J. Sérgio Marchini

Ribeirão Preto - SP
1992

**INGESTÃO RECOMENDADA DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS
PARA INDIVÍDUOS JOVENS EUTRÓFICOS DO SEXO
MASCULINO. ESTUDO EMPREGANDO ISÓTOPO ESTÁVEL,
AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS E BALANÇO NITROGENADO.**

J. Sérgio Marchini

Disciplina de Nutrologia Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

DEDALUS - Acervo - FMRP

11200059743

1992

3163

20/7/93

data de defesa: 07/06/93

ÍNDICE

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Objetivo	18
Metodologia	25
Desenho experimental	25
Casuística	27
Dietas	27
Estudo cinético ou infusão de isótopo estável	28
Coleta de sangue	30
Coleta de gás expirado	31
Aminoácidos plasmáticos: determinação e análise espectrométrica	31
Avaliação do balanço cinético de leucina	33
Balanço nitrogenado	37
Método estatístico	38
Resultados	46
Considerações gerais	46
Características dos indivíduos participantes	47
Aminoácidos plasmáticos	48
Cinética de leucina	49
Balanço nitrogenado	51
Discussão	67
Aminoácidos plasmáticos	68
Cinética de leucina	71
Balanço nitrogenado e balanço cinético de leucina	73
Referências	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Algumas funções metabólicas desempenhadas por aminoácidos no organismo humano ...	19
Tabela 2. Exemplo de cálculo das necessidades da leucina a partir de dados de balanço nitrogenado ...	20
Tabela 3. Recomendações de aminoácidos para adultos	21
Tabela 4. Cálculo das recomendações de aminoácidos a partir das perdas endógenas obrigatórias...	22
Tabela 5. Exemplos de isótopos, sendo alguns utilizados em medicina	23
Tabela 6. Uso clínico de isótopos estáveis em pesquisa médica	24
Tabela 7. Dietas experimentais e controle utilizadas com diferentes ofertas de aminoácidos essenciais	39
Tabela 8. Teor de aminoácidos oferecidos nas diferentes dietas	40
Tabela 9. Composição típica da dieta, isenta de proteína...	41
Tabela 10. Suplemento diário de vitaminas e minerais oferecidos...	42
Tabela 11. Características gerais dos indivíduos...	53
Tabela 12. Variação individual da relação peso/altura ² , índice creatinina/altura e excreção...	54
Tabela 13. Concentração plasmática de aminoácidos livres ramificados...	55
Tabela 14. Concentração plasmática de aminoácidos livres (metionina, lisina, treonina, prolina)...	57
Tabela 15. Resultados dos estudos cinéticos	59
Tabela 16. Depuração metabólica de leucina...	61
Tabela 17. Avaliação do balanço cinético...	62
Tabela 18. Estimativa do balanço cinético...	64
Tabela 19. Resumo de dados de balanço nitrogenado...	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental	43
Figura 2. Protocolo do estudo cinético	44
Figura 3. Modelo envolvendo compartimentos múltiplos	45
Figura 4. Variação dos níveis de aminoácidos ramificados...	56
Figura 5. Variação dos níveis de aminoácidos livres metionina, lisina, treonina e prolina	58
Figura 6. Fluxo e oxidação de leucina...	60
Figura 7. Balanço horário cinético...	63
Figura 8. Balanço cinético e nitrogenado diário	66

RESUMO

As atuais recomendações internacionais de ingestão de aminoácidos essenciais, propostas pela FAO/WHO/UNU¹, 1985, tem sido questionadas, acreditando-se que estejam subestimadas. O grupo do Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology, MIT, considera que as recomendações de ingestão de aminoácidos essenciais, com exceção da metionina, devem ser $\approx 2,5$ maiores que as da FAO/WHO/UNU. Conseqüentemente, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de verificar esta afirmação por meio de um estudo cinético de aminoácidos com isótopo estável, determinação dos níveis plasmáticos de aminoácidos e da utilização de balanço nitrogenado. Vinte jovens eutróficos receberam uma dieta cuja oferta protéica, na forma de L-aminoácidos, foi de $140 \text{ mgN.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, mantida constante por cinco semanas do estudo. Sua composição aminoacídica foi semelhante ao do ovo de galinha por uma semana (dieta OVO, GOVO). A seguir por três semanas, um grupo de sete destes indivíduos recebeu a dieta com quantidade de aminoácidos essenciais semelhantes às recomendações internacionais (dieta FAO, GFAO). Outros sete receberam, por três semanas, dieta com teor de aminoácidos semelhantes ao estipulado pelo MIT (dieta MIT, GMIT) e os seis indivíduos restantes continuaram na dieta OVO. Por fim, na quinta semana, todos os indivíduos voltaram a receber a dieta OVO. Nos dias 7, 14, 28 e 31 foi realizado, em todos indivíduos, um estudo cinético, com infusão por 8 horas de $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Leucina}$. Na primeiras três horas do estudo não foi oferecido alimentos aos participantes, considerada fase ou estado de jejum e nas últimas cinco horas, foi oferecido a cada hora, alimentos, correspondente a $5/12$ do total diário, considerada fase ou estado alimentado. A partir dos resultados destes estudos cinéticos foi feita a avaliação do fluxo, oxidação e balanço cinético, além da síntese e degradação protéica. A interpretação destes resultados, bem como dos níveis plasmáticos de aminoácidos e do balanço nitrogenado, indicam que a dieta FAO é insuficiente para manter a homeostase aminoacídica normal do organismo, o que possível com a dieta MIT e OVO. Conclui-se que seria prudente abandonar as atuais recomendações internacionais (FAO/WHO/UNU) de aminoácidos essenciais, pois as mesmas não suprem as necessidades de indivíduos jovens eutróficos. Sugere-se a adoção do padrão de ingestão de aminoácidos recomendado pelo MIT.

¹ Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization/United Nations University (FAO/WHO/UNU, 1985; National Research Council, 1989).

ABSTRACT

It has been previously stated that the minimum physiological recommendations for the indispensable amino acids in healthy adults, as proposed by FAO/WHO/UNU in 1985, are far too low, except for the methionine. An amino acid stable isotopic kinetic study was conducted to seek further experimental support to this hypothesis. Twenty healthy young men received an L-amino acid based diet, supplying $140 \text{ mgN} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, patterned on egg protein for 1 week, then for 3 weeks either i) a pattern based on current international recommendations (FAO diet, $n=7$), ii) a the tentative Laboratory of Human Nutrition of the Massachusetts Institute of Technology, new amino acid recommendation pattern (MIT diet, $n=7$) or iii) again the egg hen pattern (EGG diet, $n=6$). All subjects were again studied for one final, consecutive week on the egg diet. At the end of the initial week, at the first and third week with the three experimental diets, and after three days following the return to the egg diet, an 8h primed continuous intravenous infusion with $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Leucine was conducted (3h, fast, 5h fed - while subjects received hourly meals supplying the equivalent of 5/12 total daily intake). Estimation of leucine balance were carried out with measurements plasma free amino acids changes. Daily nitrogen balances were obtained throughout the study. Interpretation of plasma amino acid profiles, and changes of leucine kinetic balances, indicated that the FAO diet was not able to maintain amino acid homeostasis whereas the MIT and the egg diets sustained body amino acid equilibrium with a positive amino acid balance. Nitrogen balances tended to be more negative with the FAO diet but failed to show statistically significant differences among the three diets. The finding point out that it would be prudent to use the new, tentative recommended amino acid pattern (MIT diet) as the minimum physiological amino acid needs of healthy human adults.

INTRODUÇÃO²

A manutenção das funções normais do indivíduo depende, em parte, da quantidade e do papel metabólico das proteínas corpóreas. As proteínas desempenham uma série de funções estruturais (colágeno), de defesa (imunoglobulinas), coagulação (fibrinogênio), transporte (albumina), regulatória (enzimas) e muscular (actina) (Young & Pellett, 1983). Essencialmente todo nitrogênio orgânico da alimentação está sob a forma de proteína ou de seus constituintes os aminoácidos. No organismo os aminoácidos podem, de uma maneira esquemática, desempenhar diferentes funções metabólicas. Em primeiro lugar eles são o substrato para síntese protéica que ocorre durante as fases de formação, crescimento e manutenção de indivíduos eutróficos, além da recuperação de pacientes mal nutridos. Em segundo lugar, os aminoácidos servem de precursores a vários componentes não protéicos, que desempenham papel fundamental para manutenção da vida, como por exemplo a adrenalina. Por fim, os aminoácidos são degradados e eliminados principalmente na forma de uréia e amônia. O esqueleto de carbono resultante da degradação dos aminoácidos serve de substrato para síntese de gordura e/ou hidratos de carbono, e também pode ser eliminado do organismo via bicarbonato e CO_2 . Além destas funções metabólicas, os aminoácidos desempenham funções reguladoras enzimáticas, neurotransmissoras, no fluxo de íons, etc (tabela 1).

Os aminoácidos podem ser definidos como compostos orgânicos que contém um grupo carboxila e um amino na posição α . Existem na natureza centenas de aminoácidos, no entanto, somente cerca de 20 são biologicamente ativos e codificados para síntese protéica (Young & Pellett, 1983). Estes aminoácidos contém pelo menos um nitrogênio e pelo menos uma carboxila,

² Os termos "pool" e "turnover" por serem difíceis de serem traduzidos em uma única palavra, necessitando na maioria das vezes de várias palavras para explicar o seu sentido, serão utilizados neste texto sem tradução. O termo "pool" em linhas gerais se refere a compartimento, conteúdo, quantidade de uma substância em um determinado local do organismo, podendo ser todo o organismo, ou parte deste. O termo "turnover" se relaciona a equilíbrio, reciclagem, passagem de um compartimento, ou pool, para outro de uma maneira dinâmica, durante uma processo ou reação metabólica fisiológica constante no decorrer do tempo por unidade de massa corporal (Kleiber, 1955).

e com exceção da glicina, somente os L-aminoácidos são utilizados para a síntese protéica. Os aminoácidos são capazes de existir em duas ou mais formas isoméricas espaciais, dependendo do número de carbonos assimétricos na molécula. L-aminoácidos são os metabolicamente ativos para os seres humanos devido a estereoespecificidade enzimática. Desta maneira somente os L-aminoácidos são incorporados em proteínas humanas (Rose, 1957). Além destes 20 aminoácidos, existem no organismo cerca de 140 outros aminoácidos que desempenham funções metabólicas variadas, como por exemplo, a cistina, 3-metilhistidina, dopamina, creatina, etc (Uy & Wold, 1977). Vários fatores regulam o metabolismo aminoacídico no organismo. Estes incluem a quantidade e proporção de um determinado aminoácido no tecido, hormônios e fatores celulares locais como a presença de energia na forma de ATP (Millward & Rivers, 1988).

Em consequência do fato de que o organismo é incapaz de sintetizar o esqueleto de carbono de uma série de aminoácidos eles são considerados essenciais e devem ser supridos pela alimentação (Laidlaw & Kopple, 1987). A ausência ou deficiência de um ou mais aminoácidos essenciais em uma dieta resulta em balanço nitrogenado negativo, perda de peso, piora do crescimento de crianças, manifestações clínicas e subclínicas, dependendo do aminoácido em questão (Harper e cols., 1970; Laidlaw & Kopple, 1987). Estudos realizados nas décadas de 1930-1940 mostraram que a retirada ou restrição de um ou mais aminoácidos essenciais resultava em sério comprometimento do crescimento de ratos. Uma dieta restrita em um ou mais aminoácidos essenciais oferecida a animais, e mesmo ao homem, por longos períodos de tempo, resulta em alterações clínicas que são evidenciadas e relacionadas à deficiência aminoacídica, como por exemplo, anemia, catarata, hipoproteïnemia, edema, cirrose e morte (Lapidot & Nissim, 1980). A partir destas observações em ratos, Rose e colaboradores (Rose e cols., 1950, 1954a,b, 1955a,b; Rose & Wixon, 1955; Rose, 1957), entre os anos de 1940 a 1955, realizaram uma série de estudos de balanço nitrogenado em indivíduos jovens eutróficos, cujas dietas eram quimicamente definidas e deficientes em um aminoácido essencial específico. Quando qualquer um dos aminoácidos essenciais era retirado da dieta, os indivíduos rapidamente entravam em balanço metabólico nitrogenado negativo. Esta manifestação de deficiência, balanço nitrogenado negativo, era prontamente revertida pela a adição do aminoácido essencial em estudo. Os aminoácidos estudados foram a fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina,

treonina, triptofano e valina, que foram considerados essenciais ou indispensáveis à manutenção da saúde. Estudos similares foram realizados em mulheres (Leverton e cols., 1956a,b,c,d,e), crianças em idade escolar (Nakagawa e cols., 1960,1965) e pré-escolares (Snyderman e cols., 1959), todos chegando a conclusões semelhantes, isto é, de que estes aminoácidos são essenciais ao homem, e que, portanto, precisam ser ingeridos.

Desta maneira, o conhecimento adequado das necessidades dos aminoácidos essenciais, bem como da quantidade total de proteína é importante em nutrição humana, entre outros fatores, para:

1) *Manter o estado de saúde dos indivíduos normais, em suas diferentes fase do ciclo da vida, como crescimento, desenvolvimento, manutenção e sob diferentes estímulos ambientais, como temperatura, exercício físico, etc* (Young, Perera e cols., 1976; Garza e cols., 1977; Gaull & Young, 1979; Wagner e cols., 1983; Heimbürger e cols., 1986; Fukagawa e cols., 1988).

2) *Servir de base para o cálculo inicial das necessidades de indivíduos portadores de doenças diversas, bem como de alterações secundárias à patologia em si. Por exemplo, as necessidades de aminoácidos de pacientes portadores de hepatopatias ou nefropatias podem ser diferentes daquela do indivíduos eutrófico da mesma idade e sexo* (Kien e cols., 1978a,b; Emery e cols., 1984; Goodship e cols., 1989; Young & Marchini, 1990).

3) *Para definição de políticas populacionais nacionais quando se estabelece programas de alimentação e nutrição* (Young & Pellett, 1990, 1991).

A partir dos anos 70 várias questões tem surgido quanto ao número e a quantidade necessária de cada aminoácido essencial. Este fato é devido ao aparecimento de técnicas específicas de suporte nutricional (Jackson, 1983; Laidlaw & Kopple, 1987; Young, Bier & Pellett, 1989), a estudos realizados por períodos de tempo mais longos, permitindo uma adaptação melhor do indivíduo à dieta e a utilização de técnicas mais refinadas (Scrimshaw e cols., 1966; Young, 1982,1986,1987; Jeejeebhoy, 1986). As recomendações de ingestão de aminoácidos essenciais tem sido revistas extensivamente pelo Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology. Neste laboratório tem sido realizados uma série de experimentos com objetivo de verificar as necessidades de aminoácidos essenciais em jovens adultos (Scrimshaw e cols., 1966; Motil e cols., 1981; Young, Scrimshaw & Bier, 1981; Young, Bier & Pellett, 1989; Meguid e cols., 1986a,b; Meredith e cols., 1986; Young, 1987,1990; Young & Bier, 1987b).

Os primeiros estudos realizados no homem com objetivo de estabelecer as necessidades de aminoácidos essenciais foram feitos na década de 1940 com utilização da técnica de balanço metabólico nitrogenado (Rose e cols., 1950). No entanto esta técnica, bem como os trabalhos então realizados, tem sido criticados quanto a sua validade e sua capacidade de prever as necessidades de aminoácidos essenciais. Os erros introduzidos nos primeiros trabalhos, especialmente aqueles conduzidos por Rose e colaboradores (Jeejeebhoy, 1986; Young, 1986) sugerem que as recomendações iniciais foram no mínimos subestimadas. Um exemplo deste fato é que em nenhuma ocasião o nitrogênio endógeno perdido via pele e outras vias menores foram considerados nos trabalhos publicados na década de 50 para determinação dos aminoácidos essenciais (Rose, 1957). Posteriormente verificou-se que estas perdas chegam a $8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, o que pode alterar significativamente os resultados de balanço nitrogenado (FAO/WHO, 1973; FAO/WHO/UNU, 1985). A título de ilustração, tabela 2, a recomendação de ingestão de leucina foi determinada inicialmente em trabalho de Rose usando a técnica de balanço nitrogenado (Rose e cols., 1955a). A metodologia empregada por Rose foi, em resumo, a seguinte: foram feitos

em torno de cinco experimentos incluindo estudantes voluntários jovens adultos e eutróficos³. A oferta energética foi em torno de 55 kcal.kg⁻¹. No primeiro estudo de balanço a quantidade de todos aminoácidos era adequada. A cada cinco ou sete dias o pesquisador diminuía a oferta do aminoácido em estudo até o balanço nitrogenado ficar negativo. Quando isto acontecia o nível de oferta imediatamente anterior era considerado adequado. Assim sendo para o experimento da leucina, o indivíduo HFK ficou em balanço nitrogenado negativo quando a oferta de leucina foi inferior a 10,95 mg.kg⁻¹. Os outros indivíduos atingiram balanço negativo com as seguintes ofertas de leucina, respectivamente, inferior a: DWW = 7,41 mg.kg⁻¹; CHE = 7,30 mg.kg⁻¹; JRG = 9,95 mg.kg⁻¹ e RLF = 14,01 mg.kg⁻¹. *Como o valor encontrado para o indivíduo RLF foi o mais alto estas foram as recomendações de ingestão de leucina feita por Rose.* No entanto, como fica demonstrado na última coluna da tabela 2, se Rose tivesse considerado as perdas endógenas obrigatórias de nitrogênio, o valor recomendado seria muito superior. Neste caso seria necessário quantidade muito maior de ingestão de aminoácido para que o equilíbrio nitrogenado fosse atingido.

A partir destes dados e de estudos feitos em mulheres (Leverton e cols., 1956a,b,c), Hegsted empregando métodos estatísticos redefiniu as necessidades de aminoácidos essenciais para adultos (Hegsted, 1963). Para tanto, a partir dos resultados de balanço nitrogenado compilados da literatura, Hegsted (Hegsted, 1963) traçou uma curva de regressão e considerou como valor recomendado o ponto em que esta curva era equivalente a balanço equilibrado, zero, mais dois desvios padrões⁴. Estas recomendações foram adotadas pela FAO/WHO em 1973, com a única diferença de que os dados foram transformados e apresentados em mg.kg⁻¹.d⁻¹. Até então os valores recomendados eram apresentados em mg.d⁻¹. As recomendações de aminoácidos essenciais feitas posteriormente, 1985 e 1989, tabela 3, foram semelhantes as de 1973. Nestas ocasiões a única diferença ficou por conta da inclusão da histidina como aminoácido essencial,

³ Estes estudantes eram pós-graduandos, e a maioria deles defendeu sua tese de doutorado com os resultados obtidos nestes trabalhos.

⁴ Em comunicação pessoal feita por Hegsted, em janeiro de 1992, este autor dizia-se cético quanto aos resultados de todos os seus próprios trabalhos publicados e baseados em resultados do balanço nitrogenado. Hegsted considera que o balanço nitrogenado é difícil de ser interpretado e que é possível se atingir qualquer resultado, dependendo do delineamento experimental realizado. Um de suas maiores críticas, relaciona-se ao fato, de que as conclusões tiradas na determinação de aminoácidos essenciais, foram feitas após os voluntários ingerirem por longo tempo dieta com muito baixo teor de aminoácidos e serem hipercalóricas (Hegsted, 1963, 1976).

(FAO/WHO/UNU, 1985; National Research Council, 1989). As recomendações de 1989 (National Research Council, 1989) sugerem, pela primeira vez, que estes valores podem ser inadequados e inclusive apresenta valores nitidamente superiores, sem no entanto recomendá-los porque os dados até então apresentados ainda são sujeitos a críticas.

Um outro fator importante a se considerar foi que nos trabalhos originais de Rose, e outros autores previamente citados, a relação entre o nitrogênio proveniente de aminoácidos essenciais e não essenciais não foi mantida constante, além do fato de que as perdas obrigatórias de nitrogênio por pele, pulmão, etc. não terem sido consideradas. A dieta usada nos trabalhos originais de Rose para se determinar as necessidades de aminoácidos fornecia $\approx 3,5 \text{ g.d}^{-1}$ de nitrogênio e $\approx 55 \text{ kcal.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Com estas dietas os indivíduos ganhavam peso durante o experimento, indicando claramente que estavam ingerindo um excesso de energia. Trabalhos posteriores mostram que a mesma dieta oferecida por Rose quanto a composição e teor total de nitrogênio, porém com oferta energética em torno de $45 \text{ kcal.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ é incapaz de manter balanço nitrogenado positivo (National Research Council, 1989; Young, Bier & Pellett, 1989).

