

# UTILIZAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA O ESTUDO DO METABOLISMO PROTÉICO E AMINOACÍDICO, EM MEDICINA

STABLE ISOTOPE SPECTROMETRY TO STUDY HUMAN PROTEIN AND AMINO ACID METABOLISM

Júlio Sérgio Marchini<sup>1</sup>, Anibal Basile Filho<sup>2</sup>, Helio Vannucchi<sup>1</sup>,  
Dominique Darmaun<sup>3</sup> & Michel Krempf<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Professor Associado da Divisão de Nutrição Clínica do Departamento de Clínica Médica; <sup>2</sup> Professor Doutor da Disciplina de Terapia Intensiva do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; <sup>3</sup> Professor Doutor do Groupe de Métabolisme et Nutrition Humaine. Hotel Dieu, Université de Nantes, France.

CORRESPONDÊNCIA: Prof.Dr. Júlio Sérgio Marchini – Laboratório de Nutrição Humana – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Campus Universitário – CEP: 14048-900 – Ribeirão Preto - SP. Email: jsmarchi@fmrp.usp.br

MARCHINI JS et al. Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico, em medicina. **Medicina, Ribeirão Preto**, 30: 494-507, out./dez. 1997.

**RESUMO:** O desenvolvimento e uso de técnicas laboratoriais, envolvendo espectrometria de massa, permitiram que os isótopos estáveis pudessem ser utilizados na avaliação do metabolismo aminoacídico e protéico, em seres biológicos. Assim, medidas precisas de enriquecimento isotópico, ao nível de 3-6% além do basal, após infusão de <sup>13</sup>C-, <sup>15</sup>N- ou de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>-aminoácido, tornaram possível realizar a avaliação das interrelações metabólicas protéicas no organismo, *in vivo*. O método pode ser considerado pouco invasivo, sendo necessário, geralmente, coleta de ar expirado e sangue periférico, para determinação de substratos na concentração em torno de nanomolar. Desta maneira, períodos de infusão isotópica, de 4-6 horas, de <sup>13</sup>C-leucina, permitem estimativa do metabolismo protéico corpóreo total, pela medida direta da oxidação, via determinação do <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, no ar expirado, e da <sup>13</sup>C-Leu ou seu metabólito, <sup>13</sup>C-KIC, no sangue, assim como estimativa da degradação e síntese protéica. Mais recentemente, o advento de nova técnica, ou seja, a da associação de combustão da amostra à cromatografia e espectrometria, tornou o método mais sensível, sendo possível a determinação de substrato, marcado em amostras diluídas por um fator mínimo de 10. O método também permite o estudo da interrelação do metabolismo protéico com o de hidrato de carbono e lipídeo, quando aplicado a aminoácidos, essenciais ou não, associados a glicídios e a triglicérides.

**UNITERMOS:** Espectrometria de Massa. Metabolismo. Nutrição. Aminoácidos. Proteínas.

## INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS DE ANÁLISE ISOTÓPICAS

Os métodos de análise e utilização de isótopos estáveis, aplicáveis a ciências médicas, em geral, podem ser encontrados em livros e/ou revisões específicas, porém, após análise de levantamento feito em todas as bibliotecas da Universidade de São Paulo, via sistema *Dedalus*, não foi possível encontrar nenhum livro específico e voltado para o uso de espectrome-

tria de massa em biologia, especialmente em medicina. Por outro lado, e segundo nosso conhecimento, o primeiro laboratório de espectrometria de massa, voltado para área médica, está sendo montado no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Desta maneira, estes procedimentos estarão à disposição da comunidade científica, em especial da área médica, em futuro muito próximo (final de 1997). Conseqüentemente, espera-se, também, que estes métodos estarão sendo usados, de maneira

crescente, em pesquisas médicas, em nosso meio. A título de ilustração, nos últimos 12 meses, o American Journal of Physiology publicou pelo menos 81 artigos envolvendo, diretamente, o assunto, isótopos estáveis. O MEDLINE indexou 1035 artigos, no último ano, que, diretamente, estavam envolvidos com isótopos estáveis. Desta forma, o presente trabalho de revisão pretende não só apresentar princípios gerais desta metodologia, especialmente na área médica, como também divulgar o procedimento, em nosso meio, da técnica que utiliza isótopos estáveis como marcadores biológicos, inócuos ao homem.

As propriedades de um elemento são, de uma maneira didática, determinadas pelo número de prótons do seu núcleo, enquanto que a massa atômica depende do número de prótons e de nêutrons. Cada elemento, por exemplo, o carbono, pode ter várias formas isotópicas, que possuem as mesmas características químicas, mas, que, pelo fato de possuírem diferentes números de nêutrons, têm diferentes massas. Certos isótopos, como o  $^{14}\text{C}$ , são radioativos e se desintegram, emitindo partículas lesivas aos seres biológicos. Outros isótopos, no entanto, como o  $^{13}\text{C}$ , não se desintegram, sendo portanto estáveis. O termo isótopo estável é comumente utilizado para designar estas formas pouco abundantes de isótopos pesados, não radioativos (Tabela I) e, portanto, inócuos aos seres humanos. A incorporação destes isótopos pesados, em moléculas de interesse biológico, permite sua utilização em experimentos, tendo, como objeto, o homem, de qualquer idade, sem submetê-lo a nenhuma exposição radioativa. A ampla utilização dos isótopos estáveis, apesar de eles serem conhecidos há várias décadas, foi retardada pelo fato de requerer processo laboratorial muitas vezes tedioso e demorado para sua determinação, em oposição à utilização dos isótopos radioativos; só atualmente, com o advento de novas técnicas laboratoriais de separação e determinação, o seu uso tem sido amplamente difundido.

#### ESPECTROMETRIA DE MASSA POR DETERMINAÇÃO DA RAZÃO ISOTÓPICA (IRMS)

O espectrômetro de massa é conhecido pelo fato de obter medidas precisas em concentração isotópica muito baixa. Assim, por exemplo, quantidades de 0,001 MPE (enriquecimento isotópico em mol por cento, além da abundância natural) podem ser determinadas em amostras gasosas, cuja concentração de  $\text{CO}_2$  ou de  $\text{N}_2$  varia entre  $\mu\text{moles}$  e  $\text{nanomoles}$ .

A amostra de gás a ser analisada é introduzida, sob baixa pressão ( $\pm 10^{-8}\text{mbar}$ ), dentro da primeira parte do espectrômetro de massa, a câmara de ionização, onde as moléculas do gás são bombardeadas por um feixe de elétrons emitidos por um filamento aquecido, produzindo íons gasosos positivos. A seguir, os íons formados são submetidos a um filtro de massa. Neste filtro, os íons positivos são acelerados pela presença, na extremidade distal, de um catodo, sendo também aplicado um campo magnético perpendicular à trajetória dos íons. Como resultado da interação entre aceleração das partículas e campo magnético, os íons são desviados de acordo com a relação entre massa/carga ( $m/z$ ) de cada um. Assim o íon  $^{13}\text{CO}_2^+$  ( $m/z=45$ ) atingirá o electrodo negativo em um local diferente do íon  $^{12}\text{CO}_2^+$  ( $m/z=44$ ). Cada um destes íons incidirá, portanto, sobre um coletor especial, capaz de identificar as diferentes relações  $m/z$ .

A precisão da medida de uma relação  $m/z$ , por exemplo, 44, vem do fato de que:

- 1 - cada espectrômetro de massa é concebido para medir um número limitado de relações de cada vez;
- 2 - e, sobretudo, pela comparação permanente, via comutação contínua do aparelho, entre a amostra desconhecida e o padrão.

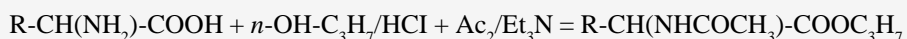
**Tabela I - Características de alguns isótopos naturais, utilizados em pesquisa clínica**

Elemento	Símbolo	Massa	Abundância natural
Hidrogênio	H	1,007825	99,9
	D ou $^2\text{H}$	2,014102	0,01
Carbono	$^{12}\text{C}$	12,00000	98,89
	$^{13}\text{C}$	13,003354	1,11
Nitrogênio	$^{14}\text{N}$	14,003074	99,635
	$^{15}\text{N}$	15,000108	0,365
Oxigênio	$^{16}\text{O}$	15,994915	99,759
	$^{17}\text{O}$	16,999133	0,037
	$^{18}\text{O}$	17,999160	0,204
Enxofre	$^{32}\text{S}$	31,972074	95,02
	$^{33}\text{S}$	32,971461	0,76
	$^{34}\text{S}$	33,967865	4,22

A principal limitação desta técnica vem do fato de que a flexibilidade de medida é limitada à utilização de gases puros. Sistemas complexos de separação das amostras são, portanto, necessários para extrair um determinado gás de uma mistura complexa. Por exemplo, em amostras de ar expirado, o CO<sub>2</sub> deve ser separado do N<sub>2</sub> e do O<sub>2</sub> por crioprecipitação, ou, ainda, um substrato não gasoso deve ser convertido em CO<sub>2</sub>, como a purificação de glucose, seguida de sua combustão em CO<sub>2</sub>.

