

# **EFEITOS DO ALFA-1-24-ACTH SOBRE A EXCREÇÃO RENAL DE AMINOÁCIDOS**

**Dissertação de Mestrado, apresentada  
ao Curso de Pós-Graduação em Medicina,  
Área de Concentração em Nefrologia,  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Lenita Wannmacher**  
**PORTO ALEGRE**  
**1977**

## AGRADECIMENTOS

Ao CLÓVIS que inspirou, orientou e auxiliou decisivamente em cada etapa deste trabalho, uma gratidão que é melhor sentida do que expressa. Como esposo, dedicou-me todo o seu esforço, seu apoio, sua compreensão e seu afeto.

A MARCELO GENERALI DA COSTA que, demonstrando inteligência, despreendimento e companherismo, trabalhou comigo desde o plano-piloto até o término da parte experimental desta pesquisa.

A IARA GOULART GUERISOLI, por seu inestimável auxílio, ao colocar as instalações, o acervo e os funcionários da Biblioteca do Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Biofísica à minha disposição, sem limitação de dias ou horas, na fase de compilação bibliográfica e redação do trabalho.

À direção do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS, nas pessoas do DR. AMANDO AUGUSTO DA MOTTA NETO e do Sr. SILVIO MENDES CORRÊA, pela boa vontade em suplantar as dificuldades de seleção e manutenção dos animais necessários ao trabalho.

Aos Laboratórios Organon do Brasil Ltda., na pessoa de seu gerente local, Sr. DANIEL COSTA, pelo fornecimento das apresentações de Cortrosina.

Ao DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, pela permissão de utilizar suas instalações e seu material na feitura das dosagens.

Ao DR. EDGAR MARIO WAGNER, pelo valioso auxílio na avaliação estatística do trabalho.

À SRA. DINARCY MOREIRA MACHADO, que gentil, prestimosa e eficientemente datilografou este trabalho.

Ao DEPARTAMENTO DE FISILOGIA, FARMACOLOGIA E BIOFÍSICA, pela concessão de dispensa de carga didática, durante a

execução final do trabalho.

Aos COLEGAS DA ÁREA DE FARMACOLOGIA, pelo apoio e pelo encargo didático adicional, que por mim assumiram. Especialmente ao DR. JAYME SCHILLING, pelo incentivo, sugestões e participação no delineamento do roteiro experimental e, sobretudo, por seus ensinamentos no que se refere ao rigorismo e honestidade com que devem ser obedecidos os princípios da metodologia científica.

As BIBLIOTECÁRIAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UFRGS, pelo atendimento gentil e sugestões pertinentes ao material bibliográfico. Em especial, agradeço a IARA STUDENT, por aceder em revisar comigo as referências bibliográficas.

Ao DR. CESAR AMAURY RIBEIRO DA COSTA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Nefrologia da UFRGS, que me incitou à realização desta dissertação, dando-me, como orientador, ampla liberdade na escolha e no desenvolvimento do tema de pesquisa.

Aos MESTRES da enfermagem 2 da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, que tão importantes foram para a minha formação médica, pois, além dos ensinamentos de Nefrologia, me forneceram exemplos de atitude médica e honestidade científica e profissional.

À minha mãe e aos meus sogros - DARCÍLIA, IVONNE e HEINZ CARLOS FREDERICO - cujo auxílio, incentivo e apoio emocional foram imprescindíveis durante a realização deste trabalho.

Aos meus filhos queridos - CARLOS FREDERICO, LIANE e EDUARDO - que, em sua compreensão infantil, souberam aceitar minha ausência, tantas vezes exigida durante este trabalho.

## SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO .....	7
	1. A manipulação renal dos aminoácidos .....	8
	2. As aminoacidúrias .....	20
	3. Os efeitos hormonais sobre a excreção renal de aminoácidos .....	29
	4. Os objetivos do presente trabalho .....	35
II.	MATERIAL E MÉTODOS .....	39
	1. A amostra .....	40
	2. O ACTH .....	40
	3. A creatinina .....	41
	4. O roteiro experimental .....	42
	5. As coletas de urina e de sangue .....	43
	6. As dosagens bioquímicas .....	44
	7. O tratamento estatístico .....	51
	8. A expressão e representação dos resultados .....	51
III.	RESULTADOS .....	53
	1. Depuração renal de creatinina exógena .....	54
	2. Aminoácidos plasmáticos .....	54
	3. Aminoácidos urinários .....	55
	4. Depuração renal de aminoácidos .....	55
	5. Reabsorção tubular renal de aminoácidos .....	56
IV.	DISCUSSÃO .....	72
	1. Depuração renal de creatinina exógena .....	78
	2. Aminoácidos plasmáticos .....	79
	3. Aminoácidos urinários .....	81
	4. Depuração renal de aminoácidos .....	82
	5. Reabsorção tubular renal de aminoácidos .....	83
V.	RESUMO E CONCLUSÕES .....	86
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88

## LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

QUADRO I	- Aminoacidúrias patológicas primárias por sobrecarga tubular renal .....	24
QUADRO II	- Aminoacidúrias patológicas primárias "sem limitar" .....	25
QUADRO III	- Aminoacidúrias patológicas primárias por deficiência do transporte tubular renal .....	25
QUADRO IV	- Aminoacidúrias patológicas secundárias congênitas .....	26
QUADRO V	- Aminoacidúrias patológicas secundárias adquiridas .....	27
TABELA I	- Médias e desvios padrões dos valores das depurações de creatinina exógena em 11 cães .	59
TABELA II	- Médias e desvios padrões dos níveis plasmáticos dos aminoácidos em 11 cães .....	62
TABELA III	- Médias e desvios padrões dos níveis urinários dos aminoácidos em 11 cães .....	65
TABELA IV	- Médias e desvios padrões das depurações de aminoácidos em 11 cães .....	68
TABELA V	- Médias e desvios padrões dos valores de reabsorção tubular renal em 11 cães .....	71
FIGURA 1	- Valores individuais da depuração da creatinina exógena nos 11 cães da amostra .....	57
FIGURA 2	- Variação percentual das médias das depurações de creatinina exógena, após o ACTH, em relação ao período controle .....	58
FIGURA 3	- Valores individuais dos níveis plasmáticos dos aminoácidos nos 11 cães da amostra ....	60
FIGURA 4	- Variação percentual das médias dos níveis plasmáticos, após o ACTH, em relação ao período controle .....	61
FIGURA 5	- Valores individuais dos níveis urinários	

	dos aminoácidos, nos 11 cães da amostra ...	63
FIGURA 6 -	Variação percentual das médias dos níveis <u>u</u> rinários dos aminoácidos, após o ACTH, em relação ao período controle .....	64
FIGURA 7 -	Valores individuais da depuração renal de <u>a</u> minoácidos nos 11 cães da amostra .....	66
FIGURA 8 -	Variação percentual das médias da depuração renal de aminoácidos, após o ACTH, em rela ção ao período controle .....	67
FIGURA 9 -	Valores individuais da reabsorção tubular renal de aminoácidos, nos 11 cães da amos tra .....	69
FIGURA 10-	Variação percentual das médias da reabsor ção tubular renal de aminoácidos, após o ACTH, em relação ao período controle .....	70

## **I - INTRODUÇÃO**

## I. INTRODUÇÃO

### 1. A MANIPULAÇÃO RENAL DOS AMINOÁCIDOS

O reconhecimento dos aminoácidos como constituintes normais da urina, através da presença de nitrogênio amínico que corresponde a 3% do nitrogênio urinário total excretado, foi feito, pela primeira vez, por PFAUNDLER, em 1900 (citado por SEGAL e THIER, 1973).

A importância metabólica dos aminoácidos, a existência de uma variedade de doenças caracterizadas por aminoacidúria, a possibilidade de obterem-se valiosas informações sobre a função renal, através do estudo de sua excreção urinária, têm estimulado um interesse crescente pelo transporte tubular renal desses compostos, ao correr dos anos. Amplas e recentes revisões se encontram em SCRIVER e BERGERON (1974), SEGAL e THIER (1973) e MOREL e DE ROUFFIGNAC (1973).

O aprimoramento de técnicas empregadas em fisiologia renal tem feito progredir a pesquisa sobre a manipulação renal de aminoácidos, ficando, ainda, muitas perguntas por elucidar. A identificação de distúrbios, congênitos ou adquiridos, modificadores do metabolismo e/ou da excreção de aminoácidos pelo rim, também vem contribuindo para a descoberta de muitos mecanismos.

Na manipulação renal dos aminoácidos estão envolvidos os três processos funcionais do rim: filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular. Os aminoácidos são ultrafiltrados nos glomérulos, em quantidades proporcionais a seus níveis plasmáticos. São, então, quase totalmente reabsorvidos no túbulo proximal, aparecendo em quantidades muito pequenas na urina normal eliminada (KIRSNER e colaboradores, 1949). Segundo EFRON (1969), só se detectam, através de cromatografia em papel, na urina de adultos sadios, os seguintes aminoácidos: glicina, glutamina, taurina, alanina, ácido-beta-amino-isobutírico, seri

na, metil-histidina, histidina e cistina. Desses, a glicina tem excreção preponderante no homem, correspondendo a 25% dos aminoácidos totais que constituem o padrão urinário normal.

Há evidências de que alguns aminoácidos também possam ser secretados pelos túbulos, já que sua taxa de excreção excede significativamente seu grau de filtração. WEBBER e colaboradores (1961) sugeriram que isso possa ocorrer com ornitina, cistina, lisina e ácido aspártico. FRIMPTER (1962), CRAWHALL (1967) e MORIN (1971), com seus respectivos grupos de investigadores, evidenciaram secreção tubular de cistina, através de estudos de depuração. Também STRICKLER e FRIMPTER (1969) verificaram ser a cistationina secretada pelo túbulo distal, em cães. Através da análise da excreção de aminoácidos nos diferentes segmentos do néfron de cães, PYTASZ e colaboradores (1970) confirmaram a ocorrência de secreção, indicada pelo aparecimento na urina tubular de aminoácidos ausentes do filtrado glomerular.

Das três funções, é a reabsorção tubular a mais importante, constituindo-se na direção fundamental do transporte renal de aminoácidos. Por isso, merece ser descrita mais detalhadamente, considerando as características do processo de reabsorção tubular, os sistemas de transporte específicos para grupos de aminoácidos e os fatores capazes de influenciar esse processo.

#### Características do transporte tubular renal de aminoácidos

O transporte tubular renal de aminoácidos caracteriza-se por:

- realizar-se, fundamentalmente, no túbulo proximal renal
- ser um transporte ativo, provavelmente mediado por carregadores
- ter especificidade química nos sítios de transporte
- realizar-se contra gradiente eletroquímico

- necessitar de um acoplamento energético ou de gradiente iônico
- ser dependente de concentração (processo saturável)
- apresentar nítidas diferenças entre as membranas luminal e intersticial, bem como entre as faces interna e externa da membrana celular
- estar constituído por sistemas de transporte, pelos quais aminoácidos de um mesmo grupo competem entre si.

A reabsorção tubular renal de aminoácidos é um processo muito eficiente, sendo eles reabsorvidos numa faixa que corresponde a 95-100% da carga filtrada, raramente chegando a 90% (WEBER, 1962). Sendo a reabsorção quase completa, os aminoácidos apresentam uma excreção relativamente constante, independente do fluxo urinário (SCRIVER, 1969), da excreção do nitrogênio ureico (KIRSNER e colaboradores, 1949) e das diferenças de teor proteico na dieta (KIRSNER e colaboradores, 1949).

O principal local de reabsorção é o túbulo proximal, como se evidencia pelos trabalhos de BERGERON e MOREL (1969) e EISENBACH e colaboradores (1975), feitos em ratos, bem como pelos dados de RUSZKOWSKI e colaboradores (1962), obtidos em cães. Os primeiros autores, através de microinjeção de aminoácidos marcados nos diferentes segmentos do néfron, não constataram reabsorção alguma nos túbulos distal e coletor.

Como a membrana da célula tubular renal é de natureza lipídica e não existem espaços intercelulares virtuais ("poros") a não ser no túbulo coletor, é difícil supor que o transporte tubular renal de aminoácidos - substâncias hidrófilas, polares - se realize por difusão passiva, através de lipídeos ou poros. Assim, admite-se o processo como sendo ativo, com consumo de energia e efetuado contra um gradiente de concentração ou elétrico, ou uma combinação de ambos. Supõe-se, ainda, seja ele um processo facilitado ou mediado por transportadores - sítios reativos da membrana, aos quais o substrato específico se liga re

versivelmente, na etapa inicial de sua entrada ou saída da célula. Provavelmente, os transportadores sejam de natureza proteica. Fala a favor disso, o fato de a puromicina, um inibidor da síntese proteica, conseguir inibir o acúmulo de aminoácidos em fatias de córtex renal (ELSAS e ROSENBERG, 1967 - citados por SEGAL e THIER, 1973).

Os transportadores podem teoricamente deslocar o aminoácido através da membrana, por meio de: um processo de difusão; rotação que venham a sofrer dentro da membrana; alterações conformacionais da membrana que a tornem permeável ao aminoácido. Esse, após ser deslocado, é deixado em forma livre, ativa, na outra face da membrana.

Sendo um transporte facilitado, a reabsorção tubular de aminoácidos apresenta especificidade para a substância transportada, pode ser inibida competitiva e não competitivamente e apresenta cinética de saturação, isto é, o sistema de transporte pode tornar-se saturado pela substância transportada. Assim, aumentos progressivos das concentrações lúminais do aminoácido determinam uma reabsorção crescente, até atingir um máximo. Esse ponto constitui-se no  $T_m$  (transporte tubular máximo). A partir daí, novos acréscimos nas quantidades intraluminais de aminoácido provocarão perda urinária do mesmo. Demonstrou-se  $T_m$  para a alanina (PITTS, 1944), a glicina (PITTS, 1943) e a arginina e lisina (BEVER e colaboradores, 1947) em cães; para arginina e lisina, em ratos (BERGERON e MOREL, 1969); e para a prolina, no homem (SCRIVER e colaboradores, 1964).

Como já foi referido, o transporte ativo de aminoácidos requer energia, conferida por mecanismos ainda não definitivamente comprovados. De qualquer forma, os movimentos de aminoácidos através de membranas são acoplados ao movimento de íons, especialmente de sódio. O gradiente de sódio pode estimular a entrada (e o acúmulo) do aminoácido na célula. A isso se dá o nome de efeito cooperativo de transporte ou co-transporte, entre aminoácidos e sódio. O processo necessita energia que é fornecida

pelo ATP. Essa energia propicia o transporte ativo de sódio de dentro da célula para o plasma, através da membrana intersticial. Isso garante a manutenção de uma baixa concentração intracelular de sódio, necessária à penetração, a favor de gradiente, do sódio, através da membrana luminal. A energia da entrada espontânea de sódio (exoergônica) pode constituir-se numa força motriz para o transporte ativo de aminoácidos do lúmen para o interior das células epiteliais do túbulo renal. Outra hipótese é de que o sódio interfira no ganho de energia metabólica, necessária ao processo, através de uma ATPase sódio-dependente.

O transporte de aminoácidos pela membrana intersticial do epitélio tubular renal é pouco conhecido, imaginando-se que ocorra por transporte passivo facilitado.

As diferenças estruturais entre as membranas luminal e intersticial da célula tubular sugerem que o transporte de aminoácidos se efetue diferentemente numa e noutra.

O acúmulo intracelular de aminoácidos, evidenciável "in vivo" e "in vitro", sugere que haja maior facilidade no influxo do que no efluxo daqueles solutos. Isso ocorre pela chamada "função de barreira" da membrana luminal, garantida pela sua assimetria, que confere diferenças de comportamento das faces interna e externa da mesma.

Com base na interação seletiva e mútua de aminoácidos similares, identificaram-se, "in vivo", pelo menos cinco sistemas de transporte, comuns a grupos de aminoácidos.

Esses e outros aspectos, característicos do transporte ativo de aminoácidos a nível renal, foram extensamente revisados por CURRAN (1972) e DIAS (1977).

### Sistemas renais de transporte de aminoácidos

Verifica-se que determinados aminoácidos competem mutuamente pela interação com os sítios reativos da membrana luminal. A idéia de que haja sistemas renais de transporte, comuns a grupos de aminoácidos estruturalmente semelhantes, surgiu a partir da observação de que a infusão plasmática ou luminal de um dado aminoácido podia determinar aumento da excreção urinária de outros similares.

Isso foi visto por WEBBER e colaboradores (1961), em relação a lisina, ornitina, arginina e cistina ou cisteína que mostram uma inibição mútua de reabsorção tubular. Também SCRIVER e colaboradores (1964), infundindo L-prolina, produziram hiperglicinúria e hidróxi-prolinúria em indivíduos sádios, provavelmente por inibição competitiva pelo mesmo sistema de transporte.

Esse efeito entre aminoácidos pode ocorrer por dois mecanismos:

- a) O aminoácido infundido liga-se preponderantemente aos sítios reativos da membrana, impedindo a interação de outros aminoácidos que também têm afinidade pelos mesmos sítios. Isso implica em inibição da reabsorção tubular dos últimos, com conseqüente aumento em sua excreção urinária.
- b) O substrato em excesso estimula, de alguma forma, o fluxo retrógrado dos outros aminoácidos; aventa-se a possibilidade de que ocorra um mecanismo de difusão por troca: o aminoácido em excesso entra para a célula, a favor de um gradiente de concentração. A energia daí proveniente facilita a movimentação do outro, em sentido contrário.

Os cinco grandes sistemas, pelos quais grupos semelhantes de aminoácidos são transportados nos túbulos renais, podem ser assim classificados:

- sistema de beta-aminoácidos - que transporta beta-alanina, ácido beta-amino-isobutírico, taurina.
- sistema de aminoácidos dibásicos - utilizado por lisina, ornitina e arginina (aminoácidos dibásicos) que interagem com cistina.

- sistema de aminoácidos ácidos ou dicarboxílicos - com o qual interagem ácido glutâmico e ácido aspártico;
- sistema imino-glicina - que transporta os iminoácidos (prolina e hidróxi-prolina) e a glicina;
- sistema de aminoácidos neutros - específico para glicina, serina, treonina, isoleucina, alanina, metionina, leucina, valina, fenilalanina, tirosina, glutamina, asparagina, cisteína, ácido alfa-amino-isobutírico, triptofânio, histidina e citrulina.

Os quatro últimos grupos fazem parte dos alfa-aminoácidos.

Podem ocorrer sub-divisões dentro dos sistemas maiores. Estudos conduzidos a partir dos distúrbios hereditários que comprometem a reabsorção tubular renal de aminoácidos, levam a crer na existência de sub-sistemas para um mesmo grupo de aminoácidos, bem como sugerem que um dado aminoácido possa ser transportado por mais de um sistema.

Funcionalmente, referem-se dois tipos diversos de sistemas de transporte:

- um com alta capacidade, baixa afinidade e baixa especificidade, o qual poderia transportar vários aminoácidos;
- outro que apresenta baixa capacidade, alta afinidade e alta especificidade, podendo transportar um número muito reduzido de aminoácidos.

Existem, também, interrelações entre sistemas diferentes. WEBBER (1962) mostrou que a infusão de aminoácidos neutros (glicina, L-alanina, L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina) produzia aumento na excreção urinária de outros aminoácidos neutros, bem como, em alguns casos, de aminoácidos básicos e ácidos.

Reforçando a idéia da existência de sub-sistemas para

um mesmo grupo de aminoácidos, referem-se alguns trabalhos. Por exemplo, em relação aos aminoácidos dibásicos e cistina: *BRODEHL e colaboradores (1967)* obtiveram aumento isolado da excreção urinária de cistina, enquanto *WHELAN e SCRIVER (1968)* detectaram hiperaminoacidúria dibásica, sem cistinúria. Sugere-se que o transporte desse grupo de aminoácidos se efetue através dos seguintes sistemas: um para cistina, um ou mais para cisteína, um para aminoácidos dibásicos e um comum à cistina e aos aminoácidos dibásicos.

Supõe-se a existência de sistemas separados para transporte de cistina e de cisteína, diversamente influenciados por temperatura, pH, concentração de íon sódio e com padrões de desenvolvimento diferentes. Talvez a melhor indicação da independência dos dois sistemas seja a normalidade dos transportes renal e intestinal de cisteína em pacientes cistinúricos.

*SCRIVER e WILSON (1967)*, através de estudos de iminoglucicinúria, sugeriram a existência de três sistemas de transporte para esse grupo de aminoácidos:

- um, utilizado por prolina, hidróxi-prolina e glicina;
- outro, com especificidade para os iminoácidos, mas que não interage com glicina;
- um terceiro, com preferência pela glicina, não interaguindo com os outros dois aminoácidos.

A sarcosina utiliza os três sistemas, como foi demonstrado por *GLORIEUX e colaboradores (1971)*.

#### Fatores que influenciam a reabsorção tubular de aminoácidos

1) Idade - A depuração de aminoácidos é maior em recém-nascidos; após os 6 meses de idade, o padrão urinário de aminoácidos da criança se iguala ao do adulto; na velhice, a depuração tende a diminuir.

No que se refere à excreção urinária de aminoácidos e idade há variações entre espécies animais e diferenças entre os diversos aminoácidos. Sugere-se que os sistemas de transporte - maturem com diferentes velocidades, uns atingindo eficiência completa antes dos outros.