Quando um aminoácido é ingerido passa a fazer parte do conjunto de diferentes compartimentos do organismo (pool), ou seja, plasma, extracelular, intracelular, etc (Kleiber, 1955; Green & Green, 1990). Entre estes diferentes pools passa a existir então um equilíbrio dinâmico, a quantidade que entra deve ser equivalente a que sai, incluindo aí o incorporado pelo organismo quando existe crescimento ou recuperação de tecido perdido em processos carências (Millward, 1989; Sugden & Fuller, 1991). Assim, desta forma o ingerido é igual ao perdido nas condições em que há equilíbrio fisiológico. Quando ocorre crescimento, o ingerido é igual ao perdido mais o incorporado pelo organismo necessário para crescer. Por fim, quando ocorre recuperação nutricional de estado carências diversos, o ingerido se equilibra com o perdido mais o utilizado para recuperação tecidual.

A excreção ou degradação de um aminoácido pelo organismo se faz por transformação do grupo amino em uréia e do grupo carboxila em CO_2 (Young & Janghorbani, 1982; Wootton e cols., 1985). Mais recentemente, com a introdução dos isótopos estáveis em biologia, estudos

cinéticos sobre as recomendação de aminoácidos essenciais tem sido feitos (Meguid e cols., 1986a). Desta maneira, é possível determinar-se as perdas de um aminoácido específico via oxidação com o uso de ^{13}C , isótopo estável do carbono. Assim sendo, a determinação da quantidade mínima de um aminoácido ingerido que se equilibra com o oxidado, produção de CO_2 , seria a quantidade de aminoácido necessária para atingir o equilíbrio (Bier & Young, 1987; Young, 1987, 1989). Assim, é possível determinar as recomendações de todos os aminoácidos essenciais, como por exemplo, leucina (Meguid e cols., 1986a), lisina (Meredith e cols., 1986), treonina (Zhao e cols., 1986). Estes estudos, em particular os realizados nos Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology, evidenciam que não só para a leucina, mas também as para outros aminoácidos essenciais as recomendações são, em geral, cerca de 2,5 vezes superiores as recomendações internacionais, com exceção da metionina, tabela 3 (Young, Bier & Pellett, 1989). Uma das críticas a estes trabalhos é que o valor recomendado foi obtido variando o aminoácido em estudo e mantendo fixa a oferta dos outros aminoácidos, em quantidades equivalentes a encontrada no ovo de galinha, que algumas vezes pode ser considerada como excessiva. Assim por exemplo no caso da leucina, o seu nível de ingestão variou entre $80 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ a menos de $10 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, sendo que a ingestão $\approx 30 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ equilibrou as perdas oxidativas (Meguid e cols., 1986a). Uma outra crítica é que em nenhum destes estudos, concomitante ao estudo cinético e a determinação da oxidação do aminoácido em questão, foi feito o balanço nitrogenado (Meguid e cols., 1986a,b; Meredith e cols., 1986; Zhao e cols., 1986).

Uma confirmação indireta e independente de que as atuais (National Research Council, 1989) recomendações de ingestão de aminoácidos essenciais é inferior as reais necessidades pode ser obtida a partir do raciocínio exposto a seguir. As perdas obrigatórias de nitrogênio no indivíduo adulto feitas em vários laboratórios quando a ingestão protéica é nula ou desprezível, considerando para tanto o nitrogênio perdido nas fezes, urina, pele e outras vias menores oscila em torno de $64 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (FAO/WHO, 1973; Marchini & Dutra de Oliveira, 1990). Paralelamente, avalia-se também que para se atingir o equilíbrio em estudos de balanço não basta oferecer aos indivíduos a quantidade exata do nitrogênio endógeno perdido, é necessário um adicional de aproximadamente 30%, ou seja, uma oferta protéica total entre 0,75 e 0,85 $\text{mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.

¹.d¹ para que se atinga o equilíbrio nitrogenado (Young & Pellett, 1987). Se este nitrogênio é perdido irreversivelmente significa também que o aminoácido em questão foi irreversivelmente oxidado, e excluindo os casos de defeitos de vias metabólicas envolvendo aminoácidos, na mesma proporção das proteínas corpóreas, considerando o corpo humano como um todo (Young, Bier & Pellett, 1989). A tabela 4 apresenta os valores proporcionais dos diferentes aminoácidos essenciais que são perdidos por meio desta oxidação obrigatória. Neste caso as recomendações seriam igual a estas perdas obrigatórias acrescidos de 30%. Observa-se que estes valores são superiores as recomendações internacionais e muito semelhante as recomendações derivadas de estudos cinéticos realizados no Massachusetts Institute of Technology, tabela 3 (Young, Bier & Pellett, 1989).

Para a realização dos estudos cinéticos são necessários marcadores biológicos que sejam inofensivos ao homem e que não alterem as reações metabólicas. Os isótopos estáveis podem ser utilizados por apresentarem estas qualidades. Estes isótopos são conhecidos por este nome para distingui-los dos isótopos radioativos e não emitirem radiações nocivas aos seres biológicos. A utilização dos isótopos estáveis, no entanto, depende de sua proporção na natureza. Somente são úteis para estudos metabólicos aqueles isótopos que aparecem em uma menor proporção (menos que 10%) em relação ao isótopo mais abundante, permitindo assim que sejam enriquecidos e reconhecidos (tabela 5). Um outro fator não menos importante e aparentemente óbvio, é que o elemento isotópico em questão esteja presente no organismo humano em quantidades mensuráveis. Por exemplo, o ¹²C apresenta-se na natureza na proporção de 98,9%, o ¹³C na proporção de 1,1% e o organismo humano tem em sua composição total 18% de carbono, tabela 5. Níveis de enriquecimento do ¹³C superiores a 1,1% tornam a separação possível de ser realizada e distinguível de substâncias que contenham a proporção natural de ¹²C, 98,9%. As suas principais vantagens são: 1) eles não são radioativos, portanto inócuos ao ser humano de qualquer idade, mesmo quando usados em maiores quantidades com objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade do método empregado na sua determinação. 2) O metabolismo de compostos com nitrogênio e oxigênio podem ser estudados, pois os mesmos não possuem equivalentes radioativos práticos de serem usados. 3) A espectrometria de massa detecta um evento primário, ou seja, o peso molecular de uma substância, ao contrário do método

radiométrico que detecta um evento secundário da molécula, ou seja a emissão de fotons após a excitação em meio cintilográfico. Além de detectar um determinado composto, a espectrometria de massa pode ser usada como método quantitativo. 4) Existe um grande número de isótopos estáveis que podem ser usados no estudo do metabolismo protéico, entre eles: o ^{13}C Carbono, o ^{18}O Oxigênio, o ^2H Hidrogênio e o ^{15}N Nitrogênio.

O uso de isótopos estáveis em experimentos clínicos tem aumentado consideravelmente (Halliday & Rennie, 1982; Rennie e cols., 1983; Klein & Klein, 1985; Pacy e cols., 1989). Convenientemente eles podem ser divididos em dois grupos. O primeiro relaciona-se com o método da diluição isotópica nos diferentes compartimentos do organismo e o segundo examina o turnover de pools metabólicos dinamicamente ativos. Por não existirem problemas éticos envolvidos com o uso de isótopos estáveis, a sua aceitabilidade tem sido crescente para o uso em seres humanos, incluindo até recém nascidos (Roberts e cols., 1988). Nestes é considerado a primeira escolha quando são necessários estudos com o uso de marcadores biológicos. O seu uso *in vivo* inclui, entre outros, a determinação da taxa de turnover e oxidação de vários substratos como aminoácidos, glicose e ácidos graxos; a medida do gasto energético; a medida de composição corporal e estudos de reações metabólicas em geral. Exemplos de uso clínico de isótopos estáveis são apresentados na tabela 6.

Desde os trabalhos originais que avaliam o turnover de proteína em humanos (Sprinson & Rittenberg, 1949), vários métodos tem sido descritos para tal fim. A maioria destes métodos tem em comum a medida da incorporação de ^{15}N em produtos urinários resultantes da degradação protéica após a administração de aminoácidos marcados com ^{15}N (Steffee e cols., 1976). *In vivo* o turnover de um aminoácido específico pode ser medido pela sua diluição em um compartimento específico, por exemplo plasma, durante a infusão contínua do mesmo aminoácido marcado, até se atingir o ponto de equilíbrio isotópico (Waterlow e cols., 1978; Pacy e cols., 1989). Uma outra maneira seria a administração de uma dose única e estudar a queda deste aminoácido no plasma (Waterlow e cols., 1978). Vários aminoácidos tem sido utilizados para tal fim (Halliday & Rennie, 1982). A escolha da leucina teoricamente apresenta vantagens, pois trata-se de um aminoácido essencial e em oposição aos outros aminoácidos, que

são metabolizados no fígado, é metabolizada primariamente no músculo, o principal e maior compartimento protéico do organismo (Waterlow e cols., 1978). Além disto, existem evidências de que a i) leucina tenha um efeito regulatório sobre: os outros dois aminoácidos ramificados, isoleucina e valina (Young & Marchini, 1990); ii) no processo de síntese e degradação protéica (Young, Gucalp e cols., 1987; Young & Marchini, 1990); iii) no metabolismo oxidativo; iv) como principal fonte de α -amino nitrogênio para gluconeogênese a partir de aminoácidos liberados do músculo (Young, 1991a). No passado, vários autores usaram a leucina radioativa marcada com ^{14}C para o estudo do turnover protéico (Waterlow e cols., 1978). Os aspectos éticos envolvidos no uso destes radioisótopos limitam grandemente o seu uso no homem.

Young e colaboradores foram os primeiros a publicar um trabalho usando isótopo estável, ^{13}C , ligado a leucina, para medida do turnover protéico em 1980 em humanos (Matthews e cols., 1980), utilizando a técnica conhecida como "prime continuous infusion technique". Considerando que a técnica utiliza um isótopo inócuo ao homem, ela pode ser aplicada a seres humanos de qualquer idade e nas mais diferentes condições de eutrofia ou de doença. A quantidade de plasma utilizada para cada uma das determinações é de aproximadamente 100 μL . A leucina marcada na posição 1, grupo carboxila, tem se mostrado um marcador particularmente útil. O seu primeiro passo de metabolização é a transaminação para α -ceto isocaproato e então descarboxilada para isovaleril-CoA e CO_2 . Este CO_2 é liberado no gás expirado, após se equilibrar com o pool orgânico de bicarbonato. Esta particularidade, perda do CO_2 via ar expirado, impede que a leucina seja reciclada no organismo o que tornaria falso os resultados.

Desta maneira, considerando que:

- 1) existem evidências de que as recomendações internacionais de aminoácidos essenciais são inadequadas;
- 2) os estudos cinéticos com isótopos estáveis destinados à determinação das necessidades e às recomendações de aminoácidos essenciais realizados até então sempre estudaram um aminoácido isoladamente de cada vez.
- 3) nos estudos citados no item anterior, variava-se um aminoácido essencial e os outros eram oferecidos em quantidades semelhante a encontrada na proteína do ovo e
- 4) não tendo sido determinado o nitrogênio total ingerido, fecal e urinário para cálculo do balanço nitrogenado.

O presente trabalho teve por objetivo:

Estudar em indivíduos jovens eutróficos do sexo masculino a adequação das recomendações atuais de aminoácidos essenciais, tendo a leucina como exemplo de aminoácido essencial.

Para tanto, foi oferecido dieta com diferentes teores de aminoácidos essenciais a indivíduos jovens eutróficos e procurou-se:

1. Empregar a metodologia cinética com isótopos estáveis para estudar a oxidação de um aminoácido essencial, a leucina.
2. Tendo a leucina como representante dos aminoácidos essenciais verificar, após um período de três semanas de adaptação à dieta, se as atuais recomendações de aminoácidos essenciais são suficientes para equilibrar as perdas oxidativas e irreversíveis deste mesmo aminoácido.
3. Verificar o efeito destas dietas sobre os níveis de aminoácidos plasmáticos.
4. Comparar os resultados cinéticos com os obtidos pelo balanço nitrogenado.

TABELA 1. Algumas funções metabólicas desempenhadas por aminoácidos no organismo humano (Uy & Wold, 1977; Young & Pellett, 1983; Millward & Rivers, 1988).

Função	Exemplo
Substrato para síntese protéica	Todos aminoácidos que são codificados (codon)
Reguladores do metabolismo protéico	Leucina, Arginina
Reguladores de atividades enzimáticas	Fenilalanina e a regulação da enzima fenilalanina hidroxilase
Precusores do sinal para transdução	Arginina e óxido nítrico
Reações de metilação	Metionina
Neurotransmissores	Triptofano (serotonina), glutamato
Fluxo de íons	Taurina, glutamato
Precusores de moléculas fisiológicas	Arginina e creatinina, glutamato e purinas
Transporte de nitrogênio	Alanina e glutamina
Propriedades de óxido-redução	Cistina, glutatona
Precursor de outros aminoácidos	Metionina e cistina
Substrato para neoglicogênese	Alanina, serina, glutamato

TABELA 2. Exemplo de cálculo das necessidades da leucina a partir de dados de balanço nitrogenado. Trabalho original de W. C. Rose publicado em 1955 (Rose e cols., 1955a).

Período	Peso	Leucina ingerida	Nitrogênio ingerido	Nitrogênio urinário	Nitrogênio fecal	Balanço*	Balanço considerando as perdas endógenas de nitrogênio†‡
dias	kg	mg/kg/d			g/d		
Indivíduo R.L.F.							
5	78,5	62,54	10,09	8,51	0,84	+0,74	+0,12
5	80,3	12,45	10,09	9,82	0,86	-0,59	-1,23
6	79,8	16,29	10,09	9,10	0,74	+0,25	-0,38
5	78,5	14,01	10,09	8,87	0,80	+0,42	-0,22
Indivíduo D.W.W.							
7	67,5	32,59	10,04	8,87	0,80	+0,37	-0,17
6	69,7	15,78	10,04	8,87	0,70	+0,47	-0,09
12	68,4	13,15	10,04	8,91	0,53	+0,60	+0,04
8	69,6	11,49	10,04	9,20	0,65	+0,19	-0,37
6	69,3	10,10	10,04	9,15	0,58	+0,31	-0,24
7	69,7	8,60	10,04	9,18	0,52	+0,34	-0,22
9	69,7	5,73	10,04	9,44	0,69	-0,09	-0,59
6	67,5	7,41	10,04	9,01	0,62	+0,41	-0,15

* Balanço = Nitrogênio ingerido - (Nitrogênio fecal + Nitrogênio Urinário)

† Nitrogênio endógeno = 8 mg/kg segundo FAO/WHO/UNU, 1985, que não foi considerado por Rose no cálculo do balanço nitrogenado.

‡ Balanço = Nitrogênio ingerido - (Nitrogênio fecal + Nitrogênio Urinário + Nitrogênio endógeno)

TABELA 3. Recomendações de aminoácidos para adultos.

Aminoácido	Fonte		FAO/WHO/UNU* 1973, 1985, 1989	Food Nutrition Board*		MIT† 1989
	1980					
	Homem	Mulher				
<i>mg.kg⁻¹.d⁻¹</i>						
Fenilalanina + tirosina	14	12,1		12,1		26
Isoleucina	10	9,5		7,8		23
Leucina	14	12,5		10,7		40
Lisina	12	9,4		8,6		30
Metionina + cistina	13	12,1		12,1		13
Treonina	7	6,5		5,3		15
Triptofano	3,5	2,9		2,8		6
Valina	10	10,7		11,2		20

* NAS-NRC, 1980; FAO/WHO/UNU, 1985; National Research Council, 1989.

† Recomendações feitas pelo Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA (Young, Bier & Pellett, 1989).

TABELA 4. Cálculo das recomendações de aminoácidos a partir das perdas endógenas obrigatórias de nitrogênio e assumindo uma eficiência de 70% do processo de digestão, absorção e utilização periférica da proteína ingerida.

Amino ácido	Composição corporal protéica $g.100g^{-1}$	Perdas obrigatórias* $mg.kg^{-1}.d^{-1}$	Quantidade recomendada para se atingir o equilíbrio $mg.kg^{-1}.d^{-1}$
Leucina	6,9	27,6	39,4
Isoleucina	4,1	16,4	23,4
Valina	5,0	20,0	28,6
Lisina	7,8	31,2	44,6
Treonina	4,2	16,8	24,0
Sulfurados	7,6	30,4	43,4
Aromáticos	3,4	13,6	19,4
* FAO/WHO, 1973			

TABELA 5. Exemplos de isótopos, sendo alguns utilizados em medicina.

Elemento	Frequência no corpo %	Isótopos	Frequência relativa átomos %	Número de Massa	Emissão	Meia vida	Característica
Hidrogênio	10	^1H	99,985	1,00783			Estável
		^2H	0,015	2,01410			Estável
		^3H		3,016049	β	12,26 anos	Radioativo
Carbono	18	^{12}C	98,89	12,00000			Estável
		^{13}C	1,11	13,00335			Estável
		^{14}C		14,00324	β	5770 anos	Radioativo
Nitrogênio	3	^{14}N	99,63	14,00307			Estável
		^{15}N	0,37	15,00011			Estável
Oxigênio	65	^{16}O	99,759	15,99491			Estável
		^{17}O	0,037	16,99913			Estável
		^{18}O	0,204	17,99916			Estável
Fósforo	1	^{31}P	100	30,97376			Estável
Enxofre	0,25	^{32}S			β	14,4 dias	Radioativo
		^{32}S	95,0	31,97207			Estável
		^{33}S	0,76	32,97146			Estável
		^{34}S	4,22	33,96786			Estável
		^{35}S			β	87,5 dias	Radioativo
Iodo	0,00004	^{35}S	0,014	35,96709			Estável
		^{127}I			γ	60 dias	Radioativo
		^{127}I	100	126,90435			Estável
		^{131}I			β, γ	12,5 horas	Radioativo
		^{131}I			β, γ	8,09 dias	Radioativo
		^{131}I			β, γ	2,3 horas	Radioativo

TABELA 6. Uso clínico de isótopos estáveis em pesquisa médica.

	Isótopo	Fonte
<i>Estudos dilucionais</i>		
Gasto energético	$^2\text{H}_2$, ^{18}O , $^2\text{H}_2\text{O}$	Schoeller & Van Santen, 1982; Klein, e cols., 1984; Westerterp e cols., 1986; Roberts e cols., 1988
Água corpórea total	H_2^{18}O , $^2\text{H}_2\text{O}$	Halliday & Miller, 1977; Schoeller e cols., 1980
<i>Metabolismo protéico</i>		
Todo organismo	^{13}C -Leu, ^{15}N -Gly, ^{15}N -Lys, $^3\text{H}_2$ -Phe	Halliday & McKernan, 1975; Golden & Waterlow, 1977; Matthews e cols., 1980; Hoffer e cols., 1983; Schwenk e cols., 1985; Layman & Wolfe, 1987
Tecidos e proteínas específicas	^{13}C -Leu, ^{15}N -Gly	Gersovitz e cols., 1980; Cheng e cols., 1987; Pacy e cols., 1987; Halliday e cols., 1988
<i>Substrato para oxidação</i>		
Gorduras	^{13}C -Palmitato, $^3\text{H}_2$ -Glicerol	Klein, e cols., 1986; Ravussin e cols., 1986; Peylot e cols., 1987
Hidratos de carbono	^{13}C -Glicose	Royle e cols., 1983; Fukagawa e cols., 1990
<i>Erros inatos do metabolismo</i>		
Estudo de vias metabólicas	vários	Curtius e cols., 1973; Bruinvis e cols., 1983
Deteção de heterozigotos	$^3\text{H}_2$ -Phe	Trefz e cols., 1979
<i>Metabolismo de minerais</i>	^{44}Ca , ^{54}Fe , ^{57}Fe , ^{203}Pb , ^{65}Cu , ^{70}Zn , ^{205}Mg	Janghorbani & Young, 1982
<i>Teste respiratórios</i>		
Deficiência de lactase	^{13}C -Lactose	Sasaki e cols., 1970
Má absorção de gordura	^{13}C -Triglicérides e ácidos graxos	Ghoos e cols., 1981; Watkins e cols., 1982
Função hepática	^{13}C -aminopiridina, ^{13}C -galactose	Shreeve e cols., 1976; Schneider e cols., 1980
Crescimento bacteriano	^{13}C -glicocolato	Solomons e cols., 1977
Deteção do "Campylobacter"	^{13}C -uréia	Graham e cols., 1987
<i>Farmacocinética</i>	vários	Blake e cols., 1975
<i>Química de aminoácidos</i>		
Transaminação	^{15}N , ^{13}C -Leu	Matthews e cols., 1981; Cheng e cols., 1987
Metabolismo	^{15}N -Gly, ^{15}N -Ala, ^{13}C -Leu	Shipley & Clarke, 1972; Lapidot & Nissim, 1980
<i>Substrato metabólico</i>		
Glicose - ác. graxo	$^3\text{H}_2$ -Glicose	Wolfe e cols., 1987

METODOLOGIA

Desenho experimental

A hipótese inicial deste trabalho foi que as recomendações atuais de ingestão de aminoácidos são questionáveis e inferiores às sugeridas pelo Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology, com exceção da metionina. Desta maneira, este estudo foi realizado para avaliar se a ingestão de aminoácidos, recomendados pela FAO/WHO/UNU⁵, 1985, é suficiente para manter o equilíbrio aminoacídico em um grupo de jovens eutróficos do sexo masculino. Para tal foram realizados e avaliados os resultados de balanços nitrogenados, níveis plasmáticos de aminoácidos livres e turnover protéico corpóreo total, com marcadores estáveis. O experimento foi planejado para durar cinco semanas ou 35 dias, sendo as dietas experimentais oferecidas por três semanas. Na semana inicial do estudo, bem como na última todos os indivíduos receberam dieta com oferta abundante de aminoácidos essenciais, semelhante a proteína do ovo que é equivalente a $\approx 4,5$ as atuais recomendações internacionais (National Research Council, 1979). Foram estudados três grupos experimentais, cujas dietas ofereciam quantidades pré-determinadas e diferentes de aminoácidos essenciais (figura 1). Cada indivíduo só participou de um grupo. O primeiro grupo foi designado como Grupo I, ou GFAO. O segundo grupo designado de Grupo II, ou GMIT e, finalmente, o terceiro Grupo III, ou GOVO. Todos os participantes do estudo somente foram internados durante o estudo cinético para infusão isotópica por oito horas. A divisão dos grupos foi ao acaso.