### ESPECTROMETRIA DE MASSA ACOPLADA A CROMATOGRAFIA GASOSA (GCMS)

Esta técnica permite medir, sem grande preparação das amostras, níveis de enriquecimento isotópicos > 0,2 MPE, habitualmente variando entre 1 e 5 MPE, em pequenas quantidades do substrato (nano ou pico moles) orgânico presente em misturas complexas como o plasma. É necessário derivatizar o aminoácido para torná-lo estável e volátil à temperatura compatível com a utilização de cromatografia gasosa. A derivatização, em geral, é feita pela adição, por exemplo, de um grupo propil nos grupos polares dos aminoácidos, amino ou ácido, ou seja:



Os produtos formados são, a seguir, injetados no cromatógrafo, fase gasosa (GC), onde uma vez volatilizados, são propulsados por uma corrente de hélio (gás não reativo) em uma longa coluna capilar, por exemplo de 20 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro. A temperatura da coluna é programada para separar os aminoácidos, em função de sua afinidade relativa pela fase estacionária da coluna. Desta maneira, dentro de condições previamente definidas, cada aminoácido é eluído em um tempo de retenção que lhe é particular. A seguir, o derivado do aminoácido específico é transferido para o espectrômetro de massa (MS). Na primeira parte do MS, câmara de ionização, ocorre o bombardeamento, fragmentado o composto inicial em numerosas partes que são, a seguir, carregadas positivamente. O tipo de fragmentação é específico para cada aminoácido, resultando em um **espectro de massa** particular. Os diferentes fragmentos resultantes são, a seguir, acelerados dentro do filtro de massa. No caso do GCMS, o filtro é de

quatro barras polarizadas (quadripolar) e uma câmara elétrica substitui o campo magnético do IRMS sendo, a seguir, os íons identificados por um detector único. As oscilações do potencial elétrico das barras polarizadas alteram as trajetórias de cada íon, que podem ser programadas para que somente um determinado espectro de íons m/z atinja o detector. A varredura de toda uma gama de diferentes íons é obtida em fração de segundos, graças à informatização das barras quadripolares. Para medida do enriquecimento plasmático de <sup>13</sup>C-leucina, por exemplo, utiliza-se o derivativo *n*-propil/*n*-acetil. A leucina natural produz íon medido m/z 128, e a leucina enriquecida, m/z 129. Esta técnica também é conhecida como Monitorização Seletiva de Íon, SIM. A relação da superfície obtida no detector dos íons 129/128 é diretamente proporcional à relação <sup>13</sup>C-Leu/<sup>12</sup>C-Leu dentro da amostra.

### COMBUSTÃO, GC-C-IRMS

Por meio desta técnica, são acoplados, em série, cromatografia gasosa (CG), forno de combustão e, por fim, espectrometria de massa. Desta maneira, amostras biológicas, separadas por meio de CG, são oxidadas a CO<sub>2</sub>, em um forno de combustão, a 800°C, e, em seguida, a relação <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub> é analisada em IRMS. Este método tem sido utilizado para glucose<sup>(1)</sup> e leucina<sup>(2)</sup>. Ela combina a capacidade do GCMS de separar/extrair uma substância, de uma mistura complexa, na ordem de nano- a pico-moles, alta precisão do IRMS para determinação do enriquecimento isotópico<sup>(3)</sup> de <sup>13</sup>C, na ordem de 0,1 a 0,7 %; nesta situação, o coeficiente de regressão entre delta <sup>13</sup>C por 1000 e a concentração de <sup>13</sup>C-glutamina é de 0.998 (y=64x - 32.4).

### AVALIAÇÃO DA CINÉTICA PROTÉICA AO NÍVEL DO CORPO TOTAL

Em geral, esta avaliação é realizada por meio da infusão de aminoácidos marcados com <sup>15</sup>N ou <sup>13</sup>C. A seguir, são apresentados, resumidamente, os métodos comumente utilizados para tal fim.

### O MÉTODO ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DA <sup>15</sup>N-GLICINA

Historicamente, este foi o primeiro método utilizado para estimar a dinâmica das proteínas com

o auxílio de isótopos estáveis<sup>(4)</sup>. A validação deste método exige que as seguintes hipóteses sejam, "a priori", estabelecidas:

- 1 - o "pool" metabólico de nitrogênio é único,
- 2 - a glicina penetra igualmente em todos compartimentos do organismo onde existe nitrogênio,
- 3 - deve existir proporção constante entre o N da glicina e o dos outros aminoácidos em todo o organismo,
- 4 - a utilização, pelo organismo do <sup>15</sup>N é igual a do <sup>14</sup>N e,
- 5 - durante o período do experimento não deve existir reciclagem do nitrogênio marcado.

As maiores dificuldades de utilização deste método repousam no fato de que a glicina não é distribuída uniformemente no plasma<sup>(5)</sup> e nem é transportada de maneira igual por todas as células do organismo, como por exemplo, pelas hemácias<sup>(6)</sup>. Por fim, os resultados obtidos por este método deveriam ser semelhantes aos obtidos por meio de outros métodos, o que nem sempre acontece<sup>(7)</sup>. No entanto, e dentro de condições experimentais pré-definidas e constantes, com estabelecimento de casos e controles adequados, o método fornece importantes e indubitáveis informações sobre os diferentes estados fisiológicos, através de uma metodologia relativamente simples.

A <sup>15</sup>N-glicina pode ser administrada como dose única ou por infusão constante. Quando é administrada por infusão constante, durante 2 ou 3 dias, via venosa ou oral, existirá um equilíbrio entre a <sup>15</sup>N-glicina e o "pool" corpóreo de nitrogênio, Figura 1. Se a <sup>15</sup>N-glicina é administrada até que seja atingido o "plateau" de enriquecimento urinário (E), admite-se, então, que a fração da dose <sup>15</sup>N administrada é proporcional à fração do N urinário excretado sob a forma de uréia e/ou amônia, assim:

$$^{15}\text{Nu}/i = U/Q \text{ ou}$$

$$^{15}\text{Nu}/U = I/Q$$

O primeiro termo da equação representa a relação entre a uréia marcada e a não marcada, em equilíbrio metabólico; em outras palavras, o enriquecimento isotópico de <sup>15</sup>N na urina, representado por E. Portanto:

$$i / Q = (V \times \text{Nur} \times E) / (V \times \text{Nur})$$

$$E = i/Q, \text{ logo,}$$

$$Q = i/E, \text{ onde:}$$

E = enriquecimento isotópico de <sup>15</sup>N-uréia na urina, átomos % em excesso,

I = taxa de infusão de <sup>15</sup>N,

<sup>15</sup>Nu = teor de <sup>15</sup>N-uréia excretada na urina,

Nur = concentração de nitrogênio uréico no volume de urina considerado,

Q = taxa de renovação de nitrogênio corpóreo total, fluxo,

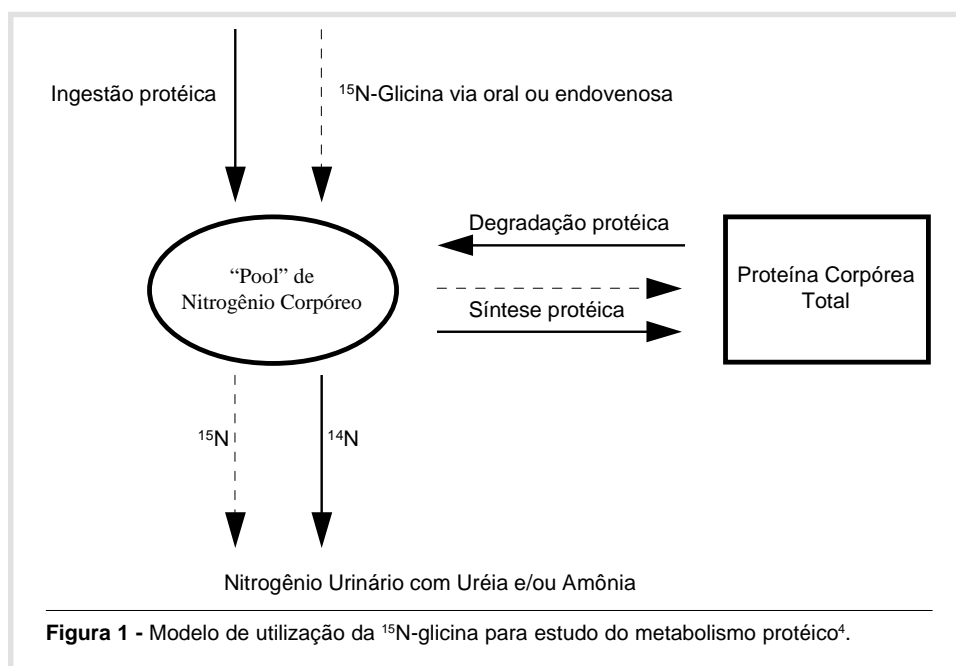
U = uréia urinária total, ou seja, uréia marcada, adicionada a uréia não marcada,

V = volume urinário.

Admitindo-se que o "pool" metabólico total de nitrogênio corpóreo, durante o estado de equilíbrio, seja constante, o balanço entre a quantidade de nitrogênio que entra no "pool" é igual ao que sai, ou seja:

$$I + B = Q = S + \text{Nu}, \text{ onde:}$$

B = total de nitrogênio, entrando no "pool", proveniente da degradação protéica total do organismo.



- I = ingestão alimentar de nitrogênio (proteína).  
 Nu = excreção de nitrogênio, sob forma de uréia urinária. Vide fator de correção, a seguir.  
 S = incorporação de nitrogênio em proteína corpórea.