2) Gravidez - Nessa condição há um aumento na excreção urinária de vários aminoácidos. O primeiro a ser detectado foi a histidina, sendo esse achado confirmado por inúmeros investigadores. Em 1950, WALLRAFF e colaboradores evidenciaram a excreção aumentada de histidina, treonina, triptofânio, tirosina, arginina, fenilalanina, serina, lisina e ácido aspártico na urina de mulheres grávidas. Alguns autores (DOE e outros, 1960) tentaram correlacionar a aminoacidúria da gravidez a um aumento na função adrenocortical, evidenciável pela elevação plasmática de cortisol não ligado à proteína, naquela situação. ZINNEMAN e colaboradores (1967), retomando essa linha de investigação, determinaram que a aminoacidúria que ocorre no terceiro trimestre da gestação é muito semelhante à induzida por cortisol e que os níveis plasmáticos de aminoácidos têm uma tendência geral a diminuir nessa circunstância. O principal aumento urinário ocorreu com histidina e treonina. Esses autores sugeriram que a aminoacidúria da gravidez pudesse ser um reflexo do aumento de atividade do cortisol durante a gestação humana, atuando a nível renal. É de notar-se que esse achado não é comum a todos os mamíferos, em período gestacional.

3) Período do dia - Há um ritmo circadiano definido - em relação aos aminoácidos, tanto plasmáticos quanto urinários. FEIGIN e outros (1968) mostraram que os níveis plasmáticos no homem são maiores no fim da manhã, à tarde e nas primeiras horas da noite. No que se refere a excreção urinária, TEWKSBURY e LOHRENZ (1970) verificaram a existência de um ritmo basal, com valores crescentes a partir do meio da manhã e decrescentes à noite, atingindo um mínimo das 2 às 8 horas.

4) Jejum e Alimentação - FEIGIN e colaboradores (1968)

verificaram que o jejum de 24 horas não modificou as concentrações plasmáticas de aminoácidos ou sua periodicidade. Isso foi confirmado por SCRIVER (1969) que enfatizou a constância de concentração de aminoácidos nos fluidos extracelulares. TEWKSBURY e LOHRENZ (1970) demonstraram que a excreção urinária diária de aminoácidos decresceu em 51%, em indivíduos submetidos a jejum de 24 horas. Também foi variável o ritmo de excreção urinária, em condições de jejum ou alimentação normal:

- a) em indivíduos alimentados normalmente, houve 3 picos de concentração urinária de aminoácidos, correspondentes aos momentos das 3 refeições.
- b) em indivíduos submetidos a 24 horas de jejum, os níveis urinários de aminoácidos decresceram progressivamente durante o dia, com valores mínimos entre 2 e 5 horas da manhã.

Quanto ao tipo de alimentação empregada, KIRSNER e outros (1949) evidenciaram que variações nos teores proteicos e de aminoácidos de várias dietas normocalóricas empregadas não interferiram nos níveis plasmáticos dos aminoácidos testados (metionina, lisina, arginina, histidina, isoleucina, valina e treonina) ou em sua excreção urinária.

5) Temperatura - É um fator que interfere no movimento de aminoácidos para dentro e para fora da célula, o qual de cresce em 60% a baixas temperaturas. "In vitro", quando a temperatura decresce de 37°C para 20°C, diminui significativamente a reabsorção de aminoácidos. HALE e colaboradores (1960) relataram haver variações na excreção urinária de alanina, arginina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, lisina e serina, pesquisada nos mesmos indivíduos, no verão e no inverno.

6) pH - "in vivo" a absorção de aminoácidos não é influenciável pelo pH; "in vitro", a captação dos aminoácidos pe las células corticais renais diminui, quando o pH está abaixo de 7. O mecanismo desse efeito não está devidamente esclarecido.

7) Concentração de íons - O transporte ativo de amino

ácidos requer a presença de íon sódio no meio externo para funcionar normalmente; porém, o transporte passivo facilitado desses compostos não a exige (CURRAN, 1972). No caso dos processos de transporte sódio-dependentes, a remoção desse íon do meio externo ocasiona dois efeitos: a velocidade de captação efetiva do aminoácido diminui e sua concentração final de equilíbrio dentro da célula não difere significativamente da do meio. Isso favorece a hipótese de que o movimento de aminoácidos nestes sistemas seja acoplado ao movimento de íons. No entanto, há diferenças na influência que a concentração de sódio exerce nos diversos sistemas: o de aminoácidos neutros lhe é totalmente dependente, o mesmo não acontecendo ao de aminoácidos dibásicos.

RIGGS e colaboradores (1958) salientaram a influência do íon potássio no processo de transporte de aminoácidos. JOHNSTONE (1972) sugeriu que o potássio possa diminuir a afinidade do transportador pelo aminoácido, em qualquer superfície da membrana. A afinidade do  $K^+$  pelo carregador na face interna da membrana é maior do que a do  $Na^+$ , com conseqüente diminuição da concentração celular desse íon, o que favorece a captação do mesmo, bem como a dos aminoácidos.

8) Interação com glicídeos - Observa-se a associação de aminoacidúria com várias situações, em que há distúrbios do metabolismo de glicídeos: na intolerância à frutose (FROESCH e colaboradores, 1963) e na galactosemia (CUSWORTH e colaboradores, 1960), mas não no diabete melito (UMBARGER e colaboradores, 1963). Além disso, em algumas tubulopatias renais, como o Síndrome de Fanconi, surgem, concomitantemente, aminoacidúria e glicosúria. Infusões de glicose, galactose e frutose (FOX e outros, 1964) podem induzir o aparecimento de aminoacidúria generalizada, bem como a infusão de certos aminoácidos resulta em glicosúria (WEBBER e CAMPBELL, 1965). Os dados acima sugerem haver interrelações entre os transportes de aminoácidos e oses, os quais, certamente, apresentam algumas características comuns.

9) Inibidores metabólicos - Conseguem afetar o transpor

te tubular de aminoácidos, presumivelmente pelos seguintes mecanismos:

- a) ação direta do inibidor sobre o sistema de transporte;
- b) efeito no suprimento de ATP;
- c) aumento da concentração intracelular de sódio, com consequente diminuição do gradiente químico.

O cianeto, afetando o metabolismo aeróbico-do qual depende a fonte de energia celular acoplada ao transporte de aminoácidos - inibe a reabsorção de alguns deles, como os neutros. Contrariamente, os dibásicos toleram a anoxia. Os efeitos da anoxia têm consequências diversas, segundo o segmento do néfron considerado e o estágio de desenvolvimento perinatal. Assim, glomérulos isolados ou fatias de papilas conservam a capacidade de transporte em condições anaeróbicas, bem como fatias de córtex renal, se obtidas de ratos recém-nascidos.

Outros inibidores metabólicos diminuem a capacidade de acúmulo de aminoácidos pelas células tubulares renais:

- o dinitrofenol inibe a captação de prolina, glicina e ácido alfa-amino-isobutírico;
- o salicilato e o ácido maleico aumentam a velocidade de efluxo de aminoácidos, perdendo a membrana luminal a sua "função de barreira".

BERGERON e colaboradores (1976), injetando maleato de sódio em ratos, produziram aminoacidúria generalizada, glicosúria e fosfatúria, similarmente ao Síndrome de Fanconi. Os autores interpretaram esses efeitos como decorrentes de aumento do efluxo de moléculas nos túbulos distais, as quais passam diretamente à urina. O maleato atua, pois, sobre a permeabilidade da membrana do túbulo distal e não sobre os sistemas de transporte dos túbulos proximais.

Os glicosídeos cardíacos inibem o transporte de aminoácidos "in vitro", quando usados em altas concentrações, como foi demonstrado por KOSTYO e SCHMIDT (1963).

A floridzina inibe o efluxo, não influenciando a captação de aminoácidos pela célula; conseqüentemente, aumenta o acúmulo intracelular de aminoácidos.

## 2. AS AMINOACIDÚRIAS

O termo aminoacidúria geralmente designa o aumento da excreção urinária de um ou vários aminoácidos além dos valores em que normalmente se encontram na urina, ou a excreção de certos aminoácidos ou seus intermediários metabólicos ausentes do padrão urinário usual, ou ambos (SOTOS e BOGGS, 1973).

Há cerca de 40 situações associadas à excreção urinária elevada de aminoácidos (BACCHUS, 1976).

No adulto normal, a excreção diária de aminoácidos é praticamente constante, independente do volume urinário e da ingestão proteica (EFRON, 1969). Um mesmo indivíduo mantém um padrão de excreção urinária de aminoácidos muito constante e as variações de um dia para outro são discretas (HALE e colaboradores, 1960). Entretanto, há situações onde ocorrem aminoacidúrias fisiológicas. São elas:

- refeições com excesso de carne - que provocam aumento de excreção urinária de histidina e metilhistidina
- gravidez - condição em que o padrão urinário normal é acrescido de vários aminoácidos; esses podem aumentar de 1,7 a 7 vezes mais do que os níveis habituais; histidina e treonina apresentam predominantemente esse efeito (ZINNEMAN e colaboradores, 1967).
- imaturidade funcional renal - em recém-nascidos e lactentes até os 3 meses de idade se observa uma excreção urinária de aminoácidos aumentada, comparativamente à dos adultos. Isso se deve à imaturidade dos sistemas de reabsorção tubular renal. Em alguns casos podem ocorrer defeitos transitórios no metabolismo in

intermediário de aminoácidos, resultando, por exemplo, na excreção de tirosina e etanolanina. *CHILDS (1952)* estudou a excreção de alfa-amino-nitrogênio em lactentes normais, prematuros e crianças até 12 anos de idade. Houve uma excreção significativamente aumentada em lactentes e prematuros, em relação à das crianças maiores. Os valores nas crianças foram menores do que os encontrados para adultos, não havendo variação entre os sexos. Em prematuros pode ocorrer aminoacidúria generalizada, com predomínio de glicina, alanina, treonina, serina, asparagina, glutamina, cistina, prolina e ácido glutâmico; essa aminoacidúria é considerada fisiológica, já que não se acompanha de nenhuma manifestação de doença.

- características raciais - certas populações asiáticas apresentam acidúria beta-amino-isobutírica, sem quaisquer indícios de doença (*ARMSTRONG e colaboradores, 1963-citados por EFRON, 1965*). Esse aminoácido também foi encontrado em quantidades apreciáveis na urina de 4,8% de indivíduos britânicos, pesquisados por *CRUMPLER e outros, em 1951 (citados por SOTOS e BOGGS, 1973)*.

Ao contrário das citadas, pode haver aminoacidúrias patológicas, ocorrendo em doenças congênitas ou adquiridas. Em ambas, pode haver comprometimento de um aminoácido isolado ou de um grupo determinado de aminoácidos, constituindo-se nas aminoacidúrias específicas. Se a maioria dos aminoácidos está envolvida, diz-se que a aminoacidúria é generalizada.

*EFRON (1965)* classifica as aminoacidúrias em duas grandes categorias:

- 1) Primárias - causadas por um defeito do metabolismo ou do transporte de aminoácidos; são geralmente congênitas e específicas.

- 2) Secundárias - podem ocorrer secundariamente a erros

inatos do metabolismo não relacionados aos aminoácidos, a tubulopatias renais, a hepatopatias, a traumas, ao efeito de substâncias exógenas, a tumores e a uma série de outras condições. Não se constituem na manifestação mais importante da doença, sendo, por vezes, inconstantes. Podem ser congêntas ou adquiridas e, com maior freqüência, generalizadas.

Em função de seus mecanismos etiopatogênicos, as aminoacidúrias podem ser divididas em três grandes grupos (EFRON, 1969):

a) Aminoacidúrias por sobrecarga tubular renal - devidas a um defeito, geralmente congênito, da metabolização de um ou mais aminoácidos, com conseqüente elevação de seus níveis plasmáticos. Isso acarreta um aumento na carga filtrada pelo glomérulo, excedendo a capacidade de reabsorção tubular renal. Caracterizam-se, pois, por altos níveis plasmáticos e excreção urinária aumentada de aminoácidos.

b) Aminoacidúrias "sem limiar" - ocorrem por defeito de enzimas que metabolizam aminoácidos intracelulares ou seus intermediários. Como se acumulam, aparecem no líquido extracelular, sendo filtrados pelos glomérulos. Como não há mecanismo de reabsorção tubular renal para eles (ou há reabsorção muito pequena) são excretados totalmente (ou quase) na urina. Essas aminoacidúrias se caracterizam por apresentar níveis plasmáticos quase normais ou levemente elevados e alta depuração renal dos aminoácidos envolvidos.

c) Aminoacidúrias renais - conseqüentes a um déficit de transporte tubular renal de um aminoácido, um grupo específico deles ou sua maioria. Podem, ainda, fazer parte de um comprometimento mais geral da função reabsortiva do rim, em que também esteja afetado o transporte de outros solutos. Caracterizam-se por apresentar níveis plasmáticos normais ou baixos e alta depuração renal de aminoácidos.

Alguns autores (HOLLERMAN e CALCAGNO, 1968) consideram o primeiro grupo como aminoacidúria pré-renal e englobam os dois outros nas aminoacidúrias renais.

As aminoacidúrias renais congêntas específicas po

dem ser conseqüentes à mutação de genes que controlam componentes específicos dos sistemas de transporte. Isso, segundo SCRIVER e BERGERON (1974) pode acarretar:

- diminuição da afinidade do sítio de transporte pelo seu substrato;
- diminuição do número de sítios de ligação para um dado aminoácido; a afinidade é normal, mas a capacidade total de transporte fica prejudicada;
- comprometimento de uma opção de transporte, quando há mais de um sítio disponível para a captação de um dado substrato.

Nas aminoacidúrias renais congênitas generalizadas é difícil supor seja uma única mutação capaz de afetar múltiplos sistemas de transporte. Talvez estejam comprometidos, então, o acoplamento energético ou a difusão por troca, que conferem força motriz ao processo ativo.

As aminoacidúrias renais secundárias têm o mecanismo de reabsorção tubular renal mais amplamente inibido, envolvendo a deficiência de reabsorção de glicose, fosfato, bicarbonato, potássio, etc.

d) Aminoacidúrias combinadas - são aquelas em cuja gênese estão envolvidos dois mecanismos diferentes. Podem estar associados, por exemplo, o mecanismo de sobrecarga renal para um aminoácido e o de inibição de transporte tubular renal para outros aminoácidos de mesmo grupo. Isso ocorre na hiperprolinemia familiar: a prolinúria se deve à sobrecarga filtrada, em função dos altos níveis plasmáticos do aminoácido, enquanto a hidróxi-prolinúria e a glicinúria são de origem renal, por competição mútua pelo sistema de transporte comum (SCRIVER e EFRON, 1972).

Outro exemplo é o da hiperbetalaninemia (SCRIVER e PERRY, 1972), onde a beta-alanina predomina, por saturação, no sistema de transporte, impedindo a reabsorção de taurina e ácido beta-amino-isobutírico.

As aminoacidúrias primárias, classificadas por seus três mecanismos, e as secundárias, congênitas e adquiridas, podem ser vistas nos quadros de I a V, adaptados de EFRON (1965,

QUADRO I

AMINOACIDÚRIAS PATOLÓGICAS PRIMÁRIAS POR SOBRECARGA TUBULAR RENAL

DOENÇA	AMINOÁCIDOS URINÁRIOS	OUTROS SOLUTOS URINÁRIOS
Fenilcetonúria	Fenilalanina	Ácido fenil-pirúvico, Ácido o-hidrôxi-fenil-acético, Ácido acético, Ácido fenil-láctico
Tirosinemia	Tirosina, Metionina	Ácido p-hidrôxi-fenil-pirúvico, Ácido acético, Ácido láctico
Histidinemia	Histidina, Alanina	Ácidos láctico, acético e imidazol-pirúvico
Hipervalinemia	Valina	
Hiperglicinemia com cetose sem cetose	Glicina	Acetona Baixa excreção de oxalato
Citrulinemia	Citrulina	
Hiperlisinemia	Lisina, Ornitina	Etanolamina, Ácido gama-amino-butírico
Intolerância congênita à Lisina	Lisina, Arginina	
*Hiperprolinemia Tipo I Tipo II	Prolina, Hidrôxi-prolina e glicina	Ácido delta-1-Pirrolin-5-carboxílico
Hidrôxi-prolinemia	Hidrôxi-prolina	
*Hiperbetalaninemia	Beta-alanina, Ácido beta-amino-iso-butírico, taurina	Ácido gama-amino-butírico
Sarcosinemia	Sarcosina	Etanolamina
Ornitinemia	Ornitina	
Triptofanemia	Triptofânio	
Hipermetioninemia	Metionina, Tirosina	Ácido alfa-ceto-gama-metil-butírico, Ácido fenil-pirúvico
Doença do Xarope do Bordo	Leucina, Isoleucina, Valina	Cetoácidos

\* Aminoacidúrias combinadas, onde se associam os mecanismos de sobrecarga tubular renal e de deficiência de transporte tubular renal de aminoácidos (vide texto).

QUADRO II  
AMINOACIDÚRIAS PATOLÓGICAS PRIMÁRIAS "SEM LIMIAR"

DOENÇA	AMINOÁCIDOS URINÁRIOS
Homocistinúria	Homocistina, Metionina
Cistationinúria	Cistationina
Arginino-Succinacidúria	Ácido Arginino-Succínico Ácidos mono-amino-mono carboxílicos
Hipofosfatasia	Fosfoetanolamina
Carnosinúria	Carnosina
Sulfocisteinúria	s-Sulfocisteína

QUADRO III  
AMINOACIDÚRIAS PATOLÓGICAS PRIMÁRIAS POR DEFICIÊNCIA  
DO TRANSPORTE TUBULAR RENAL

DOENÇA	AMINOÁCIDOS URINÁRIOS	OUTROS SOLUTOS URINÁRIOS
Hipercistinúria	Cistina	
Glicinúria familiar c/urolitíase s/urolitíase	Glicina	
Glicoglicinúria familiar	Glicina	Glicose
Cistinúria Tipo I	Lisina, Ornitina, Arginina, Cistina	
Tipo II	Lisina, Cistina	
Tipo III	Lisina, Cistina	
Hiperaminoacidúria dibásica	Arginina, Lisina, Ornitina	
Iminoglicinúria renal familiar	Prolina, Hidróxi- prolina, Glicina	
Síndrome de Joseph (Prolinúria Severa)	Prolina, Hidróxi- prolina, Glicina	
Doença de Hartnup	Aminoácidos neu- tros, exceto meti- onina	Ácido Índico

QUADRO IV  
AMINOACIDÚRIAS PATOLÓGICAS SECUNDÁRIAS CONGÊNITAS

DOENÇA	AMINOÁCIDOS URINÁRIOS	OUTROS SOLUTOS URINÁRIOS
Galactosemia	Generalizados	Glicose, Galactose, Fosfato
Cistinose	Generalizados	Glicose, Fosfato, Potássio, Bicarbonato
Síndrome de Fanconi do adulto	Generalizados	Glicose, Fosfato
Síndrome de Lowe	Generalizados	Glicose, Fosfato, Proteínas
Intolerância Hereditária à frutose	Generalizados	
Doença de Wilson	Generalizados, Glicina, Serina e Cistina predominantes	
Tirosinose	Generalizados, Predomínio de Tirosina	Glicose, Fosfato
Raquitismo Perdedor de Fosfato	Glicina	Fosfato
Acidose tubular renal congênita	Generalizados	
Pancreatite Hereditária	Lisina, Leucina	

QUADRO V  
AMINOACIDÚRIAS PATOLÓGICAS SECUNDÁRIAS ADQUIRIDAS

CAUSAS	AMINOÁCIDOS URINÁRIOS
Envenenamento por metais pesados	
Chumbo	Generalizados; Alanina e Ácido beta-amino-isobutírico <u>pre</u> dominantes
Mercúrio	Generalizados; Glicina predominante
Urânio	Generalizados; Alanina predominante
Cádmio	Generalizados; Serina e Treonina predominantes
Envenenamento por Ácido Maleico, Lisol, D-Serina	Generalizados
Doenças renais	
Necrose tubular aguda	Generalizados
Síndrome nefrótica	Generalizados
Doenças hepáticas	
Necrose hepática	Metionina, Cistina, Taurina, Ácido beta-amino-isobutíri <u>co</u> e etanolamina predominantes
Ceto-acidose diabética	Generalizados
Raquitismo	Generalizados; Taurina predominante
Distrofia muscular progressiva	Taurina, Tirosina, Fenilalamina
Caquexia	Generalizados; Taurina, Ácido beta-amino-isobutírico e etanolamina predominantes
Kwashiorkor	Generalizados
Doença do armazenamento de <u>Gli</u> cogênio	Generalizados

QUADRO V  
 AMINOACIDÚRIAS PATOLÓGICAS SECUNDÁRIAS ADQUIRIDAS (conclusão)

CAUSAS	AMINOÁCIDOS URINÁRIOS
Queimaduras	Generalizados
Tumores	
Leucemias	Generalizados
Mieloma múltiplo	Generalizados
Neuroblastoma	Generalizados; Cistationina predominante
Deficiência de Vitamina D	Generalizados
Escorbuto	Tirosina
Deficiência de Vitamina B <sub>6</sub>	Cistationina
Administração de fármacos	
Anticonvulsivantes	Generalizados
Antibióticos: tetraciclina vencidas	Generalizados
Hormônios	
Cortisol	Generalizados
Dexametasona	Generalizados
ACTH *	Histidina, Taurina, Treonina, Metionina, Tirosina, Fenilalanina
Cortisona*	Histidina, Taurina, Treonina, Metionina, Tirosina, Fenilalanina
Hormônio da paratireóide	Generalizados

\* Efeitos variáveis sobre a excreção de aminoácidos, em diferentes trabalhos.

