

NATUREZA ENZIMÁTICA DO EFEITO DA UREIA

EM CONDIÇÕES NUTRICIONAIS ESPECIAIS

LUCY BRENNER RAMOS

TESE apresentada para prova de

LIVRE DOCÊNCIA

Departamento de Bioquímica

Instituto Central de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

O tema do presente trabalho iniciou com os estudos do professor TUISKON DICK (1950) quando participou da equipe do professor William C. Rose e, posteriormente, foi desenvolvido em sua tese de livre docência, apresentada na Faculdade de Medicina de Porto Alegre, UFRGS (1957). Vimos participar de seus trabalhos quando ingressamos no Curso de Pós-Graduação de Bioquímica, no Departamento de Bioquímica, do Instituto Central de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e sob sua orientação, conseguimos prosseguir dando continuidade aos seus estudos.

A ele nossos agradecimentos.

Ao João, a meus filhos Laura Maria, Maria Leonor, Maria de Fátima, Antonio Luís, João Paulo, Carlos Augusto e Elizabeth, e aos meus pais, com atenção especial à minha mãe, dedico esta tese.

A B R E V I A T U R A S

CPS - carbamila fosfato sintetase I

OTC - L-ornitina carbamila transferase

AS - L-arginina succinato liase

L-arg - L-arginina

GOT - L-glutamato oxaloacetato transaminase (amino transferase)

GPT - L-glutamato piruvato transaminase (aminotransferase).

GDH - L-glutamato desidrogenase

GSH - glutatião reduzido

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

ATP - adenosina trifosfato.

ns - não significativo

I N D I C E

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	10
1. Animais	10
2. Dietas	12
3. Reagentes	15
4. Preparação da L-ornitina-carbamil transferase EC-2.1.3.3 Carbamila fosfato: L-ornitina-carbamil transferase de fígado de boi	16
4.1. Isolamento e purificação	16
4.2. Ensaio da atividade	18
5. Preparação do material enzimático	20
5.1. Homogeneizado de fígado	20
5.2. Homogeneizado de rim	22
5.3. Homogeneizado de mucosa gástrica	22
5.4. Homogeneizado de mucosa intestinal	22
6. Condições gerais da determinação da atividade das enzimas	23
7. Metodologia para a determinação da atividade das enzimas	26
7.1. Carbamila-fosfato sintetase I EC-2.7.2.2a - ATP: carbamato fosfotransferase	26
7.2. L-ornitina-carbamil transferase EC-2.1.3.3 carbamila fosfato: L-ornitina-carbamil transferase ..	26
7.3. Argininasuccinato sintetase EC-6.3.4.5 L-citrulina: L-aspartato ligase (AMP)	27
7.4. Argininasuccinase EC-4.3.2.1 L-argininasuccinato: arginina, liase	27

7.5. L-arginase EC-3.5.3.1 L-arginina amidina hidrolase	28
7.6. L-glutamato desidrogenase EC-1.4.1.3 L-glutamato NAD ⁺ (P) oxidoreductase	28
7.7. Glutamato: oxaloacetato transaminase EC-2.6.1.10 L-glutamato oxalatoacetato amino transferase	28
7.8. Glutamato: piruvato transaminase EC-2.6.1.12 L-glutamato piruvato amino transferase	29
7.9. Urease EC-3.5.1.5 Ureia amido hidrolase	29
8. Métodos de identificação e dosagem dos produtos formados nas reações enzimáticas	29
8.1. Dosagem de citrulina	30
8.2. Dosagem de ureia	30
8.3. Dosagem de amônia	31
8.4. Dosagem de piruvato	31
8.5. Dosagem de NAD ⁺	32
III. RESULTADOS	33
IV. DISCUSSÃO	61
V. SUMÁRIO	66
VI. BIBLIOGRAFIA	67

I. INTRODUÇÃO

AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS E AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS

A essencialidade de compostos nitrogenados na nutrição animal foi verificada em princípios do século XIX, quando uma dieta livre de proteínas foi oferecida a cães, levando-os em pouco tempo à morte.

O desenvolvimento das técnicas de hidrólise de proteínas e separação dos seus constituintes, os aminoácidos, contribuiu para o esclarecimento desta essencialidade. Uma proteína tem seu valor nutritivo na qualidade e quantidade de seus componentes.

Rose & Scull (1938) usando dietas com misturas de aminoácidos purificados, em vez de proteínas, definiram o caráter de essencialidade: "um componente alimentar essencial é aquele que não pode ser sintetizado pelo organismo animal, a partir de material ordinariamente à disposição, em velocidade e extensão satisfatórias às exigências de crescimento e manutenção normais".

Para o rato em crescimento, dez aminoácidos são considerados componentes alimentares essenciais (Dick, 1957).

Aminoácidos essenciais	Aminoácidos não essenciais
lisina	glicina
triptofano	alanina
histidina	serina
fenilalanina	ácido aspártico
leucina	ácido glutâmico
isoleucina	prolina
treonina	hidroxiprolina
metionina	tirosina
valina	cistina
arginina	citrulina

Em publicações sucessivas, Rose et alii (1955a,b,c) verificaram as necessidades de aminoácidos essenciais para o homem, que não diferiram das do rato albino.

SÍNTESE DE AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS: FONTE DE AMÔNIA

Conhecendo os aminoácidos essenciais nos seus níveis mínimos que mantem um crescimento máximo em ratos, Rose et alii (1949) investigaram quais as fontes de nitrogênio para a síntese dos aminoácidos não essenciais.

Os resultados vieram demonstrar que vários componentes nitrogenados podiam ser utilizados para acelerar o crescimento do rato, quando a dieta só contém os aminoácidos essenciais em seus níveis mínimos. A adição de sais de amônia, ácido glutâmico, glicina ou mesmo a ureia foram eficazes no ganho de peso dos animais, sendo a ureia que proporcionou o menor ganho de peso.

Paralelamente, Lardy & Feldolt (1959) verificaram que a suplementação com citrato de amônia a uma dieta de uma mistura de aminoácidos essenciais, em seus níveis mínimos, deu a mesma resposta ao crescimento de ratos que uma suplementação de uma mistura de aminoácidos não essenciais contendo as mesmas quantidades de nitrogênio.

Mais tarde, foram publicados vários trabalhos com ratos em crescimento, recém desmamados, alimentando-os com dietas contendo os aminoácidos essenciais em seus níveis mínimos suplementados com vários compostos nitrogenados como fontes de nitrogênio para síntese de aminoácidos não essenciais. Os resultados destas experiências demonstraram que sais de amônia (acetato, citrato monoácido, cloreto, lactato) glutamato monossódio, glicina e ureia foram bastante eficientes para liberar grupos alfa-amínicos utilizáveis para a biossíntese dos aminoácidos não essenciais.

Rose et alii (1955c), em seus estudos sobre necessidades de aminoácidos essenciais, alimentaram homens com quantidades exageradas de glicina ou ureia em combinação com misturas de aminoácidos essenciais. A glicina e a ureia foram fornecidas como fonte de nitrogênio para síntese de aminoácidos não essenciais.

Rose & Dekker (1956) demonstraram que o nitrogênio urêico foi utilizado para síntese de aminoácidos não essenciais por ratos em crescimento quando nenhuma outra fonte de nitrogênio protéico era disponível, numa dieta que continha somente os dez aminoácidos essenciais em seus níveis mínimos.

Dick (1957), em suas experiências com ratos albinos em crescimento, evidenciou o aproveitamento de nitrogênio não protéico na forma de citrato de amônia ou ácido aspártico refletido em ganho de peso dos animais.

Snyderman et alii (1962), em seus estudos para determinar o fator nitrogenado limitante, utilizaram a proteína do leite em crianças. Entre outras conclusões, Snyderman demonstrou que a suplementação de nitrogênio não específico contribuiu para a síntese de proteína, alimentando crianças com dieta de baixo conteúdo protéico - em que a ureia com 15_N e cloreto de amônia 15_N foram oferecidos. A incorporação substancial de nitrogênio marcado em proteína plasmática e hemoglobina resultou da alimentação de fonte de nitrogênio não específico.

Nos estudos de Korslund (1974), com alimentação protéica suplementada com ureia, confirmaram-se os resultados de Snyderman: um produto nitrogenado não específico foi eficaz, fornecendo um valor nutritivo aparente de um alimento intacto como fonte de

proteína para indivíduos em crescimento. Tal fato leva-nos a considerar que fontes de baixo custo de nitrogênio não específico possam ser utilizadas na suplementação de proteínas nas dietas dos homens, incluindo crianças. Portanto, há dados positivos quanto à utilização de nitrogênio não específico, quando numa mistura adequada de aminoácidos essenciais, cada um destes em seus níveis mínimos, são fornecidos para manter o crescimento em ratos e o balanço nitrogenado no homem.

De acordo com Gallina et alii (1971), para que o nitrogênio urêmico possa ser aproveitado para síntese de aminoácidos não essenciais, são necessárias as seguintes etapas:

1. hidrólise da ureia a amônia por bactéria intestinal;
2. incorporação de amônia a alfa-cetoglutarato para originar glutamato;
3. disponibilidade de alfa-cetoácidos de aminoácidos não essenciais;
4. transaminação destes alfa-cetoácidos por glutamato.

O efeito da restrição protéica sobre a incorporação de amônia ^{15}N em proteínas foi estudada por Richards et alii (1967) em indivíduos saudáveis e urêmicos. Eles fazem referências a que a amônia é a forma em que o homem incorpora o nitrogênio urêmico derivado da ação microbiana da flora intestinal.

Giordano (1963), em suas experiências com indivíduos urêmicos, evidenciou que a ureia é potencialmente utilizada para síntese de proteína e que nestes indivíduos o nitrogênio urêmico acumulado pode ser usado para processos anabólicos, uma vez que lhes seja fornecida uma dieta adequada em calorias e um suprimento mínimo de aminoácidos essenciais.

Giordano et alii (1966) citam que a incorporação de ^{15}N em aminoácidos plasmáticos por pacientes urêmicos não foi impedida quando a flora intestinal foi suprimida com paramomicina.

Giovanetti & Maggiore (1964) prepararam uma dieta deficiente em nitrogênio e a suplementaram com mistura de aminoácidos essenciais ou proteína de ovos, conseguindo alguns resultados posi-

tivos: diminuição da azotemia e o balanço nitrogenado alcançou o equilíbrio em alguns casos.

U.F.P.A.
BIBLIOTECA SETORIAL DE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS

SÍNTESE DE AMINOÁCIDOS A PARTIR DE ALFA-CETO ANALOGOS

Lardy & Feldott (1950) testaram a eficácia do alfa-ceto ácido correspondente à treonina, substituindo esta em dietas contendo citrato de amônia. Sugeriram que é o esqueleto peculiar dos átomos de carbono de cada uma destas moléculas que constitui o componente essencial nutritivo.

Rose (1937, 1938) já havia feito especulação a este respeito.

Gallina & Dominguez (1971) observaram que, quando a ingestão de carboidratos foi reduzida na dieta, o nitrogênio urêmico não corrigiu o balanço nitrogenado.

Richards et alii (1967) sugeriram que pacientes urêmicos poderiam utilizar o nitrogênio da ureia endógena para a síntese de proteínas se lhes fosse oferecida uma dieta com os alfa-ceto análogos dos aminoácidos essenciais.

Rudman (1971) demonstrou que o homem pode converter o ácido alfa-ceto isovalérico e o ácido fenilpirúvico nos correspondentes aminoácidos essenciais, valina e fenilalanina.

Giordano et alii (1972) usaram cloreto de amônia ^{15}N na dieta de pacientes sadios e pacientes urêmicos, para testar a capacidade do ácido alfa-ceto isovalérico e o ácido fenilpirúvico substituírem os aminoácidos correspondentes. Suas conclusões são que, tanto os indivíduos sadios como os indivíduos urêmicos, são capazes de sintetizar valina e fenilalanina de seus ceto-análogos.

Chow & Walser (1974) substituindo, numa dieta de uma mistura de aminoácidos, L-metionina, L-fenilalanina, L-leucina, L-isoleucina e L-valina por seus alfa-ceto análogos, demonstraram que estes podem, com vários graus de eficiência, substituir os aminoácidos correspondentes. A bactéria intestinal não pareceu ter um impor

tante papel neste processo.

COMO SE EXPLICA QUE A UREIA, UM CATABÓLITO NORMAL
DO METABOLISMO NITROGENADO, POSSA SER FONTE DE NI
TROGÊNIO PARA SÍNTESE DE PROTEÍNAS?

Todo o nitrogênio da dieta é uma fonte potencial de amônia, um metabólito normal altamente tóxico para as células do corpo e da microflora intestinal. Os animais livram-se da amônia convertendo-a em produtos não tóxicos ou facilitando a difusão no meio ambiente. Os mamíferos possuem um sistema enzimático especializado que transforma a amônia em ureia, produto catabólico natural dos animais ureotélicos. (Visek, 1974).

Os ruminantes são particularmente bem adaptados a converter o nitrogênio urêmico da dieta em amônia, que pode então ser utilizada em seu organismo para síntese de aminoácidos não essenciais, ou para síntese tanto de aminoácidos essenciais como de aminoácidos não essenciais, pelas bactérias do rumen. Entretanto, é importante o fato de que os animais monogástricos possam utilizar este nitrogênio na síntese de aminoácidos não essenciais para suas proteínas. A utilização é maior quando a dieta protéica é mínima e quando a necessidade é máxima, como nos animais em crescimento. Esta evidência tem sido testada nos animais jovens por medida de crescimento e, com menor eficiência, em animais adultos, pelo balanço nitrogenado.

Várias espécies animais, como ratos [Bloch (1946); Rose e Dekker (1956)], gatos [Kornberg (1952)], coelhos [King (1971)], carneiros [(Carver (1974))], aves [(Featherston et alii (1962))], touros [Harmeyer et alii (1971)] e até o homem, [Rose (1949, 1955c); Walser et alii (1959); Giordano (1963, 1966); Gallina (1971), Korslund (1974)] entre outras, tem sido estudadas, ou por crescimento, ou por balanço nitrogenado, a respeito da sua capacidade para incorporar nitrogênio não protéico em suas proteínas teciduais. Os resultados são muito divergentes.

Chao et alii (1953) mostraram que ureia marcada com ^{14}C ,

quando injetada em ratos adultos normais, é decomposta, e cerca de 40% de $^{14}\text{CO}_2$ aparece nos gases respiratórios em 24 horas. O rato eviscerado decompõe a uréia comparativamente com menor velocidade.

Menyhárd (1971), em suas observações clínicas, verificou que o nível de ureia sanguínea segue uma curva de tempo típica de saturação em pacientes urêmicos. Baseado nestas observações, fez experiências onde notou um efeito regulador da concentração da uréia sobre a velocidade de produção de ureia, por fatias de fígado de ratos.

Eggum et alii (1973) afirmam que a eficiência da alimentação de animais monogástricos com nitrogênio não protéico depende muito da composição de aminoácidos da proteína da dieta. Daí os resultados divergentes obtidos por alguns pesquisadores. O nitrogênio não protéico, diz ele, poderá ser preferido para síntese de proteína mesmo quando o nitrogênio protéico estiver disponível na dieta, pois o aproveitamento de um ou de outro vai depender da capacidade de formação de grupos alfa-amínicos.

Alguns pesquisadores têm investigado o efeito da alimentação com ureia, em animais ruminantes, sobre as atividades das enzimas do ciclo da ureia [Chalupa et alii (1970), Prior et alii (1970), Salem et alii (1973)]. Harmeyer et alii (1971) interessaram-se sobre o metabolismo da flora microbiana e do tecido do animal hospedeiro alimentado com ureia, verificando a composição de aminoácidos no plasma sanguíneo e composição de aminoácidos das proteínas microbianas.

O efeito da alimentação com ureia sobre os sistemas enzimáticos responsáveis pela desintoxicação da amônia não foi investigado nos animais monogástricos. Apesar dos estudos de Schimke (1962a,b, 1963) terem revelado alguns dos mecanismos que poderiam fundamentar as adaptações a várias cargas de nitrogênio protéico, a importância do problema da toxidez da amônia permanece. Há necessidade de maiores esclarecimentos sobre a regulação da síntese da ureia.

O principal caminho da síntese da ureia de nitrogênio alfa-amínico no fígado de mamífero envolve a formação inicial de glutamato no citoplasma, por reações de transaminação entre vários aminoácidos e alfa-cetoglutarato. O glutamato é transportado por um

sistema carregador específico na matriz mitocondrial, onde ele é de saminado por reação com glutamato desidrogenase. As enzimas carbamila fosfato sintetase I e ornitina transcarbamilase estão localizadas na matriz mitocondrial, enquanto que as outras enzimas do ciclo da ureia são enzimas citoplásmicas. A síntese de citrulina é realizada na mitocondria.

Sabe-se que a velocidade total de síntese de ureia em fígado de rato aumenta em resposta a uma dieta rica em proteínas. As atividades das enzimas do ciclo da ureia aumentam nestas condições [(Schimke, 1962a), Kravicka (1974)], como as atividades de algumas aminotransferases (Krebs, 1972).

Pouco se conhece a respeito dos fatores que controlam a síntese da ureia [Schimke (1964), Buttery (1971), Tatibana (1972), Krebs (1972, Krebs et alii (1973), Mc Givan et alii (1973)]

Neste trabalho propomo-nos:

1) A investigar as mudanças que ocorrem na atividade das enzimas do ciclo da ureia e das enzimas relacionadas com o metabolismo de grupos amínicos, como as aminotransferases, glutamato piruvato aminotransferase e glutamato oxaloacetato aminotransferase, e a glutamato desidrogenase, quando adicionamos ureia a uma dieta com proteína e a uma dieta sem proteína em animais monogástricos, utilizando ratos Wistar machos em nossas experiências. Uma vez que a necessidade da proteína para o crescimento é mais crítica do que aquela para a manutenção, pareceu-nos mais indicado investigar o efeito da suplementação de nitrogênio não protéico à dieta para os animais em crescimento.

2) Tentar responder a algumas perguntas como:

a) A ureia exógena teria algum efeito sobre a síntese da ureia endógena? Este efeito seria uma repressão, com conseqüente poupança de grupos alfa-amínicos para síntese de aminoácidos não essenciais?

- b) A ureia exógena induziria uma urease tecidual? Os estudos sobre a existência de uma urease na mucosa gástrica são controversos [Luck (1924), Lind et alii (1964), Maramba (1966), Aoyagi et alii (1966a,b), Evans et alii (1966), Delluva et alii (1968), Höller (1971)].
- c) Existe outro sistema enzimático específico para o metabolismo da ureia? Muitos pesquisadores falam em reciclagem do nitrogênio urêmico no homem [Richards (1972), Rosenver (1975)].
- d) A ureia teria um efeito direto ou intermediário sobre o metabolismo nitrogenado?

Para responder a estas perguntas e assim esclarecer a natureza do fenômeno, nos propomos a executar os seguintes passos experimentais:

1) Usando dieta normoprotéica e dietas hipoprotéica e livre de proteínas, suplementadas com ureia, utilizando ureia em concentração isonitrogênica à dieta normoprotéica, avaliar a adaptação enzimática com restrição total de proteína e com restrição parcial. A variação do nível das seguintes enzimas foi examinada:

- a) carbamila fosfato sintetase I EC-2.7.2.2a
- b) L-ornitina-carbamila transferase EC-2.1.3.3
- c) L-arginina succinato sintetase EC-6.3.4.5
- d) L-arginina succinato liase EC-4.3.2.1
- e) L-arginase EC-3.5.3.1
- f) L-glutamato desidrogenase EC-1.4.1.3
- g) L-glutamato: oxaloacetato aminotransferase EC-2.6.1.10
- h) L-glutamato: piruvato aminotransferase EC-2.6.1.12
- i) urease EC-3.5.1.5

2) Usando dieta normoprotéica e normoprotéica suplementada com ureia, avaliar o efeito direto da ureia sobre os níveis destas enzimas.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram usados em todas as experiências ratos brancos, machos, Wistar, procedentes do Biotério do Instituto Central de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com a idade de 30-35 dias. Os animais foram desmamados no período normal (24 dias da data do nascimento) e mantidos numa dieta para ratos^(*), ad libitum, até serem selecionados, de maneira que os grupos experimentais pesassem de 60-70 g, quando foi iniciado o tratamento com a dieta purificada. Eles foram guardados em gaiolas individuais, numa sala com luz intermitente, com períodos de iluminação de 12h (6h-18h), temperatura de 22°C e umidade relativa de 50-60%.

