyme of cholesterol biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 255:8128-8135, 1980.

Brandt, S. — *Daten Analyse*. Bibliographisches Institut, AG, Mannheim, 1975.

Burnett, D. A., Lysenko, N., Manning, J. A. e Ockner, R. K. — Utilization of long-chain fatty acids by rat liver. Studies of the role of fatty acid binding protein. *Gastroenterology* 77:241-249, 1979.

Constantin, J. — *A transformação de ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia em corpos cetônicos e dióxido de carbono e as consequências de uma inibição do transporte através da membrana plasmática nas células hepáticas*. Tese de Mestrado, Maringá, 1989.

Constantin, J., Kelmer-Bracht, A. M., Ishii-Iwamoto, E. L., Ferraresi-Filho, O. e Bracht, A. — Saturated fatty acids with different chain lengths as ketogenic substrates in the rat liver. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23:637-641, 1990.

Constantin, J., Ishii-Iwamoto, E. L., Ferraresi-Filho, O., Kelmer-Bracht, A. M. e Bracht, A. — Sensitivity of ketogenesis and citric acid cycle to stevioside inhibition of palmitate transport across the cell membrane. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24:767-771, 1991.

Cooper, R., Noy, N. e Zakim, D. — A physical-chemical model for cellular uptake of fatty acids: prediction of intracellular pool sizes. *Biochemistry* 26:5890-5896, 1987.

Daniels, C., Noy, N. e Zakim, D. — Rates of hydration of fatty acids bound to unilamellar vesicles of phosphatidylcholine or to albumin. *Biochemistry* 24:3286-3292, 1985.

Dole, V. P. e Meinertz, H. — Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 235:2595-2599, 1960.

Elias, H. — Liver morphology. *Biological reviews* 30:263-310, 1955.

Ferraresi-Filho, O. — *O transporte de palmitato no fígado de rato perfundido isoladamente*. Tese de Mestrado, Curitiba, 1989.

Ferraresi-Filho, O., Ferraresi, M.L., Constantin, J., Ishii-Iwamoto, E.L., Schwab, A.J. e Bracht, A. — Transport and metabolism of palmitate in the rat liver. Net flux and unidirectional fluxes across the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1103:239-249, 1992.

- Fleischer, A. B., Shurmantine, W. O., Luxon, B. A. e Forker, E. L. — Palmitate uptake by hepatocyte monolayers. Effect of albumin binding. *The Journal of Clinical Investigation* 77:964-970, 1986.
- Forker, E. L. e Luxon, B. A. — Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver. *The Journal of Clinical Investigation* 67:1517-1522, 1981.
- Forker, E. L. e Luxon, B. A. — Albumin-mediated transport of rose bengal by perfused rat liver: kinetics of the reaction at the cell surface. *The Journal of Clinical Investigation* 72:1764-1771, 1983.
- Forker, E. L., Luxon, B. A. e Sharma, V. S. — Hepatic transport and binding of rose bengal in the presence of albumin and gamma globulin. *American Journal of Physiology* 248:G702-G708, 1985.
- Goresky, C.A., Ziegler, W.H. e Bach, G.G. — Capillary exchange modeling. Barrier-limited and flow-limited distribution. *Circulation Research* 27:739-764, 1970.
- Goresky, C. A., Bach, G. G. e Nadeau, B. E. — On the uptake of materials by the intact liver. The transport and net removal of galactose. *The Journal of Clinical Investigation* 52:991-1009, 1973.
- Goresky, C.A., Daly, D.S., Mishkin, S. e Arias, I.M. — Uptake of labeled palmitate by the intact liver: role of intracellular binding sites. *American Journal of Physiology* 234:E542-E553, 1978.
- Goresky, C.A., Bach, G.G. e Rose, C.P. — Effects of saturating metabolic uptake on space profiles and tracer kinetics. *American Journal of Physiology* 244:G215-G232, 1983.
- Hamilton, J. A. — Medium-chain fatty acid binding to albumin and transfer to phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:2663-2667, 1989.
- Hryb, D. J. e Hogg, J. F. — Chain length specificities of peroxisomal and mitochondrial β -oxidation in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 87:1200-1206, 1979.
- Inoue, M., Okajima, K., Nagase, S. e Morino, Y. — Plasma clearance of sulfobromophthalein and its interaction with hepatic binding proteins in normal and analbuminemic rats: is plasma albumin essential for vectorial transport of organic anions in the liver? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80:7654-7658, 1983.
- Ishii, E.L., Schwab, A.J. e Bracht, A. — Inhibition of

monosaccharide transport in the intact rat liver by stevioside. *Biochemical Pharmacology* 36:1417-1433, 1987.

Kaikaus, R. M., Bass, N. M. e Ockner, R. K. — Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* 46:617-630, 1990.

Kelmer-Bracht, A. M., Ishii, E. L., Andrade, P. V. M. e Bracht, A. — Construction of a liver perfusion apparatus for studies on metabolic regulation and mechanisms of drug action. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 27:419-438, 1984.