1969), SOTOS e BOGGS (1973), THOMAS e SCOTT (1973) e CROME e STERN (1967) - citados por PAULSON e ALLEN (1973).

### 3. OS EFEITOS HORMONAIS SOBRE A EXCREÇÃO RENAL DE AMINOÁCIDOS

Dentre as aminoacidúrias induzidas por fármacos, aparecem as causadas por hormônios. Esse tem sido um aspecto pouco explorado na literatura. Contudo, encontram-se relatos sobre a influência hormonal nos níveis plasmáticos e urinários dos aminoácidos, em várias espécies animais, através de experimentos "in vivo" e "in vitro".

Tais relatos situam-se nos anos 1950 a 1960, não se fazendo menção posterior a esse aspecto, mesmo em amplas revisões sobre aminoacidúrias (EFRON, 1965; HOLLERMAN e CALCAGNO, 1968) ou sobre hormônios que poderiam induzir seu surgimento (URQUHART, 1974).

Assim sendo, os efeitos de hormônios, sintetizados mais recentemente, sobre a excreção renal de aminoácidos não têm sido pesquisados.

As concentrações plasmáticas de aminoácidos mostram-se bastante constantes e não são, geralmente, afetadas de forma significativa pelos hormônios, quando dados agudamente. Ao contrário, observa-se aumento na excreção urinária de vários aminoácidos sob a administração de adrenocorticotrofina (ACTH), cortisol, dexametasona, 9-alfa-flúor-hidrocortisona e cortisona. Já outros hormônios como estrógenos, progesterona e somatotrofina não apresentam esse efeito.

Na década de 50, vários grupos de investigadores preocuparam-se com o efeito do ACTH natural, então disponível, e da cortisona sobre o metabolismo dos aminoácidos. Um exemplo desses trabalhos é o de STEPHENS e colaboradores (1950), onde se verificou um acréscimo significativo na excreção urinária

de histidina, com leve aumento de seus níveis plasmáticos, induzidos pela administração intramuscular de ACTH (40-160mg/dia) ou de cortisona (100mg/dia) a 15 pacientes com artrite reumatóide. A histidinúria só ocorria na vigência de remissão clínica da doença.

O mesmo grupo de investigadores (BRODIE e colaboradores, 1950) ampliou o estudo, analisando a excreção urinária de treonina, lisina, tirosina e arginina em 41 pacientes com artrite reumatóide, antes e após tratamento com ACTH e cortisona, no mesmo esquema do trabalho anterior. Verificaram ocorrer aumento significativo na excreção de treonina, lisina e tirosina, sob efeito de ACTH. Com cortisona, só os valores máximos de treonina e tirosina se modificaram significativamente em relação aos do período controle.

A excreção de arginina não foi afetada por nenhum dos fármacos.

Em outro trabalho (HOLBROOK e colaboradores, 1950) foi observado o aumento de histidina, lisina e metionina na urina, após uma semana de uso de ACTH.

Numa etapa seguinte, aqueles pesquisadores passaram a comparar os níveis plasmáticos de alguns aminoácidos livres (arginina, glicina, histidina, lisina, fenilalanina, serina e treonina) em indivíduos normais e em pacientes com artrite reumatóide (BORDEN e colaboradores, 1950). Verificaram valores mais baixos para arginina, histidina e treonina em pacientes artríticos. Os demais aminoácidos não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos.

O próximo passo consistiu na investigação dos níveis plasmáticos e urinários de aminoácidos sob efeito do ACTH, dado similarmente a normais e a pacientes com artrite reumatóide. Assim, BORDEN e colaboradores (1952) demonstraram que pacientes com artrite reumatóide apresentavam um aumento plasmático

de arginina, lisina e treonina e uma elevação significativa na excreção urinária de todos os aminoácidos testados, com uma resposta tipo "curva", em que ocorreu um pico, seguido por um decréscimo, ainda na vigência do tratamento. As modificações urinárias maiores ocorreram com histidina, lisina, treonina e tirosina. Nos normais, não houve mudanças significativas, para nenhum dos aminoácidos testados no plasma. Na urina, observou-se uma resposta de mesma tendência, mas de menor intensidade, comparativamente à dos artríticos. Somente se elevaram, significativamente, fenilalanina e tirosina.

Um fato interessante é que as alterações de histidina são limitadas à urina, enquanto as de arginina são peculiares ao plasma.

ROSE e colaboradores (1951) também detectaram histidinúria, conseqüente à administração de 100mg de ACTH, por 3 dias, a pacientes com asma brônquica e doenças alérgicas similares.

GROB (1952) confirmou esse achado, utilizando ACTH e cortisona em indivíduos normais, pacientes com doenças alérgi cas e pacientes com miastenia gravis. Os três grupos mostraram comportamento semelhante. Demonstraram-se elevação importante na taxa urinária de histidina, diminuição na sua reabsorção tubular renal (de 93% para 80% da quantidade filtrada) e níveis plasmáticos sem modificações, comparativamente aos valores controles. O autor sugeriu ser a histidinúria de origem renal.

PENTZ e colaboradores (1959) infundiram endovenosamen te 25 a 40 U de ACTH a pacientes com patologia endócrina, para fins diagnósticos. Verificaram uma elevação súbita, em pico, na taurina urinária. Da mesma forma, a administração aguda de 9-alfa-flúor-hidrocortisona foi seguida pela elevação da excreção renal desse aminoácido.

Em 1962, HOOFT e HERPOL (citados por ZINNEMAN e cola

boradores, 1963) observaram que 35% de crianças com síndrome refrótica que recebiam ACTH ou cortisona apresentaram aminoacidúria, com um padrão urinário constante de aminoácidos.

Aminoacidúrias mais generalizadas têm sido descritas durante a administração aguda de cortisol e dexametasona, com padrões urinários de aminoácidos muito semelhantes entre si e aos verificados durante a gestação (ZINNEMAN e colaboradores, 1967).

Os efeitos do primeiro foram descritos por ZINNEMAN (1963), através da administração de 100mg de cortisol, por via oral, a 11 homens normais, durante 5 dias. Observou-se um aumento significativo na excreção urinária de 15 dos 25 aminoácidos testados, enquanto os níveis plasmáticos não se modificaram consistentemente. Dentre os aminoácidos que se elevaram na urina, houve diferenças quanto ao início e à duração do efeito. Assim: treonina, serina, ácido aspártico, glutamina, alanina e histidina se elevaram precocemente durante o tratamento e permaneceram elevados nas 24 horas seguintes à suspensão do cortisol; o aumento de glicina, cistina, fenilalanina, cistationina e lisina foi precoce e perdurou somente na vigência do fármaco; finalmente, valina, ácido alfa-amino-isobutírico, leucina, ornitina e etanolamina se elevaram 72 horas após a administração do cortisol e decaíram a níveis pré-tratamento, com sua suspensão.

ZISCHKA e outros (1970) estudaram os efeitos da dexametasona (3mg/dia, por 3 dias) sobre os aminoácidos plasmáticos e urinários de 12 crianças com formas leves de desenvolvimento sexual precoce. Observaram uma aminoacidúria significativa, em relação a 16 aminoácidos dos 26 testados. A maior excreção ocorreu com treonina, serina, alanina, glutamina, histidina e cistina. Os níveis plasmáticos dos aminoácidos não se modificaram. Com isso, os autores sugeriram fosse a aminoacidúria provocada por efeito direto da dexametasona sobre os túbulos renais, bem como estivesse relacionada à estrutura esteróide, já que cortisol e dexametasona ocasionaram efeitos muito

similares.

Outros tipos de estudos têm sido feitos, no intuito de demonstrar a influência hormonal sobre o metabolismo de aminoácidos.

CHOITZ e GAEBLER (1959, 1966) estudaram a excreção urinária total de  $N^{15}$ , obtido de glicina, alanina e ácido alfa-amino-isobutírico, marcados isotopicamente e administrados a 2 cadelas adultas. Observaram que o ACTH natural aumentou a excreção, enquanto o hormônio de crescimento ou diminuiu ou não exerceu efeito sobre ela, dependendo da fonte de  $N^{15}$ .

Já EICHORN e colaboradores (1961) pesquisaram os efeitos de insulina, ACTH, hormônio de crescimento e corticosterona sobre a incorporação do ácido alfa-amino-isobutírico em células do diafragma e da adrenal. O ACTH e a insulina aumentaram o acúmulo celular daquele aminoácido, enquanto os demais não apresentaram esse efeito.

Através de um estudo semelhante (KOSTYO e SCHMIDT, 1963), porém realizado "in vitro", observou-se que corticosterona, desoxicorticosterona e aldosterona inibiam a captação de ácido alfa-amino-isobutírico em células de diafragma de rato. Outro trabalho mostrou que a testosterona estimulou a reabsorção do ácido alfa-amino-isobutírico, em baixas concentrações plasmáticas, através da membrana luminal (RIGGS e BARBER, 1971).

Verifica-se que a elevação plasmática de hormônio da paratireóide aumenta a excreção renal de aminoácidos. Isso pode justificar a existência de aminoacidúria no raquitismo resistente à vitamina D (KHACHADURIAN, 1962) ou em hiperparatireoidismo (SCRIVER e colaboradores, 1964). "In vivo", o paratormônio aumenta o fluxo retrógrado, mediado por uma ação do AMP cíclico da membrana, permitindo a passagem de aminoácidos para o lúmen tubular. "In vitro", observa-se que estimula a captação de aminoácidos pelas células de fatias corticais.

Em ratos, através da utilização de fatias corticais de rim, *SEGAL e outros (1965)* demonstraram o acúmulo de aminoácidos e sua incorporação a proteínas, por influência de hormônio de crescimento, prolactina e ACTH, produzidos por um tumor de hipófise, transplantado nos animais. O fato de esse efeito ser abolido pela adrenalectomia, sugeriu o envolvimento de hormônios adrenais em sua gênese. Já que o hormônio de crescimento, administrado isoladamente, não causou tal efeito, ao contrário do ACTH, os autores supuseram ser a estimulação adrenocorticotrófica sobre o córtex adrenal o fator primário.

O cortisol, administrado cronicamente a ratos, reduziu todos os aminoácidos plasmáticos livres, bem como alterou suas concentrações no fígado e no músculo (*DE LOECKER e STAS, 1973*). Os autores interpretaram esses resultados, como expressão do efeito dos corticóides sobre o metabolismo proteico.

Dentre os hormônios que não ocasionam variações nos níveis plasmáticos e urinários dos aminoácidos estão:

- os estrógenos, cujo efeito foi estudado por *ZINNEMAN e colaboradores (1965)*, através da administração de 5mg diários de dietilestilbestrol a 5 homens, por 5 dias. Dos 15 aminoácidos testados, ocorreu elevação de l-metil-histidina na urina e de treonina no plasma, bem como diminuição de tirosina e histidina na urina e de ácido glutâmico, tirosina e ornitina no plasma.

- a progesterona, que não ocasiona alterações na excreção urinária de alfa-amino-nitrogênio, apesar de seus níveis plasmáticos diminuírem discretamente, como foi visto por *LANDAU e LUGIBIHL (1961)*, em trabalho realizado num grupo de homens e mulheres, normais ou com deficiência adrenal.

*ZINNEMAN e colaboradores (1967)* testaram os efeitos de progesterona isolada e de uma combinação de progesterona e estrógeno, administradas a homens normais, sobre a excreção urinária e os níveis plasmáticos de 25 aminoácidos. Constataram que a progesterona elevou a excreção de taurina e fenilalanina,

apenas; no plasma, aumentou a concentração de fenilalanina e diminuíram as de treonina, alanina, cistina, ornitina e arginina.

A combinação hormonal atuou pouco sobre os níveis urinários, aumentando a excreção de taurina, valina, cistationina, 3-metil-histidina e diminuindo a de ornitina. No plasma, o efeito consistiu na diminuição de serina, glicina, alanina, valina, ornitina, lisina, arginina, ácido alfa-amino-butírico e citrulina.

#### 4. OS OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

Apesar de se empregarem diferentes métodos (microbiológicos, dosagem de alfa-amino-nitrogênio, marcação isotópica de aminoácidos, análise automática de aminoácidos) para a avaliação dos efeitos do ACTH sobre a excreção renal de aminoácidos, as pesquisas indicam que o hormônio natural estimula o aparecimento dessas substâncias na urina, por um mecanismo não definitivamente aclarado.

Na literatura revisada, não se encontrou nenhuma referência aos efeitos dos análogos sintéticos do ACTH sobre a excreção renal de aminoácidos, exceto a detecção de aminoacidúria em duas crianças, após a administração intramuscular de alfa-1-24-ACTH de depósito ou tetracosáctido-zinco, a qual se mostrou reversível com a suspensão do tratamento (WANNMACHER, 1973). Em um dos casos, a aminoacidúria já ocorreu após 12 horas da injeção do fármaco.

Em função desses fatos, decidiu-se estudar a influência do alfa-1-24-ACTH sobre a excreção renal de aminoácidos, em condições controladas.

Esse análogo sintético é um polipeptídeo constituído pelos 24 primeiros aminoácidos que existem na cadeia do ACTH natu

ral, segmento comum a todas as corticotrofinas conhecidas e que retêm a atividade biológica (HAUGEN, 1969).

Recebe a designação de alfa em conformidade com as recomendações de nomenclatura citadas por PRATT e colaboradores (1976).

Foi sintetizado por KAPPELER e SCHWYZER em 1961 e demonstrou, em doses equipotentes, as mesmas atividades esteroidogênica e de estimulação trófica da adrenal que as do hormônio natural. Em ratos se verificou que 10µg de α-1-24-ACTH equivalem a aproximadamente a 1 UI do ACTH natural, no que diz respeito à estimulação adrenal.

LANDON e colaboradores (1964) salientaram a existência de duas diferenças entre os dois hormônios análogos: uma, quanto à duração de efeito, que é menor com o tetracosáctido administrado por injeção única, intravenosa ou intramuscular; outra, quanto às propriedades alergênicas, que são praticamente nulas com o alfa-1-24-ACTH, em consequência de um maior grau de pureza e por ter cadeia polipeptídica comum a várias espécies de animais.

Foram feitos estudos comparativos entre o análogo sintético e o ACTH natural, no que se refere a outros efeitos, tais como: inibição da função reprodutora e capacidade de produção de lesões glomerulares em camundongos intactos e adrenalectonizados (CHRISTIAN, 1967), aumento de fluxo sanguíneo ovariano - (STARK e colaboradores, 1967), distribuição preferencial do hormônio marcado isotopicamente para o rim, em cobaias (GOLDER e BOVNS, 1970), aumento da síntese de fibrinogênio (SELIGSOHN e colaboradores, 1973).

Em todos esses trabalhos houve similaridade de comportamentos entre os dois hormônios.

Cogitou-se, então de verificar se o alfa-1-24-ACTH teria a capacidade de estimular a excreção urinária de aminoáci-

dos, como faz o ACTH natural.

Para tanto, realizou-se um experimento agudo, em que se administrou endovenosamente, através de uma única injeção, o alfa-1-24-ACTH (tetracosáctido) a cães, avaliando-se os efeitos a través das dosagens urinária e plasmática de alfa-amino-nitrogênio total. Esse expressa a quantidade dos alfa-aminoácidos presentes nesses líquidos, tendo sido observada uma boa correlação entre as dosagens urinárias de alfa-amino-nitrogênio e os cromatogramas urinários realizados em indivíduos normais e em portadores de aminoacidúrias (WELLS, 1969).

Simultaneamente se obteve a depuração da creatinina exógena em todos os animais, com a finalidade de calcular, comparativamente, os valores de depuração renal e de reabsorção tubular de aminoácidos.

São objetivos do presente trabalho:

- 1- Verificar se administração endovenosa rápida de alfa-1-24-ACTH determina aminoacidúria em cães.
- 2- Se houver aminoacidúria, verificar se esta se deve ao aumento do "pool" circulante de aminoácidos (aminoacidúria por sobrecarga) ou a uma ação a nível tubular renal (aminoacidúria renal).

Através dessa pesquisa, pretende-se contribuir ao estudo da fisiologia renal, no que concerne à manipulação tubular renal de aminoácidos, um aspecto até hoje controvertido.

Os aspectos novos aqui analisados, comparativamente à bibliografia revisada, no que se refere à produção de aminoacidúria, são:

- a) o uso de um análogo sintético do ACTH (alfa-1-24-ACTH ou tetracosáctido), de emprego clínico corrente em alguns tipos de patologias.

b) a tentativa de identificar a que nível (sistêmico ou renal) o mecanismo responsável pelo efeito se processa, avaliando-se a carga filtrada de aminoácidos e sua fração de reabsorção tubular.

## **II - MATERIAL E MÉTODOS**

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. A AMOSTRA

O presente trabalho foi realizado em 15 cães, adultos, machos, de raça mista, pesando de 6,1 a 12,0 kg (peso médio = 8,0 kg). Os animais, mantidos em gaiolas individuais, foram submetidos a uma dieta padronizada por 5 dias. Essa constava de Ração Kanina Purina, em quantidade calculada para fornecer 5g de proteína, por quilograma de peso corporal, por dia. O alimento foi ofertado uma vez ao dia, sempre no mesmo horário. O acesso à água foi livre e constante.

Os cães foram pesados nos dias inicial e final da dieta, sendo utilizados apenas os que apresentaram peso relativamente estável.

Nas 16 horas precedentes à experiência, os cães foram deixados sem alimento, mas não privados de água.

No experimento a que foram submetidos, cada animal constituiu-se em controle de si mesmo.

Do grupo inicial de 15 cães, 4 animais não puderam ser aproveitados, pelos seguintes motivos: morte no momento da suplementação anestésica, em um deles; manutenção inadequada de creatinina, em outro; obtenção de volumes plasmáticos insuficientes às dosagens, num terceiro; volumes urinários parciais, no último.

### 2. O ACTH

Foi utilizado o alfa-1-24-ACTH (tetracosáctido), na dose de 4µg/kg de peso corporal. Essa dose foi retirada de uma solução de tetracosáctido (CORTROSINA, ORGANON), contendo 0,25

mg em 2ml de solução fisiológica estéril, preparada imediatamente antes do uso.

A administração do ACTH sintético se fez por via endovenosa, utilizando o método da injeção rápida (5-10 segundos).

### 3. A CREATININA

A fim de determinar a filtração glomerular, através da depuração da creatinina exógena, administrou-se CREATININA MERCK, conforme preconiza MALNIC (1969):

- injeção endovenosa de uma dose inicial de creatinina ("prime"), por meio da qual se elevam os níveis plasmáticos dessa substância até valores adequados. O cálculo da dose baseou-se nas seguintes premissas:

- a) estimou-se em 0,15mg/ml o nível sérico de creatinina a ser atingido;
- b) essa substância se distribui no líquido extracelular que corresponde a cerca de 20% do peso do cão.

Multiplicando aquele valor pelo volume extracelular, obteve-se a quantidade de creatinina (em mg) a injetar. Essa foi obtida de uma solução de creatinina em solução glico-fisiológica isotônica, cuja concentração era de 100mg/ml.

- infusão de manutenção de creatinina, endovenosa, a uma velocidade constante, durante todo o experimento, para que a concentração plasmática permaneça nos níveis desejados. O cálculo da quantidade de creatinina perdida por minuto foi feito, multiplicando-se o nível desejado de creatinina (0,15mg/ml) por um valor teórico da filtração glomerular do cão, estimado em 4ml/kg/minuto. Essa quantidade foi repostada pela infusão, no mesmo espaço de tempo, estando contida num volume de solução isotônica glico-fisiológica, também calculado para repor as perdas líquidas,

estimadas em 1ml/kg/hora (correspondentes às perdas urinárias e insensíveis), acrescido de 6ml (equivalente às 2 retiradas de sangue, efetuadas nesse período).

A velocidade de infusão atendeu pois, simultaneamente, às necessidades de reposição hídrica e de creatinina.

#### 4. O ROTEIRO EXPERIMENTAL

Todos os experimentos se iniciaram entre 8 e 9 horas da manhã, a fim de minimizar os possíveis efeitos da variação circadiana de aminoácidos (TEWKSBURY e LOHRENZ, 1970).

Os cães foram anestesiados com pentobarbital sódico, na dose de 30mg/kg de peso corporal, através de injeção endovenosa numa das patas dianteiras. Em casos de posterior superficialização da anestesia, essa foi mantida em nível intermediário, com pequenas doses de pentobarbital sódico, correspondentes a 1-3ml da solução inicial (GILMORE e MICHAELIS, 1969).

Uma vez anestesiados, os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre goteiras próprias e contidos pelas quatro patas.

Foi, então, canulada a veia cefálica de uma pata dianteira, através da qual se heparinizou o animal com uma dose de 100 U/kg, de uma solução de heparina, com concentração de 200 U/ml.

A seguir, infundiu-se, pela cânula venosa, solução fisiológica, na velocidade de 5ml/kg/hora, durante 30 minutos, a fim de garantir um fluxo urinário normal, em torno de 0.1-0.3 ml/min. (O'CONNOR e SUMMERILL, 1976).