As gaiolas de telas de arame possuíam o fundo com espaços entre os fios de arame de modo a permitirem que as fezes caíssem numa bandeja, para impedir a coprofagia.

O alimento foi colocado em tijelas de cerâmica, próprias para pássaros, tendo na parte superior um orifício de mais ou menos 4 cm de diâmetro. Assim impedia-se que os animais dispersassem o alimento ou mesmo pudessem contaminá-lo com fezes ou urina.

(*) (Ração para ratos do Moinho Guarany S/A - com a seguinte composição (g) - protídios, 20%; lipídios, 4%; celulose, 5%; glicídios, 52%; cálcio, 12,%; fósforo, 0,8%; sal marinho, 0,5%; manganês, 0,005%; vitamina B₁, 1500 U.I. p/kg; vitamina B₂, 5000 µg p/kg; vitamina D₃, 1200 U.I. p/kg; vitamina A, 3000 U.I. p/kg; oligoelementos como ferro, zinco, iodo, cobre e cobalto sob forma de traços).

Entretanto, quando o alimento fosse dispersado, o fundo da tela de arame das gaiolas possibilitava correções apropriadas, recolhendo-o nas bandejas. A água era suprida por mamadeiras, presas externamente por arames, às quais já estavam habituados no Biotério de sua procedência.

Tanto o alimento quanto a água foram consumidos ad libitum.

O consumo de alimento e as diferenças de peso dos animais foram determinados diariamente, à mesma hora (8 horas).

Em um período normal de uma semana todos os animais receberam uma dieta purificada contendo 18% de caseína, em forma de farinha, para que se adaptassem ao isolamento e ao tipo de alimentação e assim fosse compensada qualquer falta de uniformidade na história dietética anterior ao período experimental.

Após este período, em que os animais alcançaram um peso corporal médio de 75-85 g, alguns foram sacrificados para a determinação da atividade das enzimas propostas, considerando-se neste momento o tempo zero de nossas experiências. Os ratos restantes foram divididos em três grupos; Grupo A, foi alimentado com a dieta purificada sem ureia; Grupo B, recebeu a dieta purificada suplementada com a ureia e o Grupo C, para efeito de controle, permaneceu com a dieta purificada usada no período de adaptação. A divisão em grupos foi feita ao acaso.

Após sete dias, metade dos animais de cada grupo foi sacrificada e depois de 14 dias do tempo zero, a outra metade foi também sacrificada.

Os animais foram sacrificados à mesma hora em cada manhã, de maneira que as variações possíveis devido ao ritmo circadiano fossem diminuídas.

2. DIETAS

A maioria dos trabalhos sobre metabolismo em ratos é omissa ou há uma discrepância quanto às necessidades de alguns nutrientes componentes das dietas, Greenfield, H. et alii (1971). Um estudo sobre necessidades de vitaminas na dieta para ratos nos leva à mesma afirmação.

As dietas foram preparadas tendo como base a dieta purificada para rato de Santos e Warner (1968), modificada. [Rose (1956) Warner (1962)].

ESTUDO COMPARATIVO DAS MISTURAS DE VITAMINAS UTILIZADAS EM DIETAS PARA RATOS

VITAMINAS	mg/100g de dieta							
	Rose (1956)	Rosen (1959)	Harper (1959) Stucki (1962)	Klain (1962)	Wagner (1962)	Santos (1968)	Decken (1972)	Itoh (1974)
Tiamina - HCl	0,500	1,000	0,500	2,220	0,125	2,200	0,500	0,511
Riboflavina	1,000	1,000	0,500	2,220	-	2,200	0,500	0,511
Ácido nicotínico	0,500	4,000	2,500	10,000	1,500	9,900	2,250	2,499
Ácido p-amino benzóico	30,000	20,000	-	11,100	-	11,000	2,500	-
Pantotenato de cálcio	2,500	6,000	2,000	40,300	0,800	6,600	1,500	1,997
Piridoxina - HCl	0,500	1,000	0,250	2,220	0,120	2,200	0,500	0,246
Inositol	100,000	15,000	10,000	11,100	-	11,000	2,500	9,996
Ácido fólico	0,100	0,020	0,020	0,200	-	0,198	0,045	0,017
Cloreto de colina	200,00	200,000	150,000	166,500	75,000	165,000	37,500	150,000
Biotina	0,010	0,020	0,010	0,044	-	0,044	0,010	0,008
Cianocobalamina	-	-	0,002	0,003	0,5 *	0,003	0,675 *	1,7 *
Menadiona	0,200	-	0,050	5,000	0,010	4,950	1,120	0,051
Ácido ascórbico	-	-	5,000	100,000	-	-	22,500	4,470
Vitamina A	-	-	400 UI	2.000 UI	200 UI	1982 UI	450 UI	2.000 UI
Vitamina D	-	-	200 UI	222 UI	?	220 UI	50 UI	200 UI
α - Tocofenol	2,500	-	10,000	11,100	6,000	11 UI	2,500	10,000
Pó de fígado "Wilson" (1:20)	400,000	-	-	-	-	-	-	-
Óleo de fígado de Halibut	50,000	500,00	-	-	-	-	-	-

(*) µg

Composição e conteúdo de nitrogênio das dietas experimentais

Ingredientes	% Composição					
Caseína	18,00	18,00	-	-	9,00	9,00
Amido de milho (Maizena Duryea)	51,30	57,50	69,30	75,50	60,30	66,50
Óleo de milho (Mazolla)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Sacarose (açúcar União)	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Sais minerais (*)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
DL metionina	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Mistura de vitaminas (**)	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
Ureia (45% N)	6,20	-	6,20	-	6,20	-
Nitrogênio total (***)	4,75	2,40	2,38	0,17	3,79	1,40
Nitrogênio como suplemento (ureia)	2,25	-	2,38	-	2,39	-

(*) mistura segundo Jones e Foster (1942)

(**) mistura de vitaminas segundo Santos, A.C. (1968)

(***) g de nitrogênio nas dietas determinadas pelo método de Kjeldahl em três amostras.

A diferença nas dietas residiu na substituição de fontes de nitrogênio por amido de milho e em dietas sem ureia e suplementadas com ureia, de maneira que mudanças no nível de proteína e todas as adições de ureia foram compensadas ajustando a percentagem do amido de milho. Os regimes foram praticamente isocalóricos.

Os sais minerais foram pesados em balança analítica e misturados em moído de bolas até homogeneização completa. A mistura foi armazenada em frasco escuro, bem fechado, para uso na preparação de todas as dietas.

As vitaminas, depois de pesadas, foram misturadas previamente antes de serem adicionadas aos outros ingredientes.

Na preparação das dietas, cuidou-se de misturar o óleo de milho à sacarose primeiramente e, logo em seguida, foram adicio-

nadas, gradualmente, a mistura de sais minerais e as vitaminas misturadas. Por último, o amido de milho e a caseína foram incorporados aos poucos aos demais componentes. A mistura de todos os ingredientes foi feita numa grande bandeja alouçada e misturada com uma colher de aço inoxidável, de cabo longo. A dieta, assim preparada, foi introduzida num moinho de bolas para homogeneização; para isto movimentou-se mecanicamente o moinho durante 8 horas, ininterruptamente.

As dietas foram conservadas a 6°C na câmara fria, até o momento de uso. Para cada experiência preparou-se dieta nova.

3. REAGENTES

L-ornitina-HCl, L-alanina, L-aspartato (sal monopotássio), L-citrulina, L-arginase, NADH - forma reduzida (sal dissódico), glutatião reduzido, N-acetilglutamato, diacetilmonoxima, do laboratório Sigma Chemical Co.; Ácido α -cetoglutárico, 2,4-dinitrofenilhidrazina, ácido pirúvico (sal de sódio) do Laboratório Merck; 1,2 propanodiona-2-oxima, da Eastman Organic Chemicals, Rochester 3, N. Y.; ATP (sal dissódico), carbamifosfato (sal dilúcio), L-arginase, urease, L-argininosuccinato (sal de bário), da C.F. Boehringer und Söhne G.m.b.H., Mannheim, Germany. Todos os outros reagentes foram produtos comerciais, pro análise.

As soluções dos reagentes foram feitas em volumes convenientes e conservadas em porções para uso, no congelador a -20°C, para evitar congelamento e descongelamento. Para a preparação da solução de carbamifosfato seguimos os cuidados citados por Nakamura e Jones (1970).

A enzima ornitina transcarbamilase foi preparada de fígado de boi, segundo técnica descrita a seguir.

4. PREPARAÇÃO DA ENZIMA ORNITINA TRANSCARBAMILASE (EC 2.1.3.3. carbamila fosfato, L-ornitina-carbamila transferase)

A técnica utilizada foi a de Burnett e Cohen (1957), com algumas modificações.

4.1. Isolamento e purificação da enzima

Foi usado fígado de boi, fresco, obtido de matadouro, transportado em gelo, dentro de 2 a 3 horas, após a morte do animal, para a preparação enzimática. Foram picadas, porções de 100g cada uma, homogeneizadas com solução isotônica de KCl 0,15M gelada, na proporção de 1:3.

A homogeneização foi feita a baixa velocidade num liquidificador Walita durante 45 segundos para cada porção. Em seguida o homogeneizado foi filtrado com gaze dupla. Do filtrado reservou-se uma amostra (nº 1), depois de ter sido medido o volume. Nesta amostra foi dosada a proteína e determinada a atividade da enzima.

O volume filtrado foi centrifugado em garrafas de aço inoxidável, numa Sorvall Superspeed RC-2B Automatic Refrigerated Centrifuge a 3000 x g por 45 minutos, usando-se o rotor GSA.

O líquido sobrenadante foi despresado. As paredes das garrafas da centrífuga foram limpas com papel de filtro, para retirar as camadas de gordura, aderentes.

O resíduo foi suspenso no volume original do meio homogeneizante, misturado nas garrafas da centrífuga com ajuda de um bastão de vidro. Então, centrifugou-se novamente nas mesmas condições anteriores, mas durante 20 minutos.

Este processo foi repetido.

O resíduo lavado e suspenso em solução isotônica gelada de KCl 0,15M foi misturado em 10 a 15 volumes de acetona gelada (-20°C) em liquidificador Walita a baixa velocidade durante 45 segundos. A mistura foi transferida a uma proveta e deixada em repouso por 2 minutos. Em seguida procedeu-se à filtração em funil grande de Büchner com sucção por intermédio de uma bomba a vácuo. Antes

de completar a filtração, isto é, passar toda a mistura água-acetona, o funil foi enchido com acetona gelada (-20°C).

O resíduo foi misturado levemente na acetona com um bastão de vidro curvo em ângulo reto numa das extremidades. Quando o funil continha mais ou menos a metade do líquido, foi coberto com uma folha de papel plástico perfurada e presa a ele com atilhos de borracha. A partir deste momento foram necessários aproximadamente 15 minutos para a preparação parecer seca. A preparação do pó cetônico foi realizada em câmara fria.

O conteúdo do funil de Büchner foi triturado com um bastão de vidro e passado rapidamente por peneira de plástico fina, a temperatura ambiente, e recolhido sobre uma folha de papel de filtro.

O pó cetônico resultante foi embrulhado levemente na folha de papel de filtro que foi colocada numa cápsula de porcelana em dessecador a vácuo, com sílica gel. Feito o vácuo, o dessecador foi guardado no refrigerador a -20°C . (*)

Após 2 dias, o pó cetônico foi pesado e fracionado em lotes de 10g. De cada lote foi extraída, duas vezes durante 30 minutos, a enzima com 100ml de água destilada, desionizada, gelada, com agitação leve e constante, em câmara fria. Os extratos foram combinados e permaneceram em repouso para sedimentar a porção insolúvel. Decantou-se o sobrenadante para uma proveta, mediu-se o volume e foi retirada uma alíquota (nº 2) para dosagem de proteína e determinação da atividade. O extrato aquoso foi transferido a um bequer, que foi colocado num banho de água a 70°C .

A temperatura da solução foi mantida a 65°C durante 1 minuto, com agitação constante [Jones (1962), Marshall e Cohen (1972)]; desta maneira a carbamilfosfoquinase, sensível a esta temperatura, foi inativada. A solução enzimática quente foi resfriada bruscamente numa mistura de água e gelo, a 4°C . A proteína, desnaturada pelo aquecimento, foi retirada por centrifugação durante 15 mi

(*) O pó cetônico conservou a atividade da enzima por mais de um ano guardado em dessecador a vácuo, a -20°C .

nutos a 14500 x g na Sorvall, usando tubos de polietileno e o rotor SS-34. A solução sobrenadante contendo a enzima foi decantada num copo e seu volume medido. Depois de retirada uma aliquota (amostra nº 3) para posteriores exames, a enzima foi precipitada por sulfato de amônio em pó na proporção de 0,56g do sal por g de solução enzimática, resultando numa concentração de 80%. O sulfato de amônio foi colocado gradualmente com a solução em agitação mecânica, contínua, em câmara fria. Depois de colocar todo o sal, prolongou-se a agitação por 30 minutos. A proteína precipitada foi separada por centrifugação na Sorvall, a 14500 x g por 45 minutos. O precipitado do sulfato de amônio foi redissolvido num volume mínimo de tampão 0,02 M Tris-HCl, pH 8,3.

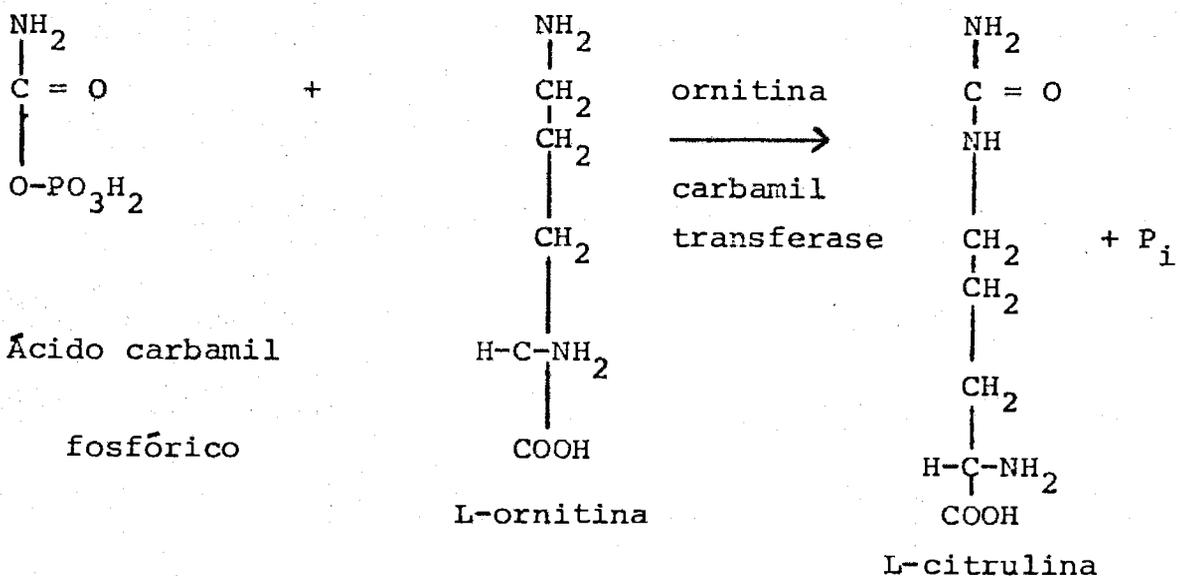
A solução enzimática foi distribuída em frascos em pequenas porções e congelada. Assim se evitou um congelamento e descongelamento, não havendo queda significativa na atividade da enzima por mais ou menos um ano conservando-a a -20°C.

Antes do uso, uma porção da enzima foi dializada contra tampão 0,02M Tris-HCl, pH 8,3, em câmara fria, a 4°C durante quatro horas, com duas trocas de tampão, para retirar o excesso de sal.

Experimentamos uma purificação com cromatografia em hidroxilapatita que não nos ofereceu vantagens porque a enzima não conservou a atividade por mais de quinze dias, de acordo com nossas observações.

4.2. Ensaio da atividade da enzima

A enzima catalisa a seguinte reação:



A atividade da enzima pode ser medida por síntese de citrulina de carbamila fosfato e L-ornitina, pela produção de ortofosfato de carbamila fosfato ou por produção de bicarbonato ou amônia numa reação reversa, quando a citrulina é incubada com arsenato.

O ensaio colorimétrico da atividade da ornitina trans-carbamilase foi baseado na determinação do produto da reação, a citrulina, pelo método de Archibald modificado (1944).

As preparações enzimáticas, foram diluídas, de modo a obtermos concentrações da enzima onde, nas condições de ensaio, a atividade fosse linear com o tempo de 30 minutos e originasse não mais do que 0,5 micromóis de citrulina.

Foi preparada uma mistura de incubação contendo: 2 partes de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,4, 1 parte de L-ornitina-HCl 0,1M pH 7,0 e 1 parte de carbamila fosfato 0,1M pH 7,0 [Nakamura e Jones (1970), Raijman (1974)].

Uma porção da solução enzimática foi incubada com 0,1ml da mistura de incubação descrita acima contendo 50 micromóis de tampão Tris-HCl pH 7,5, 2,5 micromóis de L-ornitina-HCl pH 7,0 e 2,5 micromóis de carbamila fosfato diluído pH 7,0; e água num volume final de 0,5 ml. Depois de 15 minutos a 38°C a reação foi interrompida com 1 ml de solução 0,25M de ácido tricloroacético. Os tubos foram centrifugados para separar a proteína precipitada. Uma alíquota da mistura da reação de 0,5ml foi retirada para a dosagem do produto da reação.

Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que formou 1 micromol de citrulina por minuto nas condições do ensaio. As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e alii (1951), Laine (1957), com albumina bovina como proteína padrão. Em todos os ensaios foram feitos testes de controle: 1) Sistema contendo enzima e tampão mas não substratos; 2) sistema contendo somente substratos; 3) sistema contendo substratos mais enzima com solução 0,25M de ácido tricloroacético adicionada ao tempo zero.

As amostras das diferentes etapas foram diluídas de maneira a produzir entre 0,05 a 0,20 μ M de citrulina nas condições do ensaio.

5. PREPARAÇÃO DO MATERIAL ENZIMÁTICO

Os animais, mortos por decapitação em guilhotina, pela manhã, não estavam em jejum. A retirada do fígado foi feita imediatamente após a morte, por incisões superficiais longitudinais e transversais ao animal, depois de afastar o pêlo, tornando-se fácil o isolamento do referido órgão. Também retiramos o estômago, intestino e rins, que foram conservados em gelo até o momento da pesagem e preparação dos homogeneizados.

O fígado e os rins foram secados levemente em papel filtro antes de serem pesados.

5.1. Homogeneizado do fígado

Após a pesagem do órgão total, retirou-se 0,5g de cada fígado para homogeneização em água destilada desionizada (Griffin - Raleigh Water deionizer - Gt. Britain) na concentração de 1/10 (g/ml). A homogeneização foi efetuada mecanicamente num homogeneizador de Potter-Elvehjem com pistilo de Teflon, [Potter (1955)] em câmara fria, com movimentos verticais lentos e velocidade constante, durante 1 minuto, correspondendo a 35 excursões do pistilo. O homogeneizado foi transferido a um tubo gelado e centrifugado durante 10 minutos a 536,6x g na centrífuga Janetzki K₂₃, refrigerada (2°C).

O sobrenadante foi decantado num tubo gelado e imediatamente foi retirada uma alíquota para outro tubo gelado que foi levado ao congelador (-20°C) para determinação da atividade da L-glutamato NAD⁺ (P) oxidoreductase e das transaminases, glutamato oxaloacetato aminotransferase e glutamato piruvato aminotransferase no dia seguinte. O resto do sobrenadante foi deixado no tubo de ensaio que permaneceu numa caixa de estiropor com gelo picado até ser usado para determinação da atividade das outras enzimas.