Kelmer-Bracht, A. M., Ishii-Iwamoto, E. L. e Bracht, A. — Binding of the anti-inflammatory drug niflumic acid to bovine serum albumin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23:789-794, 1990.

Kelmer-Bracht, A. M. — *Efeitos metabólicos e transporte de ácido niflúmico no fígado de rato*. Tese de doutorado, Curitiba, 1993.

Kelmer-Bracht, A. M., Ishii-Iwamoto, E. L. e Bracht, A. — Transport, distribution space and intracellular concentration of the anti-inflammatory drug niflumic acid in the perfused rat liver. *Biochemical Pharmacology* 45:1863-1871, 1993.

Ketterer, B., Tipping, E., Hackney, J. F. e Beale, D. — A low molecular weight protein from rat liver that resembles ligandin in its binding properties. *Biochemical Journal* 155:511-521, 1976.

Klevens, H. B. — Critical micelle concentrations as determined by refraction. *Journal of Physical and Colloid Chemistry* 9:130-148, 1948.

Krisans, S. K., Mortensen, R. M. e Lazarow, P. B. — Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes. Computer-assisted analysis of cell fractionation experiments. *The Journal of Biological Chemistry* 265:9599-9607, 1980.

Kuhl, W. E. e Spector, A. A. — Uptake of long-chain fatty acid methyl esters by mammalian cells. *Journal of Lipid Research* 11:458-465, 1970.

Lieb, W. — A kinetic approach to transport studies. In: Ellory, J. C. e Young, J. D. (editores) — *Red cell membranes. A methodological approach*, Academic Press, London, pp. 135-164, 1982.

Marinetti, G. V. — Biosynthesis of triglycerides. In: Florkin, M e Stotz, E. H. (editores) — *Lipid Metabolism*. Netherlands, Elsevier Publishing Co, p. 117-153, 1970.

McGarry, J. D., Wright, P. H. e Foster, D. W. — Hormonal control of ketogenesis. Rapid activation of hepatic ketogenic capacity in fed rats by anti-insulin serum and glucagon. *The Journal*

of Clinical Investigation 55:1202-1209, 1975.

Meier, P. e Zierler, K.L. — On the theory of the indicator dilution method for measurement of blood flow and volume. *Journal of Applied Physiology* 6:731-744, 1954.

Mellamby, J. e Williamson, D. H. — Acetoacetate. In: Bergmeyer, H. U. (editor) — *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press, p. 1840-1843, 1974.

Mishkin, S., Stein, L., Gatmaitan, Z. e Arias, I. M. — The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 47:997-1003, 1972.

Noy, N. e Zakim, D. — Substrate specificity of fatty-acyl-CoA ligase in liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 833:239-244, 1985.

Noy, N., Donnelly, T. M. e Zakim, D. — Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver. *Biochemistry* 25:2013-2021, 1986.

Nunes, R., Kiang, C. L., Sorrentino, D. e Berk, P. D. — "Albumin receptor" uptake kinetics do not require an intact lobular architecture and are not specific for albumin. *Journal of Hepatology* 7:293-304, 1988.

Ockner, R. K. e Manning, J. A. — Fatty acid binding protein. Isolation from rat liver, characterization, and immunochemical quantification. *The Journal of Biological Chemistry* 257:7872-7878, 1982.

Peeters, R. A., Veerkamp, J. H. e Demel, R. A. — Are fatty acid-binding proteins involved in fatty acid transfer? *Biochimica et Biophysica Acta* 1002:8-13, 1988.

Pfleger, R. C., Anderson, N. G. e Snyder, F. — Lipid class and fatty acid composition of rat liver plasma membranes isolated by zonal centrifugation. *Biochemistry* 7:2826-2833, 1968.

Renaud, G., Bouma, M. E., Foliot, A. e Infante, R. — Free fatty acid uptake by isolated rat hepatocytes. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 93:313-319, 1985.

Rhoads, D. E., Ockner, R. K., Peterson, N.A. e Raghupaty, E. — Modulation of membrane transport by free fatty acids: inhibition of synaptosomal sodium-dependent amino acid uptake. *Biochemistry* 22:1965-1970, 1983.

Rose, C. P., Goresky, C. A. e Bach, G. G. — The capillary and sarcolemmal barriers in the heart. An exploration of labeled

water permeability. *Circulation Research* 41:515-533, 1977.

Sangren, W. C. e Sheppard, C. W. — A mathematical derivation of the exchange of a labeled substance between a liquid flowing in a vessel and an external compartment. *Bulletin of Mathematics and Biophysics* 15:387-394, 1953.

Scholz, R., Hansen, W. e Thurman, R. G. — Interaction of mixed function oxidation with biosynthetic processes. 1. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry* 38:64-72, 1973.

Scholz, R., Schwabe, U. e Soboll, S. — Influence of fatty acids on energy metabolism. 1. Stimulation of oxygen consumption, ketogenesis and CO₂ production following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver. *European Journal of Biochemistry* 141:223-230, 1984.