Passado esse tempo, injetou-se, pela mesma veia, a dose inicial de creatinina ("prime"). Logo após, se iniciou a in

fusão de manutenção de creatinina, sã interrompida no término do experimento.

O passo seguinte consistiu na canulação da veia jugu lar externa, para as retiradas sangüíneas, e na sondagem vesical, através de sonda uretral "SONDAPLAST", de números 5 ou 6, dependendo do tamanho do cão, lubrificada com vaselina líquida.

Exatamente 60 minutos depois da injeção do "prime", a bexiga foi completamente esvaziada, conforme preconiza MALNIC (1969).

Ao final, anotou-se rigorosamente o tempo, pois esse momento se constituiu no início do primeiro período de coleta de urina.

Daí em diante, o experimento se dividiu em:

1º) fase controle - que compreendeu 2 coletas de u rina, realizadas a intervalos de 30 minutos, e 2 retiradas de sangue, feitas aproximadamente na metade de cada período de co leta de urina.

2º) fase experimental - iniciada imediatamente após a injeção endovenosa rápida de  $4\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal, de alfa -1-24-ACTH. Essa fase constou de 4 coletas de urina, aos 30, 60, 90 e 120 minutos do início, e de 4 retiradas de sangue, obtidas nas metades daqueles períodos.

Terminada a experiência, o animal foi sacrificado com 20ml de éter sulfúrico na veia.

## 5. AS COLETAS DE URINA E DE SANGUE

A urina foi obtida por cateterização vesical. Tanto no momento do esvaziamento inicial, bem como ao término de ca da período de coleta, foram realizados os seguintes passos:

a) esvaziamento da bexiga por pressão abdominal;

- b) injeção de 20ml de água destilada pela cânula uretral, para lavar a bexiga; retirada desse volume por pressão abdominal e, eventualmente, aspiração, certificando-se de que o volume injetado foi totalmente recolhido;
- c) injeção de 20ml de ar, para expulsar eventuais restos de urina.

Os momentos inicial e final de cada coleta foram cuidadosamente verificados e anotados, bem como o volume obtido. Desse, era retirada uma alíquota, guardada a  $-15^{\circ}\text{C}$ , para posteriores dosagens. Obtiveram-se 6 amostras de urina por animal.

As amostras de sangue, cujo volume era de 3ml, foram retiradas da veia jugular externa, previamente canulada com polietileno fino, adaptado a uma agulha BD 25/8. O sangue foi aspirado com seringas de 5ml, cujo espaço morto (0.05ml) era preenchido com heparina (LIQUÉMINE, 5000 UI/ml). Após, era lentamente transferido a tubos próprios, centrifugados imediatamente em centrífuga JANETZKI T32A, a 2000 rpm durante 15 minutos. O plasma foi aspirado e guardado a  $-15^{\circ}\text{C}$ , para posteriores dosagens. As 6 amostras de sangue foram obtidas a intervalos de 30 minutos, em cada cão.

## 6. AS DOSAGENS BIOQUÍMICAS

No material coletado, realizaram-se as seguintes determinações:

- Dosagem de creatinina - no plasma e na urina, pelo método de Folin, modificado, que se baseia na reação de Jaffé, onde a creatinina reage com solução de picrato alcalino, para formar picrato de creatinina, um produto cuja cor alaranjada é medida por espectrofotocolorimetria. Embora o método não seja específico para a creatinina - outras substâncias cromógenas também reagem com o picrato alcalino - esse erro é desprezível, quando se administra creatinina

exogenamente. Por isso o uso do reagente de Lloyd, preconizado por Hare é dispensável (DIGIORGIO, 1974).

- Dosagem de alfa-amino-nitrogênio total, na urina - segundo a técnica descrita por WELLS (1969), cujo princípio consiste na quelação de alfa-aminoácidos por íons cúpricos, com subsequente estimativa, pela produção de um composto amarelo estável e altamente específico com 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (neocuproína).
- Dosagem de alfa-amino-nitrogênio total, no plasma - pela técnica de Wells, adaptada por WANNMACHER (1977) baseada no mesmo princípio.

Todas as dosagens foram feitas em duplicata para cada amostra, correspondendo os resultados expressos neste trabalho à média dos valores das duas determinações. Os cálculos foram obtidos por comparação com curvas padrões, executadas simultaneamente com as amostras. Nessas, cada determinação também foi feita em duplicata.

A partir das dosagens, foram calculadas:

- a depuração da creatinina exógena e dos aminoácidos - pela aplicação da fórmula:

$$D = \frac{U}{P}$$

onde: U - representa a excreção urinária da substância, em mg por minuto.

P - representa a concentração plasmática da substância, em mg por ml.

- a reabsorção tubular renal de aminoácidos - calculada, considerando-se a depuração da creatinina exógena como uma medida da filtração glomerular e aplicando-se a fórmula

$$RTA = 100 \left[ 1 - \frac{DA}{DCE_x} \right]$$

onde: RTA - corresponde à reabsorção tubular de aminoácidos, expressa em percentagem.

DA - representa a depuração dos aminoácidos.

DCE<sub>x</sub> - representa a depuração da creatinina e xôgena.

A seguir, descrevem-se as técnicas bioquímicas utilizadas:

Dosagem da creatinina na urina e no plasma

Adaptada do método de Folin modificado, descrito por DICK (1970).

a) Reagentes:

Ácido pícrico	1,25%
Hidróxido de sódio	10%
Creatinina	1mg%
Ácido clorídrico	0,1N
Ácido sulfúrico	$\frac{2}{3}$ N
Tungstato de sódio	10%

b) Preparação da amostra:

Urina - diluí-la 50, 40 ou 30 vezes, conforme o volume da amostra a ser dosada.

Plasma - desproteínez-lo, pela adição, a 0,2ml de plasma, de 1,4ml de água destilada, 0,2ml de ácido sulfúrico  $\frac{2}{3}$  N e 0,2ml de tungstato de sódio 10% e posterior centrifugação por 10 minutos, a 2000 rpm, em centrífuga JANETZKI T-32A.

c) Técnica :

Pipetar, segundo o esquema abaixo:

	Curva Padrão					Amostra	
	0	1	2	3	4	Urina	Plasma
Creatinina lmg%	-	0.75	1.5	2.25	3.0	-	-
Urina diluída	-	-	-	-	-	0.5	-
Plasma desproteínizado	-	-	-	-	-	-	0.6
Água destilada	3.0	2.25	1.5	0.75	-	2.5	2.4
Picrato alcalino	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Correspondência em mg	0	7,5	15	22,5	30	?	?

Misturar bem e ler a 530 nm, em espectrofotômetro JENA SPEKOL, 20 minutos após a adição do picrato al calino, contra o tubo zero da curva padrão.

d) Resultados:

Calcular o  $Q_m$  (quociente médio) da curva padrão. Na urina: multiplicar a extinção medida pelo  $Q_m$ , pela diluição da urina e por 2, para obter os resultados em mg/ml.

No plasma: multiplicar a extinção medida pelo  $Q_m$ , e por 16,67, para obter os resultados em mg/ml.

Dosagem de alfa-amino-nitrogênio total na urina

Técnica descrita por WELLS (1969).

a) Reagentes:

Cloreto de cobre ( $CuCl_2$ ) 0.03 M

Fosfato dissódico ( $Na_2HPO_4$ ) 0.1 M

Neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) 0,1% em etanol

Solução redutora: partes iguais de uma solução de Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 13,6% e de uma solução de Citrato de sódio di-hidratado 20%.

Glicina 0.1 M com Acetato de fenil-mercúrio 0,1% - (Solução de estoque)

Glicina 25 mM (Solução de uso).

b) Técnica:

Pipetar, segundo o esquema abaixo:

	Curva Padrão					Amostra
	0	1	2	3	4	
Glicina 25 mM	-	0.05	0.10	0.15	0.20	-
Água destilada	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	-
Urina	-	-	-	-	-	0.50
$\text{CuCl}_2$ 0.03 M	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M	4.25	4.25	4.25	4.25	4.25	4.25
Correspondência em $\mu\text{M}$	0	1,25	2,50	3,75	5,00	?

Misturar bem e deixar os tubos em repouso, por 15 minutos, à temperatura ambiente.

Centrifugar a 4000 rpm, por 15 minutos, em centrífuga JANETZKI T.32<sub>A</sub>.

Aspirar o sobrenadante e pipetar 0.5ml do mesmo a tubos de ensaio.

Adicionar a cada tubo 3.5ml da solução redutora e 1ml de neocuproína.

Ler, após 5 minutos, a 457 nm, em espectrofotômetro SPEKOL. A cor desenvolvida é estável por várias horas.

c) Resultados

Calcular o  $Q_m$  (quociente médio) a partir dos valores obtidos na curva padrão.

Multiplicar a extinção da amostra pelo  $Q_m$  e por 2, para obter os resultados em  $\mu\text{M/ml}$ .

Dosagem do alfa-amino-nitrogênio total no plasma

Foi feita uma adaptação (WANNMACHER, 1977) da técnica de WELLS (1969) utilizada para a urina.

a) Reagentes:

Cloreto de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) 0.03 M

Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.25 M

Neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) 0,1% em etanol

Solução redutora: partes iguais de uma solução de Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 24,3% e de uma solução de Citrato de sódio di-hidratado 35,7%

Glicina 0.1 M com Acetato de fenil-mercúrio 0,1% (Solução de estoque)

Glicina 5 mM (Solução de uso)

Ácido tricloroacético (TCA) 10%.

b) Preparação da amostra:

Desproteizar 0,5ml de plasma pela adição de 0,5ml de TCA 10% e posterior centrifugação a 4000 rpm, por dois períodos de 15 minutos, com leve agitação no intervalo, em centrífuga JANETZKI T.32A.

c) Técnica :

Pipetar, segundo o esquema abaixo

	Curva Padrão				Amostra
	0	1	2	3	
Glicina 5 mM	-	0.05	0.10	0.15	-
Água destilada	0.15	0.10	0.05	-	-
TCA 10%	0.15	0.15	0.15	0.15	-
Plasma desproteínizado	-	-	-	-	0.30
CuCl <sub>2</sub> 0.03 M	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.25 M	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Correspondência em $\mu$ M	0	0.25	0.50	0.75	?

Misturar bem e deixar os tubos em repouso por 20 minutos, à temperatura ambiente.

Centrifugar a 4000 rpm, por 15 minutos, em centrífuga JANETZKI T.32<sub>A</sub>.

Aspirar 2ml do sobrenadante a tubos de ensaio, adicionando a cada tubo 2ml de solução redutora e 1 ml de neocuproína.

Ler, após 5 minutos, a 457 nm, em espectrofotômetro SPEKOL. A cor desenvolvida é estável por várias horas.

d) Resultados:

Calcular o  $Q_m$  (quociente médio) a partir dos valores obtidos na curva padrão.

Multiplicar a extinção da amostra pelo  $Q_m$  e por 6,67 para obter os resultados em  $\mu$ M/ml.

## 7. O TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para avaliar estatisticamente os resultados obtidos, u tilizou-se o teste "t" de Student para comparação de duas amostras dependentes, já que se tratava de um experimento no qual se desejava comparar resultados antes e após um tratamento, ser vindo cada animal como controle de si mesmo.

Comparou-se, em todos os animais, a média das duas determinações do período controle com o resultado da determinação feita para cada uma das 4 amostras da fase experimental, correspondentes aos períodos de coleta de 120-150, 150-180, 180-210 e 210-240 minutos.

O tratamento estatístico, aplicado isoladamente para ca da período de coleta da fase experimental, obedeceu a fórmula:

$$t_c = \frac{|\bar{x}|}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} \quad \text{onde:} \quad s^2 = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}$$

O nível de significância estabelecido foi de alfa = 5%.

## 8. A EXPRESSÃO E REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados das dosagens plasmáticas de aminoácidos foram expressos em  $\mu\text{M/ml}$ .

Os resultados das dosagens urinárias de aminoácidos foram referidos em  $\mu\text{M/minutos}$ , estabelecendo-se uma relação entre o volume excretado e o tempo de coleta de cada amostra, já que esse não correspondeu sempre a 30 minutos exatos. Isso foi feito, multiplicando-se o resultado da dosagem (expresso em  $\mu\text{M/ml}$ ) pelo volume-minuto.

Os resultados das depurações renais de creatinina e de aminoácidos foram expressos em  $\text{ml/minuto}$  e os da reabsorção tu

bular renal de aminoácidos, em percentagem.

Os resultados finais de todas as determinações realizadas foram referidos ao peso do animal, para se obter maior uniformidade.

Escolheu-se representar os resultados através de gráfi-  
cos - onde se expressaram os valores individuais de todos os pa-  
râmetros pesquisados e a variação percentual das médias dos va-  
lores obtidos a cada 30 minutos da fase experimental, comparati-  
vamente ao período controle - e de tabelas, onde se registraram  
as médias e os desvios padrões dos valores obtidos em cada de-  
terminação, bem como a diferença média e o erro padrão para ca-  
da período de coleta da fase experimental, o que permite facil-  
mente refazer o cálculo de "t" para amostras dependentes. Ficou  
aí também registrado o nível de significância atingido.

### **III - RESULTADOS**

### III. RESULTADOS

#### 1. DEPURAÇÃO RENAL DA CREATININA EXÓGENA

Excetuando dois cães (de nºs 6 e 9), que apresentaram valores extremos e inversos, dos demais obtiveram-se níveis de depuração de creatinina exógena que variaram dentro de uma faixa de 5 a 2 ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (figura 1).

Pela reunião dos valores individuais disponíveis, chegou-se ao cálculo das médias e desvios padrões, para cada momento de coleta, tanto na fase controle quanto na experimental. A análise estatística pelo teste "t" de Student para amostras dependentes não mostrou significância para um alfa=5%, quando a média de cada ponto foi comparada com a média dos dados controles. Isso pode ser verificado na tabela I.

Expressando em percentagem a variação das médias, após a administração do ACTH, em relação ao período controle, observa-se ser pequena essa variação, embora haja um decréscimo em relação ao controle (figura 2).

#### 2. AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS

Observando os níveis plasmáticos individuais, atingidos nos seis momentos de coleta, nota-se a heterogeneidade existente entre eles (figura 3).

Pela análise das médias da fase experimental, comparativamente às do controle, verifica-se uma tendência à elevação dos níveis plasmáticos dos aminoácidos, a qual, entretanto, não foi estatisticamente significativa, quando analisados os valores para cada momento de coleta. (tabela II).

A variação percentual dos níveis plasmáticos médios da

fase experimental em relação à média dos valores da fase controle está expressa na figura 4, onde se visualiza a tendência à elevação dos aminoácidos plasmáticos, após uma queda inicial que ocorreu imediatamente após a administração do ACTH.

### 3. AMINOÁCIDOS URINÁRIOS

Nos cães de nºs 7, 8 e 4 houve uma elevação em pico dos níveis urinários de aminoácidos, após 30 e 60 minutos da administração do ACTH. No cão nº 1 houve uma elevação progressiva da concentração urinária de aminoácidos, observável logo após a injeção do fármaco. Os demais apresentaram aumento dos níveis urinários cerca de 90 a 120 minutos após a administração do ACTH, exceto os cães de nºs 2, 5 e 6 que não apresentaram resposta. Os comportamentos, nesta amostra, foram muito heterogêneos, conforme se visualizam graficamente (figura 5).

Apesar disso, tanto os valores médios (tabela III) - quanto a variação percentual das médias obtidas na fase experimental em relação à da fase controle (figura 6), são inegavelmente crescentes. A avaliação estatística dos valores médios de cada momento de coleta da fase experimental, comparativamente aos do período controle, não mostrou ser a aminoacidúria significativa a nível de 5%.

### 4. DEPURAÇÃO RENAL DE AMINOÁCIDOS

Os traçados dos valores individuais das depurações renais dos aminoácidos e da variação percentual das médias do período experimental, comparada ao controle, mostram uma nítida tendência ao aumento daquelas, após o ACTH (figuras 7 e 8). Graficamente, são muito semelhantes aos traçados que representam os níveis urinários dos aminoácidos. No entanto, a análise estatística não revelou significância para  $\alpha=5\%$ , quanto a es

sa variação (tabela IV).

## 5. REABSORÇÃO TUBULAR RENAL DE AMINOÁCIDOS

A reabsorção tubular renal diminuiu, após a administração do ACTH. No cão de nº 1 observou-se o maior decréscimo, atingindo a RTA o valor de 87.9% (figura 9). De todos os parâmetros pesquisados, foi esse o que apresentou maior homogeneidade dentro da amostra.

Na tabela V expressaram-se os valores médios e os desvios padrões em cada momento de coleta, tanto na fase controle quanto na experimental. O tratamento estatístico desses dados não revelou significância.

A figura 10 expressa nitidamente a diminuição da reabsorção tubular renal dos aminoácidos, avaliando percentualmente a variação dos valores médios obtidos, após o ACTH, em relação ao período controle.

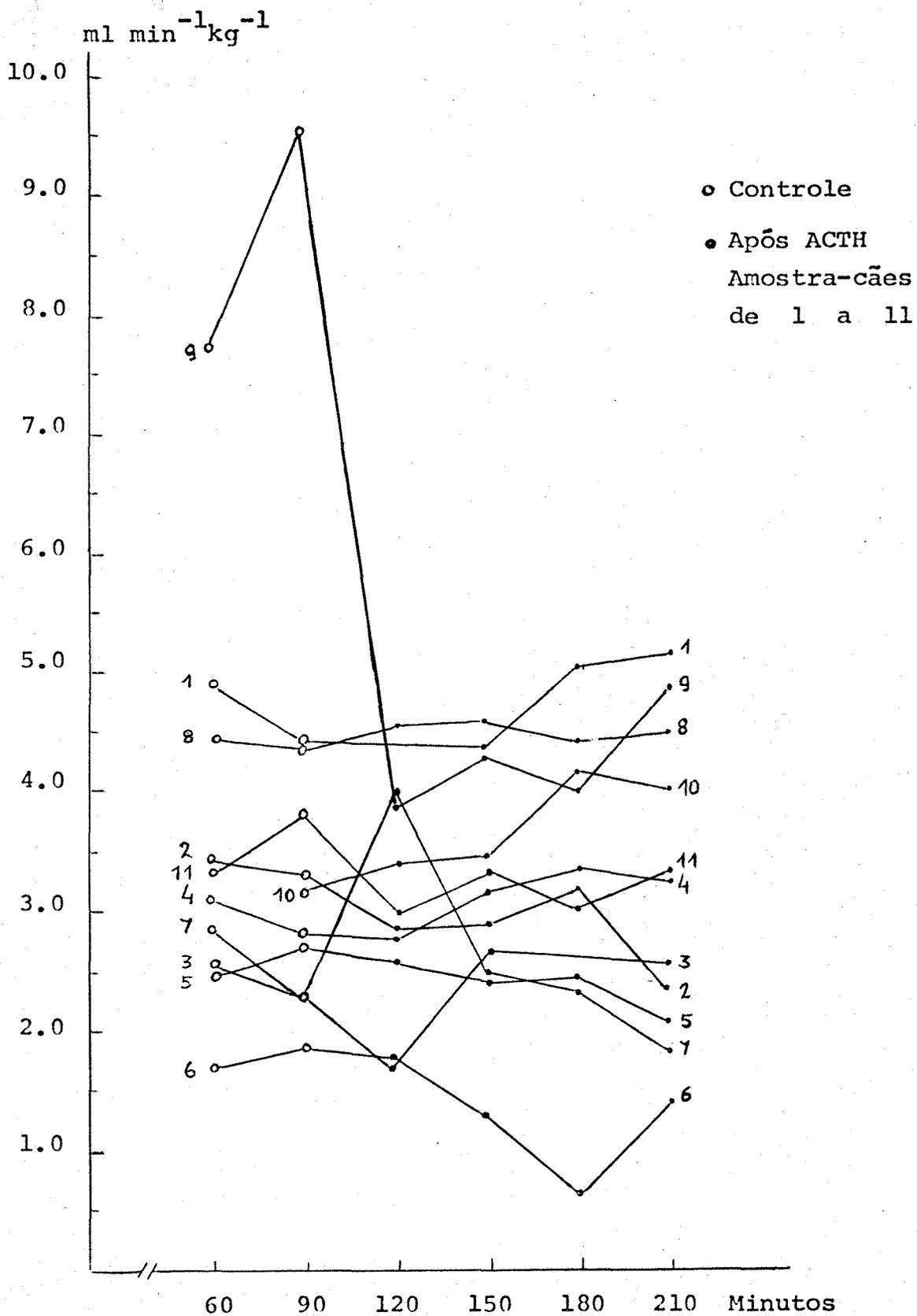


Fig.1 - Valores individuais da depuração da creatinina exógena nos 11 cães da amostra.