O tempo máximo de utilização do homogeneizado foi de 3 horas, após a morte do animal.

Antes havíamos testado uma homogeneização no homogeneizador de Potter-Elvehjem com pistilo de Teflon durante 15 segundos e logo a seguir no homogeneizador Virtis "45" (The Virtis Co. Inc.

Gardiner, N.Y.) com refrigeração externa, durante 1 minuto, para maior divisão do tecido, uma vez que algumas das enzimas a serem do sadas estão localizadas na mitocôndria, L-ornitina carbamila transferase [Schnaitman & Greenwalt (1968), Cohen (1970)] carbamila fosfato sintetase I (Cohen e Hayano, 1948) L-glutamato desidrogenase [(Hogeboom, C.H. & Schneider, W.C. 1954; De Duve, 1962; Schnaitman & Greenwalt, 1968; Cohen, 1970); Beaufay et alii (1959)].

Assim, para maior rapidez em nossas preparações enzimáticas e incubação dos sistemas, procuramos uma metodologia em que obtivéssemos um único homogeneizado para a determinação de todas as enzimas num tempo mínimo para podermos sacrificar 15 ratos cada vez. Desta maneira, teríamos em cada experiência 3 ratos em dieta contro le, 6 ratos em dieta purificada e 6 ratos em dieta purificada suple mentada com ureia.

O meio de extração foi a água desionizada gelada, que também foi usado por Schimke (1962a) Deostale e Tulpule (1969, 1969a) Raijman (1974) e de acordo com Schimke (1962a); para as enzimas do ciclo da ureia foi a preparação mais conveniente e que em nenhum ca so resultou em atividades significativamente mais baixas do que aquelas obtidas por processos de extração com vários tampões e deter gentes.

500mg de fígado foram suficientes para a determinação de todas as enzimas.

Experimentamos a extração com uma solução de CTAB a 0,1% (brometo de cetiltrimetilamonio) como recomendado por Brown e Cohen, (1959), mas a abandonamos por termos conseguido um esquema melhor, onde a metodologia era bastante mais simples e os resultados aproximados aos da literatura consultada. Neste estudo, não se tratava de obter valores absolutos para as atividades das enzimas, mas de mudanças relativas das atividades em função de alterações na dieta específica aos animais.

Tamir e Ratner (1963) relacionam coletâneas de resultados divergentes das atividades de algumas enzimas do ciclo da ureia em fígado de rato, entre vários pesquisadores.

5.2. Homogeneizado do rim

Após obtenção do peso total dos rins, pesou-se 0,5g para a preparação do homogeneizado.

A homogeneização foi feita nas mesmas condições do fígado, isto é, no homogeneizador de Potter-Elvehjem com pistilo de Teflon (35 excursões) e na concentração de 10% (g/ml).

5.3. Homogeneização da mucosa gástrica

O estômago, logo após a excisão, foi aberto e lavado sob água destilada desionizada gelada com jorro contínuo de um barrilete, na câmara fria. Em seguida, foi colocado sobre um papel de filtro para retirar o excesso de água.

Sobre uma placa de vidro apoiada numa caixa de estiro por, cheia de gelo picado, o muco da mucosa gástrica foi retirado com leve raspagem e a seguir a mucosa foi raspada, usando-se uma lâmina de vidro para microscopia. Logo após, a mucosa foi pesada para fazer um homogeneizado em água destilada desionizada gelada numa concentração de 10% (g/ml).

A homogeneização foi feita mecanicamente no homogeneizador de Potter-Elvehjem com pistilo de Teflon durante 15 segundos (10 excursões do pistilo) e o homogeneizado foi transferido a uma cubeta gelada do homogeneizador de Virtis "45". A homogeneização no Virtis, com a cubeta envolvida em gelo picado, foi feita em 3 minutos, a 20.000 rpm. O homogeneizado foi transferido a um tubo gelado para centrifugação na centrífuga Janetzki K₂₃ refrigerada (2°C) durante 10 minutos a 536,3xg. Após a centrifugação o sobrenadante foi decantado num tubo gelado que foi conservado em gelo picado até o uso. Sempre usamos uma mistura de mucosa de 3 estômagos para obtermos um volume de homogeneizado satisfatório.

5.4. Homogeneizado da mucosa intestinal

O intestino delgado, após a excisão, foi depositado num bequer gelado. Em seguida, foi lavado introduzindo-se água desionizada gelada por meio de uma seringa. Duas porções de 20cm cada uma foram cortadas e com um bastão de vidro de 250mm de comprimento por

3mm de diâmetro retirou-se o muco, empurrando-o para fora. Logo após, a porção do intestino foi virada com o mesmo bastão e a mucosa sobre o bastão foi secada com papel de filtro para retirar o excesso de água e mesmo retirar o muco que ainda permanecesse. O bastão de vidro envolto da porção de intestino com a mucosa exposta, foi apoiado numa placa de vidro sobre gelo picado e gradualmente a porção foi puxada sobre a placa com uma lâmina de vidro para microscópio, ao mesmo tempo que a mucosa ia sendo raspada. Consideramos o processo menos trabalhoso de que aquele proposto por Collares (1973).

A mucosa foi pesada para se obter um homogeneizado na concentração de 5% (g/ml).

A homogeneização foi feita nas mesmas condições da mucosa gástrica.

6. CONDIÇÕES GERAIS DO ENSAIO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS

As atividades de 9 enzimas foram medidas em várias diluições do homogeneizado de fígado, tanto quanto possível, em concentração ótima de substrato e coenzimas e em pH ótimo. As condições foram caracterizadas por velocidade de reações que foram lineares durante o período completo de incubação.

Nos homogeneizados de rim, da mucosa gástrica e mucosa intestinal foi investigada uma possível atividade ureasica.

Para verificar as variações na atividade das enzimas em função do tempo foi feita uma curva, em 1h30min, 3h, 6h30min após a morte do animal. Uma amostra do homogeneizado foi congelada imediatamente após o término da preparação do homogeneizado e a atividade da enzima foi determinada após 24h e uma semana de congelamento.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

O volume dos sistemas enzimáticos variaram de 0,50 a 2,0ml para as incubações, de acordo com a atividade das enzimas a dosar. Os tubos destapados foram colocados em banho maria a 37°C, sem agitação. As reações foram paralizadas com solução 0,25M, 0,50M,

2,5M e 5,0M de ácido tricloroacético e toda a proteína precipitada foi separada por centrifugação durante 5 minutos a 3.500 rpm, na centrífuga Janetzki T_{32A}, de acordo com a metodologia para cada enzima. Entretanto, para a determinação da atividade da glutamato desidrogenase, o volume do sistema enzimático foi de 2ml, incubado em cubetas de quartzo, com tampa, à temperatura de 23°C. A velocidade da reação foi verificada com registro automático da oxidação de NADH, no espectrofotometro Specord UV-VIS, JENA em 340nm.

O material enzimático para determinação da atividade de algumas enzimas foi necessário ser diluído, e está especificado na própria técnica.

Para cada sistema enzimático foram feitos os testes seguintes: mistura de incubação completa; mistura de incubação com homogeneizado; mistura de incubação sem substrato e mistura de incubação completa mais solução de ácido tricloroacético, considerando-se este o tempo zero da reação enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que cataliza a formação de 1 micromol de produto das reações: citrulina, ureia, amônia, piruvato de NAD⁺ por hora nas condições do ensaio, de acordo com os substratos utilizados.

As atividades das enzimas foram calculadas por peso úmido de fígado (g), por peso úmido total do fígado, por peso úmido do fígado por 100g de peso corporal (peso relativo ao fígado) e por miligrama de proteína.

A proteína foi determinada pelo método de Lowry et alii (1951) modificado.

CONDIÇÕES DE ENSAIO DAS ENZIMAS

Sistemas enzimáticos	Composição	Volume ml	pH	Temperatura °C	Produto final	Comprimento de onda nm
Carbamila fosfato sintetase I	tris-Cl, 50 micromóis; ATP, 10; Mg Cl ₂ , 10; GSH, 8; KHCO ₃ , 40; NH ₄ Cl, 10; L-ornitina, 5; N-acetil-glutamato, 5; OTC, 40 UE.	0,5	7,5	37	citrulina	490
L-ornitina carbamil transferase	tris-Cl, 50; carbamila fosfato, 2,5; L-ornitina, 2,5.	0,5	7,5	37	citrulina	490
Arginina succinato sintetase	K ₂ HPO ₄ , 50; MgSO ₄ , 5; ATP, 5; citrulina, 5; L-aspartato, 5; L-arginase, excesso.	0,5	7,8	37	ureia	540
Arginina succinase	K ₂ HPO ₄ , 50; L-arginina succinato, 1,75; L-arginase, excesso.	0,5	7,8	37	ureia	490
L-arginase	L-arginina, 250; MnCl ₂ , 1.	1,0	9,7	37	ureia	540
L-glutamato desidrogenase	tris-acetato, 20; EDTA 0,020; NH ₄ Cl, 100; NADH, 0,1; α-cetoglutarato, 40.	2,0	8,0	23	NAD+	340
Glutamato oxaloacetato amino-transferase	K ₂ HPO ₄ , 100; ac. aspártico, 100; α-cetoglutarato, 40.	1,5	7,4	38	piruvato	490
Glutamato piruvato aminotransferase	K ₂ HPO ₄ , 100; L-alanina, 100; α-cetoglutarato, 40.	1,5	7,4	38	piruvato	490
Urease	K ₂ HPO ₄ , 300; EDTA, 0,02; ureia, 150.	2,0	7,0	40	amônia	630

7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS

7.1. Carbamila fosfato sintetase I - EC-2,7.2.2. ATP: carbamato fosfotransferase

A atividade desta enzima, que converte amônia e bicarbonato em carbamila fosfato, foi medida pela velocidade de formação de citrulina num sistema acoplado contendo ornitina e ornitina transcarbamilase, isolada de fígado de boi pelo método de Burnett e Cohen (1959) modificado, descrito antes.

Num volume final de 0,5ml, a mistura de incubação continha 0,3ml dos substratos e cofatores cuja concentração era: tampão Tris-HCl pH 7,5, 50 micromóis; ATP pH 7,0, 10 micromóis; $MgCl_2$, 10 micromóis, GSH pH 7,0, 8 micromóis; $KHCO_3$, 40 micromóis, NH_4Cl , 10 micromóis; L-ornitina-KCl pH 7,0, 5 micromóis; N-acetilglutamato pH 7,0, 5 micromóis e 400 unidades de OTC de fígado de boi, livre de carbamilfosfoquinase, preparada por nós. O homogeneizado foi usado em duas concentrações, 25 μl e 50 μl , em duplicata em cada determinação. O volume final de 0,5ml da mistura de incubação foi completado com água destilada desionizada. Dado que o GSH, devido ao grupo tiólico, reduz a cor desenvolvida na reação entre o produto formado, citrulina, e a diacetilmonoxima, foram feitos quatro tubos controle da mistura de incubação sem enzima, de modo a ser usada, na curva padrão de citrulina, uma alíquota igual à das amostras dos tubos com mistura de incubação completa. A incubação foi feita durante 30 minutos a 37°C e a reação foi interrompida com 1 ml de solução 0,25 M de TCA em cada tubo. Uma alíquota de 0,5ml da mistura de incubação desproteïnizada foi utilizada para a dosagem de citrulina.

Foram usadas misturas controles desproteïnizadas no tempo zero e incubadas na ausência de N-acetilglutamato.

7.2. L-Ornitina transcarbamilase - EC-2.1.3.3 - carbamil fosfato: L-ornitina carbamila transferase

O ensaio da enzima foi feito de acordo com Nakamura e Jones (1970) modificado. Num volume final de 0,5ml, a mistura de incubação continha 50 micromóis de tampão Tris-HCl pH 7,5; 2,5 micromóis de carbamila fosfato dilitio pH 7,0 e 2,5 micromóis de L-ornitina-HCl pH 7,0, homogeneizado, diluído 1:25, completando-se o volu

me com água destilada desionizada. O volume do homogeneizado foi de 25 μ l e 50 μ l. Após incubação de 15 minutos a 37°C, a reação foi interrompida com 1 ml de solução de TCA 0,25M. A citrulina foi dosada em alíquotas de 0,5ml de mistura de incubação livre de proteínas.

7.3. Arginina succinato sintetase - EC-6.3.4.5 - L-citrulina; L-aspartato ligase (AMP)

O ensaio desta enzima foi feito de acordo com Brown e Cohen (1959) com pequena modificação. O sistema enzimático para a determinação da atividade compreendeu uma série de reações consecutivas catalisando a condensação de aspartato e citrulina, originando argininosuccinato, posterior clivagem do último e subsequente ação da L-arginase com produção de ureia.

Num volume de 0,5ml, o sistema continha: 50 micromóis de tampão fosfato de potássio pH 7,8; 5 micromóis de sulfato de magnésio; 5 micromóis de ATP pH 7,0; 5 micromóis de citrulina pH 7,0; 5 micromóis de L-aspartato pH 7,0; um excesso de arginase. O homogeneizado foi adicionado em diluição conveniente completando o volume final de 1ml. O tempo de incubação foi de 60 minutos a 37°C, e a reação foi paralizada com 1,5ml de solução 0,25M de TCA. Uma alíquota de 1ml foi usada para a dosagem de ureia pelo método de Archibald modificado (1945).

7.4. Arginina succinase - EC-4.3.2.1 - L-arginina succinato arginina-liase

O sistema de ensaio foi uma modificação de Brown e Cohen (1959).

Num volume de 0,5ml, a mistura de incubação continha : 50 micromóis de tampão fosfato de potássio pH 7,8; 1,75 micromóis de argininasuccinato pH 7,0 com solução de KOH antes do uso, excesso de arginase, homogeneizado e água. Incubação foi durante 30 minutos a 37°C e a reação foi interrompida com 1,0ml de solução 0,5M de ácido tricloroacético. Foram usadas alíquotas de 0,5ml de mistura livre de proteínas, para determinação da ureia, com diacetilmonoxíma.

7.5. L-arginase - EC-3.5.3.1 - L-arginina amidina hidrolase

Para o ensaio da atividade da L-arginase, seguimos o método de Schimke (1970) com alguma modificação. A enzima foi primeiro ativada, incubando-se 0,90ml do homogeneizado com 0,10ml de solução 0,1M de $MnCl_2$ a 55°C durante 5 minutos; a seguir, centrifugou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Do sobrenadante, retiraram-se amostras (10 μ l e 20 μ l) e cada uma foi incubada durante 10 minutos a 37°C, com 1,0ml de solução 0,25M de L-arginina pH 9,7 contendo $MnCl_2$ na concentração de 0,001M.

A reação foi interrompida com 2,5ml de solução 0,5M de ácido tricloroacético. Alíquotas apropriadas de 0,10-0,25ml foram usadas na dosagem da ureia pelo método de Archibald (1945) modificado.

7.6. Glutamato-desidrogenase - EC-1.4.1.3 - L-glutamato NAD(P) oxidoreductase

O método de ensaio foi de Fahien e Cohen (1970). A velocidade de oxidação de NADH foi medida espectrofotometricamente a 340 nm do espectrofotômetro Specord UV-VIS, JENA, com cubetas de quartzo de 1 cm de comprimento, durante 5 minutos, a 23°C.

A mistura de incubação continha, num volume de 2ml, tampão Tris acetato pH 8,0, 20 micromóis, EDTA 0,02 micromóis ou 20 nanomóis, NH_4Cl 100 micromóis; NADH 0,1 micromóis ou 100 micromóis, recentemente preparada; α -cetogluturato pH 7,0, 40 micromóis; água e homogeneizado diluído a 2%.

Como em todos os ensaios enzimáticos, as determinações foram feitas em duas concentrações de homogeneizado (100 μ l e 200 μ l) e fizeram-se controles sem α -cetogluturato.

7.7. L-Glutamato: oxaloacetato transaminase - EC-2.6.1.10 - L-glutamato: oxaloacetato amino transferase

Método de Tonhazy e col. (1950) com algumas modificações. Um volume de 1,5ml continha 100 micromóis de ácido aspártico pH 7,4; 100 micromóis de fosfato dipotássico pH 7,4; 40 micromóis de α -cetogluturato, homogeneizado e água. A incubação ocorreu durante 10 minutos a 38°C e a reação enzimática foi interrompida com

0,1ml de solução 5M de ácido tricloroacético. Um dos produtos da reação, oxaloacetato, foi medido como piruvato depois da descarboxilação com citrato de amônio, de acordo com o método descrito na seção de identificação dos produtos de reação.

7.8. L-Glutamato: piruvato transaminase - EC-2.6.1.12 - L-glutamato: piruvato amino transferase

Método de Tonhazy e col. (1950) modificado. As mesmas condições e reagentes do processo para determinação da glutamato: oxaloacetato transaminase foram usadas, apenas substituindo 100 micromóis de ácido aspártico por 100 micromóis de L-alanina.

7.9. Urease - EC-3.5.1.5 - Ureia amido hidrolase

A técnica usada foi baseada no método de Lind & Martinson (1964) modificado. Um volume de 2ml continha 150 micromóis de ureia; 300 micromóis de tampão acetato de sódio pH 5,4, com EDTA 20 nM, ou 300 micromóis de tampão fosfato de potássio com EDTA 20 nM, pH 7,0 e homogeneizado diluído. O tempo de incubação foi de 40 minutos a 40°C. A reação foi interrompida com 0,10ml de solução 5M de ácido tricloroacético. Após centrifugação, uma alíquota de 1 ml do sobrenadante foi usada para a determinação de amônia pelo método de Chaney e Marbach (1962) modificado.

8. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E DOSAGEM DOS PRODUTOS FORMADOS NAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Os sobrenadantes límpidos das misturas dos sistemas de incubação, livres de proteínas, foram analisados para a determinação da atividade das enzimas em função dos produtos formados nas reações enzimáticas: citrulina, ureia, amônia ou piruvato, de acordo com o sistema enzimático. Para cada determinação foi feita curva padrão em duplicata com os padrões correspondentes.

8.1. Dosagem de citrulina

A citrulina foi dosada pelo método de Archibald (1944) modificado, usando-se alíquotas apropriadas dos sobrenadantes. A 2ml da solução aquosa das alíquotas, juntamos 1ml da mistura ácida (ácido sulfúrico concentrado e ácido fosfórico xaroposo a 85% na proporção de 1:3). Após misturar, adicionou-se 0,125ml de solução aquosa de diacetilmonoxima a 3% e agitou-se o tubo. Em seguida, todos os tubos, fechados com bolas de gude, foram colocados em banho de água fervente, durante 30 minutos. Após resfriamento em água fria (10 minutos), as densidades óticas das soluções coradas, do produto formado entre a citrulina e a diacetilmonoxima, em solução ácida, foram lidas em 490nm, no espectrofotômetro Spekol, Jena, com cubetas de 1cm de comprimento. (Porque o produto formado é sensível à luz, todo o processo foi realizado no escuro). Uma curva padrão de citrulina contendo concentrações de 0,05 a 0,5 micromóis foi incubada ao mesmo tempo que as amostras dos ensaios enzimáticos.

Há linearidade exata somente entre 0,10 a 0,35 micromóis. Em concentrações menores e maiores, a relação entre a concentração e a densidade ótica não é perfeitamente linear.

8.2. Dosagem de ureia

A ureia foi determinada pelo método de Archibald (1945) modificado por Schimke (1970). Usamos 0,25ml de solução aquosa das alíquotas dos sobrenadantes das misturas de incubação, livres de proteínas. Juntamos 3ml da mistura ácida diluída (ácido sulfúrico concentrado, 90ml e ácido fosfórico xaroposo a 85%, 270ml completando com água o volume de 1 litro) e 0,10ml da solução de 1-fenil-1:2 propanodiona-2-oxima a 3% em etanol. Os tubos foram agitados, fechados com bolas de gude, em seguida colocados em banho de água fervente durante 30 minutos. Após resfriamento (10 minutos), as densidades óticas das soluções coradas foram lidas no espectrofotômetro Spekol, Jena, a 540nm com cubetas de 1cm de comprimento. Fez-se sempre uma curva padrão de ureia nas concentrações de 0,125 micromóis a 1,00 micromóis, junto com as amostras. Como no método anterior (dosagem da citrulina), a cor desenvolvida na reação é sensível à luz, e por isso todo o processo foi realizado no escuro.