Schulz, H. — Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1081:109-120, 1991.

Sheppard, C. W. — *Basic principles of the tracer method. Introduction to mathematical tracer kinetics.* John Wiley & Sons, Inc., New York, 1962.

Silverman, M. e Goresky, C. A. — A unified kinetic hypothesis of carrier mediated transport: its applications. *Biophysical Journal* 5:487-509, 1965.

Soler-Argilaga, C., Infante, R., Renaud, G. e Polonovski, J. — Factors influencing free fatty acid uptake by the isolated perfused rat liver. *Biochimie* 56:757-761, 1974.

Sorrentino, D., Robinson, R. B., Kiang, C. L. e Berk, P. D. — At physiologic albumin/oleate concentrations oleate uptake by isolated hepatocytes, cardiac myocytes, and adipocytes is a saturable function of the unbound oleate concentration. Uptake kinetics are consistent with the conventional theory. *The Journal of Clinical Investigation* 84:1325-1333, 1989.

Spector, A. A. — Fatty acid binding to plasma albumin. *Journal of Lipid Research* 16:165-179, 1975.

Spector, A. A., Fletcher, J. E. e Ashbrook, J. D. — Analysis of long-chain fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry* 10:3229-3232, 1971.

Stewart, J. M., Driedzic, W. R. e Berkelaar, J. A. M. — Fatty-acid-binding protein facilitates the diffusion of oleate in a model cytosol system. *Biochemical Journal* 275:569-573, 1991.

Stewart, J. M. — Fatty acid-binding protein and facilitated

diffusion of fatty acids. *Biochemical Journal* 280:835-836, 1991.

Stollman, Y. R., Gärtner, U., Theilmann, L., Ohmi, N. e Wolkoff, A. W. — Hepatic bilirubin uptake in the isolated perfused rat liver is not facilitated by albumin binding. *The Journal of Clinical Investigation* 72:718-723, 1983.

Storch, J., Bass, N. M. e Kleinfeld, A. M. — Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 264:8708-8713, 1989.

Stremmel, W., Strohmeyer, G., Borchard, F., Kochwa, S. e Berk, P. D. — Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82:4-8, 1985.

Stremmel, W. e Theilmann, L. — Selective inhibition of long-chain fatty acid uptake in short-term cultured rat hepatocytes by an antibody to the rat liver plasma membrane fatty acid-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 877:191-197, 1986.

Stremmel, W., Strohmeyer, G. e Berk, P. D. — Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a rat liver plasma membrane fatty acid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83:3584-3588, 1986.

Stremmel, W. — Translocation of fatty acids across the basolateral rat liver plasma membrane is driven by an active potential-sensitive sodium-dependent transport system. *The Journal of Biological Chemistry* 262:6284-6289, 1987.

Stremmel, W. — Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process. *The Journal of Clinical Investigation* 81:844-852, 1988.

Sugden, M. C. e Williamson, D. H. — Fatty acid metabolism and ketogenesis. In: Sies, H. (editor) — *Metabolic Compartmentation*. London, Academic Press, p.287-311, 1982.

Svenson, A., Holmer, E. e Andersson, L. O. — A new method for the measurement of dissociation rates for complexes between small ligands and proteins as applied to the palmitate and bilirubin complexes with serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* 342:54-59, 1974.

Tipping, E. e Ketterer, B. — The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes. *Biochemical Journal* 195:441-452, 1981.

Tiribelli, C., Lunazzi, G. C. e Sottocasa, G. L. — Biochemical

and molecular aspects of the hepatic uptake of organic anions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1031:261-275, 1990.

Trulzsch, D. e Arias, I. M. — Z protein: isolation and characterization of multiple forms in rat liver cytosol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 209:443-440, 1981.

Tsao, S. C., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Nagase, S., Iga, T. e Hanano, M. — Effect of albumin on hepatic uptake of warfarin in normal and analbuminemic mutant rats: analysis by multiple indicator dilution method. *Journal of Pharmacy and Biopharmaceutics* 14:51-64, 1986.

Vork, M. M., Glatz, J. F. C. e Vusse, G. J. van der — Does fatty acid-binding protein facilitate the diffusion of oleic acid? *Biochemical Journal* 280:835, 1991.

Weisiger, R., Gollan, J. e Ockner, R. — Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. *Science* 211:1048-1050, 1981.

Weisiger, R. A. — Dissociation from albumin: A potentially rate-limiting step in the clearance of substances by the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82:1563-1567, 1985.

Weisiger, R. A. e Ma, W. L. — Uptake of oleate from albumin solutions by rat liver. Failure to detect catalysis of the dissociation of oleate from albumin by an albumin receptor. *The Journal of Clinical Investigation* 79:1070-1077, 1987.

Wilkinson, T. C. I. e Wilton, D. C. — Studies on fatty acid-binding proteins. The binding properties of rat liver fatty acid-binding protein. *Biochemical Journal* 247:485-488, 1987.

7 - AGRADECIMENTOS

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