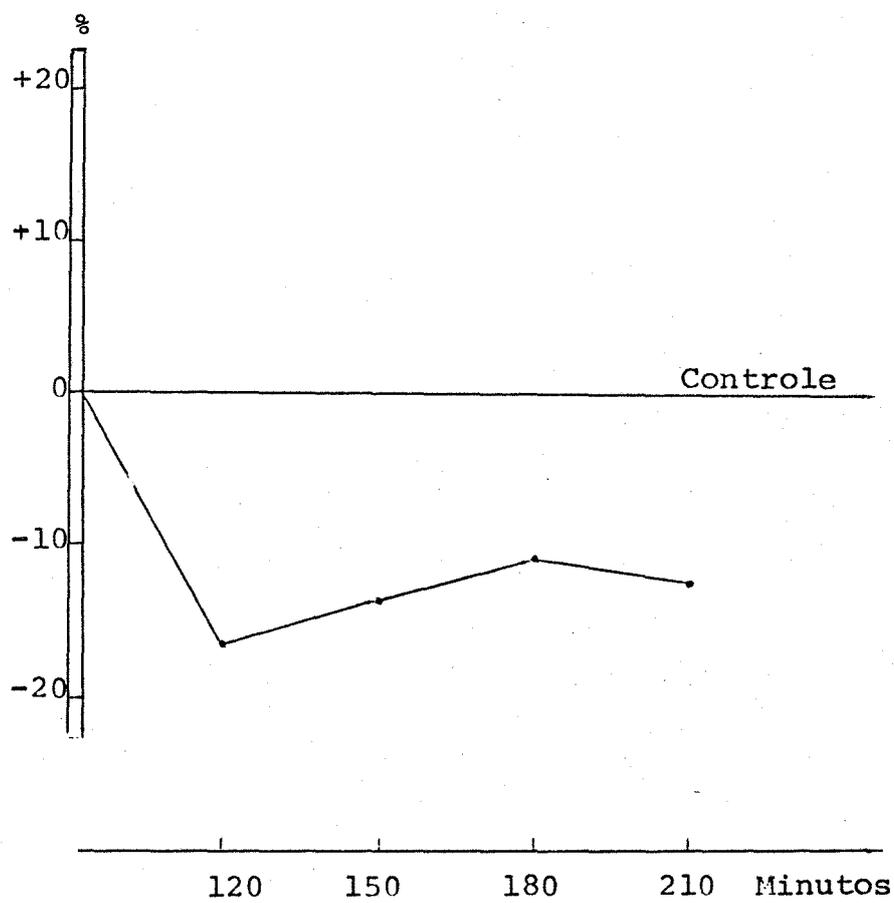


Fig.2 - Variação percentual das médias das depurações de creatinina exógena, a pós ACTH, em relação ao período controle.

TABELA I

Médias e Desvios Padrões dos Valores das Depurações

Renais de Creatinina Exógena em 11 Cães

Tempo de Início da Coleta (Minutos)	Fase Controle		Fase Experimental (Após ACTH)		$\bar{D} \pm s_{\bar{D}}^*$	Teste "t"
	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	(n)	$\bar{x} \pm s^*$		
60	(10)	$3.66 \pm 1.69$				
90	(11)	$3.68 \pm 2.10$				
120			(10)	$3.05 \pm 0.91$	$0.445 \pm 0.492$	$p > 0.05$
150			(11)	$3.16 \pm 1.31$	$0.444 \pm 0.405$	$p > 0.05$
180			(10)	$3.26 \pm 1.27$	$0.459 \pm 0.507$	$p > 0.05$
210			(11)	$3.20 \pm 1.27$	$0.403 \pm 0.385$	$p > 0.05$

Onde: (n) = número de determinações nos 11 cães da amostra

$\bar{x} \pm s$  = média  $\pm$  desvio padrão

$\bar{D} \pm s_{\bar{D}}$  = diferença média  $\pm$  erro padrão (dados pareados)

\* = resultados expressos em  $\text{ml min}^{-1} \text{kg}^{-1}$

Teste "t" = calculado para amostras dependentes

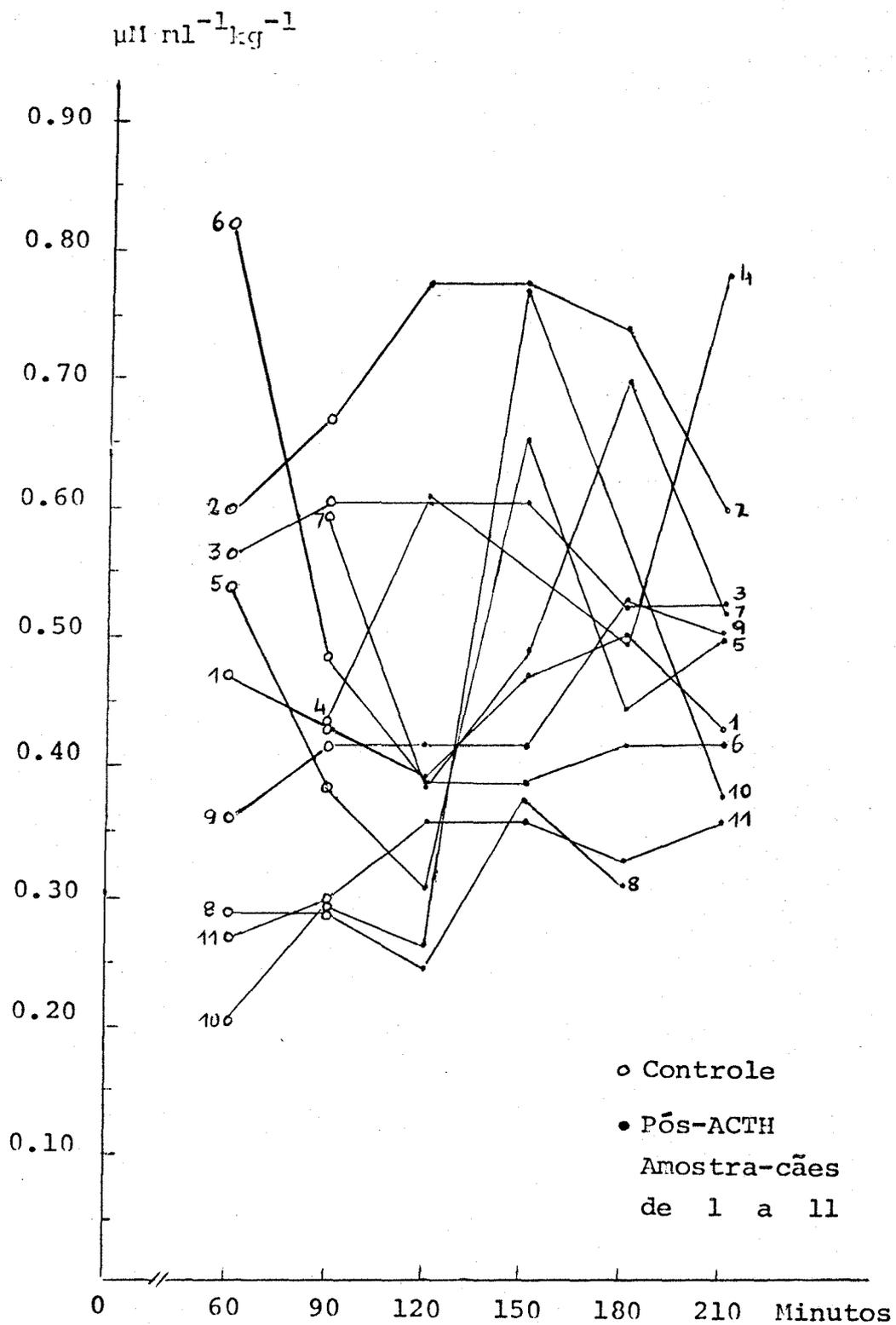


Fig.3 - Valores individuais dos níveis plasmáticos de aminoácidos nos 11 cães da amostra.

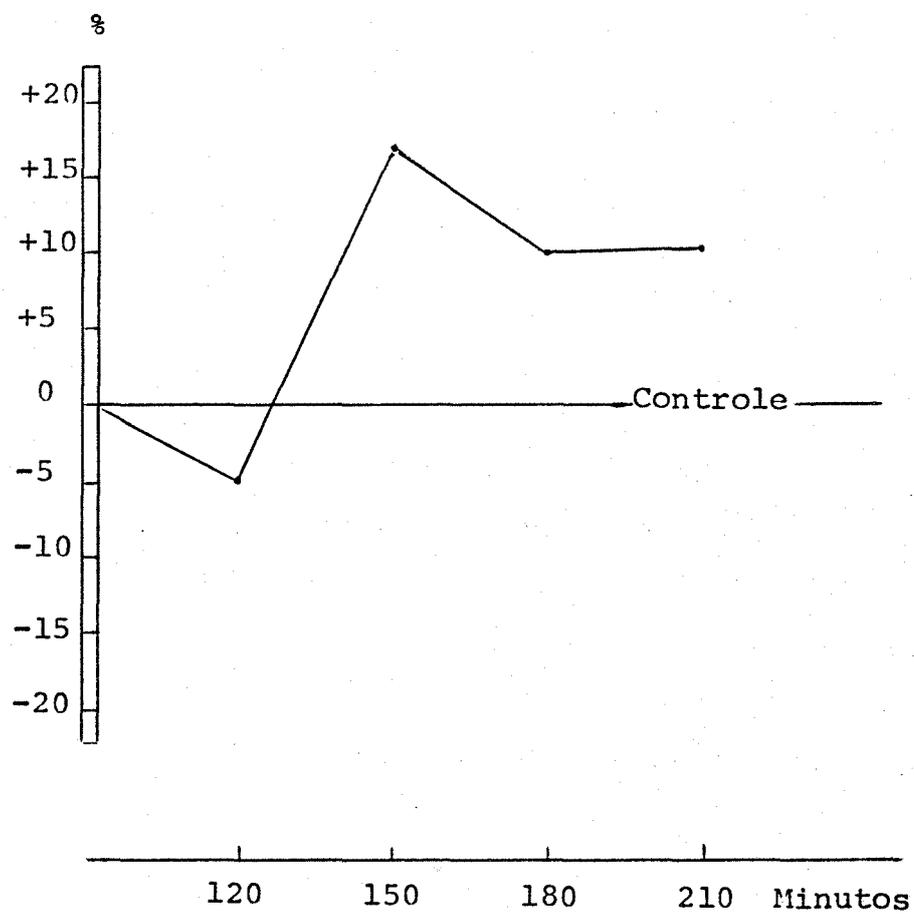


Fig.4 - Variação percentual das médias dos níveis plasmáticos dos aminoácidos, após o ACTH, em relação ao período controle.

TABELA II

Médias e Desvios Padrões dos Níveis Plasmáticos dos  
Aminoácidos em 11 Cães

Tempo de Início da Coleta (Minutos)	Fase Controle		Fase Experimental (Após ACTH)		Teste "t"
	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	
60	(9)	$0.457 \pm 0.196$			
90	(11)	$0.450 \pm 0.127$			
120			(11)	$0.431 \pm 0.165$	$0.025 \pm 0.042$ p > 0.05
150			(10)	$0.530 \pm 0.160$	$0.072 \pm 0.064$ p > 0.05
180			(10)	$0.500 \pm 0.139$	$0.022 \pm 0.034$ p > 0.05
210			(10)	$0.501 \pm 0.123$	$0.028 \pm 0.049$ p > 0.05

Onde: (n) = número de determinações nos 11 cães da amostra

$\bar{x} \pm s$  = média  $\pm$  desvio padrão

$\bar{D} \pm s_{\bar{D}}$  = diferença média  $\pm$  erro padrão (dados pareados)

\* = resultados expressos em  $\mu\text{M ml}^{-1}\text{kg}^{-1}$

teste "t" = calculado para amostras dependentes

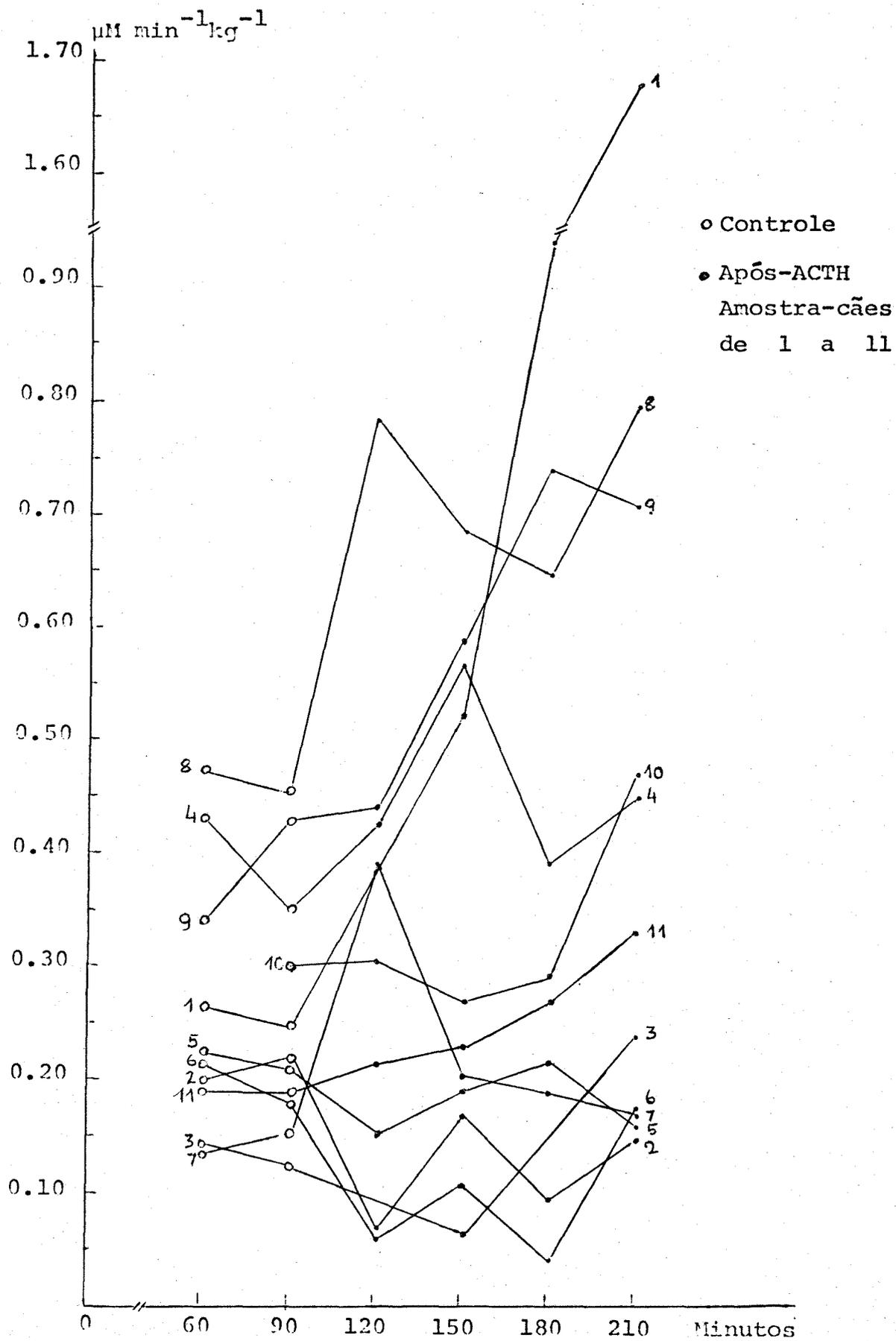


Fig.5 - Valores individuais dos níveis urinários dos aminoácidos nos 11 cães da amostra.

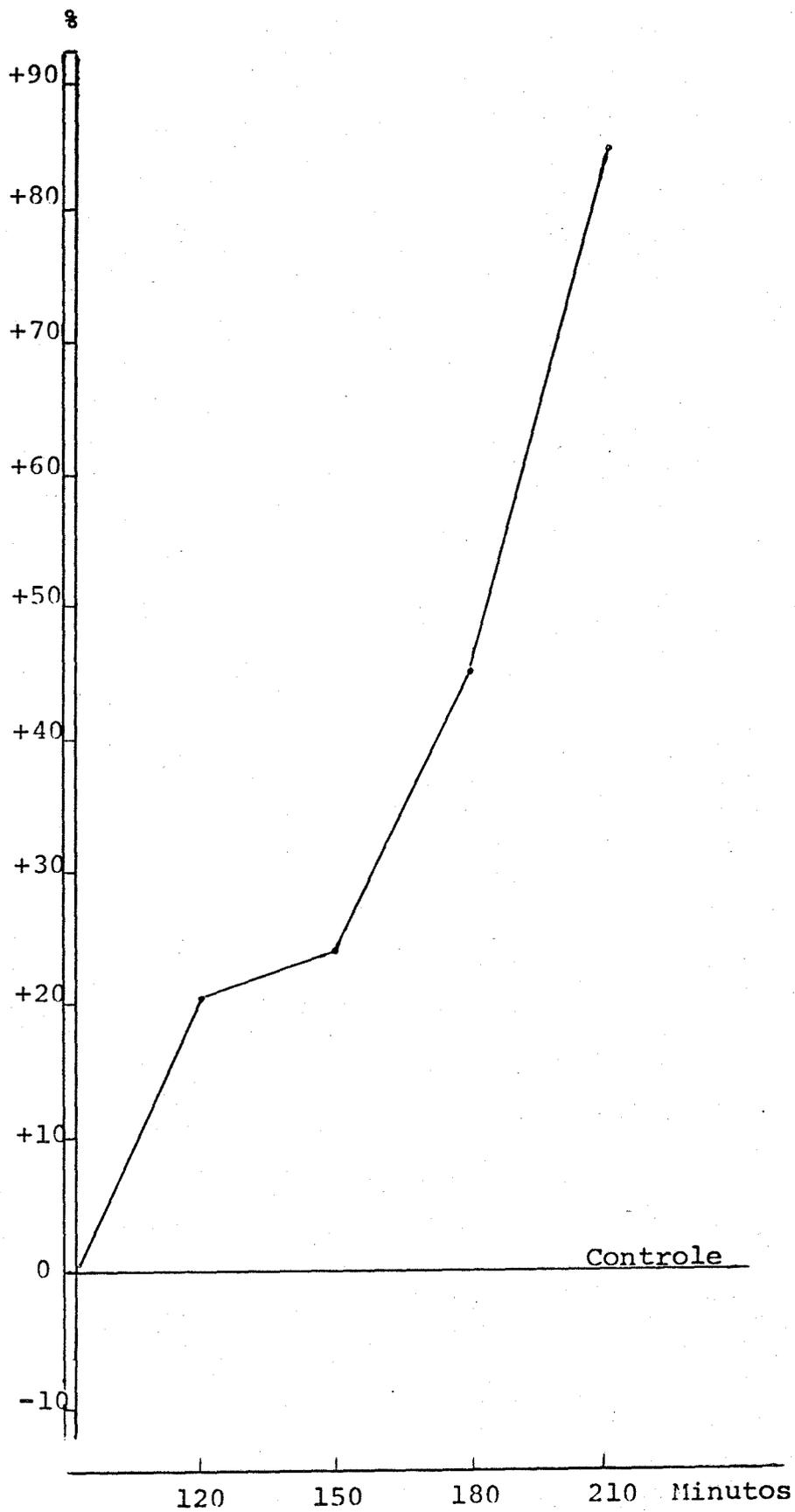


Fig.6 - Variação percentual das médias dos níveis urinários dos aminoácidos, após o ACTH, em relação ao período controle.