8.3. Dosagem de amônia

A determinação de amônia foi feita pelo método de Chaney e Marbach (1962) modificado. Num volume aquoso de 1ml de alíquota dos sobrenadantes adicionou-se 2ml do reagente A, misturou-se e acrescentou-se 2ml do reagente B. Novamente misturou-se durante 20 minutos em banho de água a 55°C. Diluiu-se a solução corada com 10 ml de água destilada e a densidade ótica foi lida no espectrofotômetro Spekol a 625nm em cubetas de 1cm de comprimento. A curva padrão de sulfato de amônia, continha de 0,05 a 0,3 micromóis de amônia.

Reagente A - 4,7g de fenol

6mg de nitroprussiato de sódio

dissolver e completar volume de 100ml com água destilada

Reagente B - 2g de hidróxido de sódio

2ml de solução de hipoclorito a 5%

dissolver e completar volume de 100ml com água destilada

8.4. Dosagem de ácido pirúvico

Após a reação enzimática ser interrompida com solução de ácido tricloroacético 5M, acrescentou-se 0,1ml de solução de citrato de anilina recente, com agitação, aguardando-se 10 minutos, Dick (1970). A seguir, juntou-se 0,5ml de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina a 0,1% em solução de ácido clorídrico 20% (V/V). Misturou-se bem, deixou-se em repouso durante 5 minutos. A extração do composto formado foi feita adicionando-se 2,0ml de tolueno e agitando fortemente o tubo, tendo o cuidado de fechá-lo com rolha de borracha, em seguida centrifugou-se durante 5 minutos. Da camada de tolueno retirou-se uma alíquota de 1ml para um tubo de ensaio, contendo 5ml de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 2,5%, preparada recentemente. Misturou-se e a leitura das densidades óticas foi feita no espectrofotômetro Spekol a 490nm em cubeta de 1ml de comprimento. A curva padrão continha de 0,25 a 2,0 micromóis de ácido pirúvico.

8.5. Dosagem de NAD⁺

A determinação da nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD⁺) foi feita pela queda da absorbância em 340nm no sistema completo de incubação, durante 5 minutos a 25°C, usando o espectrofotômetro Specord UV-VIS, Jena, com cubetas de quartzo de 1cm de comprimento, com registro automático, usando-se água como branco. Um teste do sistema enzimático sem α -cetogluturato acompanhou todas as determinações.

III. RESULTADOS

1. VARIAÇÃO NA ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS DE HOMOGENEIZADO DE FÍGADO DE RATO, EM FUNÇÃO DO TEMPO E DO CONGELAMENTO DA AMOSTRA - GEM.

Com o objetivo de determinar as atividades de várias enzimas num mesmo animal, fez-se necessário verificar as suas atividades, em função do tempo e do congelamento da amostra (homogeneizado de fígado), como se pode observar da Tabela 1.

TABELA 1
Efeito do tempo e congelamento sobre a atividade das enzimas de fígado de rato após amostragem

Tempo (h)	Glutamato: oxaloacetato amino-transferase	Glutamato: piruvato amino-transferase	L-arginase	L-glutamato desidrogenase
	% de atividade			
1,5	100,00	100,00	100,00	100,00
3,0	92,08	92,27	83,05	111,11
6,5	84,59	95,79	63,00	110,00
24,0*	99,09	105,19	96,90	107,30
168,0* (1 semana)	80,26	92,48	95,10	99,20

(*) Amostras congeladas imediatamente após a preparação do homogeneizado, conservadas a -20°C.

a) as aminotransferases, glutamato-piruvato aminotransferase e glutamato oxaloacetato aminotransferase não tiveram suas atividades diminuídas, conservadas, 24 horas, no congelador a -20°C . Krebs (1972) observa que teve resultados mais consistentes para as aminotransferases após o congelamento a -18°C provavelmente devido à destruição da membrana mitocondrial. Os dados por nós obtidos confirmam os resultados da estabilidade da glutamato oxaloacetato aminotransferase a 0°C , em sangue de ratos, por Tulpule et alii (1958);

b) a L-arginase mostrou-se bastante sensível ao tempo de amostragem, como Schinke (1962a) já havia observado, com queda acentuada da atividade. O mesmo não ocorreu de maneira significativa com a amostra congelada, 24 horas a -20°C ;

c) a L-glutamato desidrogenase aumentou a atividade após 3,0h da amostragem, resultado que não concorda com o de Salem et alii (1973) para a glutamato deshidrogenase de fígado de bezerro;

d) o tempo de uma semana de congelamento das amostras produziu uma redução de 20% na atividade da glutamato oxaloacetato aminotransferase, observando-se menor redução nas outras enzimas.

Os sistemas enzimáticos foram incubados no prazo de 1,5 a 3 horas após a morte do animal na seguinte ordem: L-arginase, carbamila fosfato sintetase I, arginosuccinase, arginino succinato sintetase, L-ornitina carbamila transferase e urease. A atividade das demais enzimas foram determinadas após 24 horas de congelamento imediato a -20°C .

2. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE UREIA À DIETA PURIFICADA SOBRE O CRESCIMENTO, INGESTÃO DE ALIMENTOS, PESO RELATIVO DO FÍGADO E DO RIM, PROTEÍNA HEPÁTICA E PROTEÍNA RENAL DO RATO, NUM PERÍODO DE 14 DIAS (Tabela 2)

2.1. Efeito sobre o crescimento

Os ratos alimentados com a dieta purificada contendo caseína a 18% suplementada com ureia mostraram um menor crescimento em relação aos ratos alimentados com a dieta purificada sem ureia. O mesmo aconteceu com os animais alimentados com caseína a 9% suplementada com ureia. Entretanto aqueles animais alimentados com dieta

sem caseína suplementada com ureia, perderam menos peso comparados com os animais alimentados com dieta sem caseína e sem ureia. Os resultados não foram significativos estatisticamente (Figura 1).

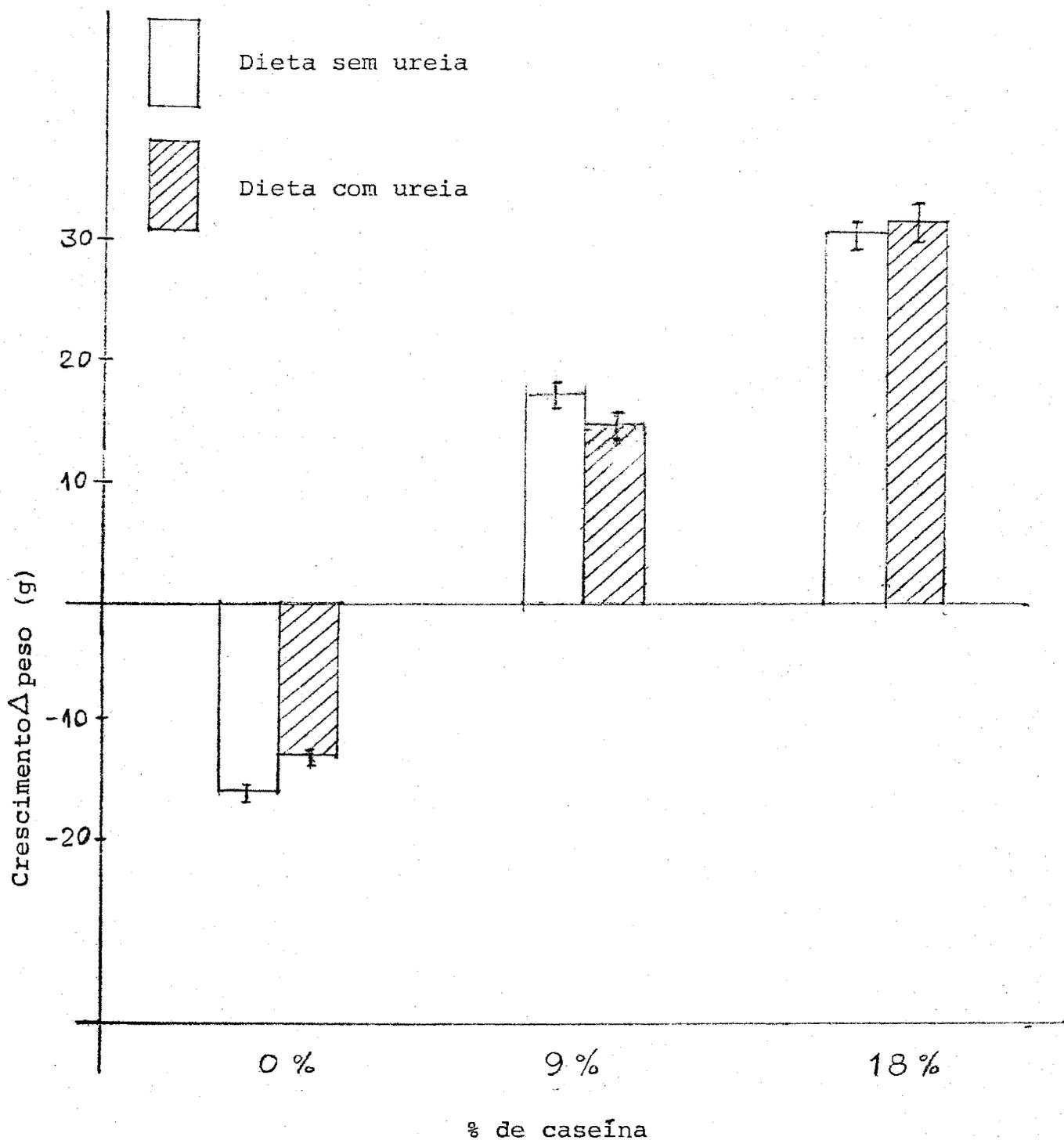


Fig. 1. Crescimento dos ratos em diferenças de peso (g) em função das dietas, em 14 dias.

2.2. Efeito sobre a ingestão do alimento

Quanto à ingestão do alimento houve uma certa preferência para as dietas suplementadas com ureia (Tabela 2). Sendo significativo o valor entre as dietas sem caseína com ureia e sem caseína e sem ureia ($P < -0,01$).

O consumo cotidiano do alimento foi mais importante nos ratos mantidos com dieta suplementada com ureia. Em função do tempo, a ingestão do alimento diminuiu nos animais com dieta livre de proteínas (Tabela 3).

2.3. Efeito sobre o peso relativo do fígado e a proteína hepática.

A resposta ao peso relativo do fígado nos animais alimentados com dieta purificada suplementada com ureia, só pareceu significativa ($p < -0,01$) na dieta sem caseína, em relação aos animais com dieta purificada sem ureia.

Entre os animais alimentados com as dietas purificadas suplementadas com ureia, observa-se um aumento gradativo do peso relativo do fígado quando a quantidade de caseína decresce na dieta. Isto não se observa em relação à proteína total hepática destes animais, considerando o peso relativo do fígado.

2.4. Efeito sobre o peso relativo do rim e da proteína renal.

O peso relativo do rim diminui gradativamente, de acordo com a quantidade de proteína da dieta, entretanto não ocorreu o mesmo quando as dietas com concentrações proteicas diferentes foram suplementadas com ureia.

Os níveis de proteína renal total são sempre maiores nos animais alimentados com dieta purificada suplementada com ureia.

Foi feita análise da variância para cada parâmetro, peso do animal, peso do fígado, peso do rim, ingestão de alimento, concentração de proteína no fígado e no rim. A significância de diferenças entre os grupos individuais foi determinada pelo teste padrão de Student.

TABELA 2

Efeito da suplementação de ureia à dieta purificada sobre o crescimento, ingestão de alimento, peso relativo do fígado e do rim, proteína hepática e proteína renal, em rato, durante 14 dias.

Dieta	Δ Peso g	Ingestão de alimento g/dia	p.r.f. (1) g	p.r.r (2) g	Proteína hepática mg/g de te- cido úmido	total mg/fígado	Proteína renal mg/g de te- cido úmido	total mg/rins
caseína 18%	+31,42±1,50 (15) ⁽³⁾	11,05±0,35 ⁽⁴⁾	5,01±0,15	1,32±0,03	203,0±4,08	1064,09	127,4±2,71	168,1
caseína 18% + ureia	+31,76±2,47 (7)	11,37±0,68	4,98±0,08	1,35±0,02	198,9±8,53	996,86	142,6±4,62	192,5
caseína 9%	+18,10±1,89 (4)	9,91±0,47	5,41±0,31	1,25±0,06	189,1±9,22	1023,3	140,3±2,82	175,4
caseína 9% + ureia	+14,56±2,24 (5)	11,16±0,40	5,31±0,27	1,42±0,04	182,0±5,41	966,4	133,7±5,23	189,8
caseína 0%	-15,66±0,95 (5)	5,98±0,57	4,73±0,29	1,21±0,05	173,4±6,95	499,85	110,6±4,70	133,8
caseína 0% + ureia	-12,96±0,73 (10)	8,02±0,13	5,73±0,19	1,32±0,09	165,6±3,84	580,57	125,0±2,48	165,0
Níveis de significância ⁽⁵⁾ , p menor do que								
caseína 18% x caseína 18% + ureia	ns	ns	ns	ns	ns		-0,01	
caseína 9% x caseína 9% + ureia	ns	ns	ns	-0,05	ns		ns	
caseína 0% x caseína 0% + ureia	ns	-0,01	-0,01	-0,001	ns		-0,05	

(1) peso umido do fígado (g) x 100/peso corporal(g)

(2) peso umido do rim (g) x 100/peso corporal(g)

(3) número de animais

(4) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(5) teste t de Student

TABELA 3

CONSUMO DE ALIMENTO (g/dia)

TIPO DE DIETA	DIAS DE DIETA		
	0	7	14
Caseína 18% (Controle)	11,02 (70)+0,22	10,25 (22) \pm 0,30	11,05 (15) \pm 0,35
Caseína 18% + ureia	-	10,16 (16) \pm 0,36	11,37 (7) \pm 0,68
Caseína 9%	-	11,65 (6) \pm 0,58	9,91 (6) \pm 0,47
Caseína 9% + ureia	-	11,75 (6) \pm 0,45	11,16 (6) \pm 0,40
Caseína 0%	-	8,68 (12) \pm 0,18	5,98 (6) \pm 0,57
Caseína 0% + ureia	-	10,59 (11) \pm 0,38	8,02 (11) \pm 0,13

Níveis de significância, p menor do que

Caseína 18% versus Caseína 18% + ureia	ns	ns
Caseína 9% versus Caseína 9% + ureia	ns	ns
Caseína 0% versus Caseína 0% + ureia	0,01	0,01

Os resultados são valores médios com seu erro padrão médio.

Entre parênteses: número de animais na experiência.

3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS

Como foi descrito em Material e Métodos, para cada enzima, foi determinada a linearidade da formação do produto da reação em função da concentração de proteínas e do tempo.

A maneira de expressar a atividade enzimática parece ser importante, num estudo sobre variações de sistemas enzimáticos.

Se observarmos a TABELA 4 encontramos uma uniformidade de resultados nos pesos dos fígados dos animais alimentados sem caseína se considerarmos o peso relativo do fígado, isto é, o peso do fígado em gramas multiplicado por 100 e dividido pelo peso do animal. O mesmo ocorre considerando-se os pesos relativos dos rins (Tabela 5).

TABELA 4

Peso (g) de fígado e de rins de ratos alimentados com dieta livre de proteínas, durante 14 dias

Ratos	peso (g)	fígado (g)	peso relativo do fígado (g)	rins (g)	peso relativo dos rins (g)
1	59,6	3,00	5,03	0,66	1,11
2	67,0	2,91	4,34	0,74	1,10
3	57,1	2,67	4,67	0,75	1,31
4	58,5	3,09	5,28	0,69	1,18
5	64,2	2,78	4,33	0,66	1,03

TABELA 5

Peso (g) de fígado e de rins de ratos alimentados com dieta normoprotéica (18% de caseína), durante 14 dias

Ratos	peso (g)	fígado (g)	peso relativo do fígado (g)	rins (g)	peso relativo dos rins (g)
1	115,3	5,46	4,73	1,58	1,37
2	115,4	4,91	4,25	1,51	1,31
3	116,2	5,60	4,81	1,55	1,33
4	127,6	6,59	5,17	1,74	1,36
5	117,7	5,46	4,64	1,64	1,39

3.1. Carbamila fosfato sintetase I EC-2.7.2.2a

As misturas de incubação desproteinizadas no tempo zero e aquelas incubadas na ausência de N-acetilglutamato não produziram citrulina.

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 6 há diferenças significativas na atividade da enzima quando as dietas com proteínas a 9% ($P < 0,01$) e sem proteínas ($P < 0,05$) são suplementadas com ureia, o que não ocorreu quando a dieta continha 18% de proteínas. O efeito da concentração de proteínas sobre a atividade da enzima foi aquele já observado por outros pesquisadores. A enzima é adaptativa com respeito à carga de proteínas. (Figura 2).

3.2. L-ornitina transvarbamilase EC-2.1.3.3.

(TABELA 7) Embora fosse observada uma maior atividade nas dietas com proteínas suplementadas com ureia, esta não foi significativa estatisticamente. Mas, a dieta livre de proteínas, a atividade diminuiu ($P < 0,01$). Pode se observar também que com as dietas a 9% e 0% de caseína a diferença na atividade da enzima não é significativa (Figura 2). A atividade da enzima diminuiu em função do tempo da dieta, quando esta foi livre de proteínas (Figura 3) (Tabela 13).

3.3. Arginina-succinato, sintetase EC-6.3.4.5

Várias tentativas foram feitas para a determinação da atividade da enzima. Os pesquisadores não estão de acordo com a técnica de dosagem. Os resultados encontrados com a técnica eleita não são muito convincentes e preferimos omití-los.

3.4. Arginina succinato liase EC-4.3.2.1

Considerando os resultados em unidades enzimáticas por fígado de rato, encontramos uma queda na atividade da enzima de acordo com a concentração de proteínas na dieta. A suplementação de ureia nas dietas só foi significativa quando a dieta não continha proteínas (Figura 2). (TABELA 8).

3.5. L-arginase EC-3.5.3.1

(TABELA 9) Não houve diferenças significativas na atividade da L-arginase com suplementação de ureia às dietas, embora a atividade tenha diminuído, de um modo geral. Quanto à atividade de acordo com a concentração de proteínas, foram confirmados os resultados já obtidos por outros autores (Figura 2). A atividade da enzima em função do tempo, aumentou na primeira semana para depois diminuir nas dietas livre de proteínas e na dieta com proteína suplementada com ureia (Figura 3) (Tabela 14).

3.6. L-glutamato desidrogenase EC-1.4.1.3

A enzima mostrou um aumento na atividade nas dietas com 9% e 0% de caseína suplementadas com ureia. Quanto à concentração de proteínas houve diferença significativa não considerando os resultados de unidades enzimáticas por mg de proteínas (Figura 2), (TABELA 10).

3.7. L-glutamato oxaloacetato amino transferase EC-2.6.1.10

Não houve diferença na atividade das enzimas quando adicionamos ureia às dietas. Quanto à concentração de proteínas nas dietas, observamos uma diferença significativa entre as dietas com proteínas e sem proteínas. ($P < 0,01$) (Figura 2), (TABELA 11).

3.8. L-glutamato piruvato amino transferase EC-2.6.1.12

(TABELA 12) Esta amino transferase foi mais sensível à concentração de proteínas na dieta. Houve diminuição da atividade enzimática com a suplementação de ureia às dietas, sendo esta bastante evidente na dieta sem caseína ($p < 0,01$) (Figura 2). A atividade da enzima diminuiu em função do tempo da dieta quando esta foi livre de proteínas (Figura 3) (Tabela 15).

3.9. Urease EC-3.5.1.5

Em homogeneizados de fígado e de rim os testes de controle, revelaram amônia endogena, nas concentrações de 6,48 micromóis e 7,77 micromóis, respectivamente, Não se observou atividade

ureásica em nenhum dos homogeneizados de fígado e de rim dos ratos alimentados com as diferentes dietas.

Em homogeneizados da mucosa gástrica, os testes de controle foram praticamente nulos, não detectando-se amônia endógena. Atividade ureásica, nas diferentes dietas, não foi revelada.