Durante a primeira e última semanas de estudo foi oferecido a todos os grupos uma dieta cujo teor de aminoácidos essenciais foi semelhante a proporção encontrada no ovo de galinha,

⁵ Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization/ United Nations University.

considerada uma oferta abundante de aminoácidos essenciais, ou seja, $\cong 4$ vezes as recomendadas. Nas três semanas do meio, isto é, a segunda, a terceira e a quarta semanas de estudo, foram oferecidas as dietas experimentais. O GFAO recebeu teor de aminoácidos essenciais semelhante as recomendações internacionais. O GMIT recebeu teor de aminoácidos essenciais na dieta semelhantes as recomendações do Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology. O Grupo III, GOVO, durante todas as cinco semanas de estudo recebeu teor de aminoácidos semelhantes a proporção encontrada no ovo de galinha.

Ao final da primeira (sétimo dia), segunda (décimo quarto dia) e quarta semanas (vigésimo oitavo dia) e no meio da quinta semana (trigésimo primeiro dia) realizou-se em todos os indivíduos estudo cinético com aminoácido marcado, ^{13}C -leucina. Cada estudo cinético foi subdividido em duas fases, ou estados metabólicos. Durante as primeiras três horas de infusão não foi oferecido dieta aos indivíduos, sendo esta fase identificada como de jejum ou *estado de jejum*. Durante a segunda fase do estudo cinético, com duração de cinco horas, foi oferecida dieta aos indivíduos participantes em quantidade e períodos de tempo regulares. Esta segunda fase, foi identificada como *estado alimentado*. Para efeito prático os *estudos cinéticos* também são identificados como *infusão* de isótopo estável.

Durante todo o experimento foram coletadas urina e fezes, além de amostras da dieta para determinação do balanço metabólico nitrogenado. A determinação dos níveis de aminoácidos plasmáticos livres foi feita nos dias do estudo cinético. Para tal finalidade foram coletada duas amostras de sangue, uma no tempo zero, considerada representativa do estado de jejum e outra no tempo 480 minutos, ou seja, ao final do estudo cinético, considerada representativa do estado alimentado.

Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelos Conselho de Ética do Clinical Research Center do Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, U.S.A. Qualquer um dos indivíduos podia desistir do estudo sem qualquer explicação e a todos foi oferecida, ao final do estudo, uma compensação financeira.

Casística

Os estudos foram realizados em indivíduos do sexo masculino, sem doenças aparentes, voluntários e em regime ambulatorial. Todos mantiveram suas atividades rotineiras. Os participantes foram considerados eutróficos após história médica, exame clínico e exames laboratoriais (hemograma, urina rotina, glicemia, albuminemia, uremia) no início e final do estudo. Nenhum dos participantes tinha história de perda de peso recente, práticas alimentares não usuais, endocrinopatia, terapêutica medicamentosa, ou tratamento hormonal.

A todos explicou-se os riscos potenciais do estudo relacionados com o gosto desagradável da dieta, monotonia do estudo, punção venosa superficial, coleta de urina, fezes e gás expirado. Todos mantiveram suas atividades físicas usuais e foram impedidos de realizar atividades físicas extremas mesmo que esporádicas, inclusive participar em competições esportivas.

Dietas

A oferta calórica, vitamínica, mineral e de água foi semelhante para todas as dietas, atendendo as recomendações internacionais (National Research Council, 1989), tabela 7. Cada indivíduo recebeu três refeições isocalóricas e isonitrogênicas às 8:00, 12:00 e 17:00 horas, exceto nos dias de estudo cinético, como descrito a seguir. As refeições foram preparadas e servidas no restaurante do Clinical Research Center, do Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology, Boston, sob supervisão constante de Nutricionista.

A oferta protéica total foi equivalente a 0,8 (Nitrogênio x 6,25) g proteína.kg⁻¹.d⁻¹ semelhante para todos os grupos estudados. Toda oferta protéica foi conseguida pela ingestão de aminoácidos cristalinos (Ajinomoto Inc., USA; Teaneck, New Jersey). Conforme exposto anteriormente, figura 1, a dieta oferecida ao GFAO, teve teor de aminoácidos essenciais

semelhantes às recomendações internacionais. A do GMIT semelhantes às recomendações do Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology e a do GOVO semelhante ao padrão ovo de galinha, tabela 8.

A oferta energética foi constante para um mesmo indivíduo e variou entre 40 e 50 kcal.kg⁻¹.d⁻¹. Esta oferta foi calculada a partir dos dados de ingestão e atividades usuais dos diferentes participantes do estudo e tinha como objetivo manter o peso estável. A fonte calórica foi derivada de açúcar da beterraba, bolos feitos com amido de trigo, sucos artificiais, sendo todas as fontes calóricas isentas de proteína, tabela 9.

A oferta de minerais e vitaminas foi constante para todos os indivíduos e em quantidades suficientes para suprir ou exceder as necessidades preconizadas FAO/WHO/UNU, tabela 10 (National Research Council, 1989). A ingestão de água, café e chá sem cafeína ou açúcar foi *ad libitum*. Na noite anterior à infusão de isótopo estável para se realizar o estudo cinético, era permitido ingerir líquidos até as 22:00 horas. Após o término da infusão a dieta fornecida voltava a ser a usual até a próxima infusão.

Estudo cinético ou infusão do isótopo estável.

L-[1-¹³C] leucina (Tracer Technologies Inc., Somerville, MA, USA) e [¹³C] bicarbonato de sódio (Cambridge Isotopes Laboratories, Woburn, MA, USA) foram utilizados como isótopos estáveis. A pureza química, isomérica e isotópica foi confirmada por meio de cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

As soluções infundidas foram consideradas esterilizadas e livres de pirogênicos por meio de testes realizados em laboratório independente (Alves e cols., 1990; Matthews e cols., 1982). Para verificar a esterilização, as soluções empregadas foram semeadas e mantidas incubadas por período de 10 dias. Todas culturas foram incubadas em meio de caseína à temperatura de 30°-

35°C. Após o décimo dia não foi evidenciado crescimento microbiano, em todas amostras utilizadas no presente trabalho. A verificação da presença de pirogênicos em solução foi feita após diluição em NaCl 0,9% e filtração em filtro de 0,22 μm . A concentração final da solução teste foi ajustada para 0,4 mg.dL⁻¹ e a dose de 10 ml.kg⁻¹ foi injetada em coelho. Para tanto, cada teste foi feito em três coelhos adultos, mantidos em gaiolas apropriadas e sob monitorização contínua de temperatura retal. A solução teste foi injetada na veia lateral da orelha de cada animal. Além da temperatura basal, medida imediatamente antes da injeção teste, foi feito também registro uma, duas e três horas após. O teste era realizado e os resultados interpretados de acordo com a recomendação USP XXI. Todos materiais experimentados foram considerados isentos de pirogênicos.

Cada indivíduo permaneceu 10-12 horas de jejum antes de cada estudo isotópico, figura 2. Na manhã do estudo eles chegavam às 6:00 no "Clinical Research Center" do Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology. Às sete horas era colocado um cateter na veia antecubital após anestesia local com xilocaína, onde foi infundido o isótopo estável. A coleta de sangue foi feita por meio de um outro cateter colocado na veia superficial da mão ipsilateral. Esta mão foi mantida dentro de uma caixa com fluxo contínuo de ar aquecido a 68°C por 10 minutos antes de cada retirada de sangue. Este procedimento era realizado afim de coletar sangue considerado arterializado (Abumrad e cols., 1981). A permeabilidade do cateter foi mantida com o uso de solução salina. Trinta minutos após os cateteres terem sido colocados foi coletado amostras de sangue e gás expirado para as determinações basais e a seguir iniciado o estudo propriamente dito. As amostras de sangue foram mantidas em gelo até o momento da centrifugação (3000 g por 15 minutos) logo após o término do estudo. A seguir as amostras de plasma foram armazenadas a -80°C até o momento das análises isotópicas. As amostras de gás expirado foram guardadas a 20°C até o momento da determinação isotópica que ocorria nos dias subseqüentes ao do estudo. Três medidas de calorimetria indireta, cada um por 30 minutos, também foram realizadas durante o estudo para determinação da produção total de CO₂. A primeira determinação foi feita no início da infusão sendo representativa do estado de jejum. Duas outras medidas foram feitas após a oferta de alimentos sendo a média destas determinações utilizada como o valor correspondente ao estado alimentado.

Cada indivíduo recebeu a seguinte dose inicial ou "prime" de isótopo:

1- $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3 = 1,2 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (82,8 μg)

2- $\text{L-[1-}^{13}\text{C] leucina} = 6,4 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (0,85 mg)

A infusão contínua do isótopo foi:

1- $\text{L-[1-}^{13}\text{C] leucina} = 3,8 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (0,50 mg)

Oito horas, após a infusão da dose "prime", teve início a infusão contínua de $\text{L-[1-}^{13}\text{C] leucina}$ durante oito horas, figura 2. A infusão foi feita com bomba modelo 940 Harvard Apparatus, Harvard, MA, sendo continuamente utilizado filtro de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Bedford, MA). Após três horas do estudo, etapa chamada jejum, os indivíduos começavam a receber dieta de hora em hora. A dieta foi oferecida, em porções iguais a cada hora, por cinco horas, e equivalente a 5/12 do total de nutrientes diariamente oferecidos. A dieta foi fornecida em forma de pó ou bolo contendo calorias, minerais, vitaminas e a mistura apropriada de aminoácidos.

Coleta de sangue

A coleta de sangue foi feita em vidro heparinizado (Venoject®, Terumo Medical Corp, Elkton, MD). Após a coleta da amostra basal, foi coletada outra amostra aos 60 minutos do estudo. A seguir coletou-se amostras a cada 20 minutos até o tempo de 180 minutos. Neste ponto as amostras passaram a ser horárias até 420 minutos, quando as amostras passaram novamente a ser coletadas de 20 em 20 minutos até o final do estudo aos 480 minutos, figura 2. Foram coletadas por fim um total de 18 amostras, sendo cada uma de 3 ml, ou seja um total de 54 ml de sangue, ou aproximadamente 216 ml durante todo o estudo. O participantes do estudo além

de terem o hematócrito monitorizado semanalmente, receberam um suplemento de 18 mg ferro na forma de FeSO_4 .

Coleta de gás expirado

A determinação dos gases, teores de O_2 e CO_2 inspirados/expirados foi feita por meio de calorimetria indireta (Hoerr e cols., 1989). Durante a infusão a produção total de CO_2 e o consumo de O_2 foi determinado. Para tanto foi aplicado máscara facial com válvula própria (Speak-Easy II, Respironics, Monroeville, PA) que impedia a mistura do ar expirado com o ar ambiente, sendo feita a determinação imediata de CO_2 e O_2 . A concentração de CO_2 foi medida por meio de um analisador de infravermelho (Analisador Médico de gases modelo LB-2, Beckman Instruments, Fullerton, CA). A concentração de O_2 foi medida por meio de um célula eletrolítica (modelo SA1, Ametek-Applied Electrochemistry, Pittsburgh, PA). O volume expiratório foi determinado após a correção destes volumes considerando-se a temperatura, pressão e umidade do ar no local do experimento.

A análise do $^{13}\text{CO}_2$ enriquecido no gás expirado, em adição às amostras basais, foi feita em triplicata. O ar expirado foi coletado no final da expiração por meio de um peça bucal e um válvula de duas vias tipo Rudolf. As amostras foram armazenadas em tubos de vidro sem silicone (Venoject® collection tubes, Terumo Medical Corp, Elkton, MD) e foram mantidos a temperatura ambiente até o momento das dosagens (Hoerr e cols., 1989).

Aminoácidos plasmáticos: determinação, derivatização e análise espectrométrica

A concentração plasmática de aminoácidos livres e de leucina na solução infundida, foi feita em sistema Hewlett Packard HPLC (AminoQuant II), com derivatização pré-coluna usando

orto-fitalaldeído e 9-fluorenilmetilcloroformato. A quantificação foi feita com detector fluorescente.

A análise do ácido ^{13}C -cetoisocapróico (^{13}C -KIC) foi, em resumo, feita como descrita a seguir. Inicialmente o plasma, 300 μL , foi desproteínizado com metanol. A seguir o sobrenadante foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e o material seco resultante redissolvido em 200 μL de água destilada. A seguir preparou-se o derivativo quinoxalino segundo Rocchiccioli e cols., 1981, usando solução a 1% de *O*-fenilenediamino em ácido hidrocloreico e aquecimento. A solução contendo o ^{13}C -KIC parcialmente derivatizado foi extraída, duas vezes, com etilacetato e evaporada à secura. O resíduo foi diluído em 50 μL de *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil) trifluoracetamida (MTBSTFA, Pierce, Rockford, Illinois, USA) e 50 μL de piridina. A solução a seguir foi mantida por 12 horas, a temperatura ambiente, formando assim quinoxalino-*t*-BDMS (Langenbeck e cols., 1985). Um μL desta solução era suficiente para análise por meio de GC/MS e monitorização seletiva do íon pré selecionado (SIM).

Para determinação da ^{13}C -Leucina (^{13}C -Leu) eluiu-se 200 μL de plasma com 1 mL de 1 N ácido acético em resina de troca iônica (BioRad AG50-X2 resin, Richmond, CA, USA) (Adams, 1974). A fração contendo os aminoácidos foi eluída da coluna com hidróxido de amônia. Esta porção foi evaporada até ficar seca. O derivativo terciário butil dimetilsilil (*t*-BDMS) do aminoácido é formado após aquecimento do resíduo por uma hora a 60°C com 50 μL de MTBSTFA e 50 μL de acetonitrilo. Dois ou três μL s desta mistura são suficientes para análise em GC/MS.

As medidas de diluição isotópica foram feitas em um sistema Hewlett Packard (HP), composto de cromatógrafo a gás (GC) acoplado a um espectrômetro de massa (MS) quadrupolo HP 5988A. O controle e coleta de dados do sistema HP foi feito com utilização do programa HP RTE-A (HP, Palo Alto, CA, USA). A ionização por impacto eletrônica foi realizada a 120 eV.

Para determinação do ^{13}C -KIC utilizou-se coluna de sílica fundida de 30 m x 0,25 mm DB 1701 (Jand W Scientific, Folsom, CA, USA), com controle de temperatura de 140°C a 300°C, com incremento de 10°C/min. O KIC elue a 7,2 minutos e foi monitorizado no pico básico m/z 259[M-57] e a espécie marcada com ^{13}C no pico m/z 260 que corresponde a perda do grupo *t*-butil (Langenbeck e cols., 1985). O enriquecimento plasmático de KIC foi medido contra curva de calibração preparada com misturas padrões variando de 0 a 10% marcada com ácido [1- ^{13}C]cetoisocapróico. Os gráficos de calibração tinham inclinação próxima a unidade e coeficiente de correlação $\cong 0,99$. Cada amostra foi medida em duplicata.

A análise da leucina foi realizada no GC/MS com uso de uma coluna de sílica fundida de 30 m x 0,25 mm DB 1301 (Jand W Scientific, Folsom, CA, USA) sendo a temperatura programada para variar entre 200°C e 300°C com incremento de 15°C/min. A leucina elue a 3,4 minutos. A monitorização seletiva de íons foi feita no fragmento M-57 que corresponde a perda do grupo *t*-butil (Neves & Vasconcelos, 1987). O pico básico foi m/z 302 para leucina natural e m/z 303 para [1- ^{13}C]leucina. O gráfico de calibração foi linear, com inclinação próxima a um e coeficiente de correlação maior que 0,90. Cada amostra foi medida em duplicata.

Avaliação do balanço cinético de leucina

O modelo geral para determinação da cinética de leucina é apresentado na figura 3, onde os passos metabólicos irreversíveis são representados por flexas escuras. Neste sentido a passagem de KIC para isovaleril-CoA e CO_2 representa uma reação de oxidação irreversível com perda de CO_2 pelo ar expirado. Este modelo multicompartmental considera que a leucina plasmática é captada e liberada por diferentes tecidos do organismo. O ácido cetoisocapróico (KIC) é formado por transaminação intracelular de leucina e é também liberado na circulação sistêmica. Para aqueles tecidos que liberam KIC para o plasma, o enriquecimento isotópico de ^{13}C -KIC plasmático será equivalente ao enriquecimento intracelular de ^{13}C -Leucina, durante a infusão constante de ^{13}C -Leucina. Esta equivalência intracelular de ^{13}C -KIC e ^{13}C -Leucina ocorre

porque a única fonte de KIC é a transaminação de leucina. Conseqüentemente, o enriquecimento de ^{13}C -KIC plasmático deve representar o pool intracelular de ^{13}C -Leucina integrado durante o tempo de infusão isotópica (Matthews e cols., 1982). Desta maneira o fluxo de leucina é determinado a partir do enriquecimento plasmático do α -[1- ^{13}C]KIC. A partir do fluxo de leucina é calculado a taxa de síntese e degradação protéica, utilizando-se o modelo estocástico descrito por Waterlow (Waterlow e cols., 1978):

$$Q = S + O = I + B$$

onde Q = fluxo, S = síntese protéica ou taxa de desaparecimento plasmático não oxidativo de leucina, O = oxidação de proteína, I = ingestão de leucina e B = leucina liberada a partir da degradação protéica ou taxa de aparecimento plasmático de leucina independente da ingestão. Este parâmetros são expressos em $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$

O fluxo foi calculado pela equação:

$$Q = i \times (E_i/E_p - 1)$$

onde i = é a taxa de infusão de L-[1- ^{13}C]leucina, E_i = é o enriquecimento de L-[1- ^{13}C]leucina no infusado (átomos por cento excesso) e E_p é o enriquecimento plasmático de L-[1- ^{13}C] KIC no ponto de equilíbrio (plateau). Enriquecimento plasmático é o valor percentual da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em relação ao valor basal obtido previamente à infusão de L-[1- ^{13}C]leucina. Ponto de equilíbrio, também conhecido como ponto de enriquecimento isotópico constante, é definido como a média dos valores de enriquecimento plasmáticos e constantes de L-[1- ^{13}C] KIC, após um período pré determinado de infusão de L-[1- ^{13}C]leucina.

Para o cálculo dos dados cinéticos, os valores de enriquecimento de $^{13}\text{CO}_2$ do gás expirado, no ponto de equilíbrio, também foram corrigidos pelo valor basal de excreção de $^{13}\text{CO}_2$. Este valor corrigido é abreviado por E_{CO_2} e expresso em $\text{APE} \cdot 10^{-3}$ (átomos por mil excesso acima do basal). A produção de $^{13}\text{CO}_2$ ($\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a partir da oxidação de L-[1- ^{13}C]leucina foi calculada pela equação:

$$V_{13CO_2} = [(V_{CO_2} \times E_{13CO_2}) / \text{peso corpóreo}] \times [60 \times 44,6 / (100 \times r)]$$

onde V_{CO_2} é a taxa de produção de CO_2 ($ml \cdot min^{-1}$), E_{13CO_2} é o enriquecimento de $^{13}CO_2$ no ar expirado no ponto de equilíbrio. O peso corpóreo é expresso em kg. A constante 60 converte minutos em horas, e 44,6 converte mililitros de leucina em μ moles leucina (a pressão e temperatura constantes, 760 mmHg e $0^\circ C$), 100 torna o valor percentual. O fator r corrige o valor de $^{13}CO_2$ libertado pela oxidação de L-[1- ^{13}C]leucina, mas retido no bicarbonato corpóreo. Para infusão endovenosa de L-[1- ^{13}C]leucina, a fração de $Na[^{13}C]$ bicarbonato recuperado no gás expirado como $^{13}CO_2$ é de 0,70, em jejum, e de 0,82 para o período alimentado, como previamente determinado no Clinical Research Center, Massachusetts Institute of Technology, para jovens adultos (Hoerr e cols., 1989).

O enriquecimento de ^{13}C no ar expirado foi medido por espectrômetro de massa com coletor triplo, Finigan-MAT delta E (Hoerr e cols., 1989).