TABELA III

Médias e Desvios Padrões dos Níveis Urinários dos  
Aminoácidos em 11 Cães

Tempo de Início da Coleta (Minutos)	Fase Controle		Fase Experimental (Após ACTH)		Diferença $\bar{D} \pm s_{\bar{D}}^*$	Teste "t"
	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	(n)	$\bar{x} \pm s^*$		
60	(10)	$0.263 \pm 0.117$				
90	(11)	$0.262 \pm 0.110$				
120			(9)	$0.316 \pm 0.227$	$0.037 \pm 0.052$	$p > 0.05$
150			(11)	$0.327 \pm 0.219$	$0.062 \pm 0.039$	$p > 0.05$
180			(10)	$0.381 \pm 0.296$	$0.110 \pm 0.083$	$p > 0.05$
210			(11)	$0.484 \pm 0.457$	$0.220 \pm 0.127$	$p > 0.05$

Onde: (n) = número de determinações nos 11 cães da amostra

$\bar{x} \pm s$  = média  $\pm$  desvio padrão

$\bar{D} \pm s_{\bar{D}}$  = diferença média  $\pm$  erro padrão (dados pareados)

\* = resultados expressos em  $\mu\text{M min}^{-1}\text{kg}^{-1}$

Teste "t" = calculado para amostras dependentes

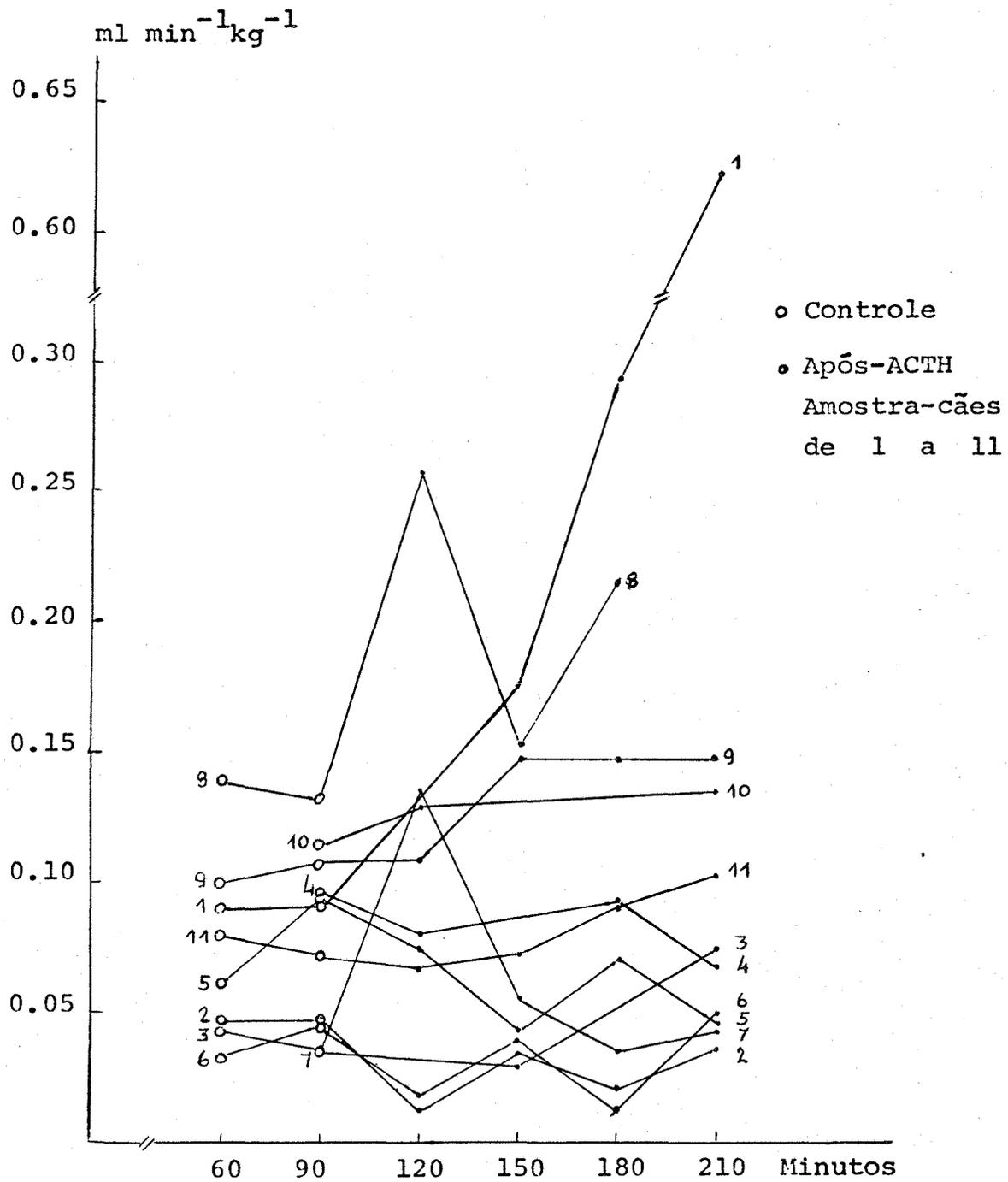


Fig.7 - Valores individuais da depuração renal de aminoácidos nos 11 cães da amostra.

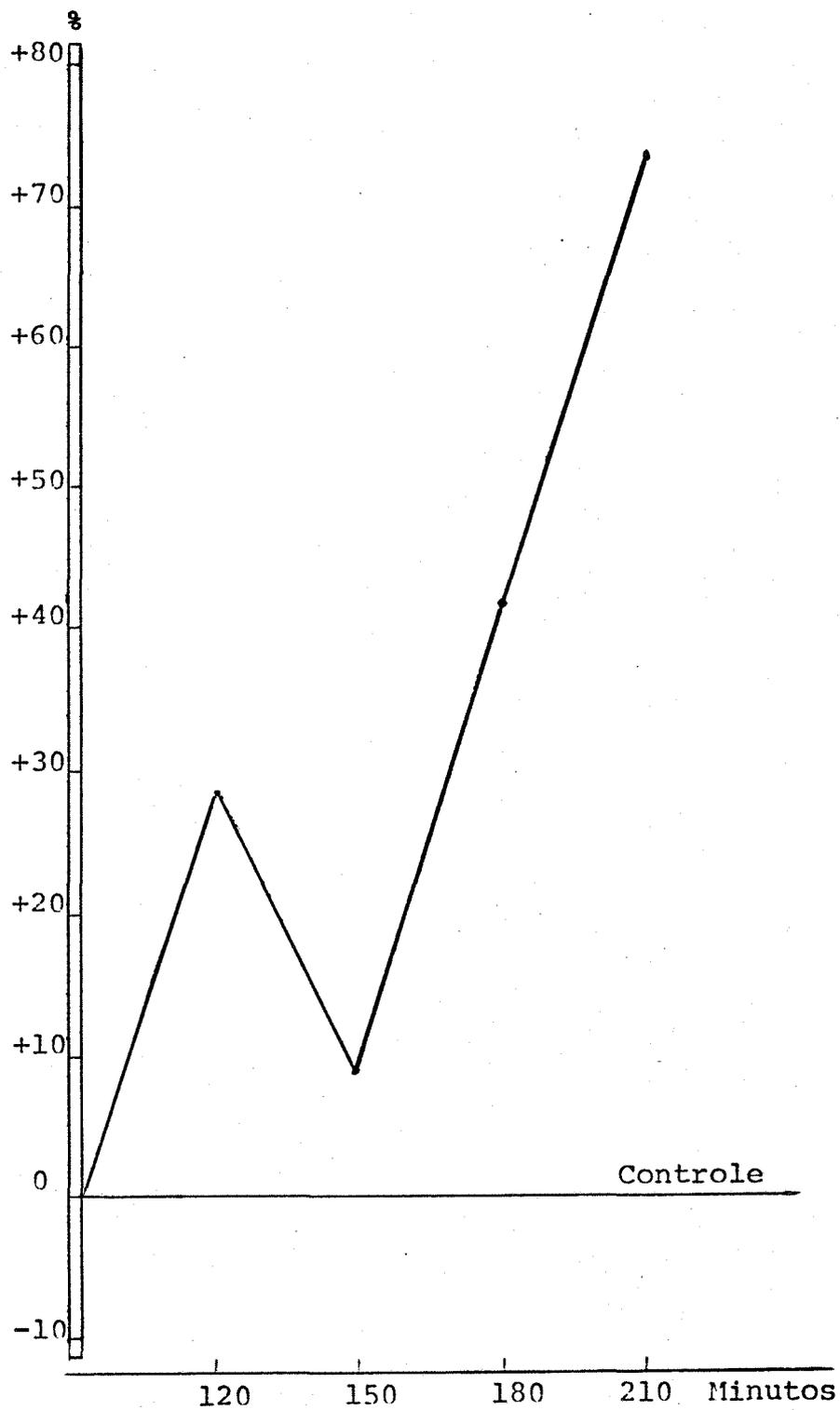


Fig.8 - Variação percentual das médias da depuração renal de aminoácidos, a pós o ACTH, em relação ao período controle.

TABELA IV

Médias e Desvios Padrões dos Valores das Depurações  
de Aminoácidos em 11 Cães

Tempo de Início da Coleta (Minutos)	Fase Controle		Fase Experimental (Após ACTH)		Teste "t"
	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	
60	(8)	0.074 $\pm$ 0.035			
90	(11)	0.079 $\pm$ 0.034			
120			(9)	0.098 $\pm$ 0.074	0.018 $\pm$ 0.018 p > 0.05
150			(9)	0.083 $\pm$ 0.059	0.012 $\pm$ 0.012 p > 0.05
180			(9)	0.108 $\pm$ 0.095	0.031 $\pm$ 0.024 p > 0.05
210			(10)	0.132 $\pm$ 0.175	0.061 $\pm$ 0.053 p > 0.05

Onde: (n) = número de determinações nos 11 cães da amostra

$\bar{x} \pm s$  = média  $\pm$  desvio padrão

$\bar{D} \pm s_{\bar{D}}$  = diferença média  $\pm$  erro padrão

\* = resultados expressos em ml min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>

Teste "t" = calculado para amostra dependente

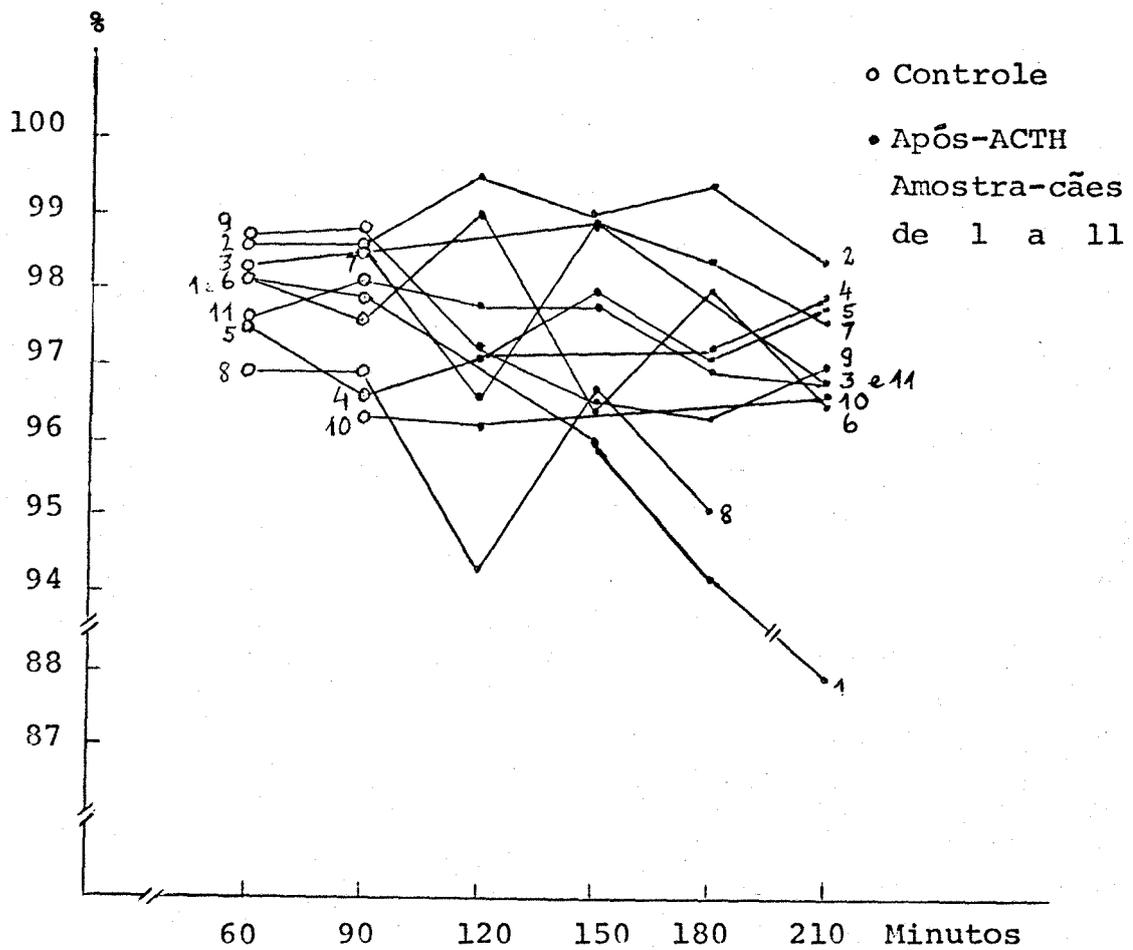


Fig.9 - Valores individuais da reabsorção tubular, renal de aminoácidos nos 11 cães da amostra.

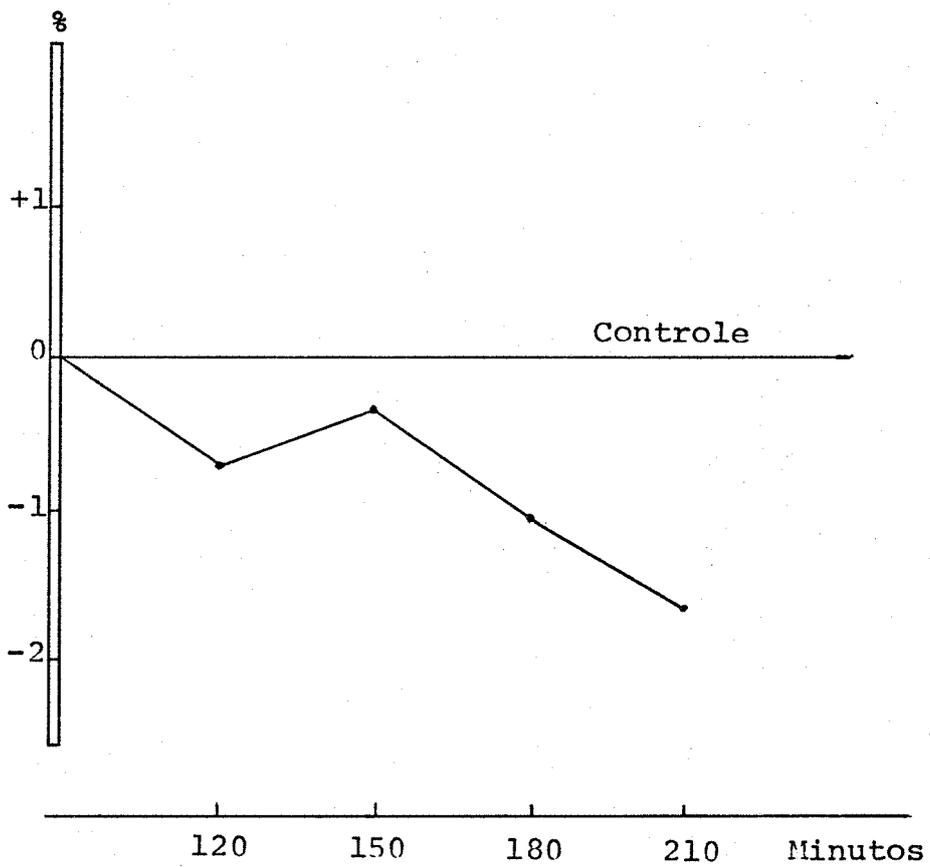


Fig.10 - Variação percentual das médias da reabsorção tubular renal de aminoácidos, após o ACTH, em relação ao período controle.

TABELA V

Médias e Desvios Padrões dos Valores da Reabsorção  
Tubular Renal em 11 Cães

Tempo de Início da Coleta (Minutos)	Fase Controle		Fase Experimental (Após ACTH)		Teste "t"
	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	(n)	$\bar{x} \pm s^*$	
60	(8)	98.0 $\pm$ 0.61			
90	(11)	97.7 $\pm$ 0.92			
120			(9)	97.2 $\pm$ 1.53	0.40 $\pm$ 0.44 p > 0.05
150			(9)	97.6 $\pm$ 1.20	0.41 $\pm$ 0.39 p > 0.05
180			(9)	96.9 $\pm$ 1.61	0.83 $\pm$ 0.52 p > 0.05
210			(10)	96.3 $\pm$ 3.03	1.28 $\pm$ 1.02 p > 0.05

Onde: (n) = número de determinações nos 11 cães da amostra

$\bar{x} \pm s$  = média  $\pm$  desvio padrão

$\bar{D} \pm s_{\bar{D}}$  = diferença média  $\pm$  erro padrão

\* = resultados expressos em percentagem (%)

Teste "t" = calculado para amostras dependentes

#### **IV - DISCUSSÃO**

## IV. DISCUSSÃO

Os mais importantes efeitos do ACTH consistem em aumentar a velocidade de síntese e liberação de certos hormônios a drenais, bem como aumentar o fluxo sanguíneo e manter o tama nho e o peso da glândula adrenal, os quais têm sido amplamente registrados na literatura. Além desses, relataram-se vários ou tros - alguns não mediados pelos corticóides - tais como: au mento de fluxo sanguíneo ovariano (STARK e colaboradores, 1967), efeito na síntese de fibrinogênio (SELIGSOHN e colaboradores, 1973), efeito sobre a secreção de aldosterona (PRATT e outros, 1976), efeito direto sobre os testículos (IRVINE e colaboradores, 1974), estimulação melanocítica, efeitos adipocinéticos, efeito hipoglicemiante e hiperinsulinêmico, diminuição de for mação de uréia a partir de aminoácidos infundidos, efeito cro notrópico sobre coração de mamífero "in vitro" e efeitos compor tamentais, como cita URQUHART (1974). Além disso, foi pesquisada a ação do ACTH natural sobre as concentrações plasmáticas, uri nárias e teciduais dos aminoácidos.

LANDON (1964) mostrou haver reprodutibilidade de efe tos estimulantes córtico-adrenais, quando ACTH e alfa 1-24-ACTH (um análogo sintético) eram administrados em doses equipotentes. Outros autores também comprovaram a identidade entre eles, com relação a diferentes efeitos biológicos. Como não se encon trou registro de um estudo que permitisse comparar os efeitos dos dois hormônios sobre a aminoacidúria, resolveu-se pesqui sar se o tetracosáctido também aumentaria a excreção urinária de aminoácidos, de forma similar aos dados verificados na lite ratura com o ACTH natural. Para a montagem do presente experi mento não se dispunha de um modelo prévio que utilizasse o mes mo animal, igual fármaco e idênticas condições para verificar o efeito que se buscava. Por isso, foi baseada em vários traba lhos, realizados com outros objetivos, mas que empregaram pro cedimentos que serviam às presentes finalidades.

Uniformizaram-se, tanto quanto possível, as condições experimentais.

A escolha do cão como animal de experimentação já fora feita por STEINETZ e colaboradores (1973), que o utilizaram para avaliar a duração de efeito do ACTH sintético. Seu tamanho permite um manejo fácil e a volemia grande é necessária quando se requerem várias amostras de sangue. Além disso, há geralmente boa correlação entre cão e o homem, quanto aos parâmetros de fisiologia renal pesquisados.

Os animais foram todos adultos e de sexo masculino. Na literatura, não se registram diferenças de respostas ao ACTH ou de excreção urinária de aminoácidos em relação ao sexo (PENTZ e colaboradores, 1959; BRODIE e outros, 1950), mas WELLS (1969) verificou que as taxas de alfa-amino-nitrogênio, avaliadas por seu método, eram discretamente maiores em mulheres do que em homens.

A idade não interfere com os efeitos do ACTH, tanto em humanos (KOLANOWSKI e colaboradores, 1972) quanto em bovinos - (EDWARDS e colaboradores, 1975). Mas como é um fator que influencia a excreção urinária de aminoácidos (EFRON, 1969), o experimento foi feito apenas com cães adultos.

Para tornar a amostra mais homogênea, utilizaram-se cães com pesos aproximados e, além disso, todos os dados foram referidos ao peso corporal, quando pertinentes.

Os animais foram submetidos a uma dieta com um teor proteico de 5g/kg, conforme preconiza KALLFELZ (1976), embora O'CONNOR e SUMMERILL (1976) considerem como uma ingesta proteica adequada ao cão a quantidade de 10g de proteína por quilograma de peso corporal.

Utilizou-se o alfa-1-24-ACTH, tetracosapeptídeo que se constitui dos 24 primeiros aminoácidos do ACTH natural, por

ser o fármaco de uso corrente e não haver na literatura consultada dados a respeito de seu efeito sobre a excreção urinária de aminoácidos.

Sabendo que os efeitos do ACTH exógeno dependem da dose, da via de administração e do método de administração empregados (ROSSELIN e colaboradores, 1966; RENOLD e colaboradores, 1952), e não havendo indicações prévias que correlacionassem esses fatores à indução de aminoacidúria por ACTH sintético, os mesmos foram definidos, pelos seguintes critérios:

- para dose - empregaram-se arbitrariamente 4 microgramas por quilograma de peso corporal, a partir da observação de STARK e colaboradores (1967), que verificaram ser essa dose capaz de produzir um efeito de 70% de aumento do fluxo ovariano em cadelas. STEI NETZ e colaboradores (1973) administraram a cães, através de injeção endovenosa, 0.3, 3.0 e 30  $\mu$ g/kg de tetracosáctido, mostrando que todas as doses eram capazes de elevar os níveis de cortisol plasmático, atingindo um pico em 1 hora, com igual duração de efeito e com intensidade proporcional à dose.

No plano-piloto desse experimento (COSTA e cols, 1976), o emprego daquela dose evidenciou resultados em todos os animais pesquisados. Há uma correlação, também, entre essa dose e a comumente dada ao homem (250 microgramas), se forem estimados, respectivamente seus pesos médios em 8 e 70 quilogramas.

- para a via e método de administração - utilizaram-se os dados obtidos no plano-piloto realizado, onde se observou que a via endovenosa foi a mais eficiente para a produção de aumento do alfa-amino-nitrogênio urinário. A injeção endovenosa rápida do tetracosáctido em 6 animais induziu uma resposta em pico, 30 a 60 minutos após a administração do fármaco. A infusão endovenosa lenta, por 8 horas, em 1 animal, produziu um aumento progressivo e sustentado do efeito. A injeção intramuscular em outro cão produziu uma resposta semelhante à injeção endovenosa rã

pida do ACTH sintético, só com período de latência maior. Os tipos de respostas foram muito próximas das observadas por *RENOLD e colaboradores (1952)*, em relação aos efeitos de estimulação do córtex adrenal induzidos por ACTH natural.

Como se desejava realizar um experimento agudo, optou-se pela injeção endovenosa rápida do tetracosáctido.

A creatinina foi administrada exogenamente, segundo o esquema preconizado por *MALNIC (1969)*. A filtração glomerular em cães é melhor avaliada pela depuração da creatinina exógena, que é praticamente idêntica à depuração da inulina. Já a depuração da creatinina endógena cai a valores 22% mais baixos do que os obtidos com creatinina exógena ou inulina.