Em homogeneizado de mucosa intestinal, também os resultados foram negativos quanto à atividade ureásica.

Efeito da concentração de proteínas da dieta e efeito da suplementação de ureia à dieta, sobre a atividade das enzimas no fígado de rato.

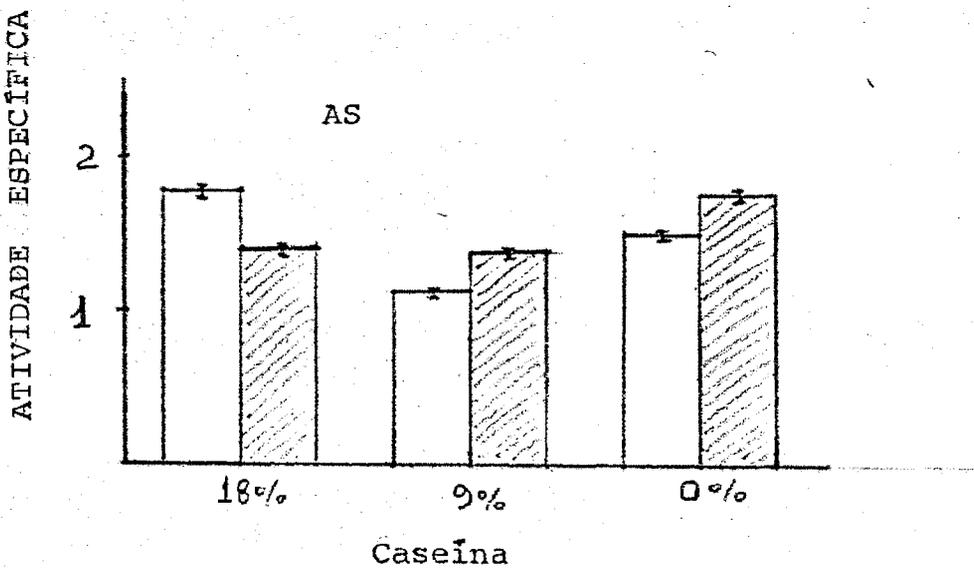
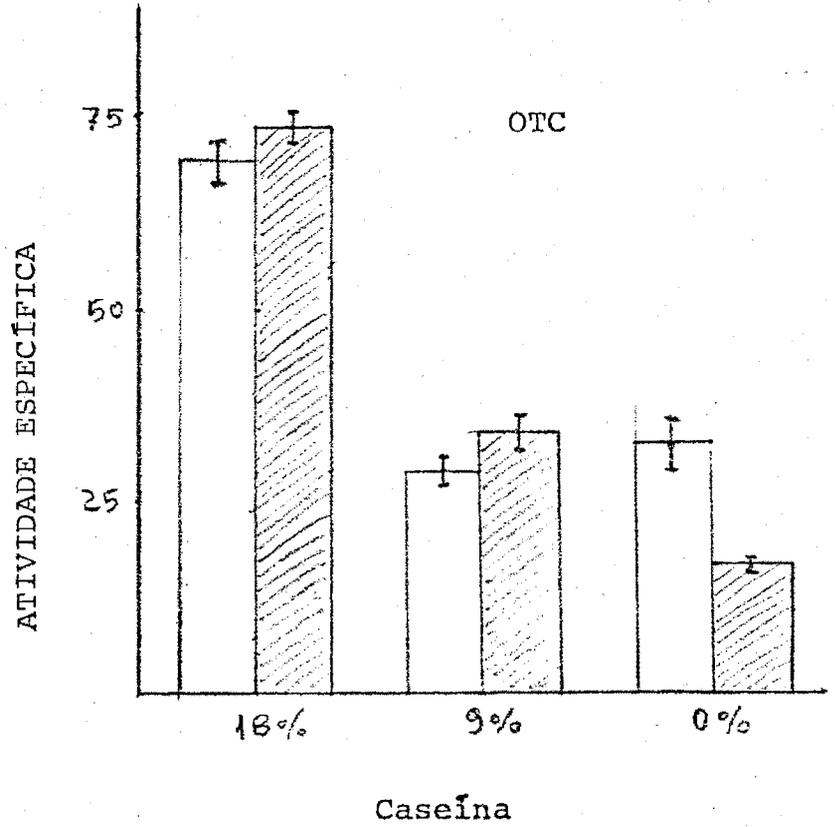
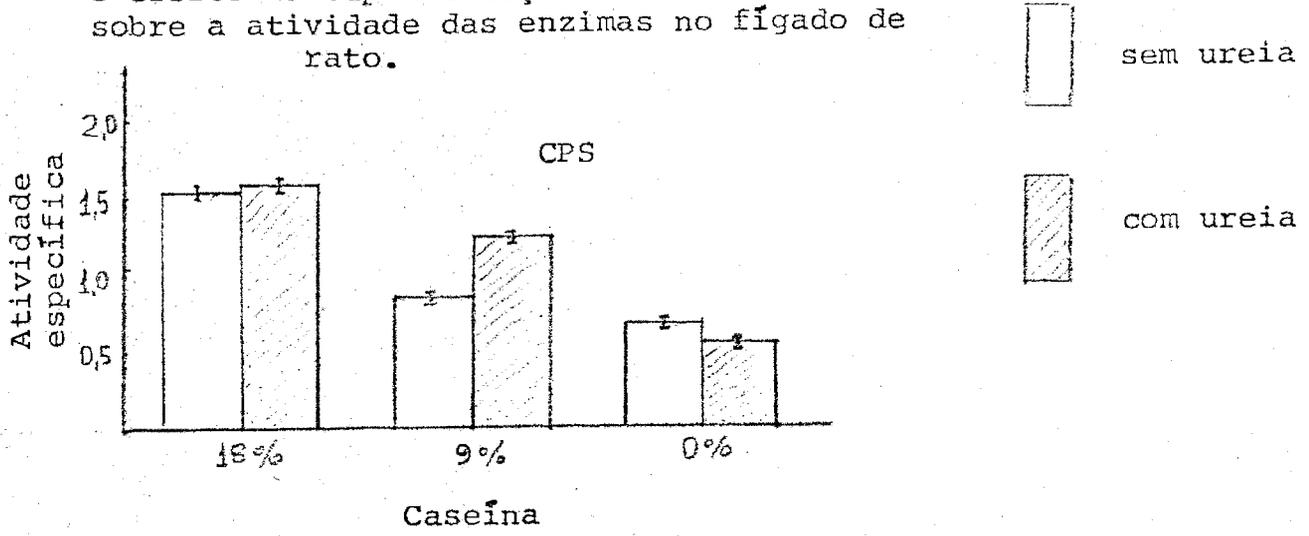


Figura 2

ATIVIDADE ESPECÍFICA

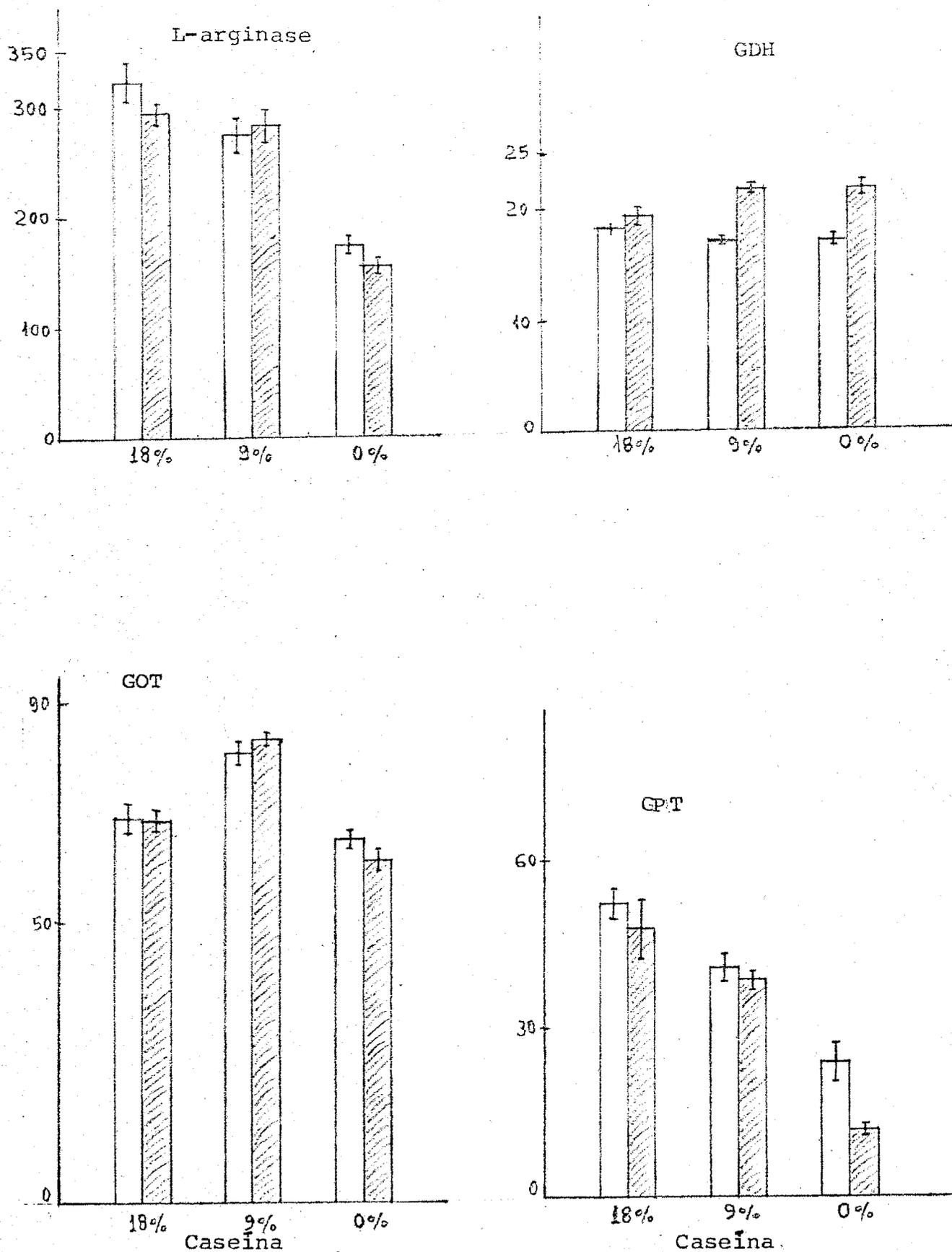


Figura 2. Atividades das enzimas no fígado de ratos durante 14 dias (TABELAS 6,7,8,9,10,11 e 12). Atividade específica é dada como o número de unidades por miligrama de proteína.

TABELA 6

Resposta da atividade da carbamila fosfato sintetase I (EC-2,7.2.2a - ATP: carbamato fosfotransferase) de homogeneizados de fígado de rato a mudanças na dieta com suplementação de ureia⁽¹⁾.

Dieta	UE ⁽²⁾ / g de tecido úmido	UE/ fígado	UE/ peso relativo do fígado ⁽³⁾	UE/ mg de proteína
caseína 18% (12) (4)	326± 8 ⁽⁵⁾	1566±74	1587±53	1,52±0,01
caseína 18% + ureia (11)	325±21	1639±103	1570±95	1,59±0,08
caseína 9% (6)	170±14	829±32	877±52	0,87±0,07
caseína 9% + ureia (6)	222±17	1041±55	1242±101	1,27±0,04
caseína 0% (12)	118±6	345±10	627±27	0,67±0,02
caseína 0% + ureia (11)	92±8	321±18	529±31	0,56±0,05

Níveis de significância⁽⁶⁾, p. menor do que

caseína 18% x caseína 18% + ureia	ns	ns	ns	ns
caseína 9% x caseína 9% + ureia	-0,05	-0,01	-0,01	-0,01
caseína 0% x caseína 0% + ureia	0,05	ns	0,05	0,05
caseína 18% x caseína 0%	0,001	0,001	0,001	0,001

(1) tempo da dieta - 14 dias

(2) UE - Uma unidade enzimática representa um micromol de produto formado por hora nas condições do ensaio.

(3) peso úmido do fígado(g) x 100/peso corporal(g)

(4) número dos animais

(5) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(6) teste t de Student.

TABELA 7

Resposta da atividade da L-ornitina carbamila transferase (EC-2.1.3.3) de homogeneizados de fígado de rato a mudanças na dieta, com suplementação de ureia⁽¹⁾.

Atividade Enzimática				
	UE ⁽²⁾ /g de tecido úmido	UE/fígado	UE/peso relativo do fígado (3)	UE/mg de proteína
	$\times 10^2$	$\times 10^2$	$\times 10^2$	
Caseína 18% (14) (4)	118,6 \pm 5,7 (5)	608,9 \pm 43,0	598,2 \pm 34,3	61,95 \pm 2,95
Caseína 18% + ureia (10)	143,9 \pm 7,5	735,1 \pm 49,1	696,2 \pm 33,3	70,37 \pm 2,08
Caseína 9% (6)	54,0 \pm 3,6	200,3 \pm 35,8	294,2 \pm 16,9	28,33 \pm 2,18
Caseína 9% + ureia (6)	61,6 \pm 5,1	291,8 \pm 29,0	333,6 \pm 26,2	33,65 \pm 2,57
Caseína 0% (6)	64,5 \pm 7,2	174,0 \pm 14,4	332,8 \pm 26,7	32,71 \pm 3,30
Caseína 0% + ureia (11)	27,0 \pm 1,6	90,2 \pm 5,1	151,6 \pm 9,1	16,25 \pm 0,8
Níveis de significância ⁽⁶⁾ , p menor do que				
Caseína 18% X Caseína 18% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 9% X Caseína 9% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 0% X Caseína 0% + ureia	0,01	0,01	0,01	0,01
Caseína 18% X Caseína 0%	0,01	0,01	0,01	0,01

(1) tempo da dieta - 14 dias

(2) UE - uma unidade enzimática representa um micromol de produto formado por hora nas condições do ensaio

(3) peso do fígado (g) x 100/peso corporal (g)

(4) número de animais

(5) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(6) teste t de Student.

TABELA 8

Resposta da atividade da L-arginina succinato liase (EC 4.3.2.1) de homogeneizados de fígado de rato e mudanças de dieta suplementada com ureia⁽¹⁾.

Dieta	Atividade Enzimática			
	UE ⁽²⁾ / g de tecido úmido	UE/ fígado	UE/peso re- lativo do fígado(3)	UE/ mg de proteí- na
Caseína 18% (12) (4)	383,0±20,0 ⁽⁵⁾	1833,0±113,4	1885,2±112,4	1,78±0,10
Caseína 18% + ureia (12)	253,9±17,2	1420,4±70,4	1371,2±60,3	1,41±0,10
Caseína 9%(6)	217,7±13,7	1152,4±89,5	1212,3±67,0	1,14±0,06
Caseína 9% + ureia(6)	252,0±13,7	1185,8±50,2	1335,8±55,2	1,38±0,06
Caseína 0%(6)	284,9±19,8	827,0±79,8	1581,0±148,5	1,52±0,11
Caseína 0% + ureia(6)	299,6±15,8	1097,7±58,7	1802,8±114,5	1,76±0,10
Níveis de significância ⁽⁶⁾ , p menor do que				
Caseína 18% x Caseína 18% + ureia	0,01	0,01	0,01	0,05
Caseína 9% x Caseína 9% + ureia	ns	ns	ns	-0,05
Caseína 0% x Caseína 0% + ureia	ns	-0,05	ns	ns
Caseína 18% x Caseína 0%	0,01	0,01	ns	ns

(1) tempo de dieta - 14 dias

(2) UE - uma unidade enzimática representa um micromol de produto formado por hora nas condições do ensaio

(3) peso do fígado(g) x 100/peso corporal(g)

(4) número de animais

(5) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(6) teste t de Student

TABELA 9

Resposta da atividade da L-arginase (EC-3.5.3.1 L-arginina ureia hidrolase) em homogeneizados de fígado de rato a mudanças de dieta suplementada com ureia⁽¹⁾

Dieta	Atividade enzimática			
	UE ⁽²⁾ /g de tecido úmido	UE/fígado	UE/peso re- lativo do fígado (3)	UE/mg de proteína
	x 10 ³	x 10 ³	x 10 ³	
Caseína 18% (15) (4)	65,8±3,1	368,1±14,1	312,1±16,4	322,66±18,57
Caseína 18% + ureia (7)	58,4±3,2	332,6±27,7	295,5±13,3	293,69±10,63
Caseína 9% (4)	51,4±3,7	264,2±17,1	279,6±21,8	272,70±16,69
Caseína 9% + ureia (5)	51,5±3,8	252,0±12,7	271,8±20,1	281,92±15,48
Caseína 0% (5)	30,0±2,5	86,3± 6,2	140,2± 7,0	172,28± 8,23
Caseína 0% + ureia (10)	25,4±0,9	88,9± 3,8	145,4± 5,6	154,54± 6,99
Níveis de significância ⁽⁶⁾ , p menor do que.				
Caseína 18% X Caseína 18% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 9% X Caseína 9% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 0% X Caseína 0% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 18% X Caseína 0%	0,01	0,01	0,001	0,01

(1) tempo de dieta - 14 dias

(2) UE-uma unidade enzimática representa um micromol de produto formado por hora nas condições de ensaio

(3) peso do fígado (g) x 100/peso corporal (g)

(4) número de animais

(5) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(6) teste t de Student

TABELA 10

Resposta da atividade da L-glutamato desidrogenase (EC-1.4.1.3 L-glutamato NAD⁺ (P) oxidoreductase) de homogeneizados de fígado de rato a mudanças de dieta suplementada com ureia⁽¹⁾.

Dieta	Atividade enzimática			
	UE ⁽²⁾ /g de tecido úmido	UE/fígado	UE/peso relativo do fígado (3)	UE/mg de proteína
	x 10 ²	x 10 ²	x 10 ²	
X Caseína 18% (9) (4)	37,9± 1,7 (5)	198,0± 7,7	186,3± 8,2	18,27±0,94
Caseína 18% + ureia (5)	35,8± 2,7	186,6±16,1	173,5±11,9	19,56±1,51
X Caseína 9% (6)	32,8± 0,4	175,2±13,7	183,4± 2,9	17,20±0,47
Caseína 9% + ureia (6)	39,9± 2,8	187,5± 9,4	211,3±10,5	21,84±1,20
X Caseína 0% (12)	29,8± 1,5	88,0± 4,6	158,1± 6,9	17,10±1,01
Caseína 0% + ureia (5)	35,2± 1,6	116,0± 8,9	191,7±13,6	21,83±1,69
Níveis de significância ⁽⁶⁾ , p menor do que				
Caseína 18% X Caseína 18% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 9% X Caseína 9% + ureia	-0,05	ns	-0,05	-0,05
Caseína 0% X Caseína 0% + ureia	ns	-0,01	-0,05	-0,05
Caseína 18% X Caseína 0%	0,01	0,01	0,05	ns

(1) tempo de dieta - 14 dias

(2) UE - uma unidade enzimática representa um micromol de produto formado por hora nas condições de ensaio

(3) peso do fígado (g) x 100/peso corporal (g)

(4) número de animais

(5) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(6) teste t de Student

TABELA 11

Resposta da atividade da L-glutamato-oxaloacetato aminotransferase (EC-2.6.1.10) de homogeneizados de fígado de rato a mudanças de dieta suplementada com ureia⁽¹⁾

Dieta	Atividade enzimática			
	UE ⁽²⁾ /g de tecido úmido	UE/fígado	UE/peso relativo do fígado (3)	UE/mg de proteína
	X 10 ³	X 10 ³	X 10 ³	
Caseína 18% (16) (4)	14,8±0,4 (5)	74,6±3,9	63,3±3,5	69,80±2,90
Caseína 18% + ureia (10)	14,0±0,4	71,6±3,7	67,8±1,9	69,26±1,98
Caseína 9% (6)	15,5±0,4	82,3±5,7	83,2±5,2	81,10±2,21
Caseína 9% + ureia (6)	15,2±0,4	72,0±3,9	81,1±4,0	83,28±1,29
Caseína 0% (12)	11,5±0,3	33,8±1,4	60,9±1,9	65,35±1,76
Caseína 0% + ureia (11)	10,2±0,4	36,0±1,5	59,2±2,2	61,96±2,03

Níveis de significância⁽⁶⁾, p menor do que

Caseína 18% X Caseína 18% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 9% X Caseína 9% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 0% X Caseína 0% + ureia	0,05	ns	ns	ns
Caseína 18% X Caseína 0%	0,01	0,01	0,01	ns

(1) tempo de dieta - 14 dias

(2) UE-uma unidade enzimática representa um micromol de produto formado por hora nas condições de ensaio

(3) peso do fígado (g) x 100/peso corporal (g)

(4) número de animais

(5) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(6) teste t de Student

TABELA 12

Resposta da atividade da L-glutamato piruvato aminotransferase (EC-2.6.1.12) de homogeneizados de fígado de rato a mudanças na dieta com suplementação de ureia⁽¹⁾.