A oxidação de leucina foi calculada:

$$O = V_{CO_2} \times (1/E_p - 1/E_i) \times 100$$

logo, a taxa de desaparecimento não oxidativo da leucina, também conhecida como taxa de captação periférica de leucina, que representa uma estimativa da síntese protéica, é derivada de:

$$S = Q - O,$$

e a taxa de aparecimento plasmático de leucina, que representa uma estimativa da degradação protéica, é derivada de:

$$B = O - I,$$

onde I = ingestão de leucina.

A avaliação do balanço cinético de leucina diário (LKB) foi extrapolada por dois métodos

diferentes, LKBi e LKBii, conforme exposto a seguir. Considera-se para efeito de cálculo, que as 24 horas do dia são divididas em duas fases iguais, sendo uma correspondente a fase de 12 horas de jejum, na qual não existe oferta de alimentos e outra, fase de 12 horas alimentado, em que a oferta de alimentos é constante neste período. Assim temos:

$$LKB = FaB + FeB$$

$$FaB = \text{BALANÇO DE LEUCINA EM 12 HORAS DE JEJUM}$$

$$FeB = \text{BALANÇO DE LEUCINA EM 12 HORAS DE ALIMENTADO}$$

Para LKBi: $FaB = (\text{Infu} - \text{Oxid}) \times 12$ e

$$FeB = (\text{Infu} + \text{Diet} - \text{Oxid}) \times 12.$$

Para LKBii: $FaB = 3 \times (\text{Infu} - \text{Oxid}) - 9 \times \text{Oxid} + \text{Prime}$ e

$$FeB = 5 \times (\text{Infu} + \text{Diet} - \text{Oxid}) + 7 \times (\text{Diet} - \text{Oxid}), \text{ onde}$$

Infu = infusão de leucina marcada, $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;

Oxid = oxidação de leucina, $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;

Diet = ingestão diária de leucina, $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e

Prime é a dose de ataque de leucina marcada ("prime dose"), $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

O valor de oxidação de leucina foi corrigida pela quantidade de leucina marcada infundida (Meguid e cols., 1986a). No primeiro método (LKBi), a quantidade de marcador dada por hora é extrapolada para 12 horas de jejum e 12 horas alimentado. Pelo segundo método

(LKBii) a quantidade real de leucina marcada só influencia os cálculos no período de estudo, isto é, três horas de jejum e cinco horas de alimentado.

Estes cálculos pressupõem que i) no período alimentado há absorção completa da leucina ingerida, a uma taxa uniforme e constante durante o período de estudo; ii) não existe diferença de oxidação entre a leucina marcada e a não marcada e que são constantes com o tempo e iii) a leucina marcada infundida mistura-se de maneira uniforme em todo organismo (Meguid e cols., 1986b). Estudos anteriores demonstraram que o erro do cálculo do fluxo de leucina é de aproximadamente 2% e do cálculo da oxidação de leucina de no máximo 10% (Matthews e cols., 1980; Meguid e cols., 1986b).

Balanço nitrogenado

O balanço nitrogenado (BN), g.24 horas⁻¹, foi considerado a diferença entre o nitrogênio ingerido (NI) e o excretado (Young, 1986). O nitrogênio excretado corresponde a soma entre o nitrogênio fecal (NF), urinário (NU) e as perdas insensíveis de nitrogênio. Estas perdas foram consideradas de 8 mg.kg⁻¹.d⁻¹ (Scrimshaw e cols., 1972). As amostras semanais de fezes foram coletadas usando marcadores (carmim) dado no primeiro e sétimo dia (Scrimshaw e cols., 1966). Ao todo foram realizados quatro estudos de balanço correspondentes as quatro últimas semanas de estudo. O nitrogênio foi dosado pelo método de Kjeldahl. Desta maneira:

$$BN = NI - (NU + NF + 8).$$

Método estatístico

Os dados foram interpretados por meio de análise de variância por medidas repetidas trifatoriais (dieta, infusão e estado de jejum/alimentado) sobre o tempo para verificar as alterações cinéticas de leucina. Nos casos em que se detectou significância na interação dieta x infusão x estado jejum/alimentado, a diferença específica foi examinada pelo teste Newman Keul's (Nintze, 1987). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, e somente as comparações significativas de interesse são apresentadas nas diferentes tabelas. Os participantes foram escolhidos ao acaso para receberem uma das três dietas estudadas, com objetivo de manter os grupos tão uniformes quanto possível. Todos os testes estatísticos foram feitos usando os programas Systat® e NCSS®.

TABELA 7. Dietas experimentais e controle utilizadas com diferentes ofertas de aminoácidos essenciais*.

Dieta 1, padrão FAO ou GFAO	Todos aminoácidos essenciais oferecidos seguiram as recomendações da FAO/WHO/UNU†. Proporção de aminoácidos essenciais igual a 11 %.
Dieta 2, padrão MIT ou GMIT	Todos aminoácidos essenciais oferecidos seguiram o padrão proposto pelo Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology, ou seja $\approx 2,5$ o padrão FAO‡. Proporção de aminoácidos essenciais igual a 21 %.
Dieta 3, padrão ovo de galinha ou GOVO	Todos aminoácidos essenciais oferecidos seguiram o padrão encontrado no ovo de galinha, ou seja, ≈ 4 vezes o padrão FAO. Proporção de aminoácidos essenciais igual a 53 %.

* Os nutrientes não protéicos das três dietas foram mantidos constantes por unidade de peso corpóreo para todos indivíduos.

† Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization/ United Nations University (FAO/WHO/UNU, 1985; National Research Council, 1989)

‡ Segundo Young, Bier & Pellett, 1989 e Young, Bier e cols., 1992.

TABELA 8. Teor de aminoácidos oferecidos nas diferentes dietas.

Aminoácido	Dieta padrão FAO, GFAO		Dieta padrão MIT, GMIT		Dieta padrão ovo, GOVO	
	Aminoácido	Nitrogênio	Aminoácido	Nitrogênio	Aminoácido	Nitrogênio
				mg. kg ⁻¹ . d ⁻¹		
Aminoácidos essenciais						
Triptofano	3,5	0,48	6	0,82	15	2,12
Treonina	7	0,82	15	1,76	47	5,49
Isoleucina	10	1,07	23	2,46	62	6,66
Leucina	14	1,49	40	4,27	83	8,86
Lisina	12	1,84	30	4,60	75	11,52
Metionina e Cistina	13 e 13	1,22 e 1,52	13 e 13	1,22 e 1,52	29 e 22	2,76 e 2,56
Fenilalanina e tirosina	8 e 5	0,68 e 0,39	26 e 13	2,20 e 1,00	54 e 40	4,60 e 3,12
Valina	10	1,20	20	2,39	70	8,34
Histidina	12	2,41	12	2,41	30	6,10
Sub-total	107,5	13,11	211	24,66	529	67,14
Aminoácidos não essenciais						
Arginina	117	31,08	107	28,46	75	19,95
Alanina	143	22,48	136	21,37	190	29,87
Ácido aspártico	129	13,57	141	14,84	12	1,25
Ácido glutâmico	256	24,40	179	17,04	29	2,79
Glicina	52	9,65	47	8,84	45	8,40
Prolina	65	7,94	60	7,27	40	8,40
Serina	131	17,39	120	15,93	80	10,66
Total	1000,3	139,2	1000,6	138,40	1000,0	139,92

* Ingestão protéica total $\approx 0,8$ g kg de peso corpóreo.d⁻¹

TABELA 9. Composição típica da dieta*, isenta de proteína (aminoácidos) oferecida a todos participantes como fonte de calorias, de minerais e de vitaminas.

Fonte	Quantidade por dia	kJ.d ⁻¹ (kcal.d ⁻¹)
Bolo sem proteína	6 a 10 unidades	≈ 2100 (≈ 530)
Manteiga	15 g	≈ 450 (≈ 100)
Sacarose	33 g	≈ 570 (≈ 140)
Suplemento mineral†		
Suplemento vitamínico†		

* Feita com amido de trigo, sacarose de beterraba, condimentos, sabores artificiais e cloreto de sódio

† Veja tabela 10.

TABELA 10. Suplemento diário de vitaminas e minerais oferecidos, comprimido, a todos os participantes independente do grupo.

Vitaminas	Recomendações*	Suplemento
Vitamina A - IU (como retinol)	3300	5000
Vitamina D - IU	300	400
Vitamina C - mg	60	60
Vitamina E - mg	10	15
Tiamina - mg	1,5	1,5
Riboflavina - mg	1,7	1,7
Niacina - mg	20	20
Piridoxina - mg	2,2	2,0
Vitamina B ₁₂ - µg	2	6
Colina - mg		500
Folacina - µg	400	400
Minerais		
Sódio - mg	> 500	2000
Potássio - mg	> 2000	2930
Cloro - mg	> 750	3000
Cálcio - mg	800-1200	1200
Fósforo - mg	800-1200	900
Magnésio - mg	350	380
Zinco - mg	15	15
Ferro - mg	10	18
Cobre - mg	≈ 2,5	2
Iodo - µg	150	150
Manganês - mg	≈ 3	1,7
Molibdênio - mg	≈ 0,35	0,08
Cromo - mg	≈ 0,1	0,17
Selênio - mg	0,1	0,1
Alumínio - mg		1,6

* National Research Council, United States of America (National Research Council, 1989)

FIGURA 1. Desenho experimental.

FIGURA 2. Protocolo do estudo cinético, infusão do istópo estável.

FIGURA 3, Modelo envolvendo compartimentos múltiplos utilizado para o estudo do metabolismo protéico total com ^{13}C -leucina.

RESULTADOS

Considerações gerais

Os voluntários foram convocados por meio de cartazes afixados em murais destinados para tal finalidade no Massachusetts Institute of Technology. Todos os indivíduos que manifestaram interesse em participar do estudo receberam explicações detalhadas sobre o protocolo experimental. Após esta primeira seleção, foi mostrado aos interessados, as técnicas de coleta de sangue, de ar expirado, de urina e fezes. A seguir os indivíduos experimentavam a dieta. Por fim, era assinado um termo de compromisso confirmando sua participação. Desta maneira foram realizadas ≈ 120 entrevistas. Entre aqueles que concordavam experimentar a dieta, ≈ 50 desistiram logo após provarem a solução de aminoácidos. Vinte e seis candidatos desistiram nos primeiros dias de estudo, por não se adaptarem aos horários, ou a dieta, ou ao esquema rígido de coleta de amostras de urina e fezes. Quatro indivíduos foram retirados do estudo, entre a primeira e segunda semana de estudo, por não seguirem corretamente as determinações para coleta das amostras de urina e/ou fezes. Um dos indivíduos foi excluído ao final da terceira semana após apresentar episódio febril, coriza nasal hialina, cefaléia e mal estar geral.

Vinte indivíduos completaram com sucesso todas as cinco semanas de estudo, sendo sete no GFAO, sete no GMIT e seis no GOVO. Entre o processo de elaboração do projeto de pesquisa, aprovação no conselho de ética e a última determinação laboratorial foram gastos 31 meses. O tempo para coleta de material nos voluntários foi de 20 meses.

As entrevistas, exames dos indivíduos, medidas antropométricas e exames laboratoriais foram feitas nas dependências do Clinical Research Center do Massachusetts Institute of Technology. Dentro desta unidade de pesquisa em humanos, a temperatura interna era sempre constante em torno de 22°C.

Característica dos indivíduos participantes

A tabela 11 mostra as características gerais dos vinte indivíduos que participaram do estudo. Todos eram estudantes de graduação do Massachusetts Institute of Technology, MIT, e residiam nos alojamentos do MIT, próximo ao local onde foram feitos os experimentos. A idade variou entre 18 e 37 anos, sendo a maioria em torno dos 22 anos, a altura de $\approx 1,70$ m e o peso ≈ 75 kg. Todos foram considerados eutróficos após exame clínico, antropometria e exames laboratoriais. Não houve variação significativa entre o peso do primeiro e último dia do estudo, o mesmo fato foi observado em relação aos outros dados considerados, com exceção da relação uréia/creatinina urinária. Os valores plasmáticos de albumina, glicose, uréia foram considerados normais e nem um deles apresentou variações significativas entre o começo e final do estudo.

A diminuição da relação uréia/creatinina urinária é um reflexo da ingestão protéica individual de cada participante (Sauberlich e cols., 1974; Marchini & Dutra de Oliveira, 1990). Os valores mais elevados, observados no início do protocolo, dentro de cada grupo são provavelmente conseqüentes a uma ingestão rotineira de proteína, maior que $0,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, antes de iniciar o estudo.

Quando se considerou a variação da relação peso/altura², índice creatinina/altura e relação uréia/creatinina urinária, tabela 12, dentro de um mesmo indivíduo durante todo o experimento, observa-se que a variação intra-individual pode ser considerada mínima. Tanto os resultados entre indivíduos, como os intra-individuais apontam para homogeneidade dos indivíduos, e mostram também que ao final de 35 dias de experimento esta constância continuou sendo observada. Assim por exemplo, para o indivíduo número 4, do GFAO, durante todos os 35 dias de estudo, a relação peso/altura² foi de $26,6 \pm 0,3$ (média $\pm$ desvio padrão), o índice creatinina/altura foi de 112 ± 4 % e a relação uréia/creatinina urinária de $11,7 \pm 1,0$ g/g (estes resultados são semelhantes aos dos outros indivíduos).

Aminoácidos plasmáticos

Os resultados dos aminoácidos plasmáticos livres ramificados (isoleucina, leucina e valina), metionina, lisina, treonina e prolina foram determinados no início e final de cada uma das quatro infusões em todos os indivíduos, e estão nas tabelas 13 e 14, figuras 4 e 5. As alterações dentro de cada grupo de indivíduos, recebendo uma das três dietas, dependem de cada aminoácido, período de experimento e estado metabólico (jejum, alimentado).

Os aminoácidos ramificados, tabela 13, figura 4, variaram de uma forma específica, dependendo de cada um e da condição metabólica. As concentrações de isoleucina e leucina foram marcadamente menores para o estado alimentado nos GFAO e GMIT, enquanto que os níveis foram constantes durante todo experimento no GOVO no período alimentado. No período de jejum, os níveis de isoleucina e leucina foram menores para GFAO e GMIT. Com relação a valina houve diferença significativa, em qualquer dos estados metabólicos, sendo menor nos GFAO e GMIT.

A metionina aumentou nos GFAO e GOVO, enquanto que ficou constante no GMIT ao final da primeira semana recebendo uma das dietas em estudo, tabela 14, figura 5. Ao fim da terceira semana, os indivíduos do GFAO, fase jejum, apresentaram valores plasmáticos de metionina cuja tendência era uma maior elevação em relação aos outros dois grupos. Os níveis de lisina permaneceram praticamente constantes em todos os grupos durante todo experimento. Entretanto, os GFAO e GMIT apresentavam valores de lisina menores no período alimentado, quando comparados com os valores da primeira semana de estudo. Esta alteração não foi vista no GOVO. Os valores de treonina foram significativamente, $p < 0,05$, reduzidos na fase de jejum dos GFAO e GMIT, e também foram menores na fase de alimentado, comparados com os valores do GOVO. Finalmente os valores de prolina foram significativamente, $p < 0,05$, maiores no GFAO tanto na fase de jejum, como fase alimentado. Nos GMIT e GOVO os valores de prolina foram semelhantes.

Cinética de leucina

A tabela 15 resume os valores de enriquecimento isotópico no ar expirado e plasma, além das medidas de cinética da leucina. Não são observadas diferenças significativas entre os três grupos para a razão de enriquecimento isotópica $^{13}\text{C-KIC}/^{13}\text{C-LEU}$. Considerando que o $^{13}\text{C-KIC}$ é o derivado intracelular da $^{13}\text{C-Leucina}$ e portanto representa o enriquecimento intracelular metabólico da leucina, somente os dados de enriquecimento plasmático de $^{13}\text{C-KIC}$ serão apresentados. Destes valores foram derivados o fluxo da leucina e demais dados relacionados com metabolismo deste aminoácido.

O fluxo de leucina, tabela 15, figura 6, durante a fase de jejum foi inferior ($p < 0,05$) nos GFAO em relação ao GOVO, e permaneceu baixo, mesmo quando a dieta com teores de aminoácidos semelhante ao do ovo foi introduzida na última semana do experimento. Não houve diferenças significativas entre os períodos de jejum e alimentado para o fluxo de leucina durante todo experimento. O desaparecimento não oxidativo de leucina (NOLD), diretamente relacionado com a síntese protéica, não foi diferente nos três grupos estudados e no período de jejum versus alimentado. A taxa de aparecimento de leucina, diretamente relacionada à degradação endógena protéica, foi reduzida após uma semana no grupo que recebeu o teor de aminoácidos semelhantes às recomendações da FAO. Não foram detectadas outras diferenças importantes. Posteriormente a taxa de aparecimento de leucina foi superior, fase alimentado, no GFAO, mas não foi detectada a mesma tendência no GMIT e GOVO.

Para o período de jejum, a taxa de oxidação de leucina foi reduzida ($p < 0,05$) quando os indivíduos receberam a dieta FAO por uma ou três semanas, mas não houve esta diminuição para os outros dois grupos estudados, tabela 15 e figura 6. Ao final de uma semana recebendo dieta com teor de aminoácidos recomendada pela FAO, durante a fase de alimentação, a oxidação de leucina foi inferior ($p < 0,05$) no GFAO, sendo inclusive menor que na fase alimentado para este mesmo grupo no mesmo período. O GMIT apresentou valores de oxidação de leucina reduzida em relação a dieta controle. Após três semanas recebendo a dieta padrão

MIT, a oxidação de leucina foi semelhante na fase de jejum e alimentado. No GOVO a oxidação de leucina foi sempre superior na fase alimentado.

Na tabela 16 são mostrados os valores de depuração metabólica de leucina plasmática. Valores de jejum foram essencialmente semelhantes para todos os grupos durante todo o experimento. Para o estado alimentado, esta depuração foi superior após uma semana nos grupos que receberam padrão FAO e MIT, no entanto após três semanas estes valores permaneceram altos somente no GFAO. Este fato sugere um trabalho metabólico extra, necessário para depurar leucina plasmática no GFAO. Neste período, isto é, após a terceira semana de oferta de dieta com teores de aminoácidos específicos, os GMIT e GOVO precisavam de $\approx 11-13$ ml de sangue. $\text{kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para depurar uma quantidade equivalente de leucina. No entanto, os participantes do GFAO, nesta mesma situação, precisavam de ≈ 18 ml de sangue. $\text{kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, quantidade cerca de 40% superior aos GOVO e GMIT.

O balanço cinético de leucina durante o período de jejum e alimentado durante o estudo é apresentado na tabela 17 e figura 7. Durante a fase de jejum os valores negativos de balanço, como esperado, foram encontrados em todos os grupos. Nesta situação houve uma tendência dos valores serem mais negativos para o GOVO do que em relação ao GFAO e GMIT, entretanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Durante a fase de alimentado, o GFAO, após uma e três semanas recebendo a dieta experimental, não alcançou balanço positivo numericamente equivalente a fase de jejum. Após três semanas recebendo padrão FAO, o balanço cinético de leucina foi estatisticamente semelhante na fase de jejum e alimentado, e este valor da fase alimentado foi significativamente inferior ao do GMIT e GOVO. O GMIT e GOVO sempre alcançaram balanço cinético de leucina positivo na fase alimentado.

Duas avaliações diferentes para o balanço cinético diário de leucina, englobando fase de jejum e alimentado, são apresentados na tabela 18 e figura 8. Na primeira semana de experimento, figura 1, quando todos indivíduos, independente do grupo, receberam dieta

controle padrão ovo, o balanço de leucina foi positivo e semelhante nos três grupos. Os valores de balanço foi mais positivo ou menos negativo, para o método LKBi do que para o LKBii, como é esperado, pois os valores infundidos, nos dias do estudo cinético, contribuíram com maior intensidade no método LKBi. O balanço calculado pelo método LKBii nos três grupos estudados, contribuiu com aproximadamente 7 a 16% da leucina ingerida na primeira semana de estudo, quando todos recebiam padrão ovo de aminoácidos. Este achado sugere uma discreta superestimação do balanço, porque era esperado que os indivíduos jovens eutróficos estivessem em balanço zero quando a oferta de leucina fosse abundante.

LKBii foi distintamente negativo no GFAO. Após três semanas recebendo dieta padrão de aminoácidos FAO, os valores GFAO foram significativamente inferiores, $p < 0,05$, aos dos GMIT e GOVO. Os valores de balanço cinético encontrados no GMIT, após três semanas recebendo dieta padrão MIT, próximo a zero, e representando menos de 5% dos valores de leucina ingerida, sugerem que os indivíduos deste grupo atingiram o equilíbrio isotópico. Os altos valores de balanço positivo encontrados no GOVO serão discutidos posteriormente.

Balanço nitrogenado

Os resultados de balanço nitrogenado estão apresentados na tabela 19 e figura 8. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os três grupos avaliados. No entanto os valores médios do GFAO mostraram uma tendência a serem menores, além de permanecerem negativos durante todas as três semanas em que foi oferecida dieta cujo padrão de aminoácidos foi o padrão FAO.