O experimento se iniciou sempre entre 8 e 9 horas da manhã, conforme fizeram *LANDON e colaboradores (1964)*, *MONCLOA e colaboradores (1966)* e *LECLERCQ e colaboradores (1970)*. Com isso se tentou evitar eventuais variações na excreção de amino ácidos, já que *TEWKSBURY e LOHRENZ (1970)* mostraram ocorrer um ritmo circadiano na excreção urinária desses compostos, em humanos.

Anestesiaram-se os cães com pentobarbital sódico, numa dose classicamente utilizada. *GREER e ROCKIE (1968)* verificaram que o pentobarbital sódico não interfere na liberação do ACTH endógeno, nem bloqueia sua resposta aos estímulos estressantes, ao contrário do que constataram *RERUP e HEDNER (1962)*, em ratos. *GILMORE e MICHAELIS (1969)* afirmaram que doses anestésicas de pentobarbital sódico não influenciam significantemente a função renal de cães sadios e normalmente hidratados. A suplementação anestésica foi necessária em poucos cães, sendo realizada conforme preconizaram aqueles autores. Não houve sugestão de que ocorressem diferenças entre os dados obtidos antes e imediatamente após a suplementação anestésica. Entre o inícida anestesia e a primeira coleta mediaram 90 minutos ,

o que se julgou o tempo necessário para que haja estabilização do animal. Outros autores (COWAN e colaboradores) medeiam um período de 60 a 80 minutos entre o momento da anestesia e o início do experimento.

A heparinização foi feita com metade da dose preconizada por STARK (1967), com a qual os resultados foram satisfatórios.

Pretendia-se que o fluxo urinário do cão se mantivesse num nível normal, de 0.1 - 0.25ml/min (O'CONNOR e SUMMERILL, 1975), pelo que não se fez sobrecarga líquida, apenas infundindo um volume de líquido por quilograma, inicialmente, numa tentativa de padronizar o grau de hidratação dos animais da amostra. Como GILMORE e MICHAELIS (1969), não se notaram amplas variações no fluxo urinário das 6 coletas realizadas.

As coletas de urina e de sangue foram realizadas, segundo o método utilizado por MALNIC (1969), GILMORE e MICHAELIS (1969) e O'CONNOR e SUMMERILL (1976).

BAREJ (1965) e HIRCH (1969), com seus colaboradores, escolheram a dosagem de amino-nitrogênio total para estimar a quantidade de aminoácidos na urina, enquanto WEBBER e colaboradores (1961) em seus estudos de competição entre aminoácidos, utilizaram dosagens urinária e plasmática de alfa-amino-nitrogênio, para avaliar os níveis dos alfa-aminoácidos, embora por métodos diferentes do aqui usado .

KACHADURIAN (1962) preconizou a utilização da relação entre as dosagens de alfa-amino-nitrogênio e de creatinina para expressar resultados de aminoácidos urinários, desde que evita erros causados por coleção incompleta de urina e permite comparações entre indivíduos de diferentes pesos.

PYTASZ e colaboradores (1970) também usaram a dosagem de alfa-amino-nitrogênio para o plasma, seguindo o método de

STEIN e MOOR numa modificação de RAC.

WELLS (1969) empregou o método por ele descrito, analisando 50 adultos, 50 crianças normais e 25 pacientes com possíveis anormalidades da excreção de aminoácidos. Comparou os resultados da dosagem do alfa-amino-nitrogênio com os evidenciados pela cromatografia em papel, realizada nos mesmos indivíduos, demonstrando haver boa correlação entre eles.

Comparando os resultados do presente trabalho aos referidos na literatura, sobre o efeito do ACTH na produção de aminoacidúria, observam-se várias semelhanças. Evidentemente a aquela comparação é relativa, já que esse efeito não foi observado anteriormente, através de experimento similar.

#### 1. DEPURAÇÃO DA CREATININA EXÓGENA

Os fluxos urinários dos cães estudados, variando entre 0.11 e 0.45ml/min, foram muito semelhantes aos obtidos por O'CONNOR e SUMMERILL (1976), que referem como faixa normal valores de 0.1 a 0.3ml/min.

Encontrou-se um valor médio de depuração da creatinina exógena ( $3.67 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1} \pm 1.87$ ), na fase controle, maior do que o referido ( $2.74 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) por aqueles autores, mas com extremos de variação muito semelhantes: 2 a  $5 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ , no presente trabalho e 2.2 a  $4.2 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ , naquela pesquisa. O'CONNOR e SUMMERILL (1976) citaram, ainda, valores médios de depuração de creatinina exógena em cães, obtidos por outros autores:  $4.3 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ,  $5.2 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  e  $4.8 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ .

ZINNEMAN (1963) e ZISCHKA (1970), com seus colaboradores, estudando, respectivamente, a influência do cortisol e da dexametasona sobre a aminoacidúria, não constataram modificações significativas de depuração de creatinina endógena, pré e pós-tratamento, em humanos.

Outros autores, observando o efeito do ACTH natural sobre a excreção urinária de aminoácidos, não pesquisaram sua influência sobre a depuração de creatinina. Como o ACTH não tem efeito sobre o fluxo sanguíneo renal (STARK e colaboradores, 1967), ao contrário do que ocorre com outros órgãos, ele não deve influir na filtração glomerular.

WEBBER e colaboradores (1961) constataram que a infusão de vários aminoácidos, em concentrações máximas dentro de seu experimento, causou diminuição de depuração de creatinina exógena em cães. Contrariamente, O'CONNOR e SUMMERILL (1976), administrando oralmente glicina, observaram aumento da depuração de creatinina exógena, na mesma espécie animal. Justificaram-no, dizendo que os produtos de desaminação da glicina, causando vasodilatação de arteríolas renais, aumentariam o fluxo plasmático renal e, conseqüentemente, a filtração glomerular.

No presente trabalho, os valores obtidos após a administração do alfa-1-24-ACTH, embora um pouco menores do que os da fase controle, não foram estatisticamente significativos, indicando que o grau de hidratação e a diurese foram mantidos dentro de níveis razoavelmente constantes. Convém salientar esse aspecto, uma vez que aqueles são fatores que sabidamente interferem na depuração da creatinina exógena.

## 2. AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS

Obtiveram-se níveis plasmáticos de aminoácidos muito heterogêneos, tanto na fase controle quanto na experimental, ao se considerarem os cães individualmente. Na literatura, os resultados descritos em relação a esse aspecto são variáveis.

WEBBER e colaboradores (1961), dosando alfa-amino-nitrogênio no período controle de seu experimento, evidenciaram pequena variabilidade nas concentrações plasmáticas de aminoácidos. Pesquisando esses compostos individualmente, observaram

que a maioria deles mantinha constante sua concentração plasmática, na situação controle, embora houvesse casos com definidas alterações. *BORDEN e colaboradores (1952)* mostraram que os aminoácidos são relativamente constantes para um mesmo indivíduo. Esses mesmos autores, administrando ACTH natural em humanos, provocaram um pequeno aumento plasmático, mas que indica uma alteração apreciável, quando considerado em termos de volume total de sangue circulante. *STEPHENS e colaboradores (1950)* também verificaram ser o ACTH capaz de aumentar discretamente o nível plasmático de histidina, em pacientes artríticos. Sugeriram que tal aumento já pudesse contribuir para o aparecimento de histidinúria. Da mesma forma, *BAREJ e KULASEK (1965)* observaram em porcos elevação plasmática de aminoácidos, sobretudo de valina e metionina, após o uso do ACTH natural. Contrariamente, *GROB (1952)* não verificou modificações na histidinemia, após administração daquele hormônio.

Após o emprego de alfa-1-24-ACTH, os níveis plasmáticos de alfa-amino-nitrogênio, comparativamente aos resultados da fase controle, apresentaram uma queda inicial e posterior elevação persistente. Embora a tendência do grupo seja a descrita acima, a variação individual foi muito ampla, incluindo 2 cães sem resposta, 3 com elevação progressiva e 6 com pico de elevação, imediato ou tardio. Possivelmente, a heterogeneidade de resposta e a ampla faixa de níveis circulantes sejam responsáveis pela ausência de significância estatística. Uma tentativa de explicar aquele comportamento seria de que, a uma imediata redução do "pool" circulante de aminoácidos, devida à sua rápida excreção urinária, se seguisse uma reposição do mesmo, por aminoácidos provenientes do "pool" intracelular. Não se pode excluir um efeito direto do ACTH sobre a permeabilidade celular, promovendo a passagem de aminoácidos para a circulação, o qual seria inicialmente mascarado pela perda urinária simultânea dos mesmos.

### 3. AMINOÁCIDOS URINÁRIOS

Habitualmente, a excreção urinária de aminoácidos é muito pequena e constante (KIRSNER e colaboradores, 1949).

No presente trabalho, a administração endovenosa rápida do tetracosáctido causou um aumento definido na excreção urinária dos aminoácidos, embora não significativa estatisticamente para  $\alpha = 5\%$ . Houve uma diferença de comportamento individual nos cães estudados, quando se analisa essa excreção urinária: em 3 deles a resposta do ACTH foi nula ou correspondeu a uma pequena queda e nos demais houve nítida elevação, embora com padrão muito variável. Em dois animais houve um aumento progressivo, enquanto os outros apresentaram respostas em pico, às vezes imediato e outras vezes tardio.

Devido a essa variabilidade, incorrendo numa amostra pequena, os resultados de cada coleta não foram estatisticamente significantes, quando comparados com o controle, apesar de ter havido um aumento percentual progressivo na excreção urinária dos aminoácidos.

É possível que, utilizando-se um maior número de animais, seja factível uma melhor definição sobre a aminoacidúria induzida pelo ACTH sintético. No presente trabalho, o que se observa é uma tendência nítida de aumento dos aminoácidos urinários sob efeito do fármaco.

Os resultados encontrados por vários investigadores - que utilizaram o ACTH natural, são descritos a seguir:

- STEPHENS e colaboradores (1950) e GROB (1952) demonstraram histidinúria significativa, sendo que o último autor evidenciou aumento da excreção urinária de amino-nitrogênio total, tanto em normais como em portadores de doenças de imuno-alérgicas.
- BAREJ e KULASEK (1965) sugeriram que o ACTH aumenta-

va os níveis urinários de todos os aminoácidos testados, em porcos.

- BRODIE e colaboradores (1950) observaram aumentos significativos de treonina, lisina e tirosina na urina de artríticos que recebiam ACTH.
- PENTZ e colaboradores (1959) referiram a elevação em pico da taurina, sob a influência do ACTH.

Variações no início e na duração da aminoacidúria também ocorreram sob efeito do cortisol (ZINNEMAN e colaboradores, 1963).

As interpretações do surgimento de aminoacidúria têm sido diversas: alguns autores (BAREJ e KULASEK, 1965) atribuíram-na à sobrecarga filtrada já que observaram concomitante aumento de aminoácidos no sangue. GROB (1952) sugeriu ser a histidinúria devida à deficiente reabsorção tubular. BORDEN e colaboradores (1952) encontraram aumento de histidina na urina, mas não no plasma, excluindo a aminoacidúria por sobrecarga renal. Sugeriram não se dever à diminuição de limiar renal, já que, administrando oralmente histidina e treonina, em doses de 2 a 10g, encontraram excreção de apenas 2 a 5% na urina.

#### 4. DEPURAÇÃO RENAL DE AMINOÁCIDOS

Em 1936, KIRK (citado por WEBBER e colaboradores, 1961) referiu que a depuração renal de amino-nitrogênio era normalmente baixa e aumentava quando se elevavam as concentrações - plasmáticas, com conseqüente aumento da filtração glomerular.

A depuração renal de aminoácidos, sob a influência do alfa-1-24-ACTH, mostrou uma tendência à elevação progressiva, de maneira similar à excreção urinária dos aminoácidos, porém menos nítida.

A depuração expressa uma relação entre a excreção urinária e os níveis plasmáticos. Se esses decrescessem ou pelo

menos se mantivessem estáveis paralelamente ao aumento da excreção urinária, a depuração teria valores maiores; entretanto, como as concentrações plasmáticas tenderam à elevação, a variação da depuração tornou-se menos nítida do que a da excreção urinária. Isso sugere a possibilidade de um efeito direto do ACTH sobre o "pool" de aminoácidos, com deslocamento dos mesmos, desde o interior das células até o meio extracelular.

## 5. REABSORÇÃO TUBULAR RENAL DE AMINOÁCIDOS

WEBBER (1962) registrou valores de reabsorção tubular de aminoácidos que variaram de 95 a 100%, raramente chegando a 90%, na situação controle. Os resultados foram muito homogêneos, com os diversos aminoácidos.

GROB (1952) observou que o ACTH induzia uma queda na reabsorção tubular de histidina a níveis de 80%.

Com o alfa-1-24-ACTH não se observou uma queda significativa ( $p > 0.05$ ) da reabsorção tubular de aminoácidos. Esse parâmetro, calculado a partir da reunião de todos os dados pesquisados, foi muito homogêneo na amostra e nos diversos momentos de coleta, mostrando pequenos desvios padrões. Isso confere segurança aos achados experimentais, mostrando uma concordância de variação entre aminoácidos urinários e plasmáticos, bem como de sua depuração e da filtração glomerular. A variabilidade de resultados, discutida anteriormente, se deve, pois, a variações individuais e não a erro experimental.

Vários relatos na literatura confirmam a variabilidade aqui notada. STEPHENS e colaboradores (1950) afirmaram que tanto a excreção controle quanto o aumento de histidina, após o ACTH, mostraram considerável variação individual. Também STARK e outros (1967) referiram que a relação dose-efeito com ACTH variou de cão para cão. LECLERCQ e colaboradores (1970), pesquisando a estimulação adreno-cortical sob uso do ACTH, observaram grande dispersão nas respostas individuais, em seres humanos.

Em resumo, nas condições do presente experimento, os dados obtidos apenas sugerem a indução de aminoacidúria pelo alfa-1-24-ACTH, desde que houve uma tendência à elevação urinária de aminoácidos. Não se excluiu que tanto a reabsorção tubular renal quanto um efeito sobre o "pool" sistêmico de aminoácidos pudessem estar envolvidos na gênese daquele aumento, já que houve uma tendência à queda da reabsorção e à elevação plasmática dos aminoácidos.

Várias possibilidades existem para explicar o não atingimento de significância estatística a nível de 5% para o efeito pesquisado:

- o comportamento heterogêneo da amostra provavelmente contribuiu para isso; como se empregaram animais de diferentes raças, a variação genética pode explicar um comportamento diversificado;
- é possível que a dose e o método de administração utilizados não tivessem sido os mais adequados à produção de aminoacidúria, em níveis que permitissem torná-la estatisticamente significativa;
- não se excluiu também que o análogo sintético comporte-se diferentemente do ACTH natural, no que se refere à indução de aminoacidúria, podendo ser responsável por esse efeito aquele segmento da cadeia polipeptídica que só existe no segundo hormônio.

Como não há trabalhos prévios que possam responder a essas indagações, é óbvia a necessidade de pesquisas adicionais, em que se aumente o número de indivíduos da amostra, para esclarecer a existência do efeito, independentemente da variabilidade de comportamento entre os animais; ou que se modifiquem doses e métodos de administração; ou que se comparem os efeitos do ACTH natural e do alfa-1-24-ACTH, nas mesmas condições experimentais.

Além disso, posteriormente seria de interesse determinar a participação da glândula adrenal no processo, verificando-

se se o efeito decorreria de uma ação direta do ACTH sintético ou seria mediado pela secreção endógena de corticóides. Alguns fatos sugeririam indiretamente a não participação dos corticóides no surgimento da aminoacidúria: os efeitos obtidos com a administração de cortisol e dexametasona foram muito semelhantes entre si quanto ao padrão urinário de aminoácidos e quanto ao mecanismo presumivelmente indutor da aminoacidúria ( reabsorção tubular renal deficiente) e diferentes do comportamento dos níveis plasmáticos e urinários dos aminoácidos, sob influência do ACTH. Fala, ainda, a favor de uma ação direta, a observação de *GOLDER e BOVNS (1971)* que detectaram maiores concentrações de alfa-1-24-ACTH marcado com  $I^{131}$  no rim do que em outros tecidos, em cobaias. *CATS e KASSENAAR (1957)* confirmaram esse achado em ratos, observando maiores concentrações de  $I^{131}$  ACTH no fígado e no rim. *RICHARDS e SAYERS (1951)* apresentaram dados similares em ratos, encontrando uma concentração predominante do ACTH no rim. Obviamente, não se exclui a possibilidade de uma ação direta do ACTH sobre as células tubulares renais, ser associada a uma ação indireta, através dos esteróides suprarrenais liberados por aquele hormônio.

## **V - RESUMO E CONCLUSÕES**

## V. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho investigou-se o efeito do alfa-1-24-ACTH (tetracosáctido), análogo sintético da adrenocorticotrofina, sobre a excreção renal de aminoácidos, em cães, através das dosagens de alfa-amino-nitrogênio na urina e no sangue. Pesquisou-se a influência do hormônio sobre a concentração sangüínea dos aminoácidos, sua excreção urinária, a depuração renal e a reabsorção tubular dos mesmos, relacionando esses parâmetros à filtração glomerular, determinada pela depuração da creatinina exógena.

Respondendo aos objetivos inicialmente propostos, pode-se concluir:

- o alfa-1-24-ACTH, injetado rapidamente por via endovenosa, em dose única de 4µg/kg de peso corporal mostrou uma tendência ao aumento da excreção urinária de aminoácidos, que não foi, entretanto significativa estatisticamente ( $p > 0.05$ ). O correram tipos de respostas muito variáveis dentro da amostra pesquisada, o que se supõe tenha contribuído para o não atingimento do nível de significância pré-determinado.

- como houve uma tendência ao aumento dos níveis circulantes e à redução da reabsorção tubular renal de aminoácidos, embora não significativas para um alfa de 5%, coloca-se a possibilidade de que ambos os mecanismos estejam envolvidos na maior excreção urinária daqueles compostos.

Uma melhor definição desses efeitos exigirá futuras investigações.

## **VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, M.D. et alii. Excretion of B-aminoisobutyric acid by man. *J. Biol. Chem.*, 238:1447-55, 1963. Apud: EFRON, M.L. Aminoaciduria. *The New England Journal of Medicine*, 272(20): 1065, May 20, 1965.
- BACCHUS, H. Clinical disorders of protein and amino acid metabolism. In: ——. *Essentials of Metabolic Diseases and Endocrinology*. Baltimore, University Park Press, 1976. cap.4, p.151-87.
- BAREJ, W. & KULASEK, G. Wpływ hormonu adrenokortykotropowego i wysokiej temperatury otoczenia na przemiany związków azotowych u prosiat; II. Aminokwasy w surowych krwi i moczu. *Acta Physiologica Polonica*, 16(4):605-12, 1965.
- BAREJ, W. et alii. Wpływ hormonu adrenokortykotropowego i wysokiej temperatury otoczenia na przemiany związków azotowych u prosiat; I. Ogólny metabolizm azotu. *Acta Physiologica Polonica*, 16 (4):593-603, 1965.
- BERGERON, M. & MOREL, F. Amino acid transport in rat renal tubules. *American Journal of Physiology*, 216(5):1139-49, May 1969.
- BERGERON, M.; DUBORD, L.; HAUSSER, C. Membrane permeability as a cause of transport defects in experimental Fanconi syndrome; a new hypothesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 57(5):1181-9, May 1976.
- BEYER, K.H. et alii. Renal clearance of essential amino acids: their competition for reabsorption by the renal tubules. *American Journal of Physiology*, 151(1):202-10, Nov. 1947.

- BORDEN, A.L. et alii. Amino acid studies and clinical findings in normal adults and rheumatoid arthritis patients treated with ACTH. *The Journal of Clinical Investigation*, 31(4):375-9, Apr. 1952.
- BORDEN, A.L. et alii. Plasma levels of free amino acids in normal subjects compared with patients with rheumatoid arthritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 75(1):28-30, Oct. 1950.
- BRODEHL, J.; GELLISSEN, K.; KOWALEWSKI, S. Isolated cystinuria (without lysine-ornithine-argininuria) in a family with hypocalcemic tetany. *KLIN. WOCHSCHR.*, 45:38-40, 1967. Apud: SEGAL, S. & THIER, S.O. Renal handling of amino acids. In: ORLOFF, J.; BERLINER, R.W.; GEIGER, S.R., eds. *Handbook of Physiology; Renal Physiology*. Washington, D.C., American Physiological Society, 1973. sec.8, cap.20, p.672.
- BRODIE, E.C. et alii. Urinary excretion of certain amino acids during ACTH and cortisone treatment of rheumatoid arthritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 75(1):285-7, Oct. 1950.
- CATS, A. & KASSENAAR, A.A.H. Influence of the kidney on the disappearance rate of labelled corticotrophin from the blood stream. *Acta Endocrinologica*, 24(1):43-9, Jan. 1957.
- CHILDS, B. Urinary excretion of free alpha-amino-acid nitrogen by normal infants and children. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 81(1):225-6, Oct. 1952.
- CHOITZ, H.C. & GAEBLER, O.H. Urinary excretion of ingested  $\alpha$ -aminoisobutyric acid- $N^{15}$  in dogs treated with growth hormone or corticotropin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 121(2):346-9, Feb. 1966.
- CHRISTIAN, J.J. Effects of  $\beta$ 1-24 synthetic corticotrophin on reproductive tract and kidneys of immature female mice.

*Acta Endocrinologica*, 55(1):62-70, Jan. 1967.