Dieta	Atividade enzimática			
	UE ⁽²⁾ /g de tecido úmido	UE/fígado	UE/peso relativo do fígado (3)	UE/mg de proteína
	x 10 ²	x 10 ²	x 10 ²	
Caseína 18% (8) (4)	111,9±7,3 (5)	575,0±29,4	543,9±36,1	53,10±3,02
Caseína 18% + ureia (10)	95,9±8,0	481,8±36,2	464,1±39,7	48,50±5,31
Caseína 9% (4)	75,3±1,4	389,2±25,9	409,6±20,1	40,17±2,42
Caseína 9% + ureia (5)	71,4±4,5	350,9±21,7	379,6±33,6	39,07±1,51
Caseína 0% (5)	46,5±5,9	128,8±19,6	241,7±29,2	24,34±3,45
Caseína 0% + ureia (5)	20,7±1,7	77,7±6,5	127,7±12,51	12,36±1
Níveis de significância ⁽⁶⁾ , p menor do que				
Caseína 18% X Caseína 18% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 9% X Caseína 9% + ureia	ns	ns	ns	ns
Caseína 0% X Caseína 0% + ureia	0,01	0,05	0,01	0,01
Caseína 18% X Caseína 0%	0,01	0,01	0,01	0,01

(1) tempo da dieta - 14 dias

(2) UE-uma unidade enzimática representa um micromol de produto formado por hora nas condições de ensaio

(3) peso do fígado (g) x 100/peso corporal (g)

(4) número de animais

(5) os resultados são valores médios com seus erros padrões

(6) teste t de Student

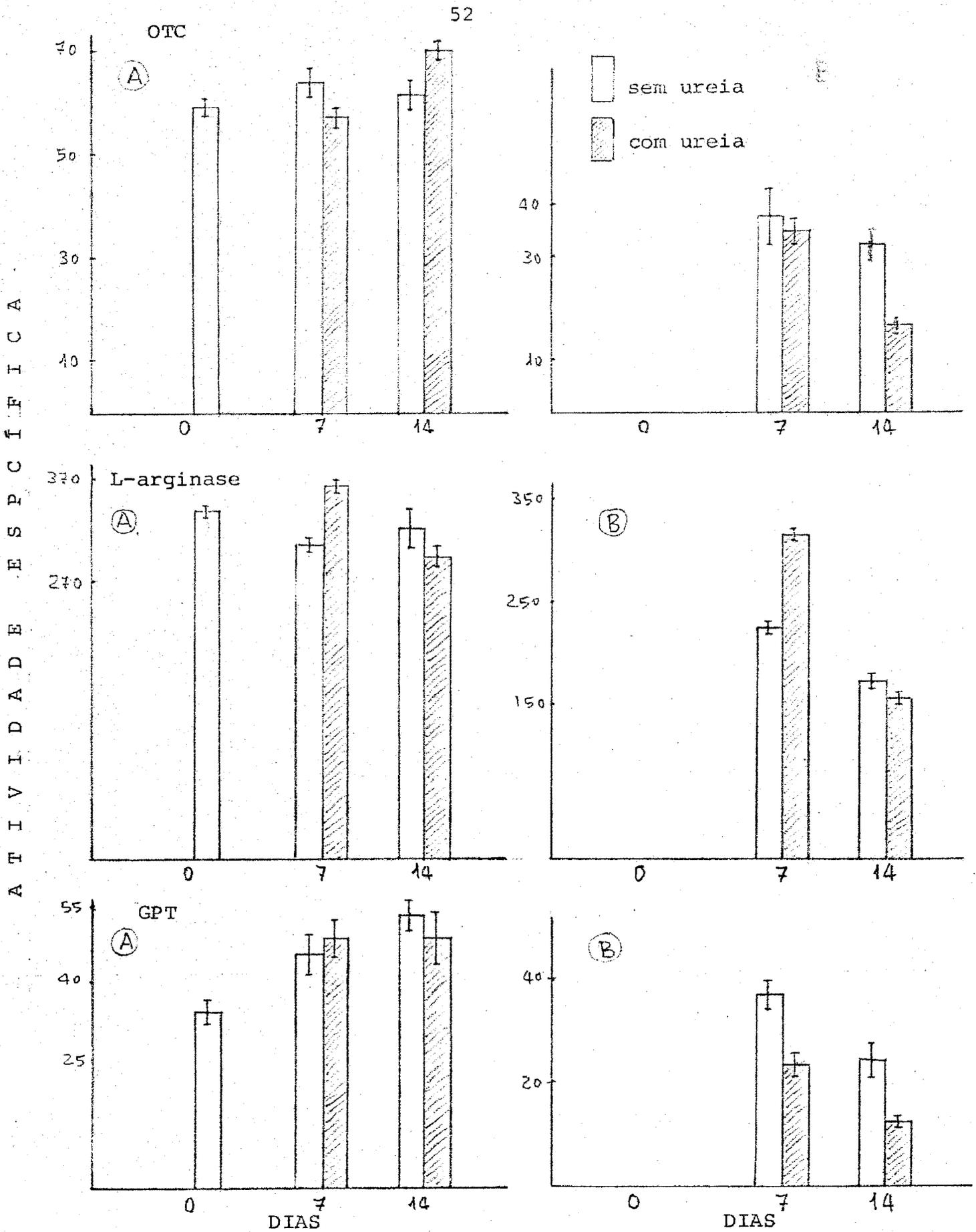


Figura 3. Atividades específicas da OTC, L-arg e GPT no fígado de ratos em função do tempo da dieta.

A) dieta com 18% de caseína e dieta com 18% de caseína suplementada com ureia;

B) dieta com 0% de caseína versus dieta com 0% de caseína suplementada com ureia.

Unidades enzimáticas são expressas por miligrama de proteínas. Veja tabelas 13, 14 e 15.

TABELA 13

Resposta da atividade da L-ornitina transcarbamilase de fígado de rato, a mudanças na dieta, em função do tempo.

Dieta	Tempo em dias		
	0	7	14
Caseína 18%	60,34* \pm 1,8(8)**	64,57 \pm 3,01(6)	61,95 \pm 2,95(14)
Caseína 18% + ureia	-	57,93 \pm 2,10(6)	70,37 \pm 2,08(10)
Caseína 0%	-	38,09 \pm 5,71(6)	32,71 \pm 3,30(6)
Caseína 0% + ureia	-	35,25 \pm 2,76(6)	16,86 \pm 0,87(11)
Níveis de significância, p*** menor do que			
Caseína 18%			
x		ns	ns
Caseína 18% + ureia			
Caseína 0%			
x		ns	0,01
Caseína 0% + ureia			

Os resultados são valores médios com seus erros padrões.

* Unidades enzimáticas - micromóis de produto formado por g de tecido úmido, por hora, por mg de proteína.

** Número de animais

*** Teste t de Student

TABELA 14

Resposta da atividade* da L-arginase de fígado de rato a mudanças, na dieta, em função do tempo.

Dieta	Tempo em dias		
	0	7	14
Caseína 18%	340,0 \pm 6,4(3) **	318,35 \pm 7,20(3)	322,66 \pm 18,57(15)
Caseína 18% + ureia	-	363,29 \pm 6,85(5)	293,69 \pm 10,63(7)
Caseína 0%	-	225,30 \pm 7,82(6)	172,28 \pm 8,23(5)
Caseína 0% + ureia	-	315,4 \pm 6,45(6)	154,54 \pm 6,99(10)

Níveis de significância, p^{***} menor do que

Caseína 18%		
x	ns	ns
Caseína 18% + ureia		
Caseína 0%		
x	0,05	0,05
Caseína 0% + ureia		

Os resultados são valores médios com seus erros padrões.

* Unidades enzimáticas - micromóis de produto formado por g de tecido úmido, por hora, por mg de proteína.

** Número de animais

*** Teste t de Student

TABELA 15

Resposta da atividade da L-glutamato: piruvato aminotransferase de fígado de rato, a mudanças na dieta, em função do tempo

Dieta	Tempo em dias		
	0	7	14
Caseína 18%	34,54±2,4(8)	45,51±4,20(3)	53,10±3,02(8)
Caseína 18% + ureia	-	48,65±3,80(4)	48,50±5,31(10)
Caseína 0%	-	36,98±2,82(6)	24,34±3,45(5)
Caseína 0% + ureia	-	23,02±2,30(6)	12,36±1,10(5)

Níveis de significância, p menor do que

Caseína 18%

x

ns

ns

Caseína 18% + ureia

Caseína 0%

x

0,05

0,01

Caseína 0% + ureia

Os resultados são valores médios com seus erros padrões

* Unidades enzimáticas - micromóis de produto formado por g de tecido úmido, por hora, por mg de proteína.

** Número de animais

*** Teste t de Student

É interessante observar, para cada enzima, as várias expressões de atividade enzimática, considerando os níveis enzimáticos correspondentes à dieta purificada com 18% de caseína como 100% de atividade. (Figura 4)

TABELA 16

Níveis enzimáticos em fígado de ratos alimentados com dieta purificada com caseína a 9%.

Enzima	UE/g de tecido úmido *	UE/fígado	UE/prf	UE/mg de proteína
CPS	52,36	52,93	55,27	56,80
OTC	45,53	47,68	49,18	45,73
AS	56,83	62,87	64,31	64,04
L-arg	78,25	71,78	89,59	84,52
GPT	67,25	67,69	75,31	75,65
GOT	104,50	110,31	131,42	116,19
GDH	86,59	88,50	98,49	94,14

(*) % da atividade enzimática

TABELA 17

Níveis enzimáticos em fígado de ratos alimentados com dieta purificada com caseína 0%

Enzima	UE/g de tecido úmido *	UE/fígado	UE/prf	UE/mg de proteína
CPS	36,40	22,05	37,50	44,08
OTC	54,45	28,57	55,64	52,80
AS	74,37	45,12	83,86	85,39
L-arg	45,69	23,45	44,94	53,39
GPT	41,53	22,40	44,45	45,84
GOT	77,49	45,90	96,12	93,62
GDH	78,67	44,46	84,88	93,60

(*) % de atividade enzimática

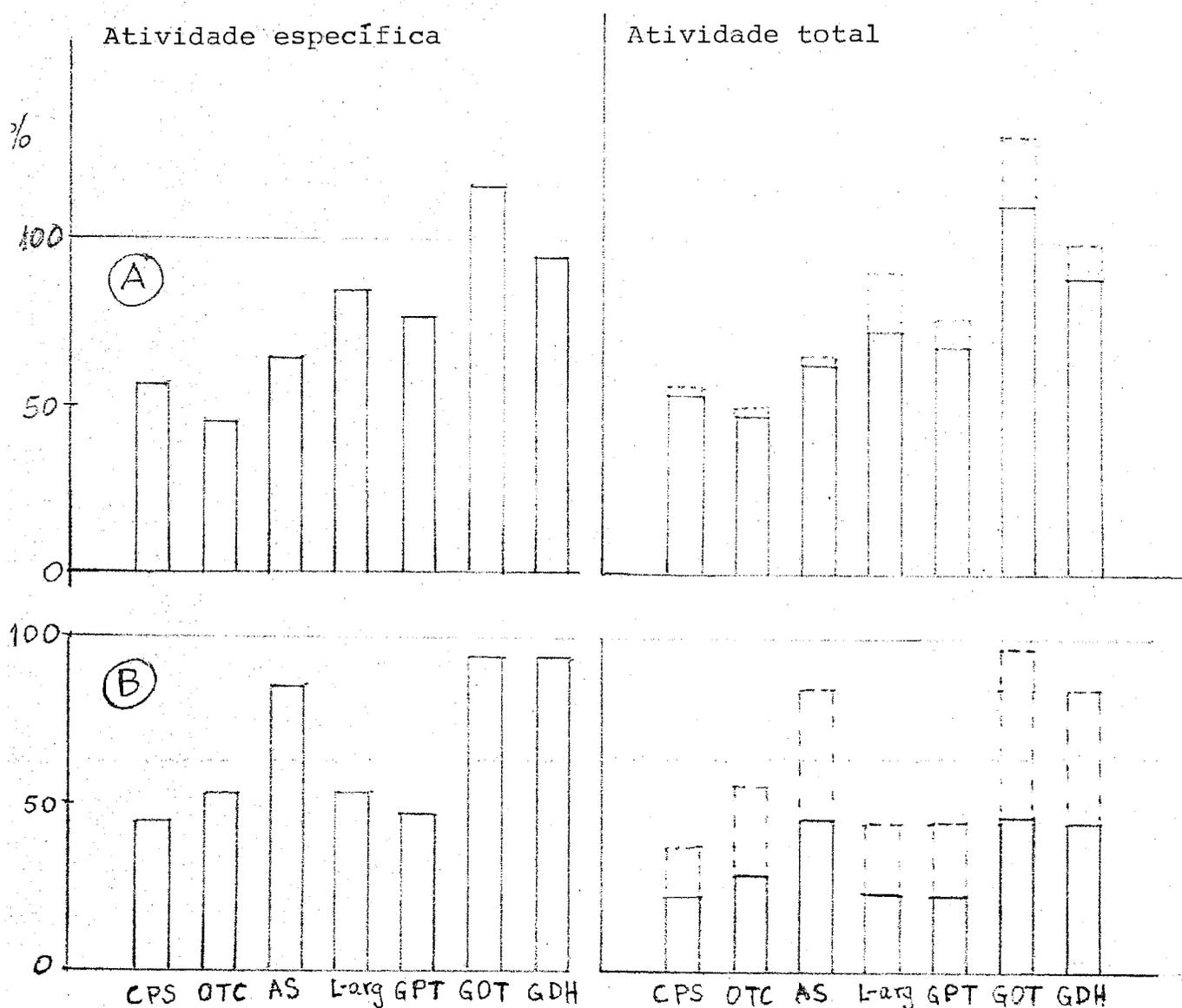


Figura 4. Atividades das enzimas no fígado de ratos durante 14 dias de dieta. (A) ratos alimentados com dieta com 9% de caseína (Tabela 6), e (B) alimentados com dieta livre de proteínas (Tabela 7). As atividades das enzimas estão representadas como valores relativos com parados com as atividades encontradas em fígado de ratos alimentados com dieta contendo 18% de caseína. As linhas interrompidas representam os valores das unidades por peso relativo do fígado. Atividade específica define unidade enzimática por miligrama de proteínas. Atividade total define unidade enzimática por peso (g) do fígado.

TABELA 18

Níveis enzimáticos em ratos alimentados com dieta purificada com caseína a 18% suplementada com ureia*

Enzima	UE**/g de tecido úmido	UE**/fígado	UE**/prf	UE**/mg de proteína
CPS	99,85	104,64	98,89	103,92
OTC	121,33	120,72	116,37	113,59
AS	66,29	77,49	72,74	79,21
L-arg	88,85	90,34	94,68	91,02
GPT	85,67	83,79	85,32	91,34
GOT	94,42	95,90	107,09	99,23
GDH	94,30	94,24	93,16	107,06

* Dieta purificada, caseína 18% - 100% de atividade

** % de atividade enzimática

TABELA 19

Níveis enzimáticos em ratos alimentados com dieta purificada com caseína a 9% suplementada com ureia*

Enzima	UE**/g de tecido úmido	UE**/fígado	UE**/prf	UE**/mg de proteína
CPS	130,43	125,54	141,54	145,98
OTC	114,07	100,50	113,37	118,78
AS	115,79	102,90	110,19	121,05
L-arg	100,10	95,36	97,18	103,38
GPT	94,84	90,15	92,67	97,26
GOT	98,02	87,51	97,14	102,69
GDH	121,41	101,32	115,20	126,98

* Dieta purificada com 9% de caseína considerada 100% de atividade

** % de atividade enzimática

TABELA 20

Níveis enzimáticos em ratos alimentados com dieta purificada com caseína a 0% suplementada com ureia *

Enzimas	UE**/g de tecido úmido	UE/ fígado	UE/ prf	UE/mg de proteína
CPS	78,19	93,00	84,33	83,58
OTC	41,84	51,87	45,57	49,68
AS	105,18	132,73	114,03	115,79
L-arg	84,67	103,00	103,69	89,70
GPT	44,65	60,35	52,83	50,78
GOT	88,88	106,45	97,21	94,81
GDH	117,89	131,87	121,26	127,66

* Dieta purificada, caseína 0% - 100% de atividade

** % de atividade enzimática.

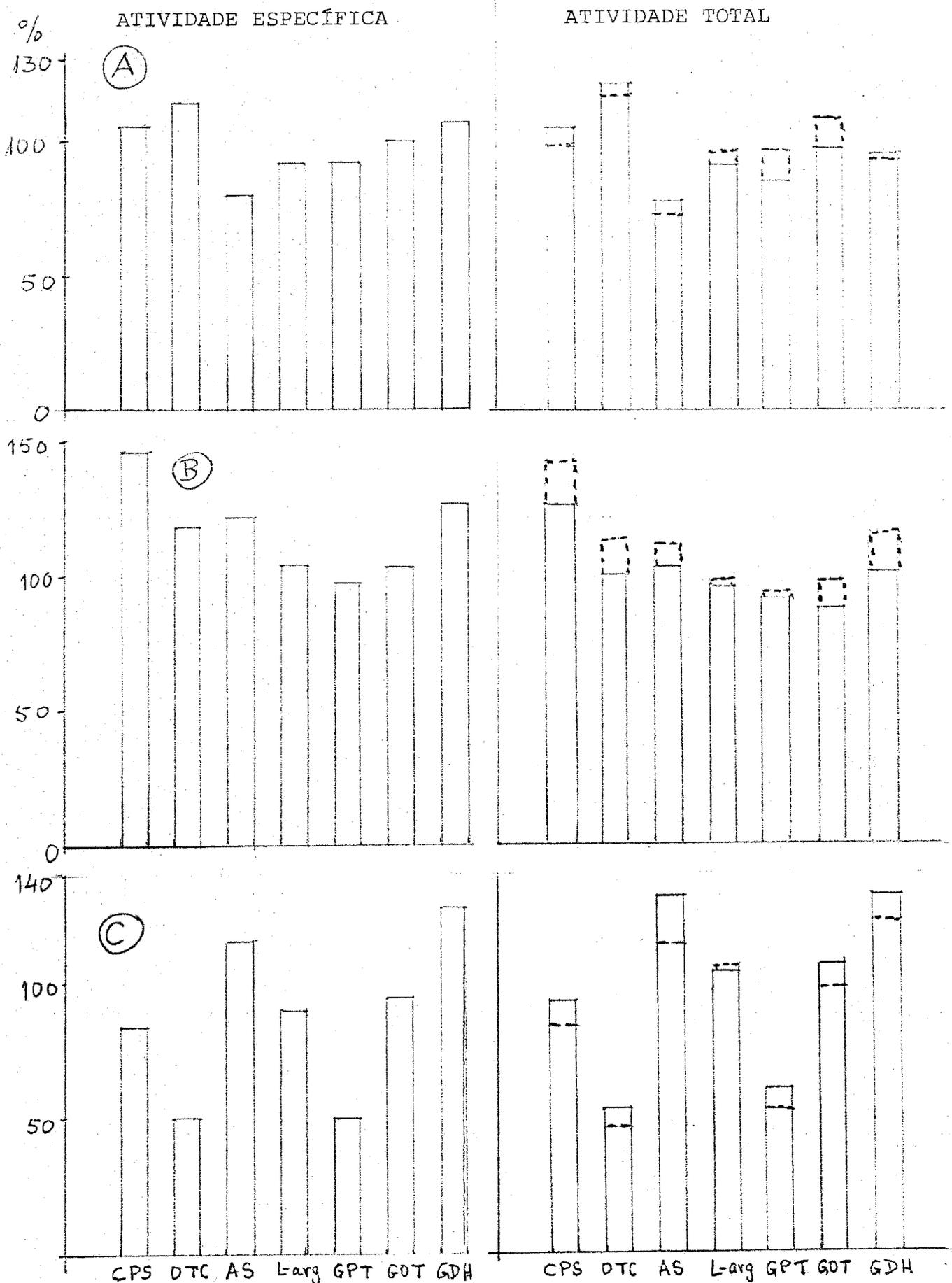


Fig. 5. Atividades das enzimas são expressas em seus valores relativos. A) valores relativos da atividade específica e valores relativos, atividade total, UE/fígado de ratos, alimentados com dieta com caseína a 18% suplementada com ureia (Tabela 18); B) os mesmos valores para ratos alimentados com dieta com caseína a 9% suplementada com ureia (Tabela 19); C) os mesmos valores para ratos alimentados com dieta livre de proteínas suplementada com ureia (Tabela 20). As linhas interrompidas representam valores de atividade total, considerando o peso relativo do fígado.