Os resultados de creatinina urinária, representados pelo índice creatinina/altura, tabela 12, foram utilizados como controle para verificar se a urina foi coletada completamente. Somente um indivíduo, dos vinte estudados, apresentou coeficiente de variação (CV) para excreção urinária de creatinina de 15%. Quatro outros apresentaram CV de $\approx 12\%$. Três com

CV $\cong$ 10% e para todos os demais o CV foi igual ou inferior a 9%. Análise de variância para medidas repetidas não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa na excreção urinária de creatinina e nitrogênio intraindivíduos, independente do período ou da dieta analisados.

TABELA 11. Características gerais dos indivíduos que participaram da presente investigação.

Característica	GFAO*	GMIT*	GOVO*
Número de participantes	7	7	6
Idade anos	27,0±7,0†	20,8±1,6	22,1±3,9
Altura m	1,76±0,12	1,77±0,03	1,72±0,07
Peso inicial kg	76,0±16,2	71,9±7,9	75,5±13,3
Peso final kg	74,6±15,5	70,2±7,1	73,7±14,0
Peso/altura ² inicial kg/m ²	24,4±3,43	22,9±2,6	25,5±4,5
Peso/altura ² final kg/m ²	23,8±3,24	22,4±2,4	24,9±4,6
Índice creatinina altura inicial %	114±22	111±26	117±18
Índice creatinina altura final %	110±21	112±22	106±23
Relação uréia/creatinina urinária inicial g/g	12,1±1,4	10,9±1,9	12,3±1,0
Relação uréia/creatinina urinária final g/g	8,8±1,9‡	8,2±1,7‡	8,9±1,9‡
Albumina sérica inicial g.L ⁻¹	45±3	45±4	44±3
Albumina sérica final g.L ⁻¹	43±3	44±2	44±4
Glicose plasmática inicial mmol.L ⁻¹	5,0±0,5	4,9±0,7	4,8±0,6
Glicose plasmática final mmol.L ⁻¹	4,5±0,4	4,6±0,6	4,5±0,4
Uréia sanguínea inicial mmol.L ⁻¹	6,3±1,4	5,2±1,0	5,3±1,1
Uréia sanguínea final mmol.L ⁻¹	5,4±1,2	4,8±1,3	4,7±1,6

* Ver tabela 7.

† Média ± desvio padrão.

‡ p < 0,05 em relação ao valor correspondente inicial.

TABELA 12. Variação individual da relação peso/altura², índice creatinina/altura e excreção urinária de uréia/creatinina durante todo o experimento para cada um dos participantes.

Grupos*	Indivíduos						
	1	2	3	4	5	6	7
	Relação peso/altura ² - kg/m ²						
GFAO	21,5±0,3†	24,2±0,2	19,1±0,1	26,6±0,3	28,0±0,4	27,4±0,4	22,8±0,3
GMIT	22,6±0,4	25,7±0,4	21,1±0,2	18,4±0,2	24,6±0,2	23,5±0,3	22,6±0,3
GOVO	21,8±0,3	21,0±0,2	24,7±0,3	29,7±0,2	23,6±0,2	29,6±0,6	
	Índice creatinina/altura - %						
GFAO	84±8	105±7	91±5	112±4	135±7	128±11	122±8
GMIT	118±6	139±10	104±7	84±3	117±10	101±13	90±10
GOVO	111±9	109±9	114±11	93±15	91±12	135±9	
	Relação uréia/creatinina urinária - g/g						
GFAO	12,2±1,3	10,5±1,3	9,7±1,3	11,7±1,0	10,7±1,1	9,5±1,3	8,8±1,1
GMIT	8,8±1,1	8,9±0,5	8,7±0,9	8,8±1,5	7,9±0,9	7,8±1,2	11,1±1,1
GOVO	10,3±1,9	7,1±1,8	10,1±1,0	10,9±0,7	9,4±1,2	9,8±1,1	

* Ver tabela 7.

† Média ± desvio padrão.

TABELA 13. Concentração plasmática* de aminoácidos livres ramificados na fase de jejum e alimentado.

Grupo† e estudo clínico	Isoleucina				Valina			
	Leucina							
	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado
GFAO, I	90,1 ± 13,0 ^{Ab} ‡	123,4 ± 15,2 ^{Ab}	144,4 ± 19,0 ^{Aa}	181,5 ± 26,1 ^{Ab}	261,1 ± 35,6 ^{Aa}	320,1 ± 42,3 ^{Ab}		
II	71,2 ± 11,9 ^{AbAa}	47,9 ± 8,8 ^{Bb}	114,3 ± 27,5 ^{AbAa}	94,0 ± 24,4 ^{Ba}	166,3 ± 35,3 ^{Ba}	137,1 ± 33,5 ^{Ba}		
III	67,6 ± 8,4 ^{Bb}	38,8 ± 8,4 ^{Bb}	107,4 ± 13,8 ^{Bb}	79,5 ± 12,5 ^{Bb}	154,3 ± 28,4 ^{Ba}	121,5 ± 24,4 ^{Ba}		
IV	90,7 ± 14,9 ^{Aa}	123,5 ± 19,9 ^{Ab}	142,9 ± 17,6 ^{Aa}	179,6 ± 33,8 ^{Ab}	274,0 ± 37,3 ^{Aa}	303,9 ± 44,3 ^{Aa}		
GMIT, I	81,3 ± 14,3 ^{AbAa}	110,9 ± 23,5 ^{Ab}	138,3 ± 21,5 ^{Aa}	169,8 ± 36,4 ^{Aa}	240,1 ± 53,9 ^{Aa}	287,8 ± 65,1 ^{Aa}		
II	72,4 ± 4,7 ^{AbAa}	48,3 ± 8,9 ^{Bb}	125,3 ± 13,4 ^{AbAa}	104,6 ± 19,6 ^{Bb}	153,9 ± 24,5 ^{Ba}	118,5 ± 65,1 ^{Bb}		
III	66,7 ± 9,0 ^{Bb}	52,3 ± 5,6 ^{Bb}	122,6 ± 14,8 ^{AbAa}	116,1 ± 7,8 ^{Ba}	145,2 ± 24,5 ^{Ba}	121,0 ± 16,3 ^{Bb}		
IV	90,1 ± 12,2 ^{Aa}	111,3 ± 14,1 ^{Aa}	138,2 ± 14,0 ^{Aa}	164,9 ± 22,3 ^{Ab}	250,1 ± 24,4 ^{Aa}	285,3 ± 21,0 ^{Ab}		
GOVO, I	90,4 ± 16,7 ^{Aa}	121,6 ± 29,0 ^{Aa}	143,9 ± 23,4 ^{Aa}	176,8 ± 39,5 ^{Aa}	253,6 ± 55,4 ^{Aa}	317,8 ± 67,4 ^{Aa}		
II	92,2 ± 9,2 ^{Aa}	131,3 ± 26,1 ^{Aa}	150,0 ± 20,6 ^{Aa}	187,0 ± 38,0 ^{Ab}	259,7 ± 54,0 ^{Aa}	326,1 ± 72,0 ^{Aa}		
III	89,6 ± 10,9 ^{Aa}	123,6 ± 20,2 ^{Aa}	148,6 ± 16,0 ^{Aa}	175,2 ± 27,8 ^{Ab}	250,2 ± 45,3 ^{Aa}	314,4 ± 55,8 ^{Aa}		
IV	92,8 ± 24,6 ^{Aa}	112,4 ± 15,2 ^{Aa}	141,8 ± 26,9 ^{Aa}	159,7 ± 14,3 ^{Aa}	255,5 ± 66,7 ^{Aa}	293,8 ± 44,7 ^{Aa}		

* μ Molar, média $\pm$ desvio padrão.

† Ver tabela 7.

‡ Análise estatística. Letras iguais: ausência de diferença estatística significativa, $p > 0,05$. Letras minúsculas comparação vertical na mesma coluna. Letra minúscula compara fase jejum versus fase alimentado.

FIGURA 4. Variação dos níveis de aminoácidos ramificados nos diferentes grupos estudados. Média $\pm$ desvio padrão.

Observação: Ver tabela 7 para explicação sobre os grupos e tabela 13 para análise estatística.

TABELA 14. Concentração plasmática* de aminoácidos livres (metionina, lisina, treonina, prolina) na fase de jejum e alimentado.

Grupo† e estudo clínico	Metionina		Lisina		Treonina		Prolina	
	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado
GFAO, I	37,6 ± 6,5 ^{ac†}	51,4 ± 7,0 ^{bc}	226,2 ± 67,5 ^{Ac}	272,2 ± 63,6 ^{ABb}	158,3 ± 26,6 ^{Ac}	184,6 ± 24,3 ^{Ab}	179,4 ± 48,5 ^{ABa}	223,8 ± 42,4 ^{Ab}
	27,5 ± 12,0 ^{ABa}	39,3 ± 2,6 ^{ABb}	176,1 ± 75,8 ^{Ac}	195,6 ± 79,0 ^{ABa}	81,9 ± 16,4 ^{ABb}	96,8 ± 24,6 ^{ABb}	238,8 ± 39,9 ^{Ac}	319,5 ± 41,9 ^{ABb}
	32,5 ± 4,0 ^{ABa}	37,0 ± 5,6 ^{ABa}	167,9 ± 56,7 ^{Ac}	199,9 ± 58,9 ^{ABa}	69,9 ± 16,2 ^{ABa}	75,8 ± 22,6 ^{ABa}	236,0 ± 56,6 ^{Ac}	334,7 ± 41,0 ^{ABb}
	33,6 ± 5,21 ^{ABa}	48,0 ± 10,6 ^{ABb}	228,9 ± 73,5 ^{Ac}	260,4 ± 95,6 ^{ABa}	152,3 ± 29,7 ^{Ac}	166,9 ± 28,7 ^{Ac}	180,8 ± 50,5 ^{ABa}	229,4 ± 46,4 ^{Ab}
GMT, I	28,9 ± 6,2 ^{ABa}	43,6 ± 12,3 ^{ABb}	192,2 ± 61,8 ^{Ac}	253,8 ± 81,1 ^{ABb}	148,0 ± 24,0 ^{Ac}	194,8 ± 49,8 ^{Ab}	158,7 ± 31,2 ^{ABa}	233,1 ± 44,8 ^{Ab}
	26,0 ± 5,9 ^{ABa}	27,6 ± 6,1 ^{Ac}	170,3 ± 36,4 ^{Ac}	179,9 ± 63,7 ^{Ac}	101,3 ± 35,1 ^{ABa}	106,4 ± 42,5 ^{ABa}	210,9 ± 43,7 ^{ABa}	264,9 ± 45,2 ^{Ab}
	25,0 ± 4,6 ^{ABa}	30,6 ± 5,3 ^{ABa}	167,6 ± 49,8 ^{Ac}	181,6 ± 45,3 ^{Ac}	87,5 ± 25,4 ^{ABb}	93,2 ± 28,7 ^{ABa}	203,2 ± 47,8 ^{ABa}	275,0 ± 54,0 ^{Ac}
	27,0 ± 4,7 ^{ABa}	42,3 ± 9,7 ^{ABb}	194,2 ± 41,3 ^{Ac}	227,5 ± 42,1 ^{ABb}	153,3 ± 42,1 ^{Ac}	179,2 ± 46,0 ^{Ac}	165,4 ± 26,4 ^{ABa}	232,8 ± 39,3 ^{ABa}
GOVO, I	29,3 ± 8,7 ^{ABa}	42,6 ± 10,5 ^{ABb}	173,4 ± 16,2 ^{Ac}	190,2 ± 11,1 ^{ABb}	157,4 ± 27,5 ^{Ac}	160,4 ± 34,1 ^{Ac}	168,3 ± 52,5 ^{ABa}	230,1 ± 40,7 ^{Ac}
	30,5 ± 8,2 ^{ABa}	44,3 ± 10,8 ^{ABb}	180,7 ± 14,3 ^{Ac}	196,6 ± 22,6 ^{ABa}	153,3 ± 23,0 ^{Ac}	189,8 ± 25,4 ^{Ac}	179,8 ± 53,0 ^{ABa}	221,5 ± 40,9 ^{Ac}
	30,4 ± 9,8 ^{ABa}	45,4 ± 5,2 ^{ABb}	177,1 ± 23,3 ^{Ac}	190,3 ± 11,1 ^{ABb}	146,6 ± 28,1 ^{Ac}	178,0 ± 19,4 ^{Ac}	192,5 ± 47,7 ^{ABa}	240,1 ± 54,0 ^{Ac}
	29,3 ± 8,8 ^{ABa}	41,3 ± 3,8 ^{ABb}	171,7 ± 17,6 ^{Ac}	190,2 ± 12,1 ^{ABa}	145,8 ± 27,8 ^{Ac}	170,1 ± 24,3 ^{Ac}	184,8 ± 34,3 ^{ABa}	235,0 ± 40,5 ^{Ac}

* μ Molar, média $\pm$ desvio padrão.

† Ver tabela 7.

‡ Análise estatística. Letras iguais: ausência de diferença estatística significativa, $p > 0,05$. Letras maiúsculas comparação vertical na mesma coluna. Letra minúscula compara fase jejum versus fase alimentado.

FIGURA 5. Variação dos níveis dos aminoácidos plasmáticos livres metionina, lisina, treonina e prolina nos diferentes grupos estudados. Média $\pm$ desvio padrão.

Observação: Ver tabela 7 para explicação sobre os grupos e tabela 14 para análise estatística.

TABELA 15. Resultados* dos estudos cinéticos.

Grupo†	Estado clínico	¹³ C ₆		¹³ C-Leu/ ¹³ C-KIC Razão molar %	Fluxo de Leu $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$	Ingestão de Leu $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$	NOLD‡ Leu $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$	Aparecimento de Leu $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$	Oxidação de Leu $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$
		A.P.E.x 1000	A.P.E.x 100						
Fase de Jejum									
GFAO	1	7,2±1,4	5,8±0,8	66±12	100,3±14,3 ^{ab}	3,9±0,2	81,1±12,4	96,4±14,3 ^{ab}	19,9±3,9 ^{ab}
	2	5,2±1,3	5,9±0,8	73±8	84,6±10,8 ^{ab}	3,8±0,2	72,5±10,3	80,9±10,8 ^{ab}	12,7±1,7 ^{ab}
	3	5,0±0,7	6,9±1,1	64±11	79,6±11,7 ^{ab}	3,7±0,5	68,7±12,2	75,9±11,7 ^{ab}	11,4±1,7 ^{ab}
	4	6,7±0,9	6,2±1,0	68±7	88,7±9,2 ^{ab}	3,9±0,3	73,3±8,3	84,8±9,2 ^{ab}	16,0±2,9 ^{ab}
GMIT	1	6,5±0,9	5,2±0,9	74±16	100,1±7,4 ^{ab}	3,9±0,2	81,3±8,0	96,2±7,3 ^{ab}	20,0±2,9 ^{ab}
	2	5,5±0,7	5,2±1,1	77±13	94,9±10,2 ^{ab}	3,9±0,4	80,0±6,8	91,0±10,7 ^{ab}	15,5±4,6 ^{ab}
	3	4,9±1,0	5,4±0,9	77±14	91,6±7,5 ^{ab}	3,9±0,3	79,0±6,1	87,7±7,3 ^{ab}	13,2±4,2 ^{ab}
	4	5,8±1,1	5,1±1,0	79±14	96,2±16,8 ^{ab}	3,9±0,3	80,4±12,0	92,3±16,7 ^{ab}	16,5±3,8 ^{ab}
GOVO	1	5,8±1,2	4,8±0,8	78±6	100,7±9,8 ^{ab}	3,9±0,3	83,9±8,9	96,8±9,7 ^{ab}	17,4±6,8 ^{ab}
	2	6,9±1,5	5,3±1,0	72±14	103,9±6,8 ^{ab}	4,0±0,2	84,6±6,8	100,0±6,9 ^{ab}	20,1±1,7 ^{ab}
	3	5,9±0,9	5,6±0,8	68±7	100,5±15,9 ^{ab}	4,0±0,2	84,3±11,6	96,5±15,8 ^{ab}	16,8±7,6 ^{ab}
	4	6,8±1,2	5,8±1,1	67±6	100,2±14,8 ^{ab}	4,0±0,2	82,1±14,2	96,2±14,7 ^{ab}	16,9±3,3 ^{ab}
Fase alimentado									
GFAO	1	9,6±1,5	5,0±1,0	70±19	113,9±15,6 ^{ab}	57,3±1,3	83,1±13,9	56,6±15,5 ^{ab}	31,9±5,5 ^{ab}
	2	3,9±1,6	5,6±1,2	87±10	74,6±11,0 ^{ab}	12,8±0,2	66,2±9,8	61,8±11,1 ^{ab}	8,9±5,5 ^{ab}
	3	5,2±1,3	6,8±1,4	62±11	84,5±8,3 ^{ab}	12,7±0,7	71,3±11,6	71,8±7,9 ^{ab}	13,8±4,6 ^{ab}
	4	9,1±1,7	4,8±0,9	76±11	105,5±9,1 ^{ab}	57,7±1,6	79,6±8,4	47,7±10,1 ^{ab}	26,8±3,2 ^{ab}
GMIT	1	8,8±1,7	4,0±0,9	85±25	116,8±11,8 ^{ab}	57,4±1,1	84,8±10,3	59,4±11,9 ^{ab}	33,1±8,8 ^{ab}
	2	6,3±1,8	5,0±0,7	83±17	93,1±11,0 ^{ab}	29,7±0,8	75,2±7,5	63,3±10,7 ^{ab}	18,6±5,9 ^{ab}
	3	5,9±0,8	4,9±0,8	87±19	91,3±11,4 ^{ab}	29,8±0,8	75,1±11,1	61,5±10,9 ^{ab}	16,9±3,2 ^{ab}
	4	7,7±1,1	4,0±0,9	92±22	107,7±19,0 ^{ab}	58,3±1,7	82,0±14,9	49,5±18,9 ^{ab}	26,7±5,3 ^{ab}
GOVO	1	8,7±2,1	3,8±0,7	88±7	113,6±11,4 ^{ab}	57,5±2,0	83,1±10,9	56,1±11,6 ^{ab}	31,6±5,9 ^{ab}
	2	9,8±2,2	4,1±0,5	80±10	120,0±12,4 ^{ab}	57,5±2,2	85,7±14,8	62,5±13,1 ^{ab}	35,5±7,3 ^{ab}
	3	8,6±1,9	4,4±0,5	74±7	119,3±19,8 ^{ab}	58,2±2,4	90,0±18,1	61,1±19,9 ^{ab}	30,3±3,1 ^{ab}
	4	8,8±2,3	4,4±0,7	81±12	112,0±12,1 ^{ab}	58,2±4,9	83,5±13,0	53,8±12,9 ^{ab}	29,6±5,9 ^{ab}

* Média ± desvio padrão.

† Ver tabela 7.

‡ Leu=leucina; KIC=ácido cetioácido.

§ Desaparecimento não oxidativo de leucina.

¶ Comparação estatística; coluna sem superscritos não apresenta diferenças estatísticas. Letras maiúsculas comparam entre os grupos em uma mesma fase metabólica (jejum ou alimentado). Letras minúsculas comparam, em uma mesma dieta, jejum versus alimentado.

FIGURA 6. Fluxo e oxidação de lactina nos diferentes grupos estudados. Média $\pm$ desvio padrão.

Observação: Ver tabela 7 para explicação sobre os grupos e tabela 15 para análise estatística.

TABELA 16. Depuração metabólica* de leucina nos diferentes grupos e períodos.

	Infusão† I			Infusão II			Infusão III			Infusão IV		
	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum	Alimentado
GFAO‡	12,4±2,0 ^{ab}	10,8±2,9 ^a	12,2±2,6 ^a	14,2±4,1 ^{ab}	12,3±2,4 ^a	18,0±2,3 ^b	11,7±1,7 ^a	10,1±2,5 ^a				
GMIT	12,0±2,5 ^a	12,1±4,3 ^a	11,9±2,8 ^a	15,1±2,8 ^{ab}	11,8±0,9 ^a	13,1±1,1 ^a	12,4±2,3 ^a	11,2±3,4 ^a				
GOVO	11,0±2,2 ^a	11,1±2,4 ^a	12,6±2,1 ^a	11,1±2,7 ^a	12,2±2,4 ^a	11,5±1,8 ^a	11,7±1,8 ^a	11,8±2,2 ^a				

* Razão: concentração plasmática de leucina/fluxo de leucina. Média ± desvio padrão, ml.kg⁻¹.d⁻¹.

† Estudo cinético.

‡ Ver tabela 7.

§ Letras iguais não são estatisticamente diferentes (p>0,05).

TABELA 17. Avaliação do balanço cinético de leucina na última hora das fases de jejum e alimentado nos diferentes grupos e períodos.