O balanço entre síntese, S, e degradação protéica, B, pode ser calculado, ou seja:

$$\text{Balanço cinético} = S - B$$

Este método se apóia em técnicas analíticas, capazes de realizar determinações precisas de  $^{15}\text{N}$ , mesmo quando o nível de enriquecimento urinário é mínimo. Para tal, é necessário fazer coleta do volume urinário, não sendo necessário fazer coleta de sangue. O marcador isotópico é ingerido, via oral, ou infundido, via endovenosa. Este método pode ser utilizado em várias situações fisiopatológicas, em sujeitos de todas as idades, incluindo recém-nascido<sup>(8,9)</sup>. Considerando que o "pool" de uréia no organismo é grande, o método requer longo período para que o equilíbrio isotópico seja atingido, 48 a 72 horas, além de supor que o metabolismo protéico seja estável durante este período, o que nem sempre é possível de ser demonstrado.

Uma variante do método de infusão contínua é aquela da dose única, via oral, e a determinação do enriquecimento isotópico urinário da uréia, Eu, e da amônia, Ea, sendo o enriquecimento final a média harmônica<sup>(10)</sup> de Eu e Ea. Outras variantes do método incluem a ingestão de outras formas de  $^{15}\text{N}$ , ou seja, na forma de outros aminoácidos diferentes da glicina, ou na forma de proteínas uniformemente marcadas<sup>(11)</sup> com  $^{15}\text{N}$ .

O emprego de qualquer um destes métodos, obrigatoriamente, deve ser seguido pela correção do  $^{15}\text{N}$  retido ou perdido no organismo sob a forma de uréia plasmática. Esta correção é feita assim:

$$Fce = (Upf - Upi) \times \text{Vol}, e$$

$$\text{Excn} = \text{Nu} + Fce, \text{ onde}$$

Excn = excreção corrigida de nitrogênio e

Fce = fator de correção da excreção total de nitrogênio do organismo, mg de N uréico,

Nu = nitrogênio urinário total, durante o experimento,

Upi = concentração plasmática de uréia, no início do experimento, mg N uréico por litro de água plasmática,

Upf = concentração plasmática de uréia, no final do experimento, mg N uréico por litro de água plasmática,

Vol = estimativa da água total do organismo, em litros.

## O MÉTODO ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DA L- $^{13}\text{C}$ -LEUCINA

Este método teve grande impulso com o surgimento de técnicas em GCMS, mais precisas, que permitiram determinar o enriquecimento de produtos intermediários do metabolismo, em concentração de nmoles; é também conhecido como método dos "precursores" presentes em quantidades diminutas, no plasma. Desde que, por exemplo, a leucina é um aminoácido essencial, ela somente pode ser encontrada quando proveniente da dieta (I) ou liberada a partir da degradação protéica (B). De outro lado, a leucina é oxidada de maneira irreversível a  $\text{CO}_2$  (Ox) ou incorporada em proteína, síntese protéica (S), Figura 2. No estado de equilíbrio metabólico, a quantidade total de leucina, "pool" metabólico, também está em equilíbrio, ou seja, a quantidade de leucina que entra no plasma (taxa de aparecimento) é igual à que sai (taxa de desaparecimento), que pode ser representada, matematicamente, como:

$$\text{Ra} = \text{B} + \text{I} = \text{Rd} = \text{S} + \text{Ox}, \text{ onde}$$

Ra = taxa de aparecimento plasmático de leucina em condições de equilíbrio.

Rd = taxa de desaparecimento plasmático de leucina em condições de equilíbrio.

Quando é feita infusão constante de  $^{13}\text{C}$ -Leucina, o "plateau" de equilíbrio, no plasma, é atingido em 2 a 3 horas. Este fato implica que cada molécula de leucina marcada é diluída por uma quantidade constante de leucina natural e que passa a fazer parte do "pool" orgânico de leucina, conjuntamente. Neste momento, a razão entre a leucina marcada e a não marcada (enriquecimento expresso em MPE) é igual à razão do débito de perfusão do  $^{13}\text{C}$ -leucina, e à taxa de aparecimento endógeno de leucina (em  $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{h}$ ):

$$Q = \text{Ra} = i \times \text{Ei}/\text{EP} - i = \text{Ra} = i * [(\text{Ei}/\text{Ep}) - 1], \text{ onde}$$

Ei = enriquecimento isotópico do infusado e

Ep = enriquecimento plasmático durante o "plateau".

I = débito de perfusão em  $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{h}$ ; i deve ser subtraído do fluxo, pois o enriquecimento desejado entre 2 a 5 % não é desprezível.

Se I é conhecido, B pode ser facilmente estimado ( $B = \text{Ra} - \text{I}$ ). Quando o débito de excreção respiratório de  $^{13}\text{CO}_2$  é determinado, por exemplo, por meio de calorimetria indireta, e o enriquecimento

isotópico de  $^{13}\text{CO}_2$ , por IRMS, a oxidação, Ox, pode ser estimada. Por fim  $S = \text{Ra} - \text{Ox}$ . A seguir, e considerando-se que em média cada 100 g de proteína corpórea contém 8 g de leucina, pode-se estimar a cinética total, corpórea, de proteína.

Para que este método seja válido, as seguintes hipóteses devem ser consideradas:

- 1 - Não existe, no organismo, discriminação entre  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$ -leucina; por exemplo, a  $^{13}\text{C}$ -leucina se equilibra, prontamente, e de maneira uniforme, entre o plasma e o interior da hemácia, com a  $^{12}\text{C}$ -leucina<sup>(6)</sup>.
- 2 - A substância marcada não é reciclada durante a realização do experimento, ou seja, a única fonte de substância marcada é a sua própria infusão. Estima-se que a taxa de reciclagem de leucina, após 24 horas de infusão contínua, é de 30%, o que, significativamente, altera o cálculo de fluxo cinético<sup>(12)</sup>.
- 3 - O enriquecimento plasmático é semelhante ao enriquecimento intracelular. No caso da leucina, prova-se que o seu enriquecimento plasmático é superior ao intracelular. Esta é a razão pela qual se recomenda o uso do  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -ceto isocaproato, que é o metabólito transaminado intracelular da leucina<sup>(13)</sup>. O enriquecimento intracelular e plasmático de  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -ceto isocaproato é semelhante ao enriquecimento intracelular de  $^{13}\text{C}$ -leucina-t-RNA, no tecido muscular, o que resulta em estimativa apropriada da síntese protéica<sup>(14,15)</sup>. De maneira análoga, o enriquecimento de  $^{13}\text{C}$ -leucina na ApoB-proteína também é semelhante ao enriquecimento plasmá-

tico de  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -ceto isocaproato<sup>(16)</sup>. A relação entre o enriquecimento plasmático de  $^{13}\text{C}$ -leucina e  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -ceto isocaproato varia em torno de 0,8. Esta diferença é devida à fração de leucina intracelular, liberada pela degradação protéica, mas que não aparece na circulação geral.

- 4 - O produto da oxidação do aminoácido em estudo é, na sua quase totalidade, recuperado no ar expelido. Em geral, a recuperação<sup>(17)</sup> do  $\text{CO}_2$ , após a infusão de bicarbonato, varia em torno de 74 a 81%, dependendo do estado de jejum ou não.
- 5 - A ingestão do aminoácido em estudo é conhecida e controlada. Este fato é importante no caso de administração oral de leucina. Nesta situação, parte da leucina absorvida é retida na região esplâncnica, o que altera o cálculo da degradação protéica corpórea total<sup>(18)</sup>.
- 6 - A utilização de qualquer aminoácido essencial deve fornecer resultados comparáveis e semelhantes. Apesar de a leucina ser oxidada predominantemente na musculatura periférica e a fenilalanina, no fígado, ambos os aminoácidos permitem o cálculo da cinética protéica total, sendo os resultados comparáveis<sup>(19)</sup>.
- 7 - Os aminoácidos essenciais são utilizados, unicamente, pelo organismo, para síntese protéica ou de degradados via oxidação. Nos experimentos, em animais, após a inibição da síntese protéica, o fluxo de leucina é praticamente abolido, validando, desta maneira, a utilização do método<sup>(20)</sup>. Assim

sendo, este método nem sempre é possível de ser utilizado para se obter a estimativa precisa do metabolismo de aminoácidos não essenciais.

8 - O método, que emprega a leucina como aminoácido marcado, vem sendo utilizado, e, portanto, testado há mais de 20 anos. Um de seus pontos mais fortes repousa no fato de se apoiar em cálculos matemáticos consistentes e ser estocástico, baseado em compartimentos corpóreos bem definidos e constantes<sup>(21)</sup>.