COSTA, M.G.; WANNMACHER, L.; WANNMACHER, C.M.D. Efeito do ACTH sobre a excreção urinária de aminoácidos: estudo da via de administração de ACTH. Comunicado na Semana Universitária Gaúcha de Debates Biológicos, 18<sup>a</sup>. Porto Alegre, 3 a 9 de outubro de 1976.

COWAN, J.S.; DAVIS, A.E.; LAYBERRY, R.A. Constancy and linearity of the metabolic clearance of adrenocorticotropin in dogs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 52(4):8-13, Feb. 1974.

CRAWHALL, J.C. et alii. The renal clearance of amino acids in cystinuria. *The Journal of Clinical Investigation*, 46(7):1162-71, July 1967.

CROME, L., and STERN, J. The Pathology of Mental Retardation. London: J. & A. Churchill, 1967. Apud: PAULSON, G. & ALLEN N. Sistema Nervioso. In: GOODMAN, R.M. *Trastornos Genéticos*. Barcelona, Salvat, 1973. cap.15, p.514.

CRUMPLER, H.R.; DENT, C.E.; HARRIS, H. and WESTALL, R.G.  $\beta$ -aminoisobutyric acid ( $\gamma$ -methyl- $\beta$ -alanine): new amino acid obtained from human urine. *Nature* (London) 167:307, 1951. Apud: SOTOS, J.F. & BOGGS, D.E. Trastornos del metabolismo. In: GOODMAN, R.M. *Trastornos Genéticos*. Barcelona, Salvat, 1973, cap.17, p.758.

CURRAN, P.F. Active transport of amino acids and sugars. *Archives of Internal Medicine*, 129(2):258-69, Feb. 1972.

CUSWORTH, D.C.; DENT, C.E.; FLYNN, F.V. The aminoaciduria in galactosemia. *Arch. Dis. Childhood*, 30:150-4, 1955. Apud: EFRON, M.L. Aminoaciduria. *The New England Journal of Medicine*, 272(20):1065, May 20, 1965.

DE LOECKER, W. & STAS, M.L. Effect of cortisol treatment on

- free amino acid levels in rats. *The Journal of Endocrinology*, 59(1):57-63, Oct. 1973.
- DIAS, R.D. Transporte ativo. In: WANNMACHER, C.M.D.; PERRY, M.L.S.; DIAS, R.D. *Bioquímica Médica*, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica, 1977, p.51-60.
- DICK, T. Determinação da creatinina; método de Folin modificado. In: *Introdução à Bioquímica, Práticas II*. Porto Alegre, Instituto de Pesquisas Bioquímicas, Faculdade de Filosofia e Faculdade de Medicina da UFRGS, 1970. p.133-5.
- DI GIORGIO, J. Nonprotein nitrogenous constituents; manual determination of creatinine and creatine. In: HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W., eds. *Clinical Chemistry: Principles and Technics*. 2 ed. Hagerstown (Maryland), Harper and Row, 1974. cap.17, p.543-6.
- DOE, R.P. et alii. Significance of the concentration of non-proteinbound plasma cortisol in normal subjects, Cushing's syndrome, pregnancy, and during estrogen therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 120(11):1484-92, Nov. 1960.
- EDWARDS, A.V.; HARDY, R.N.; MALINOWSKA, K.W. The sensitivity of adrenal responses to synthetic adrenocorticotrophin in the conscious unrestrained calf. *The Journal of Physiology*, 245(3):639-53, Mar. 1975.
- EFRON, M.L. Aminoaciduria. *The New England Journal of Medicine*, 272(20):1058-67, May 20, 1965.
- EFRON, M.L. Interpretation of the amino acid chromatograms of the human body fluids. In: SMITH, I., ed. *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. 3 ed. New York, John Wiley & Sons, 1969. v.1, cap.5, sec.3, p.151-69.

- EICHORN, J. et alii. Effect of ACTH and insulin on AIB accumulation in diaphragm muscle and adrenal "in vivo". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 106(1): 153-7, Jan. 1961.
- EISENBACH, G.M.; WEISE, M.; STOLTE, H. Amino acid reabsorption in the rat nephron; free flow micropuncture study. *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology*, 357(1-2):63-76, May, 1975.
- ELSAS, L.J. & ROSENBERG, L.E. Inhibition of amino acid transport in rat kidney cortex by puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57:371-378, 1967. Apud: SEGAL, S. & THIER, S.O. Renal handling of amino acids. In: ORLOFF, J.; BERLINER, R.W.; GEIGER, S.R., eds. *Handbook of Physiology; Renal Physiology*. Washington, D.C., American Physiological Society, 1973. sec.8, cap. 20, p.673.
- FEIGIN, R.D.; KLAINER, A.S.; BEISEL, W.R. Factors affecting circadian periodicity of blood amino acids in man. *Metabolism*, 17(9):764-75, Sept. 1968.
- FOX, M. et alii. Impaired renal tubular function induced by sugar infusion in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 24(12):1318-27, Dec. 1964.
- FRIMPTER, G.W. et alii. Inulin and endogenous amino acid renal clearances in cystinuria: evidence of tubular secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 41(2):281-8, Feb. 1962.
- FROESCH, E.R. et alii. Hereditary fructose intolerance: an inborn defect of hepatic fructose-1-phosphate splitting aldolase. *The American Journal of Medicine*, 34(2):151-67, Feb. 1963.
- GAEBLER, O.H. et alii. Effects of growth hormone and corticotropin on metabolism of  $N^{15}$  from glycine, L-alanine, and ammonium citrate. *Endocrinology*, 65(2):283-91, Aug. 1959.
- GILMORE, J.P. & MICHAELIS, L.L. Influence of anesthesia on renal responses of the foxhound to intravascular volume expansion.

sion. *American Journal of Physiology*, 216(6):1367-9, June 1969.

GLORIEUX, F.H. et alii. Transport and metabolism of sarcosine in hypersarcosinemic and normal phenotypes. *The Journal of Clinical Investigation*, 50(11):2313-22, Nov. 1971.

GOLDER, M.P. & BOYNNIS, A.R. Distribution of  $^{131}\text{I}$ -alpha<sup>1-24</sup>-adrenocorticotrophin in the intact guinea-pig. *The Journal of Endocrinology*, 49(4):649-58, Apr. 1971.

GREER, M.A. & ROCKIE, C. Inhibition by pentobarbital of ether-induced ACTH secretion in the rat. *Endocrinology*, 83(6):1247-52, Dec. 1968.

GROB, D. The renal excretion of histamine and histidine in man, and the effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone administration. *Bulletin of Johns Hopkins Hospital*, 90(5):341-67, May 1952.

HALE, H.B.; ELLIS Jr., J.P.; VAN FOSSAN, D.D. Seasonal variation in human amino acid excretion. *Journal of Applied Physiology*, 15(1):121-4, Jan. 1960.

HAUGEN, H.N. The adrenocorticotrophic effect of D-serine<sup>1</sup>-norleucine<sup>4</sup>-valinamide<sup>25</sup>-β-1-25-corticotropin (DW 75); a comparison with genuine ACTH. *Acta Medica Scandinava*, 186(3):173-5, Sept 1969.

HIRSCH, W.; MEX, A.; VOGEL, F. Metabolic traits in mentally retarded children as compared with normal populations: monoaminodicarboxylic acids and their half amides and total amino acids. *Journal of Mental Deficiency Research*, 13(part 2):130-42, June 1969.

HOLBROOK, W.P.; HILL, D.F.; STEPHENS, C.A.L., Jr.; KENT, L.J.; BORDEN, A.; KEMMERER, A.R.; WALLRAFF, E.B.; and BRODIE, E. In:

- MOTE, J.R. (ed), *Proc. First Clin. ACTH Conf.*, 1950, p.386. Apud: ZISCHKA, R.; ORTI, E.; CASTELLS, S. Effects of short-term administration of dexamethasone on urinary and plasma free amino acids in children. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 31(1):97, July 1970.
- HOLLERMAN, C.E. & CALCAGNO, P.L. Aminoaciduria-renal transport. *American Journal of Diseases of Children*, 115(2):169-78, Feb. 1968.
- HOOFT, C. and J. HERPOL, *Ann. Paediat.*, 198:3, 1962. Apud: ZINNEMAN, H.H.; JOHNSON, J.J.; SEAL, U.S. Effect of short-term therapy with cortisol on the urinary excretion of free amino acids. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 23(10):996-1000, Oct. 1963.
- IRVINE, W.J. et alii. The effect of synthetic corticotropin analogues on adrenocortical, anterior pituitary and testicular functions. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 39(3):522-9, Sept. 1974.
- JOHNSTONE, R.M. Glycine accumulation in absence of fall of the potential energy from the ion gradients for glycine accumulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 282(1):366-73, 1 Sept. 1972.
- KALLFELZ, F.A. Nutritional management of the growing dog. *Gaines Progress*:2-3, 12, Summer 1976,
- KHACHADURIAN, A.K. Amino-aciduria secondary to a functioning parathyroid carcinoma. *Annals of Internal Medicine*, 56(6): 931-4, June 1962.
- KIRK, E. *Acta Med. Scand.*, 89:450, 1936. Apud: WEBBER, W.A.; BROWN, J.L.; PITTS, R.F. Interactions of amino acids in renal tubular transport. *American Journal of Physiology*, 200(2):386, Feb. 1961.

- KIRSNER, J.B.; SHEFFNER, A.L.; PALMER, W.L. Studies on amino acid excretion in man; III. Amino acid levels in plasma and urine of normal men fed diets of varying protein content. *The Journal of Clinical Investigation*, 28(4):716-22, July, 1949.
- KOLANOWSKI, J.; SALVADOR, G.; CRABBE, J. Influence de l'agresion chirurgicale sur la sensibilité du cortex surrénal à la corticotropine exogène. *Annales d'Endocrinologie*, 33(2):211-5, mars/avr 1972.
- KOSTYO, J.L. & SCHMIDT, J.E. Inhibitory effects of cardiac glycosides and adrenal steroids on amino acid transport. *American Journal of Physiology*, 204(6):1031-8, June 1963.
- LANDAU, R.L. & LUGIBIHL, K. The catabolic and natriuretic effects of progesterone in man. *Recent Progress in Hormone Research*, 17:249-92, 1961.
- LANDON, J. et alii. Adrenocorticotropic effects of a synthetic polypeptide  $-\beta^{-1-24}$ - corticotropin - in man. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 24(11):1206-13, Nov. 1964.
- LECLERCO, R.; BRUNO, O.D.; COPINSCHI, G. Action de doses physiologiques d'ACTH synthétique chez l'homme normal. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 186(1):194, juil. 1970.
- MALNIC, G. & MARCONDES, M. Medida do ritmo de filtração glomerular e do fluxo plasmático renal em cães. In:—. *Fisiologia Renal; transporte através de membranas, fisiopatologia do néfron*. São Paulo, Edart, 1969. parte 6, p.218-9 [Experiência I].
- MONCLOA, F.; VELAZCO, I.; BETETA, L. Biological half-life of a synthetic corticotrophin in men. *Acta Endocrinologica*, 52(3):337-40, Mar. 1966.

- MOREL, F. & DE ROUFFIGNAC, C. Kidney. *Annual Review of Physiology*, 35:17-54, 1973.
- MORIN, C.L. et alii. Biochemical and genetic studies in cystinuria: observations on double heterozygotes of genotype I/II. *The Journal of Clinical Investigation*, 50(9):1961-76, Sept. 1971.
- O'CONNOR, W.J. & SUMMERILL, R.A. The effect of a meal of meat on glomerular filtration rate in dogs at normal urine flows. *Journal of Physiology*, 256(1):81-91, Mar. 1976.
- PENTZ, E.I.; MOSS, W.T.; DENKO, C.W. Factors influencing taurine excretion in human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 19(9):1126-33, Sept. 1959.
- PFAUNDLER, M. Über ein Verfahren zur Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs im Harn. *Z. Physiol. Chem.*, 30:75-89, 1900. Apud: SEGAL, S. & THIER, S.O. Renal handling of amino acids. IN: ORLOFF, J.; BERLINER, R.W.; GEIGER, S.R., eds. *Handbook of Physiology; Renal Physiology*. Washington, D.C., American Physiological Society, 1973. sec.8, cap.20, p.674.
- PITTS, R.F. A renal reabsorptive mechanism in the dog common to glycine and creatine. *American Journal of Physiology*, 140(2):156-67, Nov. 1943.
- PITTS, R.F. A comparison of the reabsorptive processes of several amino acids. *American Journal of Physiology*, 140(2):535-47, Jan. 1944.
- PRATT, J.H.; DALE, S.L.; MELBY, J.C. The effect of administered ACTH on aldosterone metabolism and secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 42(2):355-60, Feb. 1976.
- PYTASZ, M.; SANECKA-OBACZ, M.; TYBURCZYK, M. The excretion of amino acids in dog's kidney in the course of experiments

- with stop-flow diuresis. *Acta Physiologica Polonica*, 21(4): 446-55, 1970.
- RENOLD, A.E. et alii. The use of intravenous ACTH: a study in quantitative adrenocortical stimulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12(7):763-97, July 1952.
- RERUP, C. & HEDNER, P. The effect of pentobarbital (Nembutal, Mebumal NFN) on corticotrophin release in the rat. *Acta Endocrinologica*, 39(4):518-26, Apr. 1962.
- RICHARDS, J.B. & SAYERS, G. Fate and excretion of adrenocorticotrophic hormone. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 77(1):87-93, May 1951.
- RIGGS, T.R. & BARBER, H.E. Renal clearance of alpha-aminoisobutyrate in the rat: effect of testosterone propionate. *American Journal of Physiology*, 221(6):1692-6, Dec. 1971.
- RIGGS, T.R.; WALKER, L.M.; CHRISTENSEN, H.N. Potassium migration and amino acid transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 233(6):1479-84, Dec. 1958.
- ROSE, B.; PARE, J.A.P.; PUMP, K.; STANFORD, R.L.; MACKENZIE, K. R., and VENNING, E.H.: Observations on the metabolic changes resulting from the administration of ACTH to patients with asthma and allied conditions. *Proc. Second Clinical ACTH Conference*, The Blakiston Co., Phila., 1951, 1, 519-527. Apud: GROB, D. The renal excretion of histamine and histidine in man, and the effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone administration. *Bulletin of Johns Hopkins Hospital*, 90(5):366, May 1952.
- ROSSELIN, G. et alii. L'ACTH plasmatique. II. Sa régulation physiologique; son rôle en pathologie. *La Presse Médicale*, 74(17):873-8, 2 avr 1966.

RUSZKOWSKI, M. et alii. Renal reabsorption of amino acids.

*American Journal of Physiology*, 203(5):891-6, May 1962.

SCRIVER, C.R. The human biochemical genetics of amino acid transport. *Pediatrics*, 44(3):348-57, Sept. 1969.

SCRIVER, C.R. & BERGERON, M. Amino acid transport in kidney; the use of mutation dissect membrane and transepithelial transport. In: NYHAN, W.L., ed. *Heritable Disorders of Amino Acid Metabolism; Patterns of Clinical Expression & Genetic Variation*. New York, John Wiley & Sons, 1974, cap.26, p.515-92.

SCRIVER, C.R. & EFRON, M.L. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S., eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 3.ed. New York, McGraw-Hill, 1972. cap.16, p.351-69.

SCRIVER, C.R. & PERRY, T.L. Disorders of beta-alanine and carnosine metabolism. In: STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S., eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 3.ed. New York, McGraw-Hill, 1972. cap.25, p.476-90.

SCRIVER, C.R. & WILSON, O.H. Amino Acid transport: evidence for genetic control of two types in human kidney. *Science*, 155(3768) 1428-30, Mar. 17, 1967.

SCRIVER, C.R.; EFRON, M.L.; SCHAFER, I.A. Renal tubular transport of proline, hydroxyproline, and glycine in health and in familial hyperprolinemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 43(3):374-85, Mar. 1964.

SCRIVER, C.R.; KOOH, S.W.; FRASER, D. Aminoaciduria in vitamin D deficiency rickets and in disturbances of parathyroid function. *The Journal of Pediatrics*, 65(6):1085-6, Dec. 1964.

SEGAL, S. & THIER, S.O. Renal handling of amino acids. In:

- ORLOFF, J.; BERLINER, R.W.; GEIGER, S.R. eds. *Handbook of Physiology; Renal Physiology*. Washington, D.C. American Physiological Society, 1973. sec.8, cap.20, p.653-76.
- SEGAL, S.; MILKOVIC, S.; ROSENBERG, L.E. Amino acid accumulation by kidney cortex slices and intestinal segments of rats bearing a transplantable pituitary tumor. *Endocrinology*, 76 (2):267-71, Feb. 1965.
- SELIGSOHN, V.; RAPAPORT, S.I.; KUEFLER, P.R. Extra-adrenal effect of ACTH on fibrinogen synthesis. *American Journal of Physiology*, 224(5):1172-9, May 1973.
- SOTOS, J.F. & BOGGS, D.E. Trastornos del metabolismo. In: - GOODMAN, R.M. *Trastornos Genéticos*. Barcelona, Salvat, 1973. cap.17, p.694-764.
- STARK, E.; VARGA, B.; ÁCS, ZS. An extra-adrenal effect of corticotrophin. *The Journal of Endocrinology*, 37(3):245-52, Mar. 1967.
- STEINETZ, B.G. et alii. Prolonged elevation of plasma cortisol levels in dogs treated with an 18-amino acid synthetic corticotrophin. *Experientia*, 29(11):1367-8, 15 Nov. 1973.
- STEPHENS Jr., C.A.L. et alii. Apparent free histidine plasma and urine values in rheumatoid arthritis treated with cortisone and ACTH. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 74(2):275-9, June 1950.
- STRICKLER, J.C. & FRIMPTER, G.W. Renal excretion of cystathionine in dogs. *American Journal of Physiology*, 217(4):1199-1204, Oct. 1969.
- TEWKSBURY, D.A. & LOHRENZ, F.N. Circadian rhythm of human urinary amino acid excretion in fed and fasted states. *Metabolism*, 19(5):366-71, May 1970.

- THOMAS, G.H. & SCOTT Jr, C.I. Laboratory diagnosis of genetic disorders. *The Pediatric Clinics of North America*, 20(1):105-19, Feb. 1973.
- UMBARGER, B.J.; BERRY, H.K.; GUEST, G.M. Amino acid excretion patterns in diabetic children. *Diabetes*, 12(5):443-7, Sept./Oct. 1963.
- URQUHART, J. Physiological actions of adrenocorticotropic hormone. In: GREEP, R.O. & ASTWOOD, E.B., eds. *Handbook of Physiology; Endocrinology; The Pituitary Gland and its Neuroendocrine Control*. Washington, D.C., American Physiological Society, 1974. sec.7, vol.4, part 2, cap.27, p.133-157.
- WALLRAFF, E.B.; BRODIE, E.C.; BORDEN, A.L. Urinary excretion of amino acids in pregnancy. *The Journal of Clinical Investigation*, 29(11):1542-4, Nov. 1950.
- WANNMACHER, C.M.D. *Comunicação Pessoal*, 1977.
- WANNMACHER, C.M.D. *Distúrbios Metabólicos na Deficiência Mental*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1973. [Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Genética da UFRGS].
- WEBBER, W.A. Interactions of neutral and acidic amino acids in renal tubular transport. *American Journal of Physiology*, 202(3):577-83, Mar. 1962.
- WEBBER, W.A. & CAMPBELL, J.L. Effects of amino acids on renal glucose reabsorption in the dog. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 43(6):915-23, Nov. 1965.
- WEBBER, W.A.; BROWN, J.L.; PITTS, R.F. Interactions of amino acids in renal tubular transport. *American Journal of Physiology*, 200(2):380-6, Feb. 1961.

- WELLS, M.G. A simple rapid method for the determination of alpha amino acids in urine. *Clinica Chimica Acta*, 25(1): 27-9, July 1969.
- WHELAN, D.T. & SCRIVER, C.R. Hyperdibasicaminoaciduria: an inherited disorder of amino acid transport. *Pediat. Res.*, 2: 525-534, 1968. Apud: SEGAL, S. & THIER, S.O. Renal handling of amino acids. In: ORLOFF, J.; BERLINER, R.W.; GEIGER, S.R., eds. *Handbook of Physiology; Renal Physiology*. Washington, D.C., American Physiological Society, 1973. sec. 8, cap.20, p.676.
- WRIGHT, L.D. et alii. The renal clearance of essential amino acids, arginine, histidine, lysine and methionine. *American Journal of Physiology*, 149(1):130-4, Apr. 1947.
- ZINNEMAN, H.H.; JOHNSON, J.J.; SEAL, U.S. Effect of short-term therapy with cortisol on the urinary excretion of free amino acids. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 23(10):996-1000, Oct. 1963.
- ZINNEMAN, H.H.; MUSA, B.U.; DOE, R.P. Changes in plasma and urinary amino acids following estrogen administration to males. *Metabolism*, 14(11):1214-9, Nov. 1965.
- ZINNEMAN, H.H.; SEAL, U.S.; DOE, R.P. Urinary amino acids in pregnancy, following progesterone, and estrogen-progesterone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 27(3): 397-405, Mar. 1967.
- ZISCHKA, R.; ORTI, E.; CASTELLS, S. Effects of short-term administration of dexamethasone on urinary and plasma free amino acids in children. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 31(1):95-7, July 1970.