Grupos*	Estudo cinético	Jejum	Alimentado	Balanço horário médio
GFAO	I	-16,1 ± 3,5†	25,0 ± 3,9	8.9
	II	-8,9 ± 1,8	3,9 ± 2,8	-5.0
	III	-7,8 ± 1,0	-1,0 ± 5,0‡	-8.8
	IV	-12,2 ± 3,0	30,9 ± 3,8	18.7
GMIT	I	-15,7 ± 3,0	24,3 ± 8,3	8.6
	II	-11,6 ± 4,6	11,1 ± 5,5	-5
	III	-9,3 ± 4,2	12,9 ± 3,0§	3.6
	IV	-12,6 ± 6,3	31,6 ± 5,1	19.0
GOVO	I	-13,5 ± 3,9	25,9 ± 5,5	12.4
	II	-16,1 ± 1,5	22,1 ± 6,7	6.0
	III	-12,8 ± 4,7	27,9 ± 3,3§	15.1
	IV	-14,8 ± 3,3	28,7 ± 7,1	13.9

* Ver tabela 7.

† Valores em $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, média $\pm$ desvio padrão, para última hora da fase jejum e alimentado.

‡ Valor semelhante a respectiva a fase de jejum, $p > 0,05$. Todos as outras diferenças entre jejum e alimentado são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

§ Significativamente diferente do terceiro estudo cinético no GFAO, fase alimentado, $p < 0,05$.

FIGURA 7. Balanço horário cinético de leucina.

* Ver tabelas 7 e 17.

TABELA 18. Estimativas do balanço cinético de leucina diária nos diferentes grupos*.

Balanço cinético†	Estudos cinéticos			
	1	2	3	4
GFAO LbKi	112 ± 113‡ (16)§	-60 ± 50 (-39)	-106 ± 72 (-69)	225 ± 68 (32)
GFAO LbKii	54 ± 113 (8)	-117 ± 50 (-89)	-160 ± 72 (-123)	167 ± 68 (25)
GMIT LbKi	104 ± 128 (15)	-5 ± 99 (-1)	44 ± 83 (12)	229 ± 125 (33)
GMIT LbKii	45 ± 128 (7)	-64 ± 99 (-19)	-15 ± 83 (-5)	170 ± 125 (25)
GOVO LbKi	149 ± 99 (25)	71 ± 77 (12)	180 ± 83 (30)	166 ± 102 (28)
GOVO LbKii	90 ± 99 (16)	12 ± 77 (2)	121 ± 83 (21)	106 ± 102 (18)
Comparações Estatísticas				
Entre grupos				
ESTUDO CINÉTICO 1	GFAO = GMIT = GOVO (p=0,76)			
ESTUDO CINÉTICO 2	GFAO = GMIT, GMIT = GOVO, GFAO < GOVO (p=0,025)			
ESTUDO CINÉTICO 3	GFAO < GMIT < GOVO (p<0,01)			
ESTUDO CINÉTICO 4	GFAO = GMIT = GOVO (p=0,48)			
Em um mesmo grupo				
GFAO	Estudos cinéticos: 2 = 3 < 1 < 4 (p<0,01)			
GMIT	Estudos cinéticos: 1 = 2 = 3 < 4 (p=0,01)			
GOVO	Estudos cinéticos: 1 = 2 = 3 = 4 (p=0,19)			

* Ver tabela 7.

† Vide metodologia.

‡ Média ± desvio padrão, $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

§ Razão: balanço cinético de leucina/ingestão de leucina %.

TABELA 19. Resumo de dados de balanço nitrogenado encontrado para os diferentes grupos* e durante as quatro últimas semanas de estudo†.

Grupo	Semana	Padrão de aminoácidos da dieta‡	Ingestão de nitrogênio	Nitrogênio uradário	Nitrogênio fecal	Balanço nitrogenado
GFAO	2	FAO	140 ± 2§	137 ± 8	7 ± 3	-2 ± 12
	3	FAO	141 ± 4	124 ± 16	8 ± 2	1 ± 16
	4	FAO	141 ± 3	129 ± 12	6 ± 3	-2 ± 11
	5	OVO	141 ± 3	121 ± 13	7 ± 1	4 ± 13
GMIT	2	MIT	140 ± 3	124 ± 16	8 ± 3	0 ± 15
	3	MIT	140 ± 4	117 ± 14	7 ± 5	8 ± 15
	4	MIT	141 ± 3	120 ± 13	6 ± 3	6 ± 12
	5	OVO	142 ± 3	112 ± 11	7 ± 2	15 ± 10
GOVO	2	OVO	141 ± 4	117 ± 29	9 ± 3	7 ± 26
	3	OVO	141 ± 4	122 ± 19	8 ± 3	3 ± 15
	4	OVO	142 ± 5	117 ± 22	10 ± 4	7 ± 19
	5	OVO	143 ± 4	114 ± 2	7 ± 4	14 ± 22

* Ver tabela 7.

† Ver figura 1.

‡ Ver tabela 8.

§ Média ± desvio padrão, mg Nitrogênio.kg⁻¹.dia⁻¹

FIGURA 8. Balanço cinético (LKBi) e nitrogênio diário.

* Ver tabelas 7, 18 e 19.

DISCUSSÃO

As recomendações de aminoácidos para indivíduos adultos eutróficos tem sido estabelecidas usando i) balanço nitrogenado (Rose, 1957; Irwin & Hegsted, 1971; Williams e cols., 1974); ii) efeito de diferentes ofertas de aminoácidos sobre os níveis plasmáticos de aminoácidos (Stucki & Harper, 1962; Munro, 1970; Young & Scrimshaw, 1972; Lewis, 1992); iii) técnicas empregando isótopos estáveis (Young, 1987, 1991b, 1992; Young, Bier & Pellett, 1989). Todas estas técnicas tem suas limitações e não existe uma conclusão definitiva absoluta sobre o método que seria mais indicado para definir as suas recomendações. A falta de um critério funcional adequado é um problema sério a ser enfrentado na determinação destas recomendações de ingestão dos diferentes nutrientes. A importância do metabolismo protéico tanto nas situações de eutrofia como na presença de patologias faz com que se busque continuamente uma maneira mais adequada para se estudar as recomendações de ingestão de aminoácidos essenciais.

Atualmente existe um consenso (Munro, 1985; Young, 1986; Young & Bier, 1987a; Millward e cols., 1989), por razões conceituais e técnicas, de que o uso de técnicas de balanço nitrogenado muito pouco pode acrescentar à determinação destas recomendações. Consequentemente as técnicas empregando aminoácidos marcados com isótopos estáveis, utilizada desde o começo da década de 80 (Young, Bier & Pellett, 1989; Young & Marchini, 1990; Young, 1991b), tem sido empregada no sentido de validar ou não as recomendações de ingestão de aminoácidos sugeridas por organismos internacionais (FAO/WHO/UNU, 1985; National Research Council, 1989). Um dos grupos que mais se destaca pelo uso de marcadores estáveis é o ligado ao Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology, MIT (Young, 1987; Young & Marchini, 1990; Young & Pellett, 1990). As conclusões deste grupo são que as recomendações atuais de ingestão de aminoácidos seriam inadequadas, com exceção da metionina (Young, Bier & Pellett, 1989; Young, Wagner e cols., 1991). Esta concepção foi estabelecida pela avaliação das perdas obrigatórias de aminoácidos

(Young, Bier & Pellett, 1989; Young, 1991b) e pelos resultados de uma série de estudos empregando isótopos estáveis (Young, 1987, 1991b, 1992). Ela tem sido também confirmada por estudos recentes feitos em outros laboratórios, com por exemplo, no Canadá (Zello e cols., 1990, 1991) para fenilalanina e lisina; por balanços metabólicos (Weller e cols., 1971) e por investigações comparando a qualidade nutricional protéica do milho (Young, Ozalp e cols., 1971b) e trigo (Young, Fajardo e cols., 1975) em adultos. Apesar destas evidências, faltava ainda estudos em que os indivíduos recebessem, por um período relativamente longo, uma oferta constante de aminoácidos. Também não é de nosso conhecimento trabalhos que estabeleçam ao mesmo tempo a comparação da técnica de balanço, dos níveis de aminoácidos plasmáticos e do uso de isótopos estáveis. Esta foi a razão que norteou a presente investigação. Acredita-se, desta maneira, que os resultados do presente estudo forneçam subsídios concretos para analisar o efeito de dietas com diferentes teores de aminoácidos essenciais por três métodos diferentes, dois mais conservadores (balanço nitrogenado e níveis plasmáticos de aminoácidos) e outro mais recente (isótopos estáveis).

Aminoácidos plasmáticos

A avaliação do nível de aminoácidos plasmáticos tem sido utilizada na avaliação da qualidade protéica da dieta (Young & Scrimshaw, 1972; Eggum, 1973), e sob certas condições, da adequação da recomendação de ingestão de aminoácidos essenciais (Young, Hussein e cols., 1971a; Young, Tontisirin e cols., 1972; Tontisirin e cols., 1973; Rassin & Bhatia, 1992). Entretanto as concentrações plasmáticas de aminoácidos podem ser influenciadas por diferentes fatores, incluindo a dieta, o estado nutricional e diferentes estímulos hormonais. Estes fatores refletem o resultado da entrada e saída de um aminoácido específico do compartimento plasmático que sofre influência de processos metabólicos múltiplos. Desta maneira a interpretação do níveis plasmáticos de aminoácidos é difícil e sua significância funcional precisa em relação ao estado fisiológico normal, não está definitivamente estabelecida. Entretanto, o perfil de aminoácidos plasmáticos encontrado na presente investigação, nos diferentes períodos

e sob diferentes circunstâncias pode ser útil para avaliar a adequação nutricional das três dietas estudadas, uma com padrão de aminoácidos semelhante as recomendações internacionais, uma com as preconizadas pelo MIT e uma terceira controle com aproximadamente quatro vezes mais aminoácidos essenciais que as recomendações internacionais, ou seja o padrão ovo.

Assim analisando os resultados do presente estudo, em relação aos aminoácidos ramificados, observa-se um declínio dos níveis plasmáticos da concentração de isoleucina, leucina, valina e treonina na fase de jejum nos GFAO e GMIT e isto sugere uma inadequação destas dietas. Este raciocínio tem por fundamento o fato de que dietas com baixos teores de aminoácidos ou de proteína, resultam em níveis reduzidos de aminoácidos ramificados (Munro, 1970; Meguid e cols., 1986a,b), assim como também são baixos em pacientes mau nutridos (Waterlow & Alleyne, 1971; Waterlow, 1992). Níveis plasmáticos baixos de treonina também sugerem que a dieta seja inadequada. O níveis plasmáticos de treonina são prontamente influenciados pela dieta (Munro, 1970), e a sua concentração muscular representa cerca de seis vezes a plasmática em condições de normalidade fisiológica (Bergstrom e cols., 1976,1990). Paralelamente tem sido demonstrado que a queda dos valores de jejum dos níveis plasmáticos de aminoácidos ramificados tem sido associada com a queda acentuada dos valores de síntese protéica não hepática, dos valores da taxa de desaparecimento não oxidativo de aminoácidos (Lecavalier e cols., 1991) e também de menor síntese protéica de proteína no fígado (Flaim e cols., 1982). No presente trabalho houve uma queda de $\approx 10 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, no GFAO, na taxa de desaparecimento não oxidativo de leucina. Este decréscimo inferior no GMIT, $\approx 2 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, entretanto não foi estatisticamente significativo. Estes dados, no entanto, podem sugerir simplesmente que a menor oferta de aminoácidos essenciais no GFAO pode estar relacionada à menor taxa de síntese protéica, e portanto, que dieta seja inadequada em relação a oferta de aminoácidos essenciais.

As alterações plasmáticas que ocorreram na fase alimentado oferecem mais subsídios para comparar as características nutricionais das diferentes dietas avaliadas no presente trabalho. É bem conhecido o fato que o aumento plasmático de níveis de aminoácidos essenciais (Stucki & Harper, 1962) se relaciona com a oferta exagerada destes mesmos aminoácidos. Desta maneira,

foi encontrado um aumento significativo dos níveis plasmáticos de metionina na fase alimentado nos GFAO, GOVO e sem alteração no GMIT. Na presente investigação a ingestão de metionina no GFAO e GMIT foi semelhante e ≈ 2 vezes superior no GOVO. A elevação dos níveis plasmáticos de metionina no GOVO pode ser explicada pelo excesso de oferta. A elevação dos níveis plasmáticos de metionina que ocorreu no GFAO provavelmente foi devida a uma ingestão elevada de metionina em relação aos demais aminoácidos essenciais, explicando desta maneira a elevação dos seus níveis plasmáticos como sendo secundário a uma inadequação da dieta (Young, Bier & Pellett, 1989; Young, Wagner e cols., 1991; Young, 1992).

Os altos valores de concentração plasmática de prolina são consistentes com a interpretação de que a dieta FAO não oferece aos indivíduos uma intesta equilibrada quanto ao teor de aminoácidos, o que não ocorre com a dieta MIT. Mesmo quando se considera que a oferta de prolina no GFAO e GMIT não apresentaram diferenças significativas.

Em resumo, estes achados refletem a dificuldade geral relacionada à interpretação dos valores de aminoácidos plasmáticos. Entretanto, os resultados presentes não deixam de apontar para uma tendência de maior dificuldade a adaptação do GFAO. Também é importante ressaltar que as perdas oxidativas de leucina no GFAO, ao final de três semanas ingerindo as quantidades recomendadas e constantes de leucina, em relação à oxidação de leucina nos estados de alimentado/jejum foi de 1,20, que é significativamente superior a 0,70 encontrado ao fim de uma semana. Este fato não foi encontrado no GMIT, sendo esta relação constante em todo estudo, ao redor de $\approx 1,25$. Para o GOVO esta relação variou $\approx 1,80$. Este achado sugere uma oferta não adequada de aminoácidos da dieta do GFAO. Associa-se a isto uma interpretação de que a queda dos valores plasmáticos dos aminoácidos essenciais é compensada por uma menor oxidação de aminoácidos essenciais. A queda dos valores plasmáticos dos aminoácidos ramificados no GMIT, sem alteração da relação de oxidação pode significar melhor adequação da dieta. Também é importante ressaltar que no GOVO houve manutenção dos níveis plasmáticos com incremento significativo no teor de oxidação da leucina, refletindo um excesso de ingestão.

Cinética da leucina

As diferenças na cinética da leucina observadas com o uso das diferentes dietas no presente trabalho foram diversas e serão analisadas em detalhe. A título de esclarecimento, os aminoácidos plasmáticos podem sofrer influência dos processos metabólicos relacionados com:

- i) a oxidação e conseqüente produção de CO_2
- ii) síntese protéica, fenômeno também identificado como taxa de desaparecimento plasmático não oxidativo de um determinado aminoácido, por unidade de tempo, ou ainda como taxa de captação da leucina plasmática pelo organismo
- iii) degradação protéica, ou taxa de aparecimento plasmático do aminoácido.

Com relação a taxa de aparecimento de leucina, foi demonstrado uma redução no GFAO ($\cong 96 \rightarrow \cong 76$) em jejum; estes valores são próximos ao encontrados em pacientes desnutridos (Waterlow, 1984). Uma menor taxa de aparecimento de leucina, proveniente da degradação protéica, poderia ser interpretada como um mecanismo adaptativo do organismo a situações de deficiência e conseqüente menor perda deste aminoácido por outras vias, como a oxidação (Young, Meredith e cols., 1985). Esta redução, da taxa de aparecimento da leucina, foi menos significativa no GMIT ($\cong 96 \rightarrow \cong 88$), significando melhor aproveitamento da leucina oferecida na dieta e melhor equilíbrio entre os aminoácidos oferecidos. A taxa de captação corpórea de leucina foi $\cong 12\%$ ($0,10 > p > 0,05$) inferior no GFAO após três semanas, quando comparada com os valores do GMIT e GOVO. A análise em conjunto destas diferenças não favoráveis ao padrão FAO, podem sugerir que este último padrão de oferta de aminoácidos essenciais não foi capaz de manter o metabolismo protéico no GFAO (Young, Gucalp e cols., 1987). Em estudo anterior (Young, Meredith e cols., 1985) também foi observado um menor taxa de aparecimento de leucina plasmática na condição de jejum quando foi oferecido quantidades de leucina na dieta igual ou inferior às recomendações FAO. Por outro lado, as taxas de captação corpórea de leucina encontradas para GFAO em relação ao GMIT foram inclusive mais pronunciadas que

a relatada em trabalhos prévios (Young, Gucalp e cols., 1987). Estas observações podem ser decorrentes do fato de que na presente investigação a oferta de aminoácidos essenciais no GFAO obedeceu o padrão completo de recomendação FAO, enquanto que em trabalho anterior (Young, Gucalp e cols., 1987), variou-se somente a ingestão de um aminoácido, mantendo a oferta dos outros 3 a 4 vezes maiores que as recomendações.

A avaliação do balanço cinético de leucina (LKB), isto é, a diferença entre os valores de ingestão e as perdas oxidativas irreversíveis via CO_2 , revelam um diferença marcante entre as três dietas. Durante o período de jejum, todos os grupos, nos diferentes períodos, apresentaram valores de LKB negativos, sendo estes valores mais negativos no GOVO. Após a terceira semana recebendo a dieta específica, o percentagem oxidada de leucina, no jejum, em relação ao seu fluxo, foi de $\cong 17\%$ no GOVO contra $\cong 14\%$ para o GFAO e GMIT, o que sugere um excesso de ingestão de aminoácidos no GOVO.

No período alimentado, no qual os indivíduos recebiam dieta de hora em hora durante o período de infusão do isótopo ^{13}C -Leucina, o LKB tornou-se positivo no GOVO e GMIT, porém no GFAO permaneceu negativo após uma semana e mesmo após a terceira semana, continuou negativo. Conseqüentemente pode-se prever que o LKB calculado para 24 horas permaneceria negativo neste GFAO. Por outro lado, o balanço positivo alcançado nos GMIT e GOVO, na fase alimentado, foi suficiente para equilibrar as perdas ocorridas na fase jejum e desta maneira podendo-se prever um balanço adequado nas 24 horas. Esta foi mais uma evidência de que o padrão FAO foi inadequado para manter o equilíbrio aminoacídico após três semanas recebendo as recomendações FAO.

O LKB foi avaliado neste trabalho utilizando dois métodos diferentes. O primeiro (LKB_i) representa uma estimativa mais conservadora, em termos de se estabelecer o mínimo necessário de ingestão, pois não é considerado a oferta de marcador isotópico durante os estudos cinéticos. Pelo segundo método (LKB_{ii}) a infusão do marcador é considerada e adicionada a leucina ingerida pela dieta, durante o período de infusão. A validade deste cálculo depende, em parte, em se aceitar que o marcador infundido altera por si só a taxa de oxidação e o fluxo do

aminoácido em estudo. Existem evidências de que o traçador marcado, considerando que a quantidade oferecida esteja situado na ordem de μ molar, não altera a cinética do aminoácido em estudo. Por exemplo, a infusão de ^{15}N -Leucina em quantidades superiores a utilizadas de ^{13}C -Leucina na presente investigação, não afeta o fluxo ou a oxidação de KIC (Tessari e cols., 1985). Outro trabalho mostra que não existe diferença de oxidação de leucina quando se infunde ≈ 5 ou $\approx 10 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (que é o dobro da quantidade infundida na presente investigação) de ^{13}C -Leucina (Wolfe e cols., 1982).

Conforme mostrado na tabela 18, independente do método utilizado o LKB foi sempre negativo no GFAO. Entretanto para o GMIT, após três semanas recebendo o padrão MIT, houve uma tendência ao equilíbrio, ou seja, $\text{LKBi} = 44 \pm 83$ e $\text{LKBii} = -15 \pm 83 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. No caso do GOVO, os dados encontrados sugerem um balanço marcadamente positivo. Novamente estas evidências sugerem que o padrão FAO é incapaz de manter o estado fisiológico normal com relação ao metabolismo protéico, confirmando evidências anteriores (Young, 1987, 1991b, 1992; Young, Bier & Pellett, 1989).

Balanço nitrogenado e balanço cinético de leucina

Existem alguns pontos, no entanto, que devem ser considerados como possíveis limitações ao presente estudo, apesar de sua longa duração, complexidade e consistência geral dos dados obtidos. Obviamente o balanço cinético marcadamente positivo encontrado no GOVO deve ser analisado com cautela. Por exemplo, o balanço de $+121 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de leucina atingido pelo GOVO na terceira semana, corresponde a um ganho líquido de proteína corpórea de $\approx 160 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, ou cerca de 11,2 g por dia em um indivíduo de 70 kg. Este ganho não seria biologicamente razoável a longo prazo. Consequentemente o balanço é superestimado quando quantidades excessivas de proteína e/ou aminoácidos são oferecidos. De maneira similar, tem sido descrito balanço marcadamente positivo de leucina (Lecavalier e cols., 1991) quando indivíduos jovens eutróficos recebem insulina junto com uma grande oferta de aminoácidos

incluindo a própria leucina. Não é claro se este problema também estaria presente quando a oferta de aminoácidos não for excessiva, como no caso do GFAO e GMIT, mas se existe o problema, viria somente reforçar a hipótese inicial de que as recomendações FAO seriam claramente inadequadas.