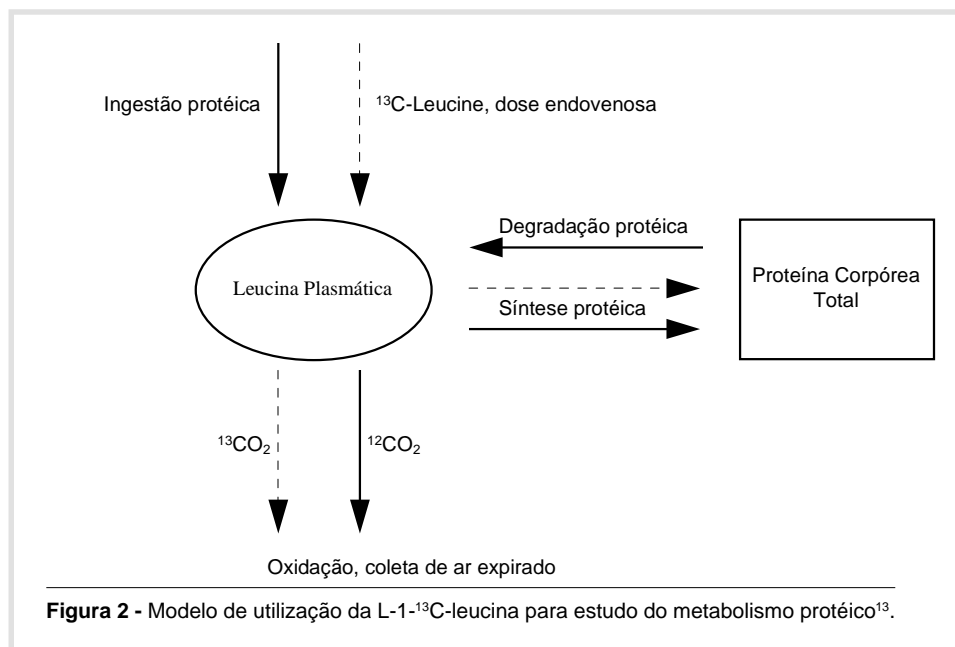


Figura 2 - Modelo de utilização da L-1- $^{13}\text{C}$ -leucina para estudo do metabolismo protéico<sup>13</sup>.

9 - Um dos pontos mais delicados do método repousa no fato de que o genoma humano codifica vários milhares de proteínas, e o método somente permite uma visão global média do metabolismo protéico. Desta maneira, proteína com taxas de renovação extremamente rápidas são analisadas juntamente com outras de renovação muito lentas. Este problema somente é contornado com a utilização de proteínas específicas e a determinação do enriquecimento de um aminoácido, em particular, como por exemplo<sup>(22)</sup>, o da <sup>13</sup>C-leucina na proteína ApoB-100.

### O MÉTODO ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DA HIDROXILAÇÃO DA FENILALANINA EM TIROSINA

Um inconveniente da utilização do método da leucina é a necessidade de coleta do gás expirado para determinação da oxidação protéica. De maneira diferente, o primeiro passo da oxidação da fenilalanina é a produção de tirosina de uma maneira irreversível. Ou seja, as duas vias significativas e importantes de desaparecimento de fenilalanina do plasma são a incorporação, síntese, em proteína, ou a transformação em tirosina, sendo posteriormente oxidada. Desta maneira, a infusão de <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-fenilalanina produzirá <sup>2</sup>H<sub>4</sub>-tirosina, desde que os deutérios estejam localizados no núcleo de benzeno<sup>(23)</sup>. Tanto a fenilalanina como a tirosina são medidas por meio de GCMS. Portanto, a oxidação de fenilalanina é calculada pelo enriquecimento e pela taxa de aparecimento plasmático de tirosina. A fração não oxidada, ou hidroxilada, de fenilalanina é atribuída à síntese protéica<sup>(24,25)</sup>. Recomenda-se, quando a taxa de conversão de fenilalanina para tirosina for estimada por meio da infusão de L-[ring-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]fenilalanina, sejam utilizados os fatores de correção<sup>(25)</sup> de 2,2 e 1,8, respectivamente, para estado de jejum e alimentado. Assim sendo, temos que:

$$Q_{pt} = Q_t \times (E_t / E_p) \times Q_p / (ip + Q_p), \text{ ou} \\ Q_t \times Q_p \times E_t / [E_p / (ip + Q_p)], \text{ onde}$$

$E_p$  = enriquecimento plasmático de 1-<sup>13</sup>C-fenilalanina, derivado da infusão de 1-<sup>13</sup>C-fenilalanina;

$E_t$  = enriquecimento plasmático de 1-<sup>13</sup>C-tirosina, derivado da infusão de 1-<sup>13</sup>C-fenilalanina;

$ip$  = taxa de infusão de 1-<sup>13</sup>C-fenilalanina;

$Q_p$  = fluxo de fenilalanina estimado pela infusão de 1-<sup>13</sup>C-fenilalanina;

$Q_{pt}$  = taxa de conversão de fenilalanina em tirosina;

$Q_t$  = fluxo de tirosina estimado pela infusão de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>-tirosina.

O interesse em conhecer-se o requerimento básico diário dos aminoácidos reveste-se de particular importância em saúde pública, cuja abrangência, muito ampla, estende-se desde a elaboração de protocolos de alimentação, em determinados grupos populacionais, até as definições das necessidades básicas do paciente crítico.

Dessa maneira, uma extensiva série de estudos, utilizando a administração desses isótopos estáveis em protocolos, com tempo de duração de 8 horas ou menos, tiveram a finalidade de incrementar a compreensão do metabolismo de vários aminoácidos, em particular, dos aminoácidos aromáticos, em indivíduos adultos, jovens e saudáveis, baseados na ingestão desses aminoácidos, em sua cinética plasmática e em sua perda oxidativa, obrigatória e irreversível.

Embora as tentativas de estabelecer-se um novo patamar de requerimento diário, em aminoácidos aromáticos, apresentasse um horizonte bem definido, críticas foram tecidas a esses estudos, no tocante à duração de 8 horas. Dessa maneira, todas as estimativas de 24 horas envolviam, necessariamente, extrapolações das perdas oxidativas irreversíveis, medidas num curto espaço de tempo.

Sendo assim, utilizando a leucina como aminoácido experimental, em três investigações independentes,<sup>(26, 27, 28)</sup> que versaram sobre a administração contínua de isótopos estáveis, durante 24 horas, mostraram que a taxa de oxidação diária da leucina pode ser extrapolada, com muita precisão, a partir de estudos de curta duração. No entanto, esta realidade parece ser bem diferente, em se tratando dos aminoácidos aromáticos. Uma das razões dessa diferença, pode estar ligada ao fato de a fenilalanina ser metabolizada, predominantemente, no hepatócito, enquanto a leucina apresenta um metabolismo mais variado, sendo oxidada no tecido muscular periférico, cujo fluxo plasmático estaria em equilíbrio com o "pool" total da leucina, no organismo.

Para melhor compreender esses achados e verificar se as conclusões traçadas poderiam ser aplicadas a outros aminoácidos, especialmente aos aromáticos, conduziram-se outros estudos sobre a administração contínua de isótopos estáveis, desta vez, utilizando-se a [1-<sup>13</sup>C]fenilalanina e a [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]tirosina, durante 24 horas e em vários níveis de ingestão de aminoácidos aro-

máticos<sup>(29, 30, 31)</sup>. A partir de medidas plasmáticas isotópicas, em intervalos de 30 minutos, durante 24 horas, tornou-se possível quantificar, com muito mais precisão, a quantidade necessária de ingestão diária de aminoácidos aromáticos, para balancear ou equilibrar suas perdas, através da oxidação. Atribui-se a esta técnica o nome de “balanço isotópico”.

Os interessantes achados desses estudos refletem a sensibilidade do metabolismo dos aminoácidos aromáticos em relação aos diferentes níveis de ingestão de fenilalanina, particularmente, no seu fluxo plasmático (Phe-flux) e nas suas taxas de oxidação e hidroxilação.

No entanto, o balanço diário de fenilalanina mostrou-se positivo nos indivíduos que consumiram 99.8 mg de fenilalanina.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, “neutro” ou em equilíbrio no nível de ingestão de 36.5 mg de fenilalanina.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> e, finalmente, negativo naqueles que consumiram 21.9 mg de fenilalanina.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>.

Finalmente, as características dessas investigações, sobretudo os diversos balanços diários de fenilalanina obtidos, levam a concluir que o presente modelo experimental, utilizando a administração de isótopos orais (<sup>13</sup>C-Phe e <sup>2</sup>H<sub>2</sub>-Tyr), subestimam a real taxa de perda irreversível (oxidação) da fenilalanina. Todas as determinações, até o presente momento, baseam-se na concentração plasmática da [<sup>13</sup>C]phe, que é, provavelmente, igual ou maior do que sua concentração isotópica no “pool” intracelular, submetido à hidroxilação e posterior oxidação. Pode ser que parte da fenilalanina, administrada na forma isotópica, seja

convertida (Phe-OH) em tirosina, através de uma reação paralela, conhecida como “canalização”, onde parte da fenilalanina administrada estaria distribuída no processo de conversão da fenilalanina em tirosina e, subsequente, oxidação; na utilização imediata, para fins de síntese protéica, e, também, na diluição da tirosina formada com a tirosina proveniente do catabolismo protéico, conforme Figura 3. Realmente, existem evidências, na literatura, de que esse tipo de reação ocorra numa infinidade de transformações bioquímicas e, de maneira ainda mais importante, na regulação metabólica e na utilização de nutrientes.

Em conclusão, parece que o emprego oral da [<sup>13</sup>C]tyr poderia tornar-se mais promissor, na tentativa de elucidar-se, ainda mais e com maior precisão, o metabolismo dos aminoácidos aromáticos.

Por outro lado e considerando o fato de a fenilalanina ser oxidada unicamente no fígado, pode-se, também, efetuar o cálculo da síntese e degradação protéica, muscular, quando associada à determinação do fluxo artério-venoso<sup>(32)</sup>. Assim, o balanço (Bm) entre síntese (Sm) e degradação (Bm), no segmento muscular considerado, é igual a:

$$Bm = Sm - Bm = F \times (Phea - Phev), \text{ onde}$$

F = fluxo de sangue no segmento considerado,

Phea = concentração arterial de fenilalanina e

Phev = concentração venosa de fenilalanina.