IV. DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam as experiências descritas na literatura sobre adaptação de enzimas por alterações nutricionais [Freedland & Harper (1957), Schimke (1962, 1962a) Rogers (1968) Mc Givan (1974) Das (1971) e Das & Waterlow (1974)].

A atividade das enzimas do ciclo da ureia diminuiu quando a concentração da proteína na dieta foi reduzida (fig. 2).

A atividade da AS e da OTC aumentou quando a dieta foi livre de proteínas não concordando com os resultados apresentados por Schimke (1962a).

Quanto às amino transferases, a GOT aumentou a atividade com a dieta a 9% de caseína (fig. 4). Cheek (1969) demonstrou um aumento na atividade da GOT com restrição proteica. A atividade observada para a GPT confirmou os estudos conhecidos de Rosen (1959), Muramatsu e Ashida (1962) e Peret (1974).

Quanto à atividade da GDH, não houve alteração significativa de acordo com a concentração de proteínas na dieta. Estes resultados estão de acordo com Schimke (1962).

Um paralelismo das alterações que ocorrem entre a velocidade e a extensão de mudanças na atividade das enzimas do ciclo da ureia e das enzimas relacionadas ao metabolismo nitrogenado (GDH, GOT e GPT) em fígado de ratos alimentados com dieta proteica e sem proteína, acrescida de ureia, não foi realizado em animais monogástricos. Nós observamos que a ureia adicionada a dietas de concentrações diferentes em proteínas e livre de proteínas ocasionou alterações na atividade das enzimas do ciclo da ureia, na atividade das aminotransferases estudadas e na atividade de GDH.

Nós observamos que a ureia adicionada a dietas de concentrações diferentes em proteínas e livre de proteínas ocasionou alterações na atividade das enzimas do ciclo da ureia, na atividade das aminotransferases estudadas e na atividade da GDH.

Quando a dieta continha 18% de caseína e ureia em concentração a 6,2%, que duplicou a concentração de nitrogênio, a atividade da AS foi modificada significativamente ($p < 0,01$). Schimke (1963) acrescentou 7,5% de ureia à dieta (caseína a 15%) para ratos e não observou alterações nos níveis das enzimas do ciclo da ureia. Entretanto quando Flores et alii (1962) adicionaram cloreto de amônia a 1,5% na água de beber, para ratos, houve uma queda na atividade da OTC e da arginina succinato sintetase (sistema completo: sintetase e liase).

Chalupa (1970) observou uma queda na atividade da CPS, OTC e L-arg., quando alimentou carneiros com ureia, e um aumento na atividade da AS e da arginina succinato sintetase, o que ocorreu também com as amino transferases, GPT e GOT, e com a atividade da GDH, cujos aumentos foram significativos.

A dieta com concentração reduzida de proteína e ureia a 6,2% ocasionou um aumento na atividade das enzimas do ciclo da ureia, sendo este aumento significativo para a CPS ($p < -0,01$) e a AS ($p < -0,05$) considerando a atividade específica (unidades enzimáticas por hora por miligrama de proteína). A atividade das amino transferases, GOT e GPT, não foram afetadas significativamente. A atividade da GDH aumentou de maneira significativa ($p < -0,05$).

A Carbamila fosfato pode inativar a GDH em condições fisiológicas. A atividade da CPS adapta-se à carga protéica, mas na dieta suplementada com ureia quando a proteína foi reduzida de 18% a 9%, a atividade da CPS aumentou, o que aliás, ocorreu com as enzimas estudadas, com exceção da GOT. Como a atividade da GDH é sensível à carbamila fosfato (Chabas & Grisolia, 1972) não parece ter havido inibição da GDH, pelo contrário, um aumento da atividade, pelo que a carbamila fosfato não deve ter sido acumulada (Fig. 4). Poderíamos pensar num aumento de quantidade de amônia que chega ao

fígado, produzida por ação da flora microbiana intestinal sobre a ureia, Wrong (1971).

A dieta livre de proteínas contendo ureia em concentração isonitrogênica à dieta com caseína a 18%, ocasionou alterações bastante interessantes na atividade das enzimas testadas. Observamos um aumento significativo da atividade da GDH ($p < -0,01$) e não significativo da AS, considerando atividade específica, mas um aumento significativo quando consideramos atividade total (unidade por fígado) ($p < -0,05$).

A atividade da CPS ($p < 0,05$), OTC ($p < 0,01$) e GOT ($p < 0,01$) foram significativamente diminuídas. Nestes resultados a atividade da flora microbiana parece não ser importante.

Observando a mudança na atividade das enzimas em função do tempo, citamos três enzimas que a nós pareceram importantes no comportamento da atividade (fig. 3). Após 7 dias de dieta a atividade da L-arginase aumentou nos fígados dos ratos alimentados com a dieta (caseína a 18%) contendo ureia (fig. 3 A). O mesmo fenômeno foi observado na atividade da enzima dos fígados dos ratos alimentados com a dieta livre de proteínas contendo ureia (fig. 3 B). No 14º dia, a atividade diminuiu, sem ser estatisticamente significativa.

Quanto à atividade da OTC, o fenômeno ocorrido nas mesmas condições de dieta foram opostos da L-arg na primeira semana.

Um novo mecanismo regulador foi verificado recentemente em *Saccharomyces cerevisiae* por Messenguy (1971): este organismo possui uma L-arginase que tem a propriedade de se ligar à OTC.

Esta ligação produz uma inibição na atividade da enzima. Nas experiências com *Torulopsis utilis* foi detectado um efeito inibidor da ureia sobre a L-arginase com um aumento dos níveis da L-arginina. Sabe-se que a ornitina em excesso é inibidora da atividade da OTC, inibição que é aumentada quando se coloca arginina no meio.

A necessidade exata de L-arginina para a síntese de proteínas dos mamíferos não é conhecida; Featherston et alii (1971) observaram que não é o fígado, mas o rim, que sintetiza a maior porção de L-arginina usada para a síntese de proteínas.

Os níveis enzimáticos da GPT foram bastante reduzidos - com 7 dias de dieta livre de proteínas contendo ureia. Prior et alii (1970) fizeram observações semelhantes em fígado de carneiro alimentado com ureia. A alanina é mais rapidamente metabolizada pelo fígado do que qualquer outro aminoácido. A principal etapa de seu catabolismo é a transaminação com alfa cetoglutarato, reação muito rápida em relação à síntese de proteínas (Krebs et alii, 1973). No décimo quarto dia de dieta livre de proteínas contendo ureia a queda da atividade foi reduzida a cinquenta por cento aproximadamente. Se observarmos a queda de atividade, em atividade total ela foi aproximadamente de 80% (fig.5).

Os valores de K_M das enzimas que iniciam a degradação dos aminoácidos são altos, de maneira que haverá catabolismo se houver uma sobrecarga. E o ciclo da ureia está relacionado à retirada "a mais" e naturalmente pode se pensar num controle da velocidade de síntese da ureia pela quantidade "a mais" de nitrogênio.

Deosthale & Tulpule (1969) em experiências com antibióticos, em ratos, afirma que observaram diferenças consideráveis na atividade da AS, uma diminuição maior ou menor conforme o antibiótico. A OTC aumentou a atividade, eles a consideraram limitante na síntese da ureia. A literatura consultada é quase unânime em afirmar que o sistema arginina sintetase deve ser a etapa limitante, Rähkä & Shihkonen (1968), Cohen (1970), entre outros.

Nossos resultados vieram trazer novos dados para interpretar o controle da síntese da ureia, mas há muitas condições a serem testadas. A necessidade para nitrogênio essencial e não essencial na dieta pode variar em diferentes estágios de crescimento (Munro, 1975). A idade dos animais nas experiências é muito importante [Charbonneau (1967), Robuge (1967)]. A adição de nitrogênio não específico a dietas pode criar um desequilíbrio nos aminoácidos que aumentam as concentrações no sangue.

Os resultados apresentados dão a entender que a ureia tem efeito sobre o metabolismo nitrogenado. Se houve metabolismo da ureia fornecendo grupos α amínicos com aumento da GDH e síntese de ácido glutâmico não podemos provar. Um novo mecanismo enzimático de aproveitamento do nitrogênio ureico foi revelado por Roon e Levenberg (1968) em *Candida Utilis*, por uma ATP-amidolase.

A redução da atividade da OTC e da GPT, enzima gluconeogênica, parece condizer com uma poupança de grupos alfa amínicos.

V. SUMÁRIO

1. Uma série de estudos foram realizados para esclarecer a natureza enzimática da alimentação com ureia em ratos Wistar, machos, em idade de crescimento.
2. Nas condições estudadas, a dieta considerada padrão (de referência) continha 18% de caseína. Uma etapa do trabalho foi realizada alimentando os ratos com dieta livre de proteína suplementada com ureia, em quantidades isonitrogênicas à dieta padrão, acompanhando outro grupo de ratos alimentados com dieta controle, livre de proteína. Noutra experiência, os ratos foram alimentados com a dieta considerada padrão suplementada com ureia, de maneira que o suprimento em nitrogênio foi duplicado. Numa terceira etapa a quantidade de proteínas na dieta padrão, foi reduzida à metade e esta dieta foi oferecida como controle de uma dieta nas mesmas condições suplementada com ureia, em quantidades isonitrogênicas à dieta padrão (de referência).
3. Em todas as condições expostas, após um período de 7 e de 14 dias os ratos foram sacrificados e determinou-se no fígado a atividade das enzimas do ciclo da ureia e a atividade da GOT, GPT, GDH e da urease. Esta foi também pesquisada no rim, na mucosa gástrica e na mucosa intestinal.
4. Os resultados confirmam as experiências sobre adaptação das enzimas do ciclo da ureia à carga de proteínas, com exceção da AS.
5. A adição de ureia às dietas apresentou um comportamento bem distinto das enzimas estudadas. Houve uma diminuição significativa nos níveis da OTC e GPT quando a dieta não continha proteína, entretanto a atividade da GDH aumentou.
6. Não foi revelada atividade ureásica nos tecidos estudados.

VI. BIBLIOGRAFIA

01. AOYAGI, Toshio et alii. Gastrointestinal urease in man. Part I. Activity of mucosal urease. Gut. London, 7 (6):631-5, dec. 1966a.
02. AOYAGI, Toshio & SUMMERSKILD, W.H.J. Inhibition by acethydroxamic-acid of human mucosal and faecal urease - specific activity. The lancet. London, WC, 296-7, feb. 5, 1966b.
03. ARCHIBALD, Reginald M. Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD, 156 (1) 121-42, nov. 1944.
04. ARCHIBALD, Reginald M. Colorimetric determination of urea. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, MD, 157 (2): 507-18, feb. 1945.
05. BAREJ, W. Metabolic aspects of the use of nonprotein nitrogen compounds in feeding ruminants - Postepy Nauk Rolniczych - Varsovia, 21(3):59-70, 1974.
06. BEAUFAY, H. et alii. Tissue Fractionation Studies. The Biochemical Journal, Cambridge, 73(4):623-8, 1959.
07. BLOCH, Konrad. The metabolism of L(+)arginine in the rat. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, MD. 165(2):469-76, oct. 1946.
08. BROWN, Jr., G.W. & COHEN, Philip P. Comparative biochemistry of urea synthesis. I. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD. 234(7):1769-74, July, 1959.
09. BROWN, C.L. et alii. The effects of low-protein diet and uraemia upon urea-cycle enzymes and transaminases in rats. Clinical Science. London, 43(3):371-6, Sept., 1972.
10. BURNETT, George H. & COHEN, Philip P. Study of carbamyl Phosphate-ornithine transcarbamylase. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD., 229(1):337-44, nov., 1957.
11. BUTTERY, P.J. & BOORMAN, K.N. The inhibition of urea synthesis by leucine in the perfused Rat liver. The Biochemical Journal. Cambridge, DGE, 122:55p, feb. , 1971.

12. CALDWELL, E. & MC HENRY. Studies on vitamine B₆ and transamination in rat liver. Archives of Biochemistry and Biophysics Academic Press, New York, 45:97-105, 1953.
13. CARVER, L.A. & PFANDER. Some metabolic aspects of urea and/or potassium nitrate utilization by sheep. Journal of Animal Science. Jansag, 38(2):410-6, feb. 1974.
14. CHABAS, A. & GRISOLIA, S. Effect of carbamyl phosphate on stability of some enzymes of the urea cycle: high sensibility of glutamate dehydrogenase, Febs Letture, Amsterdam, 21(1):25-8, March, 1972.
15. CHALUPA, W. et alii. Detoxication of ammonia sheep fed soy proteyn or ureia. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A., 100(2):170-6, feb. 1970.
16. CHANEY, Albert L. & MARBACH, Edward P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clinical Chemistry, USA, 8(2):130-2, april, 1962.
17. CHAO, Fu-Chan & TARVER, H. Breakdown of urea in the rat. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. New York, 84:(2)406-9, nov. 1953.
18. CHARBONNEAU, R. et alii. Variation with age of the enzymes of the urea cycle and aspartate transcarbamylase in rat liver. Canadian Journal of Biochemistry, 45(9):1427-32, Sept., 1967.
19. CHEEK, Donald B. & GRAYSTONE, J.E. Changes in enzymes (GOT and GDH) and Metals (Zn, Mn and Mg) in liver of Rats during endocrine imbalance and caloric restriction. Pediatric Research. 3(1):433-40, Jan., 1969.
20. CHOW, Kye-Wing & WALSER, M. Substitution of five essential aminoacids by their alpha keto analogues in the diet of Rats. The Journal of Nutrition. Maryland, 104(9):1208-15, Sept. 1974.
21. COHEN, Philip P. & HAYANO, Mika. The enzymatic steps in urea synthesis. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD, 172(2):405-15, feb., 1948.
22. COHN, C. et alii. Feeding frequency: A factor in dietary protein utilization. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. New York, 115(4):1057-9, apr., 1964.
23. COHEN, P.P.- Biochemical Differentiation during amphibibian metamorphosis - Science. London, 168:533-43, 1 May, 1970.
24. COLLARES, Edgard F. Técnica para obtenção do raspado de mucosa de segmentos longos do intestino delgado do rato. Arquivos de gastroenterologia. S.Paulo, 10(1):41-4, jan/março, 1973.
25. DAS, T.K. Rate of adaptation of some of the urea cycle enzymes to a low-protein diet. The Proceedings of the Nutrition Society. 30(3):79A-80A, dec., 1971

26. DAS, T.K. & WATERLOW, J.C. Rate of adaptation of urea cycle enzymes, aminotransferases and glutamic dehydrogenases to changes in dietary protein intake. The British Journal of Nutrition, Cambridge, 32(2):353-73, Sept., 1974.
27. DAVIS, R.H. & MARTINDALE, C.H. Effect of dietary protein and non-protein nitrogen on liver glutamate dehydrogenase activity in the chick. The British Journal of Nutrition. Cambridge, 27(2):319-25, March, 1972.
28. DECKEN, A. von der & OMSTEDT, P.T. Dietary protein quality measured by in vitro synthesis in rat skeletal muscle ribosomes. The Journal of nutrition. Maryland, 102(2):1555-62, 1972.
29. DELLUVA, A.M. et alii. The absence of gastric urease in germ-free animals. Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdam, 151(3):646-50, march, 1968.
30. DEOSTALE, Y.G. & TULPULE, P.G. Adaptive Response of the urea cycle enzymes of the rat liver to the quality and quantity of dietary proteins. Indian Journal of Biochemistry. 6(3):115-20, sept., 1969.
31. _____ . Effect of oral administration of antibiotics on the urea cycle enzymes of the rat liver. Indian Journal of Biochemistry, 6(3):121-3, Sept. 1969a.
32. DICK, Tuiskon. A biossíntese de aminoácidos não essenciais. Estudo experimental de algumas fontes de nitrogênio. Tese para Livre Docência, Faculdade de Medicina. Porto Alegre, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil, p.96, 1957.
33. _____ . Determinação da atividade das transaminases glutâmico-oxaloacética (GOT) e glutâmico-pirúvica (GPT) no soro. Em Introdução à Bioquímica, EMMA (ed), 188p., 59-74, 1970.
34. DUVE, Christian de. The separation and characterization of sub-cellular particles. The Harvey Lectures, Academic Press, New York, 59:49-87, 1965.
35. EGGUM, B.O. & CHRISTENSEN, K.D. The use of non-protein nitrogen in monogastric animal feeding. Z.Tierphysiol Tierachr Futter mitolk. 31(6):332-41, 1973.
36. EVANS, W.B. et alii. Gastrointestinal urease in man. Part II. Urea hydrolysis and ammonia absorption in upper and lower gut lumen and the effect of neomycin. Gut, London, 7:635-9, dec. 1966.
37. FAHIEN, Leonard A. & COHEN, Philip P. L-glutamate dehydrogenase (frog and Tadpole liver) Em COLOWICK Sidney P. & KAPLAN, N. O. (ed.) Methods in Enzymology. Academic Press, New York, XVII. A: 117, 839-44, 1970.
38. FAHIEN, L.A. et alii. Studies of gluconogenic mitochondrial enzymes. Archives of Biochemistry and Biophysics, Academic Press, New York, 130:449-456, 1969.

39. FEATHERSTON, W.R.; BIRD, H.R. and HARPER, A.E. Effectiveness of urea and ammonium nitrogen for the synthesis of dispensable aminoacids by the chick. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A. 78(2):198-206, Sept. 1962.
40. FLORES, G. et alii. Liver enzyme activities in ammonia fixation by the rat. The American Journal of Physiology. Washington, DC, 203(1):43-8, July, 1962.
41. FREEDLAND, R.A. Effect of progressive starvation on Rat liver enzymes activities. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A., 91(4):489-95, april, 1967.
42. GALLINA, D.L. & DOMINGUEZ, J.M. Human utilization of urea nitrogen in low calorie diets. The Journal of Nutrition. Philadelphia 4, P.A. 101(2):1029-36, march, 1971.
43. GAMBLE, James G. & LEHNINGER, Albert I. Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial Membrane. The Journal of Biological Chemistry. Tabor, H. (ed.) Maryland, 248 (2):610-8, Jan. 25, 1973.
44. GIORDANO, C. Use of exogenous and endogenous urea for protein synthesis in normal and uraemic subjects. Journal Laboratorial and Clinical Medicine, St. Louis, 3, Missouri, 62(2): 231-46, Aug. 1963.
45. GIORDANO, C. et alii. The incorporation of urea ¹⁵N into serum proteins of uremic patients on low nitrogen diets. The Journal Clinical Investigation Relan (ed.) 45(6):1013, 18, jun. 1966.
46. GIORDANO C. et alii. Utilization of ketoacid analogous of valine and phenylalanine in health and uraemia. The Lancet. London, 178-82, Jan. 22, 1972.
47. GIOVANETTI, S. & MAGGIORE, Q. A low-nitrogen diet with protein of high biological value for severe chronic uraemia. Lancet, London, 734(1):1000-3, May 9, 1964.
48. GREENFIELD, H. & BRIGGS, G.M. Nutritional methodology in Metabolic Research with rats. Annual Review of Biochemistry. Palo Alto, California, 40:549-72, 1971.
49. GÜTHOEHRLEIN, G. & KNAPPE, J. Modified determination of citrulline. Analytical Biochemistry. Academic Press, New York, 26 (1):188-91, Oct. 10, 1968.
50. HARMEYER, Von J. & JEŽKOVÁ, D. Studies on metabolism in feeding with urea. Z. Tierphysiologie, Tiernahrung n. Juttermittelkunde, 28:256-60, 1971.
51. HARPER, A.E. Aminoacid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and aminoacid imbalance. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A. 68(3):405-18, July, 1959.
52. HOGEBOOM, George H. & SCHNEIDER, W.C. Intracellular distribution of enzymes XI Glutamic dehydrogenase. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD, 204(1):233-8, Sept., 1953.