As razões que permitem uma superavaliação do balanço com maiores ofertas de proteína e/ou aminoácidos provavelmente estão relacionadas ao modelo experimental empregado, oferta e horário de alimentos, sendo pouco provável que seja devido a erros químico-analíticos. Estes mesmos valores marcadamente positivos também são encontrados em outros trabalhos. Por exemplo, recalculando os dados de cinética de leucina feito em indivíduos jovens eutróficos (Melville e cols., 1989), que receberam pequenas refeições continuamente por 12 horas, encontram-se valores de LKB semelhantes aos do GOVO. Uma outra possibilidade de erro seria considerar que a oxidação de leucina infundida endovenosa seria diferente daquela ingerida via oral. No entanto, não tem sido relatadas na literatura diferenças neste sentido (Hoerr e cols., 1989).

Um outro ponto a ser discutido é se a oxidação de um aminoácido é constante durante o estado de jejum ou alimentado, como considerado nos cálculos de LKB na presente investigação. Existem evidências de que esta afirmação é verdadeira quando a oferta de proteína é abundante (Garlick e cols., 1980; Clugston & Garlick, 1982), no entanto, não encontramos dados quando a oferta de nitrogênio é adequada ou inferior as recomendações.

O resultado de balanço nitrogenado pode apresentar dificuldade na sua interpretação. Ele tem sido tradicionalmente utilizados na avaliação da qualidade protéica de diferentes fontes protéicas em diferentes faixas etárias. Os resultados da presente investigação mostram que, apesar de não serem detectadas diferenças significativas, os valores do GFAO foram sempre inferiores aos do GMIT e GOVO. Os dados do balanço nitrogenado não são confiáveis, como previamente antecipado e de difícil interpretação (Hegsted, 1977; Young, 1986). E não deveriam ser usados para avaliar recomendação de ingestão de aminoácidos, principalmente quando a ingestão total de nitrogênio é mantida constante.

Em resumo, indivíduos jovens, após três semana recebendo dieta cujo padrão de aminoácidos foi semelhante a recomendação FAO (FAO/WHO/UNU, 1985), mostraram alterações nos níveis de aminoácidos plasmáticos e parâmetros de cinética de leucina. Eles foram usados aqui para avaliar o estado metabólico aminoacídico (Millward e cols., 1991) e que podem ser interpretadas como decorrentes da oferta inadequada de aminoácidos. Deve-se enfatizar que as recomendações de aminoácidos são feitas a partir do cálculo estatístico que cobre 95% da população, avaliado por meio de balanço nitrogenado. A proposta de ingestão de aminoácidos feita pelo grupo MIT, baseia-se no ponto médio de recomendações usando isótopos estáveis. Esta ingestão foi capaz de manter o equilíbrio corpóreo aminoacídico após três semanas, como demonstrado no presente trabalho.

Suporte adicional para estas conclusões são retiradas de trabalhos que usam a oxidação de aminoácidos para estudar suas recomendações (Zello e cols., 1990). Estas evidências mostram, por exemplo, que as recomendações de lisina são de $\approx 37 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Este valor é inclusive superior ao preconizado pelo MIT, $\approx 30 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, e muito superior as recomendações FAO de $14 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (FAO/WHO/UNU, 1985; Young, Bier & Pellett, 1989). Trabalho semelhante feito com a fenilalanina mostra que as recomendações de aminoácidos aromáticos são $\approx 33 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$, valor este semelhante ao preconizado pelo MIT, mas superior a recomendação FAO.

Como conclusão, o presente estudo foi realizado com objetivo de produzir dados adicionais relacionados às recomendações de aminoácidos essenciais para indivíduos adultos jovens. Os resultados aqui apresentados, por meio de estudos cinéticos, valores de aminoácidos plasmáticos e em menor escala pelo balanço nitrogenado, reforçam as evidências de que as recomendações internacionais atuais de ingestão de aminoácidos essenciais preconizadas para jovens adultos são efetivamente inadequadas. Sugere-se desta maneira que estas recomendações sejam revistas, com excessão da metionina, e que se passe a adotar as recomendações preconizadas pelo Laboratório de Nutrição Humana do Massachusetts Institute of Technology.

REFERÊNCIAS

1. Abumrad NN, Rabin D, Diamond MP & Lacy WW (1981). Use of heated superficial hand vein as an alternative site for the measurement of amino acid concentration and for the study of glucose and alanine kinetics in man. *Metabolism* 30: 936-940.
2. Adams RF (1974). Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography. *J. Chromat* 95: 189-212.
3. Alves W, Novo OF, Fonseca IEM & Alves HI (1990). Pirogenicidade de soluções de grande volume para uso endovenoso. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 50: 235-238.
4. Bergstrom J, Alvestrand A, Furst P, Hultmand E, Sahlin K, Vinnars E & Widstrom A (1976). Influence of severe potassium depletion and subsequent repletion with amino acids in man. *Clin. Sci. Molec. Med.* 51: 589-599.
5. Bergstrom J, Furst P & Vinnars E (1990). Effect of a test meal, without and with protein on muscle and plasma free amino acids. *Clin. Sci.* 79: 331-337.
6. Bier DM & Young VR (1987). A kinetic approach to assessment of amino acid and protein replacement needs of individual sick patients. *J. Parent. Ent. Nutr.* 11: 95S-97S.
7. Blake M, Crespi HL & Katz JJ (1975). Studies with deuterated drugs. *J. Pharm. Sci.* 64: 307-391.
8. Bruinvis L, Van Sprang FJ, Berger B, Smit GPA, Steinmann B, Leonard JV, Divry P, Farriaux JP & Carligny B (1983). Urinary excretion of deuterated metabolites in patients with tyrosinaemia type 1 after oral loading with deuterated L-tyrosine. *Clin. Chim. Acta* 130: 231-238.
9. Cheng KN, Pacy PJ, Dworzak F, Ford GC & Halliday D (1987). Influence of fasting on leucine and muscle protein metabolism across the human forearm determined using L-(1-¹³C, ¹⁵N)leucine as the tracer. *Clin. Sci.* 73: 241-246.

10. Clugston GA & Garlick PJ (1982). The response of protein and energy metabolism to food intake in lean and obese man. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 36C: 57-70.
11. Curtuis HC, Vollmin JA & Baerlocher K (1973). Study of metabolic pathways in vivo using stable isotopes. *Anal. Chem.* 45: 1107-1110.
12. Eggum BO (1973). *The levels of blood amino acids and blood urea as indicators of protein quality*. In: *Proteins in Human Nutrition*, eds. Porter JWG & Rolls BA, Academic Press, London, New York, pp.317-327.
13. Emery PW, Halliday D, Edwards RHT, Souhami RL & Rennie MJ (1984). Protein synthesis in muscle measured *in vivo* in cachectic patients with cancer. *Br. Med. J.* 289: 584-586.
14. FAO/WHO (1973). *Energy and protein requirements* ed., World Health Organization, Geneva, p.89.
15. FAO/WHO/UNU (1985). *Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU expert consultation* ed., World Health Organization, Geneva, Switzerland, p.145.
16. Flaim KE, Peavy DE, Everson WV & Jefferson LS (1982). The role of amino acids in the regulation of protein synthesis in perfused rat liver. I. Reduction in rates of synthesis resulting from amino acid deprivation and recovery during flow through perfusion. *J. Biol. Chem.* 257: 2932-2938.
17. Fukagawa NK, Anderson JW, Minaker KL, Hageman G, Rowe JW & Young VR (1990). High carbohydrate, high-fiber diets increase peripheral insulin sensitivity in healthy young and old adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 524-528.
18. Fukagawa NK, Minaker KL, Rowe JW, Matthews DE, Bier DM & Young VR (1988). Glucose and amino acid metabolism in aging man: differential effects of insulin. *Metabolism* 37: 371-377.
19. Garlick PJ, Clugston GA, Swick RW & Waterlow JC (1980). Diurnal pattern of protein and energy metabolism in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 1983-1986.

20. Garza C, Scrimshaw NS & Young VR (1977). Human protein requirements: a long-term metabolic nitrogen balance study in young men to evaluate the 1973 FAO/WHO safe level of egg protein intake. *J. Nutr.* 107: 335-352.
21. Gaull GE & Young VR (1979). *Proteins*. In: Pediatric Nutrition. Handbook, ed. American Academy of Pediatrics, Evanston, Illinois, pp.2-12.
22. Gersovitz M, Munro HN, Udal J & Young VR (1980). Albumin synthesis in young and elderly subjects using a new stable isotope methodology: response to level of protein intake. *Metabolism* 29: 1075-1086.
23. Ghos YF, Vantrappen GR, Rutgeerts PJ & Schurmans PC (1981). A mixed triglyceride breath test for intraluminal fat digestive activity. *Digestion* 2: 239-247.
24. Golden MHN & Waterlow JC (1977). Total protein synthesis in elderly people: a comparison of results with (¹⁵) glycine and (¹⁴) leucine. *Clin. Sci. Molec. Med.* 53: 277-288.
25. Goodship THJ, Mitch WE, Hoerr RA, Wagner DA, Steinman TI & Young VR (1989). Adaptation to low-protein diets in renal failure: leucine turnover and nitrogen balance. *Journal of the American Society of Nephrology* 1: 66-75.
26. Graham DY, Klein PD, Evans DJJ, Evans DJ, Alpert LC, Opekun AR & Boutton TW (1987). *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1: 1174-1177.
27. Green MH & Green JB (1990). The application of compartmental analysis to research in nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* 10: 41-61.
28. Halliday D & McKeran RO (1975). Measurements of muscle protein synthetic rate from serial muscle biopsies and total body protein turnover in man by continuous intravenous infusion of L-[α-¹⁵N]lysine. *Clin. Sci. Molec. Med.* 49: 581-590.
29. Halliday D & Miller AG (1977). Precise measurement of total body water using trace quantities of deuterium oxide. *Biom. Mass Spectrom.* 4: 82-87.

30. Halliday D & Rennie MJ (1982). Use of stable isotopes in diagnosis and clinical research. *Clin. Sci.* 63: 485-496.
31. Halliday D, Pacy PJ, Cheng KN, Dworzak F, Gibson JNA & Rennie MJ (1988). Rate of protein synthesis in skeletal muscle of normal man and patients with muscular dystrophy: a reassessment. *Clin. Sci.* 74: 237-240.
32. Harper AE, Benevenga NJ & Wohlheuter RM (1970). Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 50: 428-558.
33. Hegsted DM (1963). Variation in requirements of nutrients - amino acids. *Fed. Proc.* 22: 1424-1430.
34. Hegsted DM (1977). Balance studies. *J. Nutr.* 106: 307-311.
35. Heimburger DC, Young VR, Bistrian BR, Ettinger WH, Lipschitz DA & Rudman D (1986). The role of protein in nutrition with particular reference to the composition and use of enteral feeding formulas: A consensus report. *J. Parent. Ent. Nutr.* 10: 425-430.
36. Hoerr RA, Yu Y-M, Wagner DA, Burke JF & Young VR (1989). Recovery of ^{13}C in breath from $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ infused by gut and vein: effect of feeding. *Am. J. Physiol.* 257: E426-E438.
37. Hoffer LJ, Bistrian BR, Phinney SD, Blackburn GL & Young VR (1983). *Whole body protein turnover, studied with ^{15}N -glycine, during weight reduction by moderate energy reduction.* In: Amino Acids Metabolism and Medical Applications, eds. Blackburn GL, Grant JP & Young VR, John Wright PSG Inc., Littleton, MA, pp.48-54.
38. Irwin MI & Hegsted DM (1971). A conspectus of research on amino acid requirements on men. *J. Nutr.* 101: 539-566.
39. Jackson AA (1983). Amino acids: essential and non-essential? *Lancet* i: 1034-1037.
40. Janghorbani M & Young VR (1982). Advances in the use of stable isotopes of minerals in human studies. *Fed. Proc.* 41: 2702-2707.

41. Jeejeebhoy KN (1986). Nutritional balance studies: indicators of human requirements or adaptive mechanisms. *J. Nutr.* 116: 2061-2063.
42. Kien CL, Rohrbaugh DK, Burke JF & Young VR (1978a). Whole body protein synthesis in relation to basal energy expenditure in healthy children and in children recovering from burn injury. *Pediat. Res.* 12: 211-216.
43. Kien CL, Young VR, Rohrbaugh DK & Burke JF (1978b). Whole body protein synthesis and breakdown rates in children before and after reconstructive surgery of the skin. *Metabolism* 27: 27-34.
44. Kleiber M (1955). Meaning of 'turnover' in biochemistry. *Nature* 175: 342.
45. Klein PD & Klein ER (1985). Applications of stable isotopes to paediatric nutrition and gastroenterology: measurement of nutrient absorption and digestion using ¹³C. *J. Paediat. Gastroenterol.* 4: 9-19.
46. Klein PD, James WPT, Wong WW, Irving CS, Murgatroyd PR, Cabrera M, Dallosso HM, Klein ER & Nichols BL (1984). Calorimetric validation of the doubly-labelled water method for determination of energy expenditure in man. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 38C: 95-106.
47. Klein S, Young VR, Blackburn G & Wolfe R (1986). Palmitate and glycerol kinetics during brief starvation in normal weight young and elderly subjects. *J. Clin. Invest.* 78: 928-933.
48. Laidlaw SA & Kopple JD (1987). Newer concepts of the indispensable amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 593-605.
49. Langenbeck U, Luthe H & Schaper G (1985). Keto acids in tissues and biological fluids: *O*-*t*-butyldimethylsilyl quinoxalins as derivatives for sensitive gas chromatography/mass spectrometry determination. *Biom. Mass Spectrom.* 12: 507-509.
50. Lapidot A & Nissim I (1980). Regulation of pool sizes and turnover rates of amino acids in humans: ¹⁵N-glycine and ¹⁵N-alanine single dose experiments using gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Metabolism* 29: 230-239.

51. Layman DK & Wolfe RR (1987). Sample site selection for tracer studies applying a unidirectional circulatory approach. *Am. J. Physiol.* 253: E173-E178.
52. Lecavalier L, DeFeo P & Haymond MW (1991). Isolated hypoisoleucinemia impairs whole body but not hepatic protein synthesis in humans. *Am. J. Physiol.* 261: E578-E586.
53. Leverton RN, Ellison J, Pazur J, Schmidt F & Geschwender D (1956a). The quantitative amino acid requirements of young women. V Leucine. *J. Nutr.* 58: 355-365.
54. Leverton RN, Gram MR, Chaloupka M, Brodovsky E & Mitchell A (1956b). The quantitative amino acid requirements of young women. I Threonine. *J. Nutr.* 58: 59-81.
55. Leverton RN, Gram MR, Brodovsky E, Chaloupka M, Mitchell A & Johnson N (1956c). The quantitative amino acid requirements of young women. II Valine. *J. Nutr.* 58: 83-93.
56. Leverton RN, Johnson N, Ellison J, Geschwender D & Schmidt F (1956d). The quantitative amino acid requirements of young women. IV Phenylalanine, with and without tyrosine. *J. Nutr.* 58: 341-353.
57. Leverton RN, Johnson N, Pazur J & Ellison J (1956e). The quantitative amino acid requirements of young women. III Thryptophan. *J. Nutr.* 58: 219-229.
58. Lewis AJ (1992). *Determination of the amino acid requirements of animals*. In: Modern Methods in Protein Nutrition and Metabolism, ed. Nissen S, Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp.67-85.
59. Marchini JS & Dutra de Oliveira JE (1990). Endogenous nitrogen excretion in alcoholic patients on an enteral diet. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 23: 489-498.
60. Matthews DE, Bier DM, Rennie MJ, Edwards RHT, Halliday D, Millward DJ & Clugston GA (1981). Regulation of leucine metabolism in man: a stable isotope study. *Science* 214: 1129-1131.
61. Matthews DE, Motil KJ, Rohrbough DK, Burke JF, Young VR & Bier DM (1980). Measurement of leucine metabolism in man from a primed, continuous infusion of L-[1-¹³C]leucine. *Am. J. Physiol.* 238: E473-E479.

62. Matthews DE, Schwarz HP, Yang RD, Motil KJ, Young VR & Bier DM (1982). Relationship of plasma leucine and α -ketoisocaproate during a L-[1-¹³C]leucine infusion in man: a method for measuring human intracellular leucine tracer enrichment. *Metabolism* 31: 1105-1112.
63. Meguid MM, Matthews DE, Bier DM, Meredith CN, Soeldner JS & Young VR (1986a). Leucine kinetics at graded leucine intakes in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 770-780.
64. Meguid MM, Matthews DE, Bier DM, Meredith CN & Young VR (1986b). Valine kinetics at graded valine intakes in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 781-786.
65. Melville S, McNurlan MA, McHardy KC, Broom J, Milne E, Calder AG & Garlick PJ (1989). The role of degradation in the acute control of protein balance in adult man: Failure to stimulate protein synthesis as assessed by L-[1-¹³C]leucine infusion. *Metabolism* 38: 248-255.
66. Meredith CN, Wen ZM, Bier DM, Matthews DE & Young VR (1986). Lysine kinetics at graded lysine intakes in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 787-789.
67. Millward DJ (1989). *The endocrine response to dietary protein: the anabolic drive on growth*. In: Milk Proteins, eds. Barth CA & Schlimme E, Steinkopff Verlag Darmstadt,, pp.49-61.
68. Millward DJ (1990). Amino acid requirements in adult man. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 492-493.
69. Millward DJ & Rivers JPW (1988). The nutritional role of indispensable amino acids and the metabolic basis for their requirements. *Europ. J. Clin. Nutr.* 42: 367-393.
70. Millward DJ, Jackson AA, Price G & Rivers JPW (1989). Human amino acid and protein requirements: current dilemmas and uncertainties. *Nutr. Rev. Res.* 2: 109-132.
71. Millward DJ, Price G, Pacy PJH & Halliday D (1991). Whole body protein and amino acid turnover in man: what can we measure with confidence? *Proc. Nutr. Soc.* 50: 197-216.

72. Motil KJ, Matthews DE, Bier DM, Burke JF, Munro HN & Young VR (1981). Whole body leucine and lysine metabolism: response to dietary protein intake in young men. *Am. J. Physiol.* 240: E712-E721.
73. Munro HN (1970). *Free amino acid pools and their role in regulation*. In: Mammalian Protein Metabolism, ed. Munro HN, Academic Press, New York, pp.299-386.
74. Munro HN (1985). *Historical perspective on protein requirements: objectives for the future*. In: Nutritional Adaption in Man, eds. Blaxter K & Waterlow JC, John Libbey, London, pp.155-167.
75. Nakagawa I, Takahashi T & Suzuki T (1960). Amino acid requirements of children. *J. Nutr.* 71: 176-181.
76. Nakagawa I, Takahashi T, Suzuki T & Kobayashi K (1965). Amino acid requirements of children: quantitative amino acid requirements of girls based on nitrogen balance method. *J. Nutr.* 86: 333-336.
77. NAS-NRC (1980). *Recommended dietary allowances* 9th ed., National Academy of Science, Washington, D.C., p. 9.
78. National Research Council (1989). *Recommended Dietary Allowances* 10th ed., Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, DC, p.284. *
79. Neves HJC das & Vasconcelos AMP (1987). Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic-mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-mass spectrometric detection of the N, O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromat* 392: 249-258.
80. Nintze JL (1987). *Number Cruncher Statistical System* ed., Version 5.01, Kaysville, Utah., p.
81. Pacy PJ, Cheng KN, Thompson GN & Halliday D (1989). Stable isotopes as tracers in clinical research. *Ann. Nutr. Metab.* 33: 65-78.
82. Pacy PJ, Read M, Ford GC, Merritt H & Halliday D (1987). Influence of insulin on albumin and non-albumin protein synthetic rate. *Diabetic Med.* 4: 571A.

83. Peylot M, Beaufriere R, Riou JP & Mornex R (1987). Determination of steady state and non-steady state glycerol kinetics using deuterium-labelled tracer. *J. Lipid Res.* 28: 414-422.
84. Rassin DK & Bhatia J (1992). *Evaluation of protein status in humans*. In: Modern Methods in Protein Nutrition and Metabolism, ed. Nissen S, Academic Press, San Diego, pp.145-165.
85. Ravussin E, Borgardus C, Schjeidegger J, LaGrange R, Horton FD & Horton ES (1986). Effect of elevated FFA on carbohydrate and lipid oxidation during prolonged exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 60: 893-900.
86. RDA (1989). *Recommended Dietary Allowances* 10th ed., National Academy Press, Washington, D.C., p.285.
87. Rennie MJ, Edwards RHT, Halliday D, Matthews DE, Wolman SE & Millward DJ (1983). Muscle protein synthesis measured by stable isotopes in man: the effects of feeding and fasting. *Clin. Sci.* 63: 519-523.
88. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation (1985). *Energy and protein requirements* ed., World Health Organization, Geneva, p.208.
89. Roberts SB, Savage J, Coward WA, Chew B & Lucas A (1988). Energy expenditure and intake in infants born to lean and overweight mothers. *N. Eng. J. Med.* 318: 461-466.
90. Rocchiccioli F, Leroux JP & Cartier J (1981). Quantification of 2-ketoacids in biological fluids by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry of O-trimethylsilyl-quinoxalinol derivatives. *Biom. Mass Spectrom.* 8: 160-164.
91. Rose WC (1957). The amino acid requirements of adult man. *Nutr. Abst. Rev.* 27: 631-647.
92. Rose WC & Wixon RL (1955). The amino acid requirements of man. XVI. The role of the nitrogen intake. *J. Biol. Chem.* 217: 997-1004.
93. Rose WC, Coon MJ & Lambert GF (1954a). The amino acid requirements of man. VI. The role of the caloric intake. *J. Biol. Chem.* 210: 331-342.