De outra maneira, a quantidade total de fenilalanina, que “atravessa” a massa muscular, é o re-

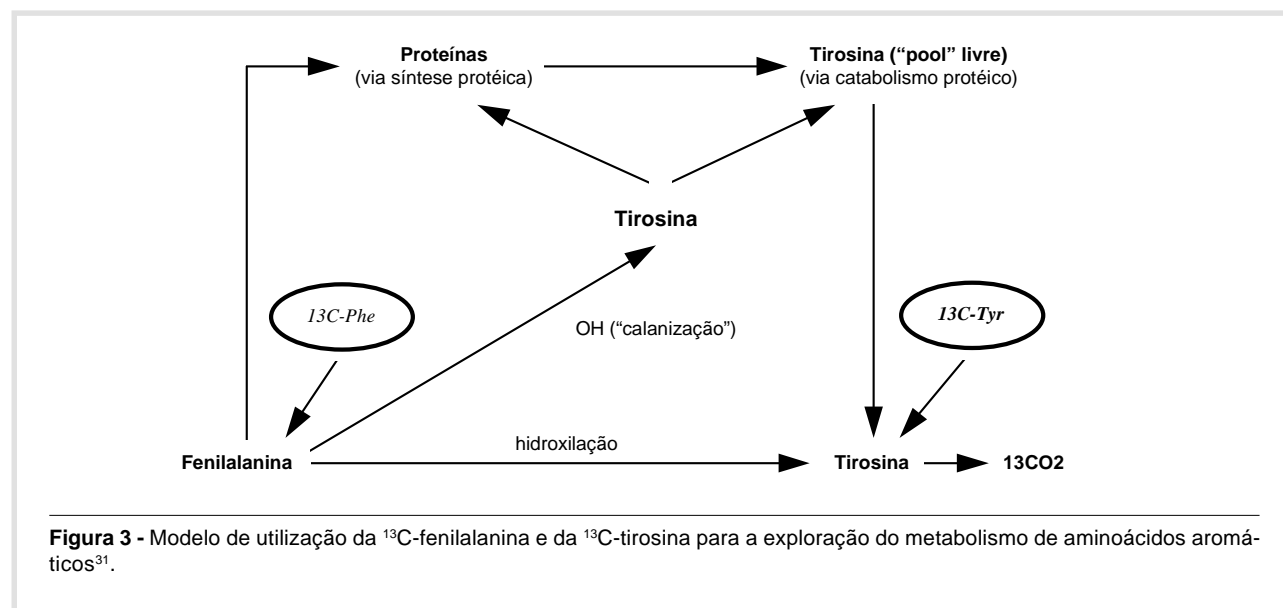


Figura 3 - Modelo de utilização da <sup>13</sup>C-fenilalanina e da <sup>13</sup>C-tirosina para a exploração do metabolismo de aminoácidos aromáticos<sup>31</sup>.



sultado da quantidade não extraída do total arterial, corrigida pela fenilalanina liberada via degradação muscular, Bm, ou seja:

$$ER = (Phea^* - Phev^*)/Phea^* = 1 - Phev^*/Phea^*,$$

$$1-ER = Phev^*/Phea^*$$

$$PheaTotal = Phea \times F$$

$$PhevTotal = Phev \times F = (1-ER) \times (Bm + PheaTotal)$$

**ou**

$$= Phev^*/Phea^* \times (Bm + Phea \times F) \text{ e}$$

$$Bm = (Phev \times F)/(Phev^*/Phea^*) - (Phea \times F)$$

$$= (Phev \times F \times Phea^*/Phev^*) - (Phea \times F), \text{ onde}$$

ER = taxa relativa de desaparecimento de fenilalanina intramuscular em relação à fenilalanina arterial total,

1-ER = taxa relativa de aparecimento de fenilalanina venosa em relação à fenilalanina arterial total,

Phea = concentração de fenilalanina arterial,

Phea\* = enriquecimento arterial de fenilalanina e

PheaTotal = fenilalanina arterial total,

Phev = concentração de fenilalanina venosa,

Phev\* = enriquecimento venoso de fenilalanina.

### AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS

O método utilizado pela leucina é aplicável aos aminoácidos não essenciais. Por exemplo, durante 4 horas de infusão intravenosa de L-[2-<sup>15</sup>N] ou de L-[1-<sup>13</sup>C]glutamina, a taxa de aparecimento de glutamina é determinada, utilizando-se os mesmos princípios de diluição isotópica: após período de equilíbrio, o enriquecimento de glutamina é dado em relação à glutamina não marcada. Nesta situação, também é necessário considerar a síntese *de novo*. Considerando-se que as proteínas corpóreas contêm, em média, 1,55 moles de glutamina (incluindo o glutamato) para cada mol de leucina, e conhecendo-se a cinética da L-[1-<sup>13</sup>C]leucina, temos que<sup>(19)</sup>:

$$BGLN = BLEU \times 1,55 \text{ e}$$

$$DGLN = RaGLN - BGLN, \text{ onde}$$

BGLN = degradação protéica, estimada a partir da infusão de L-[1-<sup>13</sup>C]glutamina;

BLEU = degradação protéica, estimada a partir da infusão de L-[1-<sup>13</sup>C]leucina;

DGLN = síntese de novo da glutamina;

RaGLN = taxa de aparecimento da glutamina.

### DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS

#### PERFUSÃO CONSTANTE DO MARCADOR

##### *Proteínas circulantes*

A perfusão intravenosa e constante de <sup>15</sup>N-glicina, durante 72 horas, tem sido utilizada para determinação da taxa de síntese de albumina<sup>(33)</sup>. A albumina, extraída do soro e hidrolisada e enriquecida por <sup>15</sup>N-glicina, é medida via GCMS. Este enriquecimento é linear com o tempo, permitindo-se que, em um determinado momento, seja calculada a taxa fracionária de síntese protéica. O "pool" total de glicina pode ser estimado pelo "pool" plasmático, mais o "pool" intra-hepático de glicina. Este último é estimado pela determinação do enriquecimento urinário de <sup>15</sup>N-hipurato, metabólito intra-hepático da glicina, excretado na urina<sup>(33)</sup>, ou seja:

$$FSR = (EALBt2 - EALBt1)/[EHIP \times (t2 - t1)], \text{ onde:}$$

EALBt1 = enriquecimento da albumina, na forma <sup>15</sup>N-glicina, no início do experimento, tempo t1;

EALBt2 = enriquecimento da albumina, na forma <sup>15</sup>N-glicina, ao final do experimento, tempo t2;

EHIP = enriquecimento urinário de hipurato;

FSR = taxa fracionária de síntese protéica;

Método semelhante a este, após a infusão de <sup>13</sup>C leucina, é utilizado para determinar a FSR de apolipoproteínas<sup>(34)</sup>.

##### *Outras proteínas*

A perfusão contínua de L-[1-<sup>13</sup>C] leucina, acoplada à coleta de biópsia muscular, também permite a determinação de FSR. O FSR das proteínas miofibrilares é em torno de 1,3%, nas 24h. Desta maneira, a utilização de IR-C-MS permite a determinação do enriquecimento de L-[1-<sup>13</sup>C] leucina, em fragmento de biópsia, mg, e após a infusão de leucina marcada por períodos relativamente curtos, de 3 a 5 horas<sup>(35)</sup>.

Método semelhante permite a estimativa de FSR, em fragmentos de mucosa intestinal<sup>(36)</sup>, fígado<sup>(36)</sup>, pele<sup>(37)</sup>, etc.

## O MÉTODO DA “SUPERDOSE” OU “FLOODING”

Este método se baseia na injeção única, intravenosa, de superdose de aminoácido marcado, equivalente a 50 mg/kg de L-[1-<sup>13</sup>C]leucina, enriquecida a 40%. Teoricamente, esta grande quantidade de leucina se equilibra rapidamente com o "pool" total de leucina, intra e extracelular, incluindo o leucina-t-RNA. A seguir, obtém-se amostras de plasma para determinação do enriquecimento de L-[1-<sup>13</sup>C]ceto isocaproato e, cerca de duas horas após, obtém-se biópsia muscular<sup>(38)</sup> ou amostra de albumina plasmática<sup>(39)</sup>, sendo possível o cálculo da FSR, ou seja:

FSR = (Emt2 - Emt1)/A, onde:

A = área sob a curva de enriquecimento plasmático de L-[1-<sup>13</sup>C]KIC;

Emt1 = enriquecimento de L-[1-<sup>13</sup>C]leucina, medido na proteína considerada no início do experimento, tempo t1;

Emt2 = enriquecimento de L-[1-<sup>13</sup>C]leucina, medido na proteína considerada ao final do experimento, tempo t2.

Apesar de este método ser considerado de fácil aplicação e rápido, ele apresenta dois inconvenientes principais. O primeiro é a necessidade de biópsia e o segundo é que tal dose de leucina é potente estimulador da secreção de insulina, que pode alterar os resultados do experimento; desta maneira, os resultados obtidos por meio deste método têm sido contestados<sup>(40)</sup>.