53. HÖLLER, Von H. Free aminoacids, arginase and urease activity in cardiaczone secretion and in gastric-mucosa-zone homogenates. Z. Tierphysiol. Teirernachr Futtermittelk, 26(5):253-7, 1971.
54. HORIE, Y. & ASHIDA, K. Effect of an adequate protein diet after a low protein diet on protein catabolism in growing rats. The British Journal of Nutrition. Cambridge, 29(1):23-31, Jan. 1973.
55. ITOH, H. et alii. Plasma aminoacids and stomach contents of Rats Fed casein and the corresponding aminoacid mixture. The Journal of Nutrition. Maryland, 104:(4)386-92, april, 1974.
56. ITOH, H. et alii. Comparactive effects of casein and aminoacids mixture simulating casein on growth and food intake in Rats. The Journal of Nutrition. Maryland, (103(12):1709-15, dec. 1973.
57. JONES, Mary E. Carbamyl Phosphate Synthesis and utilization. E. Ornithine Transcarbamylase. E: COLOWICK, Sidney, P. & KAPLAN, N.O. (ed) Methods in Enzymology, Academic Press, New York, V: [124a] , 910-3, 1962.
58. JONES, Mary E. et alii. Citrulline synthesis in Rat Tissues. Archives of Biochemistry and Biophysiscs, New York, 95(3):499-507, dec., 1961.
59. JONES, J.H. & FOSTER, C. The Journal of Nutrition. Philadelphia PA. 24:245, 1942. Em Metabolism, Biological Handbooks, 1968. Altman, L.P., and Dittmer, D.S. (ed.)
60. KING, J.O.L. Urea as a protein supplement for growing rabbits . The British Veterinary Journal, 127:523-8, nov. 1971.
61. KLAIN, G.L. et alii. Interrelationships of cold exposure and aminoacids imbalances. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A. 78(3):359-64, nov. 1962.
62. KLAIN, G.L. et alii. Effect of protein intake and cold exposure with aminoacids metabolism. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A., 80(1):107-10, May, 1963.
63. KORNBERG, H.L. & DAVIES, R.E. The metabolism of subcutaneously injected ^{15}N -urea in the cat. The biochemical Journal. Cambridge, 52:345. 1952.
64. KORSLUND, M.K. Non-essential nitrogen utilization by children and adolescents. Journal of agricultural and Food Chemistry. 22(2):187-9, March/april, 1974.
65. KREBS, H.A. Some aspects of the regulation of fuel supply omniverus animals. Advances in Enzyme Regulation. Weber, G. (ed.) 10: 397-420, 1972.
66. KREBS, H.A. et alii. Some regulatory mechanisms in the synthesis of urea in the mammalium liver. Advances in Enzyme Regulation. Weber, G. (ed.) 11:361-77, 1973.

67. KRVAVICA, S. et alii. Effect of protein-low and protein-high diets on the activity of urea cycle enzymes, glutamate dehydrogenase, glutamate oxaloacetate and glutamate-pyruvate transaminase in the pig liver. Veterinarski Arhiv., Zagreb, Knjiga 44/1974. Svezak 5-6, 121-5. Urednistvo primilo ruko - pis 5, IV, 1974.
68. LALITHA, K. & RADHAKRISHNAMURTY, R. R. Response of alanine, tyrosine and leucine amino transferases to dietary pyridoxine and protein in rats tissues. Indian Journal of Experimental Biology. 13:149-52, March. 1975.
69. LARDY, H.A. & FELDOTT, G. The net utilization of ammonium nitrogen by the growing rat. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD, 186(1):85-91, Sept., 1950.
70. LAYNE, E. Protein estimation with the Folin-ciocalteu reagent. Em Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (ed.) Methods in Enzymology. N.Y. Academic Press 3: [73], 448-50, 1957.
71. LEE, D.J.W. et alii. Enzymes studies with the livers of chick fed semi-synthetic diets containing crystalline amino acids and diammonium citrate. British Poultry Science. Great Britain, 13(3):229-35, 1972.
72. LIND, H. & MARTINSON, E.E. Activity of urease and ATPase in the subcellular fractions of the mucosa of the stomach. Biokhmya Moscou, 29(2):191-5, 1964.
73. LOWRY, O.H. et alii. Protein measurement with the Folinphenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 2, 193(1):265-79, nov. 1951.
74. LUCK, James Murray. VI Ammonia production by animal tissues in vitro. II. The demonstration of urease in the animal body, The Biochemical Journal. Cambridge, 18:825-8, 1924.
75. MARAMAA, Sulev. The distribution and functional changes of gastric urease activity. Gastroenterology. Chicago, 59(5):657-63, May, 1966.
76. MARSHALL, M. & COHEN, P.P. Ornithine transcarbamylase from streptococcus faecalis and Bovine liver. The Journal of Biological Chemistry. Maryland, U.S.A. 247(6):1641-1653, March 25, 1972.
77. MC GIVAN, J.D.; BRADFORD, N.M. and CHAPPELL, J.B. Adaptive changes in the capacity of Systems used for the synthesis of citrulline in rat liver Mitochondria in Response to high-and low-protein. diets. The Biochemical Journal. London, 142: 359-64, 1974.
78. MC GIVAN, J.D.; BRADFORD, N.M. Crompton, M., and CHAPPELL, J.B. Effect of L-leucina on the nitrogen metabolism of isolation rat liver Mitochondria. The Biochemical Journal. 134:209-15, 1973.

79. MENYHÁRT, J.; HORVÁLTH, A. and ROSTA, A. Urea production by rat liver slices at various concentrations in the medium. Acta Biochimica et Biophysica Academiae Scientiarum Hungaricae. 6 (2):145-7, 1971.
80. MESSENGUY, F.; PENNING, M.; and WIAME, Jean Marie. Interaction between arginase and ornithine carbamyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry. 22(2): 277-86, Sept. 1971.
81. MUNRO, H.N. Regulation of Protein Metabolism in relation to adequacy of intake. Infusions therapie. 2:112-7, 1975.
82. MURAMATSU, K. & ASHIDA, K. Effect of dietary level on growth and liver enzyme activities of rats. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A. 76(2):143-58, feb. 1962.
83. NAKAMURA, M. & JONES, M.E. Ornithine carbamyltransferase (*Streptococcus faecalis*). Em COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (ed.). Methods in Enzymology. Academic Press, New York, XVII A:(32) 286-94, 1970.
84. NETTLETON, J.A. and HEGSTED, D.M. The effects of protein and calorie restriction on tissue nitrogen content in protein catabolism. Nutrition and Metabolism. 17(3):129-92, april, 1974.
85. NUZUM, C.T. and SNODGRASS, P.J. Urea cycle enzyme adaptation to dietary protein in Primates. Science. 1042-3, Sept., 1971.
86. PERET, J.; CHANEZ, M.; COTA, J. et MACARIE, I. Influence du taux et de la qualité des protéines du régime sur les variations de l'activité enzymatique: piruvatokinase (PK), glucose-6-P déshydrogenase (G6 PDH), enzyme malique (EM), glutamique piruvate transaminase (GPT), glucose-6-phosphatase (G6 Pase) et phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) chez le rat. Comptes Rendus des Séances de l'académie des sciences. (D). Paris, 278:1087-90, Feb. 1974.
87. POTTER, Van R. Tissues homogenates, em Colowick, S.P. & Kaplan; N.O. (ed.). Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1:10-5, 1955.
88. PRIOR, R.L.; CLIFFORD, A.J. HOGUE, D.E. and VISEK, W.J. Enzymes and metabolites of intermediary metabolism in urea fed sheep The Journal of Nutrition. Philadelphia P.A., 100:438-43, 1970
89. RAIHA, N.C.R. and SUIHKONEN, J. Factors influencing the development of urea-synthesizing enzymes in rat liver. The Biochemical Journal. London, 107:793-7, 1968.
90. RAIJMAN, L. Citrulline synthesis in Rat tissues and liver content of carbamyl phosphate and ornithine. The biochemical Journal. London, 138:225-32, jan. 1974.
91. RICHARDS, P. Nutritional potential of nitrogen recycling in man. The American Journal of Clinical Nutrition. 25:615-25, jun. 1972.

92. RICHARDS, P. et alii. Utilization of ammonium nitrogen for protein synthesis in man, and the effect of protein restriction and uraemia. The Lancet. London, 2(7521):845-9, Oct. 21, 1967.
93. ROBERGE, A.; CHARBONNEAU, R. and BERLINGUET, L. Variation of the enzymes of the urea cycle and aspartate transcarbamylase in liver of pregnant rats. Canadian Journal of Biochemistry. 45(9)-1371-4, Sept. 1967.
94. ROGERS, Q.R. & FREEDLAND, R.A. Arginine and citrulline: metabolism in rats fed low and high protein diets. Federation Proceedings. 27:257-62, 1968.
95. ROSE, W.C. The nutritive significance of the aminoacids, and certain related compounds. Science, 86:298, 1937.
96. ROSE, W.C. The nutritive significance of the aminoacids. Physiologie Revue. Baltimore, MD, 18(1):109-35, jan. 1938.
97. ROSE, W.C. & DEKKER, E.E. Urea as source of nitrogen for biosynthesis of aminoacids. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD, 223:107-21, 1956.
98. ROSE, W.C. et alii. The utilization of ammonium salts, urea and certain compounds in the synthesis of nonessential aminoacids in vivo. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, MD, 181(1):307-16, nov. 1949.
99. ROSE, W.C. & WIXOM, R.L. The aminoacid requirements of man. XIV The sparing effect of tyrosine on the phenylalanine requirement. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore 2, USA 217(1):95-102, nov. 1955a.
100. ROSE, W.C. & WIXOM, R.L. The aminoacid requirements of man. XVI The role of nitrogen intake. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 2. U.S.A. 217(2) 997-1004, dec. 1955b.
101. ROSE, W.C. et alii. The aminoacids requirements of man. XV. The valine requirements: Summary and final observations. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 2. U.S.A. 217(2): 987-97, dec. 1955c.
102. ROSEN, F. et alii. Glucocorticoids and transaminase activity. I Increased activity of GTP in four conditions associated with gluconeogenesis. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore MD, 234:476-86, 1959.
103. RUDMAN, D. Capacity of human subjects to utilize ketoanalogues of valine and phenylalanine. The Journal of Clinical Investigation. U.S.A., 50:90-6, 1971.
104. SAHEKI, T. The studies on regulatory conditions of urea synthesis using isolated perfused rat liver. Shikoku Igaku Zasshi, 28(2):284, 1972.
105. SALEM, H.A.; DEVLIN, T.J. and MARQUARDT, R.R. Effects of urea on the activity of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, carbamyl phosphate synthetase and carbamyl phosphokinase in ruminant tissues. Canadian Journal Animal Science. 53(3):503-11, Sept., 1975.

106. SANTOS, A.C. & WARNER, R.G. Purified diet for rat em Metabolism, Biological Handbooks, Altman, L.P. and Dittmer, D.S. (ed.). Bethesda, Maryland, 1968, 130-134.
107. SCHEELE, C.W. Standardization of nitrogen-balance experiments with rats. Z. Tierphysiol. 29:18, 1972.
108. SHANNON, D.W.F. et alii. Effects on chick growth of adding glutamic acid or diammonium citrate to diets containing crystal line essential aminoacids. Proceedings of Nutrition of Society, 29:23A, 1970.
109. SCHMIDT, E. Glutamic dehydrogenase. Em Bergmeyer H.H. (ed.). Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press, 1965. Second Printing, Section C. 752-6.
110. SCHIMKE, R.T. Adaptative characteristics of urea cycle enzymes in the rat. The Journal Biological Chemistry. Baltimore, MD 237(2):459-68, Feb. 1962a.
111. SCHIMKE, R.T. Differential effects of fasting an protein-free diets on levels of urea cycle enzymes rat liver. The Journal Biological Chemistry. Baltimore MD, 237(6):1921-4, June, 1962b.
112. SCHIMKE, R.T. Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. The Journal Biological Chemistry. Baltimore, MD, 238(3):1012-18, March, 1963.
113. SCHIMKE, R.T. The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. The Journal of Biological Chemistry. Baltimore , 239(11):3808-16, nov. 1964.
114. SCHIMKE, R.T. Arginase (Rat liver). Em COLOWICK, Sidney P. & KAPLAN, N.O. (ed.). Methods in Enzymology. Academic Press, New York, XVIIIA: [37], 313-7, 1970.
115. SCHNAITMAN, Carl & GREENWALT, John W. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. The Journal of Cell Biology. New York, 38(1):158-75, July, 1968.
116. SNYDERMAN, S.E.; HOLT, J. L.E.; DANCIS, J.; RORTMAN, E.; BORJER, A. and BALIS, M.E. "Unessential" nitrogen: a limiting factor in human growth. The Journal of nutrition. Philadelphia 4, P.A. 78(1); 57-72, Sept., 1962.
117. SÓBERON, G. et alii. Urea biosynthesis an experimental model for the study of the integration of a metabolic cycle during biological evolution. A Review. Bolletín de Estudios Médicine Biol., Mex. 26:15-33, 1969.
118. SPECTOR, L. & JONES, M.E. Acetylglutamic Acid, Em COLOWICH, S.P. & KAPLAN, N.O. (ed.) Methods in Enzymology, Academic Press, New York, VI:560-1, 1963.
119. SUNDARAM, P.V. & LARDLER, R.J. The urease catalyzed hydrolyses of some substituted ureas and esters of carbamic acid. Canadian Journal of Biochemistry. 48(10):1132-40, oct. 1970.

120. STUCKI & HARPER, A.E. Effects of altering the ratio of indispensable to indispensable aminoacids in diets for rats. The Journal of Nutrition. Philadelphia, P.A., 78(3):278-86, Nov. 1962.
121. SWICK, Robert W., et alii - The metabolism of mitochondrial Proteins III. The dynamic state of rat liver mitochondria. The Journal of Biological Chemistry. Maryland, 243(13):3581-7, July 10, 1968.
122. SZEPESI, B. & FREEDLAND, R.A. Time cause of enzyme adaptation. 3. Periodic and non-periodic responses of rat liver enzyme activities to diets in meal-fed rats. Canadian Journal of Biochemistry. 49(1):108-18, Jan. 1971.
123. TAMIR, H. & RATNER, S. Enzymes of arginine metabolism in chicks. Archives of Biochemistry and Biophysics. Academic Press. New York, 102:249-258, 1963.
124. TATEYAMA, T. Enzymological studies on the urea cycle in the liver. II Measurement of the activities of urea cycle enzymes in liver after ammonium chloride administration. Naika Hokan, 19(4):97-106, 1972.
125. TATIBAMA, M. & SHIGESADA, K. Two carbamyl phosphate synthetases of mammals: Specific roles in control of pyrimidine and urea biosynthesis. Advances in Enzyme Regulation. Weber, G. (ed.) 10:249-71, 1972.
126. TAYLOR, Y.S.N. Relation between serum urea levels and dietary nitrogen utilization in young men. The British Journal of Nutrition. 32(2):407-11, Sept. 1974.
127. TONHAZY, N.E. et alii. A rapid method for the estimation of the glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation Sickness. Archives of biochemistry. Academic Press, New York, 28(1):36-42, aug. 1950.
128. TULPUL, P.G. & KSHIRSAGAR, S.G. Effect of dietary protein, calories and pyridoxine on glutamate-oxaloacetate transaminase activity of blood. The Indian Journal of Medical Research. Kanpur, 46(3) May, 452-60, 1958.
129. TYLECEK, Jan & VASICOVA, K. Utilization of the nitrogen in urea by rats. Agrochemia. 14(1):31-3, 1974.
130. VISEK, W.J. Some biochemical considerations in utilization of nonspecific nitrogen. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 22(2):174-84, March/April, 1974.
131. WALSER, M. & BODENLOS, L.J. Urea metabolism in man. The Journal of Clinical Investigation. 38(8):1617-20, Aug., 1959.
132. WARNER, R.G. Nutrients Requirements laboratory animals, 51. National Research Council, Committee on Animal Nutrition, 1962. Natl. Acad. Sci. Natl. Res. Council Publication, 990, p.68.
133. WATERLOW, J.C. Observation on the mechanism of adaptation to low protein intakes. The Lancet, 7578:sat 23, Nov., 1091-7; 1968.
134. WHITTEN, B.K. et alii. Aminoacid catabolism in environmental extremes: effect of temperature and calories. American Journal Physiology, Bethesda. MD, 219(4):1046-9, Set., 1970.
135. WIXOM, R.L. et alii A concerted response of the enzymes of urea biosynthesis during thyroxine-induced metamorphosis of rana catesbeiana. The Journal of Biological Chemistry. Maryland, 247(11):3684-92, June 10, 1972.

136. WRONG, O.M. Intestinal handling of urea and ammonia. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 64(10):1025-6, Oct. 1974.
137. YEOUH, G. et alii. Development of urea synthesis in rat liver. Int. Journal of Biochemistry I; 641-4, 1970.

ERRATA

Página		
Parágrafo		
Linha	onde se lê...	leia-se
Abreviatura 4	L-arginina	L-arginase
Índice II.7.1	EC-2.7.2.2a *	EC-2.7.2.5
7.7	EC-2.6.1.10 *	EC-2.6.1.1
7.8	EC-2.6.1.12 *	EC-2.6.1.2
V.- -	Sumario *	Sumario e Conclusões
02.3.4	Sais de amônia *	Sais de amônio
3.5	ureia *	uréia
4.1	(1959)	(1950)
4.2	citrato de amônia	citrato de amônio
03.5.6	cloreto de amônia	cloreto de amônio
04.1.6	são	é
1.7	fornecidos	fornecido
05.2.4	uma destas moléculas	aminoácido
07.3.5	diz ele	dizem eles
6.1	ureia de	uréia a partir de
09.5.4	Rosenver	Rosenoer
10.3.1	tijelas	tigelas
12.1.3	Greenfield, H., et alii (1971)	[Greenfied, H., et alii (1971)]
13 - -	Wagner	Warner
	Santos	Santos & Warner
16.5.1	despresado	desprezado
17.5.4	quante	quente
19.1.3	amônia	amônio
19.6.2	formou	produziu
21.1.7	Cohen (1970)	Gamble & Lehninger (1973)
5.2	cetiltrimetilamônia	cetiltrimetilamônio
24.3.8	de NAD +	ou NAD +
4.3	ao	do
26.2.3	MgCL ₂	MgCl ₂
27.3.5	colume	volume
28.3.1	nesaio	ensaio
3.3	do	no
4.3	ou 100 micromôis	ou 100 nanomôis
31.1.4	durante	. Deixou-se
1.8	Sulfato de amônia	Sulfato de amônio
2.4	2,4-dinitrofeni	2,4-dinitrofeni

32.1.3	25º C	23º C
34.3.3	deshidrogenase	desidrogenase
36.1.2	. Sendo	, sendo
37.- -	Suplementação	suplementação
	p. r. f.	p. r. f.
	g	
	p. r. r.	p. r. r.
	g	
38.-.2	(7)	(12)
40.item 3.2	transvarbamilase	transcarbamilase
3.3	a dieta	na dieta
41.4.4/5	diminui	diminuiu
52.1.5	versus	e
64.2.4	alamina	alanina
4.2	afirma	afirmam
4.4	,	e
5.6	Robuge	Roberge
76.128.1	indispensable	dispensable
134.1	calatolismo	catabolismo
* e demais localizações		