## USO CLÍNICO DA ESPECTROMETRIA DE MASSA

Uma das aplicações clínicas mais importantes relaciona-se com análises orgânicas<sup>(41)</sup>, como, por exemplo, na determinação do peso molecular, a partir de quantidades diminutas do analisado (analyte), sempre que for necessário elucidar a estrutura química do composto alvo. Como previamente descrito, ao se combinar a cromatografia gasosa e/ou combustão à espectrometria, este método tornou-se importante na detecção de concentrações traçadoras de compostos orgânicos no sangue, urina, gás expirado e outros fluidos biológicos. Este método pode fornecer informações, relacionando o diagnóstico de doenças e contribuindo com o seu entendimento patofisiológico.

As aplicações clínicas incluem o diagnóstico de doenças que alteram o metabolismo de ácidos

orgânicos, como, por exemplo, os aminoácidos, e, simultaneamente, análises multicomportamentais se mostraram úteis na identificação de vias metabólicas anormais (estudo do metabolismo protéico, de hidratos de carbonos e de lipídeos). Assim, são passíveis de serem estudados os ácidos orgânicos, como, por exemplo, os ácidos metilmalônico (aciduria metilmalônica) e fenilacético (fenilcetonúria); ácidos graxos de cadeia curta; compostos orgânicos voláteis, como as cetonas e aldeídos; polióis; aminas; prostaglandinas; esteróides; ácidos biliares; constituintes dos ácidos nucleicos e aminoácidos.

Nos pacientes urêmicos, por meio de espectrometria de massa, é possível demonstrar, no sangue, por exemplo, a presença de ácidos orgânicos, como o ácido eritrônico, ácido 2-deoxieritropentônico, ácido tartárico, ácido glicérico, ácido 2-metilglicérico, ácido vanílico, conjugados de ácidos orgânicos: fenilacetatoglucâmico, furoilglicina, compostos voláteis, fenóis, polióis e esteróides.

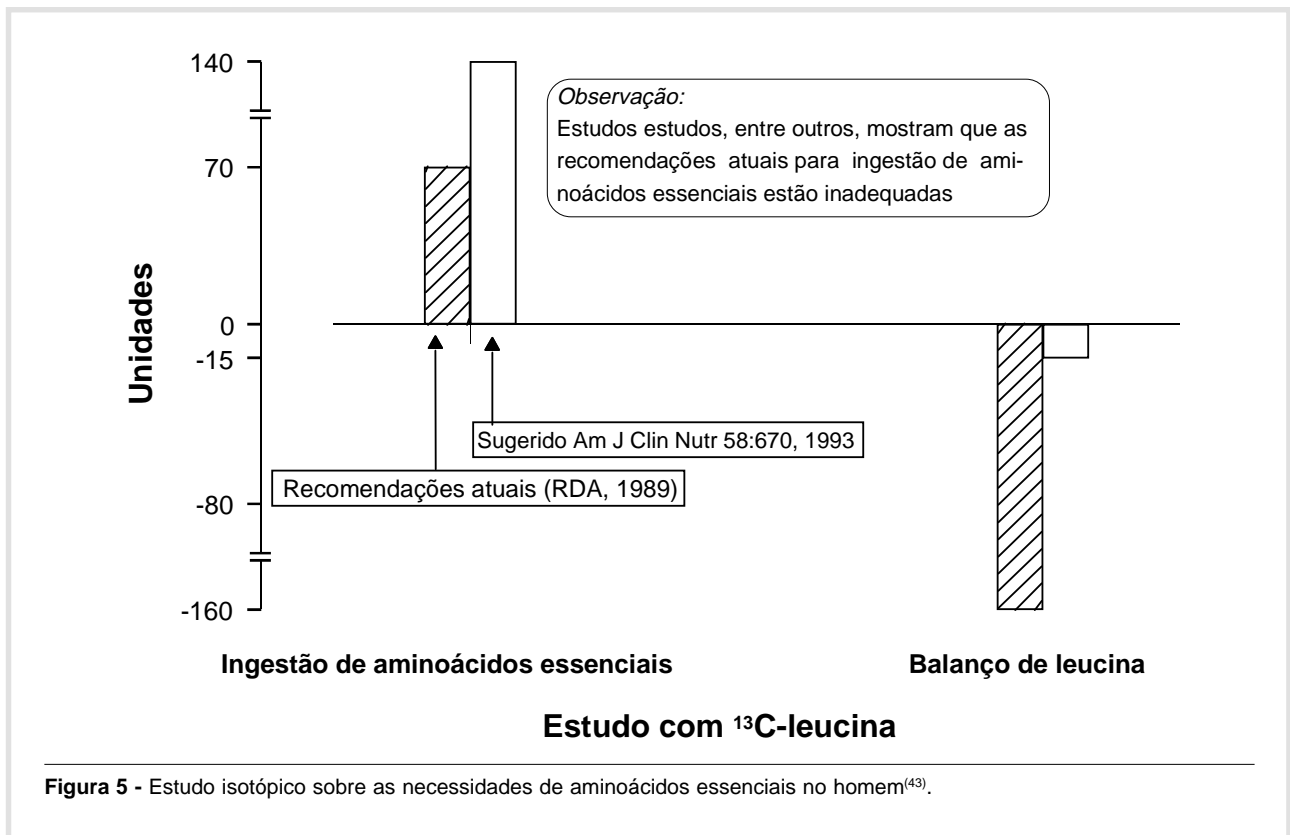
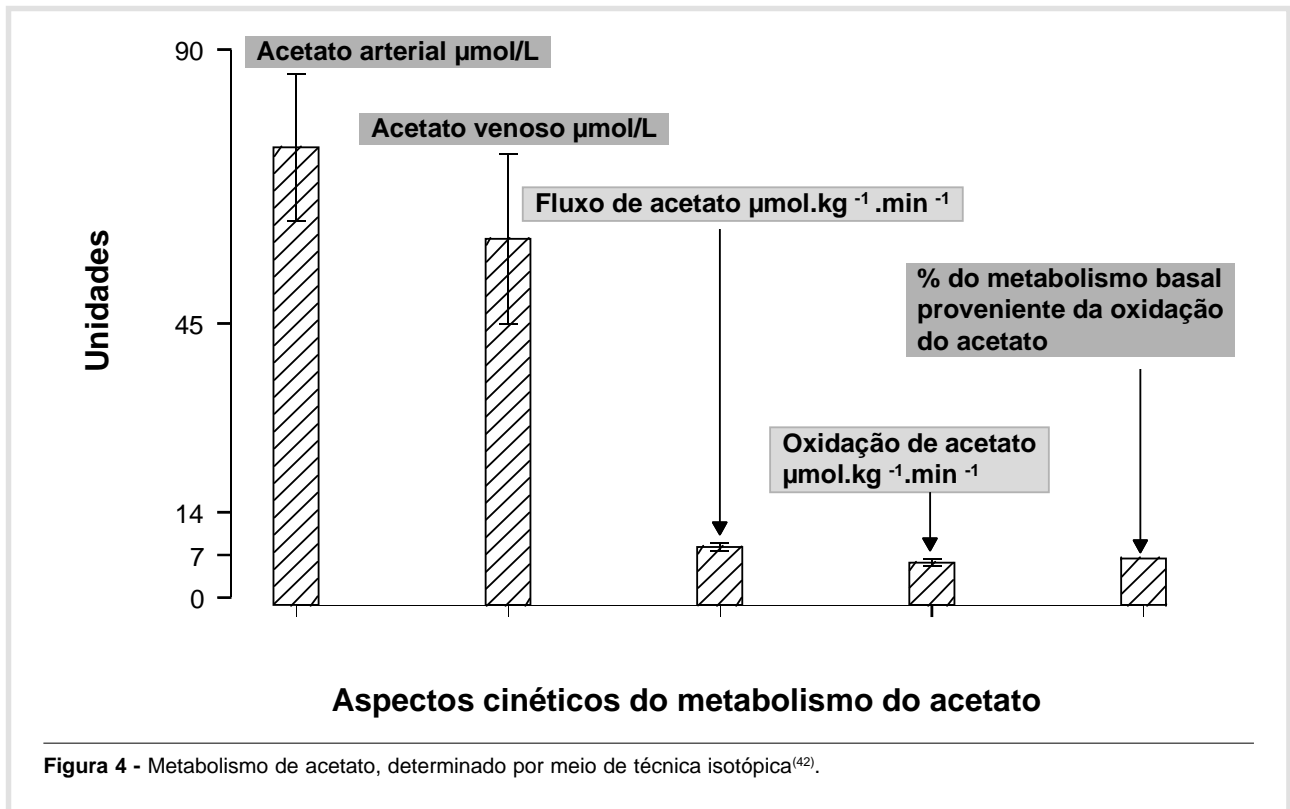
Nos pacientes diabéticos, por exemplo, no soro e/ou urina, ácidos orgânicos, ácido succínico, ácido adípico, ácido láctico, ácido 2-cetobutírico, ácido 3-hidroxyoctanedicarboxílico, compostos voláteis, 1-etanol, 1-octanol, demetiletilpirazina.

Na doença de Parkinson, por exemplo, estudo do metabolismo do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, da 1,2,3,4-tetrahidroisoquinoline, da L-Dopa e das catecolaminas.

Nas doenças hepáticas, por exemplo, metabolismo dos ácidos biliares e do colesterol, nos erros inatos do metabolismo, além do estudo de possíveis toxinas relacionadas com a encefalopatia hepática.

Uma das aplicações clínicas mais recentes dos isótopos estáveis está diretamente relacionada com a medida de tempo de trânsito intestinal e no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*.

Outros exemplos do uso de isótopos estáveis, em pesquisa médica e biológica, estão representados nas Figuras 4 a 7. A Figura 4 apresenta os resultados da cinética de acetado<sup>(42)</sup>, realizada com isótopo estável do acetato. O estudo sobre as necessidades<sup>(43)</sup> de aminoácidos essenciais é apresentado na Figura 5. Um outro aspecto destes estudos é a possibilidade do estudo do efeito de um aminoácido específico, como é o caso da glutamina<sup>(44)</sup>, representado na Figura 6. Por fim, a Figura 7, apresenta um estudo em que se verificou a interação hormonal<sup>(45)</sup> e o metabolismo do aminoácido essencial, leucina.



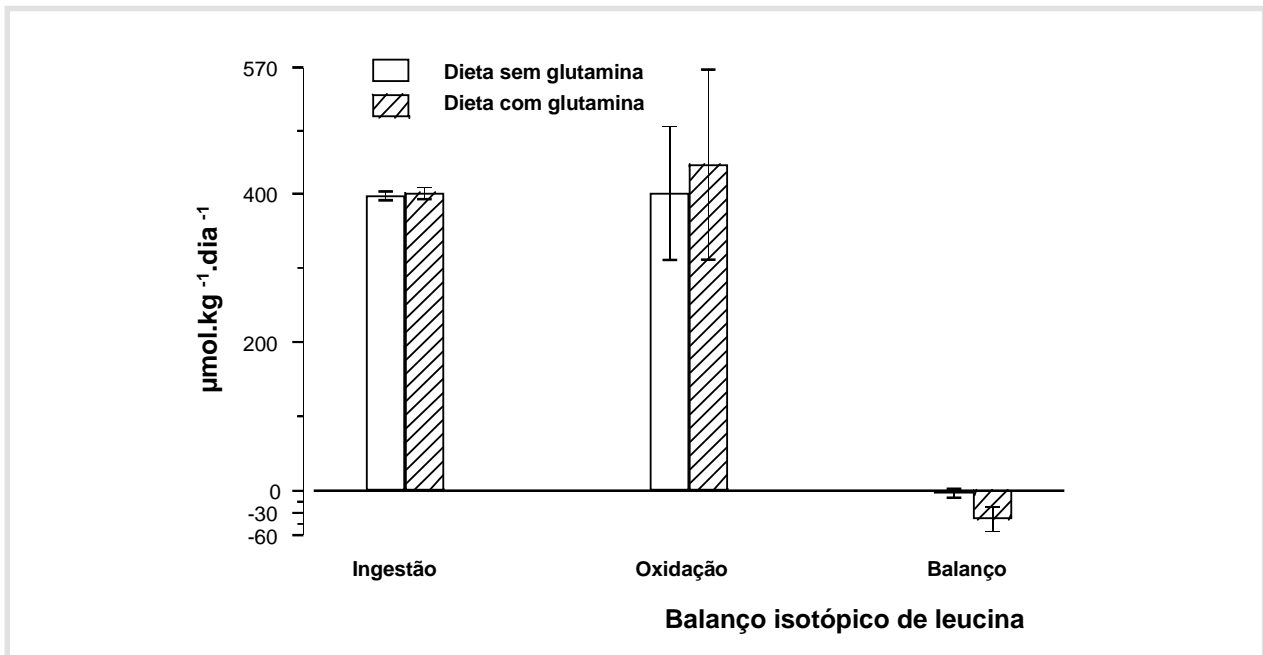


Figura 6 - Efeito da suplementação de glutamina sobre o balanço cinético de leucina<sup>(44)</sup>.

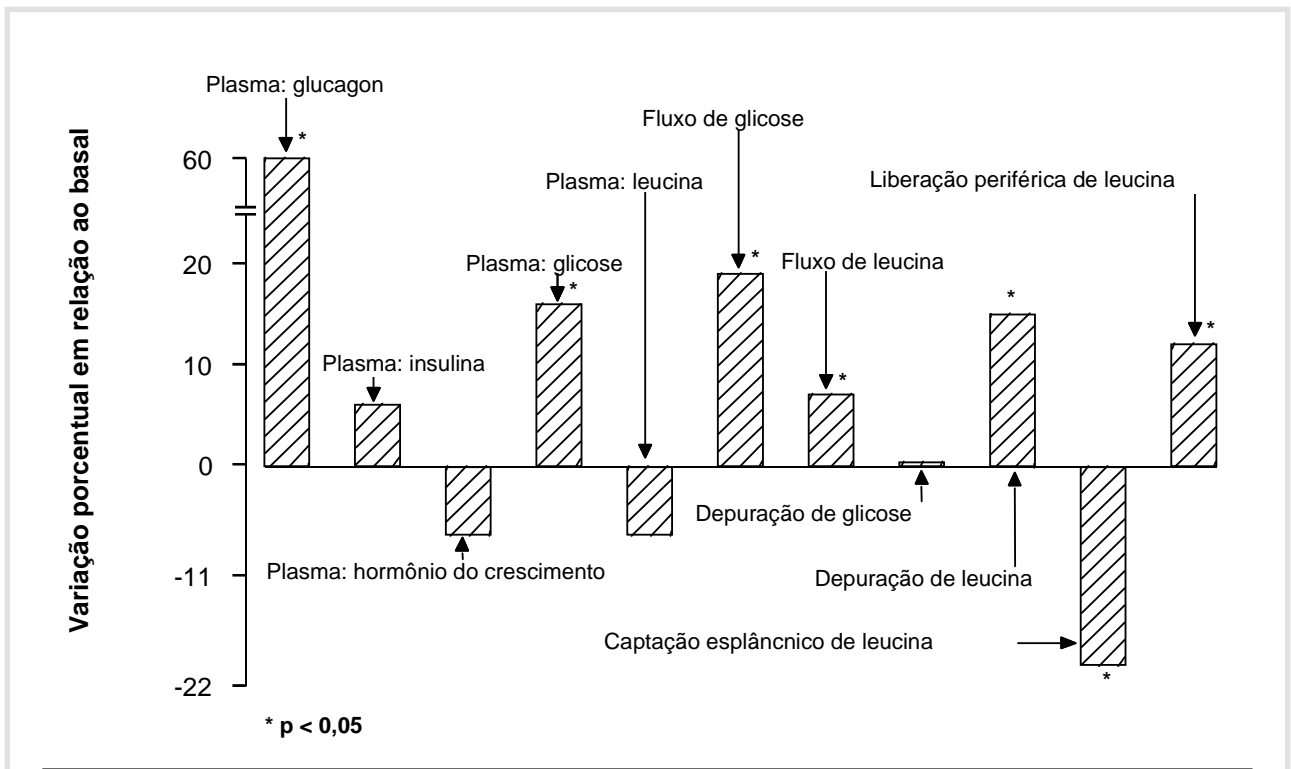


Figura 7 - Hiperglucagonemia e metabolismo da leucina<sup>(45)</sup>.

## CONCLUSÃO

A utilização de isótopos estáveis para determinação de aspectos do metabolismo protéico é prática, inócua ao homem, podendo ser obtida a partir de amostras diminutas de plasma ou da proteína em estudo. O surgimento de novas técnicas, acopladas à espectrometria de massa, como a combustão, permite também que a sensibilidade do método seja ainda superior. Um outro aspecto a ressaltar é que não só o metabolismo

protéico é factível de ser avaliado, mas também o de lipídios e o de hidratos de carbono<sup>(22,46)</sup>. Considerando que o método é inócuo, não existe qualquer contra-indicação de ser realizado, por exemplo, em crianças ou gestante, representando progresso nesta área do conhecimento. Até então, a utilização de marcadores era um fator proibitivo no estudo de detalhes metabólicos, *in vivo*, por exemplo, em gestantes, pois estes eram radioativos, o que inviabilizava o método de estudo.

MARCHINI JS et al. Stable isotope spectrometry to study human protein and amino acid metabolism. **Medicina, Ribeirão Preto**, 30: 494-507, oct./dec. 1997.

**ABSTRACT:** The aim of this work is to describe the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and its clinical application. GC/MS is becoming a tool for clinical diagnosis and research procedure interested in the molecular pathogenesis of diseases. The method is highly sensitive analytical that can obtain precise information on molecule weight and structure from a trace amount of sample. It has been applied to a wide range of fields from physics and chemistry, to life sciences such as biochemistry, pharmacy and medicine.

**UNITERMS:** Spectrum Analysis, Mass. Metabolism. Nutrition. Amino Acids. Proteins.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - TISSOT S et al. Use of a new gas chromatograph isotope mass spectrometer to trace exogenous <sup>13</sup>C-labelled glucose at a very low level of enrichment in man. **Diabetologia** 33: 449-456, 1990.
- 2 - YARASHESKI KE et al. Measurement of muscle protein fractional synthetic rate by capillary gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry. **Biol Mass Spectrom** 21: 486-490, 1992.
- 3 - DARMAUN D. Méthods d'études du métabolisme des acides aminés *in vivo* chez l'homme: approches cinétiques par les isotopes stables. **Nutr Clin Métabol** 8: 81-91, 1994.
- 4 - WATERLOW JC; GOLDEN MH & GARLICK PJ. Protein turnover in man measured with <sup>15</sup>N: comparison of end products and dose regimes. **Am J Physiol** 235: E165-E174, 1978.
- 5 - MATTHEWS DE et al. Glycine nitrogen metabolism in man. **Metabolism** 30: 886-893, 1981.
- 6 - DARMAUN D. Amino acid exchange between plasma and erythrocytes *in vivo* in humans. **J Appl Physiol** 67: 2725-2729, 1989.
- 7 - FERN EB; GARLICK PJ & WATERLOW JC. Apparent compartmentation of body nitrogen in one human subject: its consequences in measuring the rate of whole body protein synthesis with <sup>15</sup>N. **Clin Sci** 68: 271-282, 1985.
- 8 - MICHELI JL; SCHUTZL Y & JÉQUIER E. Protein metabolism of the newborn. In: POLIN RA & FOX WW, eds. **Fetal and neonatal physiology**. WB Saunders, Philadelphia, p. 462-476, 1992.
- 9 - MARCHINI JS et al. Whole-body protein metabolism turnover in men on a high or low calorie rice and bean brazilian diet. **Nutr Res** 16: 435-441, 1996.
- 10 - FERN EB et al. The excretion of isotope in urea and ammonia for estimating protein turnover in man with [<sup>15</sup>N]glycine. **Clin Sci** 61: 217-228, 1981.
- 11 - STACK T et al. <sup>15</sup>N-Tracer studies of protein metabolism in low birth weight preterm infants: a comparison of <sup>15</sup>N-glycine and <sup>15</sup>N-yeast protein hydrolysate and of human milk-and formula-fed babies. **Pediatr Res** 25: 167-172, 1989.
- 12 - SCHWENK WF et al. Recycling of an amino acid label with prolonged isotope infusion: implication for kinetic studies. **Am J Physiol** 248: E482-E487, 1985.
- 13 - MATTHEWS DE et al. Relationship of plasma leucine and alpha-ketoisocaproate during a L-[1-<sup>13</sup>C] leucine infusion in man: a method for measuring human intracellular leucine tracer enrichment. **Metabolism** 31: 1105-1112, 1982.
- 14 - HOBBER FF et al. Plasma reciprocal pool specific activity predicts that of intracellular free leucine for protein synthesis. **Am J Physiol** 257: E385-E389, 1989.
- 15 - WATT PW et al. Isolation of aminoacyl tRNA and its labelling with stable isotope tracers used in studies of human tissue protein synthesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 5892-5897, 1991.

- 16 - PARHOFER KG et al. Determination of kinetic parameters of apolipoprotein B metabolism using amino acids labeled with stable isotopes. **J Lipid Res** **32**: 1311-1318, 1991.
- 17 - HOERR RA et al. Recovery of  $^{13}\text{C}$  in breath from  $\text{Na}^{13}\text{CO}_3$  infused by gut and vein: effect of feeding. **Am J Physiol** **257**: E426-E438, 1989.
- 18 - MATTHEWS DE; MARANO MA & CAMPBELL RG. Splanchnic bed utilization of leucine and phenylalanine in humans. **Am J Physiol** **264**: E109-E118, 1993.
- 19 - DARMAUN D; MATTHEWS DE & BIER DM. Physiological hypercortisolemia increases proteolysis, glutamine, and alanine production. **Am J Physiol** **255**: E366-E373, 1988.
- 20 - SCHWENK WF; RUBANYI E & HAYMOND MW. The effect of a protein synthetic inhibitor on *in vivo* estimates of protein synthesis in dogs. **Am J Physiol** **252**: E595-E598, 1987.
- 21 - COBELLI C et al. Compartmental model of leucine kinetics in humans. **Am J Physiol** **261**: E539-E550, 1991.
- 22 - MAUGEAIS C et al. A minimal model using stable isotopes to study the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. **Diabete Metab (Paris)** **22**: 57-63, 1996.
- 23 - CLARKE JTR & BIER DM. The conversion of phenylalanine to tyrosine in man. Direct measurement by continuous intravenous tracer infusions of L-[1- $^{13}\text{C}$ ] tyrosine in the postabsorptive state. **Metabolism** **31**: 999-1005, 1982.
- 24 - THOMPSON GN et al. Rapid measurement of whole body and forearm protein turnover using a [ $^2\text{H}_5$ ] phenylalanine model. **Am J Physiol** **256**: E631-E639, 1989.
- 25 - MARCHINI JS et al. Phenylalanine conversion to tyrosine: comparative determination with L-[ring- $^2\text{H}_5$ ]phenylalanine and L-[1- $^{13}\text{C}$ ]phenylalanine as tracers in man. **Metabolism** **42**: 1316-1322, 1993.
- 26 - EL-KHOURY AE et al. Validation of the tracer balance concept with reference to leucine: 24-h intravenous tracer studies with L-[1- $^{13}\text{C}$ ]leucine and [ $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ ]urea. **Am J Clin Nutr** **59**: 1000-1011, 1994.
- 27 - EL-KHOURY AE et al. The 24h pattern and rate of leucine oxidation, with particular reference to tracer estimates of leucine requirements in healthy adults. **Am J Clin Nutr** **59**: 1012-1020, 1994.
- 28 - EL-KHOURY AE et al. The 24-h kinetics of leucine oxidation in healthy adults receiving a generous leucine intake via three discrete meals. **Am J Clin Nutr** **62**: 579-590, 1996.
- 29 - SÁNCHEZ M et al. Phenylalanine and tyrosine kinetics in young men throughout a continuous 24-h period, at a low phenylalanine intake. **Am J Clin Nutr** **61**: 555-570, 1996.
- 30 - SÁNCHEZ M et al. Twenty-four-hour intravenous and oral tracer studies with L-[1- $^{13}\text{C}$ ]phenylalanine and L-[3,3- $^2\text{H}_2$ ]tyrosine at a tyrosine-free, generous phenylalanine intake in adults. **Am J Clin Nutr** **63**: 532-545, 1996.
- 31 - BASILE-FILHO A et al. Continuous Twenty-four-hour L-[1- $^{13}\text{C}$ ]phenylalanine and L-[3,3- $^2\text{H}_2$ ]tyrosine oral tracer studies at an "intermediate" phenylalanine intake, to estimate requirements in adults. **Am J Clin Nutr** **65**: 473-488, 1997.
- 32 - BARET EJ et al. An isotopic method for measurement of muscle protein synthesis and degradation *in vivo*. **Biochem J** **245**: 223-228, 1987.
- 33 - YUDKOFF M et al. Albumin synthesis in premature infants: determination of turnover with [ $^{15}\text{N}$ ] glycine. **Pediatr Res** **21**: 49-53, 1987.
- 34 - SCHAUDER P et al. Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -glycine and 1- $^{13}\text{C}$ -leucine in apolipoprotein B of VLDL and LDL *in vivo* in healthy probands. **Beitr Infusionther** **25**: 423-429, 1990.
- 35 - RENNIE MJ et al. Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: the effects of feeding and fasting. **Clin Sci** **63**: 519-523, 1982.
- 36 - SOUTHORN BG; KELLY JM & MCBRIDE BW. Phenylalanine flooding dose procedure is effective in measuring intestinal and liver protein synthesis in sheep. **J Nutr** **122**: 2398-2407, 1992.
- 37 - WYKES LJ et al. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. **J Nutr** **126**: 1481-1488, 1996.
- 38 - GARLICK PJ et al. Measurement of the rate of protein synthesis in muscle of postabsorptive young men by injection of a "flooding dose" of [1- $^{13}\text{C}$ ] leucine. **Clin Sci** **77**: 329-336, 1989.
- 39 - BADETTI C et al. Détermination de la vitesse de synthèse de l'albumine par une surcharge de L-1- $^{13}\text{C}$ -valine chez l'homme: étude préliminaire chez des sujets brûlés en phase de récupération (Résumé). **Nutr Clin Métab** **4**: 39, 1990. Suppl.
- 40 - SMITH K et al. Flooding with L-[1- $^{13}\text{C}$ ] leucine stimulates human muscle protein incorporation of continuously infused L-[1- $^{13}\text{C}$ ] valine. **Am J Physiol** **262**: E372-E376, 1992.
- 41 - NIWA T. Clinical mass spectrometry. **Clin Chim Acta** **241/242**: 1-414, 1995.
- 42 - POUTEAU E et al. Kinetic aspects of acetate metabolism in healthy humans using [1- $^{13}\text{C}$ ] acetate. **Am J Physiol** **271**: E58-E64, 1996.
- 43 - MARCHINI JS et al. Requirements for indispensable amino acids in adult humans: long-term amino acid kinetic study with support for the adequacy of the Massachusetts Institute of Technology amino acid requirement pattern. **Am J Clin Nutr** **58**: 670-683, 1993.
- 44 - HIRAMATSU T et al. Source and amount of dietary nonspecific nitrogen in relation to whole-body-leucine, phenylalanine, and tyrosine kinetics in young men. **Am J Clin Nutr** **59**: 1347-1355, 1994.
- 45 - MARCHINI JS et al. Hyperglucagonemia and the immediate fate of dietary leucine: a kinetic study in humans. **Metabolism**, 1997. In Press.
- 46 - WATERLOW JC; GARLICK PJ & MILLWARD DJ. **Protein turnover in mammalian tissue and in the whole body**. North-Holland Publishing, Amsterdam, 1978.

Recebido para publicação em 27/05/97

Aprovado para publicação em 07/10/97