94. Rose WC, Eades CHJ & Coon MJ (1955a). The amino acid requirements of man. XII. The leucine and isoleucine requirements. *J. Biol. Chem.* 216: 225-234.
95. Rose WC, Johnson JE & Haines WJ (1950). The amino acid requirements of man. I. The role of valine and methionine. *J. Biol. Chem.* 182: 541-555.
96. Rose WC, Lambert GF & Coon MJ (1954b). The amino acid requirements of man. VII. General procedures; the tryptophan requirement. *J. Biol. Chem.* 211: 815-827.
97. Rose WC, Leach BE, Coon MJ & Lambert GF (1955b). The amino acid requirements of man. IX. The phenylalanine requirement. *J. Biol. Chem.* 213: 913-922.
98. Royle GI, Wolfe RR & Burke JF (1983). The measurement of glucose turnover and oxidation using radioactive and stable isotopes. *J. Surg. Res.* 34: 187-193.
99. Sasaki Y, Iio M, Kameda H, Ueda H, Aoyagi T, Christopher NL, Bayless TM & Wagner HNJ (1970). Measurement of ^{14}C -lactose absorption in the diagnosis of lactase deficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 76: 824-835.
100. Sauberlich HE, Skala JH & Dowdy RP (1974). *Laboratory tests for the assessment of nutritional status* ed., CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio, p.136.
101. Schneider JF, Baker AL, Haines NW, Hatfield G & Boyer JL (1980). Aminopyrine N-demethylation: a prognostic test of liver function in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 79: 1145-1150.
102. Schoeller DA & Van Santen E (1982). Measurement of energy expenditure in humans by double-labelled water method. *J. Appl. Physiol.* 53: 955-959.
103. Schoeller DA, Van Santen E, Peterson DW, Dietz W, Jaspan J & Klein PD (1980). Total body water measurement in humans with ^{18}O and ^2H labeled water. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 2686-2693.
104. Schwenk WF, Beaufre B & Haymond MW (1985). Use of reciprocal pool specific activities to model leucine metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 249: E646-E650.

105. Scrimshaw NS, Hussein MA, Murray E, Rand WM & Young VR (1972). Protein requirements of man: variations in obligatory urinary and fecal nitrogen losses in young men. *J. Nutr.* 102: 1595-1604.
106. Scrimshaw NS, Young VR, Schwartz R, Piché ML & Das JB (1966). Minimum dietary essential amino acid-to-total nitrogen ratio for whole egg protein fed to young men. *J. Nutr.* 89: 9-18.
107. Shipley RA & Clarke RE (1972). *Tracer methods for in vivo kinetics* ed., Academic Press, New York, p.
108. Shreeve WW, Shoop JD, Ott DG & McInteer BB (1976). Test for alcoholic cirrhosis by conversion of [^{14}C] or [^{13}C] galactose to expired CO_2 . *Gastroenterology* 71: 98-101.
109. Snyderman SE, Norton PM, Fowler DJ & Holt LEJ (1959). The essential amino acid requirements of infants: lysine. *J. Dis. Child.* 97: 175-185.
110. Solomons NW, Schoeller DA, Wagonfeld JB, Ott D, Rosenberg IH & Klein PD (1977). Application of a stable isotope (^{13}C)-labelled glycocholate breath test to diagnosis of bacterial overgrowth and ileal dysfunction. *J. Lab. Clin. Med.* 90: 431-439.
111. Sprinson DB & Rittenberg D (1949). The rate of interaction of the amino acids of the diet with the tissue proteins. *J. Biol. Chem.* 180: 715-716.
112. Steffee WP, Goldsmith RS, Pencharz PB, Scrimshaw NS & Young VR (1976). Dietary protein intake and dynamic aspects of whole body nitrogen metabolism in adult humans. *Metabolism* 25: 281-297.
113. Stucki WP & Harper AE (1962). Effects of altering the ratio of indispensable to dispensable amino acids in diets for rats. *J. Nutr.* 78: 278-286.
114. Sugden PH & Fuller SJ (1991). Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem. J.* 273: 21-37.
115. Tessari P, Tsalikian E, Schwenk WF, Nissen SL & Haymond MW (1985). Effects of [^{15}N]leucine infused at low rates on leucine metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 249: E121-E130.

116. Tontisirin K, Young VR, Miller M & Scrimshaw NS (1973). Plasma tryptophan response curve and tryptophan requirements of elderly people. *J. Nutr.* 103: 1220-1228.
117. Trefz FK, Erlenmaier T, Hunneman DH, Bartholome K & Lutz P (1979). Sensitive in vivo assay of the phenylalanine hydroxylating system with a small intravenous dose of heptadentrio L-phenylalanine using high pressure liquid chromatography and capillary gas chromatography/mass fragmentography. *Clin. Chim. Acta* 99: 211-220.
118. Uy R & Wold F (1977). Post-translational covalence modification of proteins. *Science* 198: 890-896.
119. Wagner DA, Young VR & Tannenbaum SR (1983). Mammalian nitrate biosynthesis: Incorporation of ¹⁵N-ammonia into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4518-4521.
120. Waterlow JC (1984). Protein turnover with special reference to man. *Q. J. Exp. Physiol.* 69: 405-438.
121. Waterlow JC (1992). *Protein-energy Malnutrition* ed., Edward Arnold, London, p.96.
122. Waterlow JC & Alleyne GAO (1971). *Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last years*. In: *Advances in Protein Chemistry*, eds. Anfinsen CBJ, Edsall JT & Richards FM, Academic Press, New York, pp.117-224.
123. Waterlow JC, Garlick PJ & Millward DJ (1978). *Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body* ed., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, p.804.
124. Watkins JR, Klein PD, Schoeller DA, Kirschner BS, Park R & Perman JA (1982). Diagnosis and differentiation of fat malabsorption in children using ¹³C-labeled lipids: trioctanoin, triolein, and palmitic acid breath tests. *Gastroenterology* 82: 911-917.
125. Weller LA, Calloway DH & Margen S (1971). Nitrogen balance of men fed amino acid mixtures based on Rose's requirements, egg white protein and serum free amino acid patterns. *J. Nutr.* 101: 1499-1508.

126. Westerterp KR, Saris WHM, Van Es M & Ten Hoor F (1986). Use of the doubly labelled water technique in humans during heavy sustain exercise. *J. Appl. Physiol.* 61: 2162-2167.
127. Williams HH, Harper AE, Hegsted DM, Arroyave G & Holt LEJ (1974). *Nitrogen and amino acid requirements*. In: Improvement of protein nutriture, ed. US Food & Nutrition Board, National Academy of Sciences, Washington, D.C., pp.23-63.
128. Wolfe RR, Goodenough RD, Wolfe MH, Royle GT & Nadel ER (1982). Isotopic analysis of leucine and urea metabolism in exercising humans. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exerc. Physiol.* 52: 458-466.
129. Wolfe RR, Henderson DN, Jahoor F, Miyoshi H & Wolfe M (1987). Effect of severe burn injury on substrate cycling by glucose and fatty acids. *N. Eng. J. Med.* 317: 403-408.
130. Wootton R, Ford GC, Cheng KN & Halliday D (1985). Calculation of turnover rates in stable-isotope studies. *Phys. Med. Biol.* 30: 1143-1149.
131. Young VR (1982). Stable isotopes in nutrition research--Introduction. *Fed. Proc.* 41: 2677-2678.
132. Young VR (1986). Nutritional Balance Studies: Indicators of Human Requirements or of Adaptive Mechanisms? *J. Nutr.* 116: 700-703.
133. Young VR (1987). 1987 McCollum award lecture: Kinetics of human amino acid metabolism; nutritional implications and some lessons. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 709-725.
134. Young VR (1989). Stable isotopes in the study of whole body protein and amino acid metabolism, with particular reference to humans. *Proc Nutr Soc, New Zealand* 14: 85-106.
135. Young VR (1990). Amino acids and proteins in relation to nutrition in the elderly. *Age Age.* 19: S10-S24.
136. Young VR (1991a). Amino acid kinetics in humans: metabolic aspects and nutritional significance. *Proc. Nutr. Soc. Aust.* 16: 154-172.

137. Young VR (1991b). Nutrient interactions with reference to amino acid and protein metabolism in non-ruminants; particular emphasis on protein-energy relations in man. *Z. Ernährungswiss* 30: 239-267.
138. Young VR (1992). Protein and amino acid requirements in humans: metabolic basis and current basis and current recommendations. *Scand. J. Nutr./Näringsforskning* 36: 47-56.
139. Young VR & Bier DM (1987a). Issues and opinions: amino acid requirements in the adult human: how well do we know them? *J. Nutr.* 117: 1484-1487.
140. Young VR & Bier DM (1987b). A kinetic approach to the determination of human amino acid requirements. *Nutr. Rev.* 45: 289-298.
141. Young VR & Janghorbani M (1982). *Use of stable isotopes for human nutrition studies*. In: Proceeding of the New Zealand Workshop on Trace Elements, ed. University of Otago, Dunedin, New Zealand, pp.352-366.
142. Young VR & Marchini JS (1990). Mechanisms and nutritional significance of metabolic response to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 270-289.
143. Young VR & Pellett PL (1983). *Some general considerations of amino acid and protein metabolism and nutrition*. In: Surgical Physiology, ed. Burke JF, W. B. Saunders, Co., Philadelphia, Pennsylvania, pp.51-74.
144. Young VR & Pellett PL (1987). Protein intake and requirements, with reference to diet and health. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1323-1343.
145. Young VR & Pellett PE (1990). Current concepts concerning indispensable amino acids needs in adults and their implications for international nutrition planning. *Food Nutr. Bull.* 12: 289-300.
146. Young VR & Pellett PL (1991). Protein evaluation, amino acid scoring and Food and Drug Administration's proposed food labeling regulations. Issues & opinions in nutrition. *J. Nutr.* 121: 145-150.

147. Young VR & Scrimshaw NS (1972). *The nutritional significance of plasma and urinary amino acids*. In: International Encyclopedia of Food and Nutrition, ed. Bigwood EJ, Pergamon Press, Oxford and New York, pp.541-568.
148. Young VR, Bier DM & Pellett PL (1989). A theoretical basis for increasing current estimations of the amino acid requirements in adult man, with experimental support. *Am. J. Clin. Nutr.* 50: 80-92.
149. Young VR, Bier DM, Matthews DE, Pelletier V & Pellett PL (1992). Stable isotope tracer studies of amino acid balance and human indispensable amino acid requirements: a reply to J. Millward. *Am. J. Clin. Nutr.*: "in press".
150. Young VR, Fajardo L, Murray E, Rand WM & Scrimshaw NS (1975). Protein requirements of man: comparative nitrogen balance response within the submaintenance to maintenance range of intakes of wheat and beef proteins. *J. Nutr.* 105: 534-542.
151. Young VR, Gucalp C, Rand WM, Matthews DE & Bier DM (1987). Leucine kinetics during three weeks at submaintenance-to-maintenance intakes of leucine in men: adaptation and accommodation. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 41C: 1-18.
152. Young VR, Hussein MA, Murray E & Scrimshaw NS (1971a). Plasma tryptophan response curve and its relation to tryptophan requirements in young adult men. *J. Nutr.* 101: 45-60.
153. Young VR, Meredith C, Hoerr R, Matthews D & Bier D (1985). *Amino acid kinetics in relation to protein and amino acid requirements: The primary importance of amino acid oxidation*. In: Substrate and Energy Metabolism in Man, eds. Garrow JS & Halliday D, John Libbey, London, pp.119-134.
154. Young VR, Ozalp I, Cholakov BV & Scrimshaw NS (1971b). Protein value of Colombian opaque-2 corn for young adult men. *J. Nutr.* 101: 1475-1482.
155. Young VR, Perera WD, Winterer JC & Scrimshaw NS (1976). *Protein and amino acid requirements of the elderly*. In: Nutrition and Aging, ed. M. Winick, John Wiley and Sons, New York, pp.77-118.

156. Young VR, Scrimshaw NS & Bier DM (1981). Whole body protein and amino acid metabolism: relation to protein quality evaluation in human nutrition. *J. Agri., Food Chem.* 29: 440-447.
157. Young VR, Tontisirin K, Ozalp I, Lakshaman F & Scrimshaw NS (1972). Plasma amino acid response curve and amino acid requirements in young men: valine and lysine. *J. Nutr.* 102: 1159-1170.
158. Young VR, Wagner DA, Burini R & Storch KJ (1991). Methionine kinetics and balance at the 1985 FAO/WHO/UNU intake requirement level in young men studied with [2H3-Methyl]-1-13C]methionine as a tracer. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 377-385.
159. Zello GA, Pencharz PB & Ball RO (1990). Phenylalanine flux, oxidation, and conversion to tyrosine in humans studied with L-[1-13C]phenylalanine. *Am. J. Physiol.* 259: E835-E843.
160. Zello GA, Ball RO & Pencharz PB (1991). Dietary lysine requirement humans determined by phenylalanine flux and oxidation. *Proc. Nutr. Soc. Austr.* 16: 31.
161. Zhao X-H, Wen ZM, Meredith CN, Matthews DE, Bier DM & Young VR (1986). Threonine kinetics at graded threonine intakes in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 795-802.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Telefone: PABX 633-3035 - Telex (0166) 354 - FAX (016) 633-1586
14049-900 - RIBEIRÃO PRETO - Est. São Paulo

COPIA AUTÊNTICA DA ATA DO CONCURSO DE TÍTULOS E PROVAS VISANDO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE LIVRE-DOCENTE, JUNTO AO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA - DISCIPLINA DE NUTROLOGIA, AO QUAL ESTÁ INSCRITO O PROFESSOR DOUTOR JÚLIO SÉRGIO MARCHINI.

Aos sete dias do mês de junho de mil, novecentos e noventa e três, às seis horas e trinta minutos, presentes os Professores Doutores José Eduardo Dutra de Oliveira, Marcos Antonio Rossi, Álvaro Oscar Campana, Eder C. R. Quintão e Antonio Carlos Cicogna, instalou-se sob a Presidência do primeiro a Comissão Julgadora indicada pela Congregação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em sua 577a. Sessão Ordinária, de dezesseis de abril de mil, novecentos e noventa e três, para os trabalhos do Concurso de Títulos e Provas visando à obtenção do Título de Livre-Docente, junto ao Departamento de Clínica Médica, ao qual se inscreveu o Professor Doutor Júlio Sérgio Marchini. O Professor Doutor Marcos Antonio Rossi foi escolhido para Secretário da Comissão Julgadora. Foi então elaborado pela Comissão o roteiro dos trabalhos e a lista de pontos para a realização da Prova Escrita. Às 07:00 horas, a Comissão Julgadora convocou o Professor Doutor Júlio Sérgio Marchini para tomar conhecimento do roteiro e da lista de pontos para a Prova Escrita. Foi então elaborada pela Comissão Julgadora, a lista de pacientes para a realização da Prova Prática. Às 07:30 horas, como o candidato estivesse de acordo, sorteou um deles, tendo saído o de número 02: iniciais S.P., Registro Hospitalar no. 0309581-J, leito 503-3. A seguir, realizou-se a Prova Prática, na Enfermaria do Departamento de Clínica Médica. Terminada a prova, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, procedeu ao julgamento da mesma, tendo sido obedecidos os preceitos legais. Foi decidido pela Comissão Julgadora, que o candidato seria arguido na seguinte ordem: Professores Doutores: Antonio Carlos Cicogna, Eder C. R. Quintão, Álvaro Oscar Campana, Marcos Antonio Rossi e José Eduardo Dutra de Oliveira. A Assistência Técnica Acadêmica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto providenciou a divulgação dos horários das provas públicas, que foram realizadas na Sala da Congregação, no Prédio Central da Faculdade de Medicina. Às 14:00 horas, realizou-se a Prova Pública de Arguição e Julgamento do Memorial. Encerrada a arguição, em sessão secreta, a Comissão procedeu ao Julgamento do Memorial, registrando-se as notas, tendo sido obedecidas as exigências legais. No dia oito de junho, às 07:00 horas, o Professor Doutor Júlio Sérgio Marchini, sorteou o ponto destinado à Prova Escrita, tendo saído o de número 05: "Nutrição parenteral total: indicações e complicações". Logo após, a Comissão cientificou o candidato de que teria sessenta minutos para consultas bibliográficas e o prazo de quatro horas para a realização da prova. As consultas bibliográficas e a realização da Prova foram feitas na Sala da Congregação, no Prédio Central da Faculdade de Medicina. A seguir, foi realizada, em sessão pública, a Leitura da Prova Escrita. Logo após, a Comissão se reuniu, em sessão secreta, para proceder ao julgamento da Prova Escrita, tendo sido obedecidos os preceitos legais. Às 11:30 horas, dando

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Telefone: PABX 633-3035 - Telex (0166) 354 - FAX (016) 633-1586
14049-900 - RIBEIRÃO PRETO - Est. São Paulo

- 2 -

prosseguimento, a Comissão Julgadora entregou a lista de dez temas para a Prova de Avaliação Didática, previamente elaborada, ao candidato, para a escolha do tema. No ato da entrega da lista a Comissão cientificou-o de que teria sessenta minutos para consultas bibliográficas e o prazo de duas horas para escrever sobre o tema escolhido. O candidato comunicou à Comissão a escolha do tema de número 01: "Semiologia nutricional: análise crítica dos dados semiológicos (clínicos e laboratoriais) de importância no diagnóstico do estado nutricional". A arguição sobre a Prova de Avaliação Didática foi feita em sessão pública, tendo a mesma transcorrido dentro dos preceitos legais vigentes. Encerrada a prova, em sessão secreta, a Comissão Julgadora procedeu ao seu julgamento, registrando-se as notas. Às 14:30 horas, em sessão pública, realizou-se a Prova de Defesa de Tese de Docência, intitulada: "Ingestão recomendada de aminoácidos essenciais para indivíduos jovens eutróficos do sexo masculino. Estudo empregando isótopo estável, aminoácidos plasmáticos e balanço nitrogenado". De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora, em sessão secreta, procedeu ao julgamento, fazendo o lançamento das notas. A prova transcorreu dentro dos preceitos legais. Reaberta a sessão, o Senhor Presidente, esclareceu aos presentes que o Concurso chegava ao seu término. Os resultados gerais do Concurso, foram anunciados pelo Presidente da Comissão Julgadora e registrados no quadro-negro; tendo sido estas as notas atribuídas ao candidato Professor Doutor Júlio Sérgio Marchini - Professor Doutor José Eduardo Dutra de Oliveira - Prova Prática: 10,0 (dez); Prova Escrita: 10,0 (dez); Prova de Avaliação Didática: 10,0 (dez); Prova de Defesa de Tese: 10,0 (dez); Prova Pública de Arguição e Julgamento do Memorial: 10,0 (dez); Média Ponderada: 10,0 (dez). Professor Doutor Marcos Antonio Rossi - Prova Prática: 10,0 (dez); Prova Escrita: 10,0 (dez); Prova de Avaliação Didática: 10,0 (dez); Prova de Defesa de Tese: 10,0 (dez); Prova Pública de Arguição e Julgamento do Memorial: 10,0 (dez); Média Ponderada: 10,0 (dez). Professor Doutor Álvaro Oscar Campana - Prova Prática: 10,0 (dez); Prova Escrita: 10,0 (dez); Prova de Avaliação Didática: 10,0 (dez); Prova de Defesa de Tese: 10,0 (dez); Prova Pública de Arguição e Julgamento do Memorial: 10,0 (dez); Média Ponderada: 10,0 (dez). Professor Doutor Eder C. R. Quintão - Prova Prática: 10,0 (dez); Prova Escrita: 10,0 (dez); Prova de Avaliação Didática: 10,0 (dez); Prova de Defesa de Tese: 10,0 (dez); Prova Pública de Arguição e Julgamento do Memorial: 10,0 (dez); Média Ponderada: 10,0 (dez). Professor Doutor Antonio Carlos Cicogna - Prova Prática: 10,0 (dez); Prova Escrita: 10,0 (dez); Prova de Avaliação Didática: 10,0 (dez); Prova de Defesa de Tese: 10,0 (dez); Prova Pública de Arguição e Julgamento do Memorial: 10,0 (dez); Média Ponderada: 10,0 (dez). Concluída a apuração, o Senhor Presidente declarou que a Comissão, à vista dos resultados acima, considerava que o candidato Professor Doutor Júlio Sérgio Marchini estava apto a receber o Título de Livre-Docente do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em seguida, o Senhor Presidente, após cumprimentar o candidato pelo sucesso alcançado, agradeceu, em

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Telefone: PABX 633-3035 - Telex (0166) 354 - FAX (016) 633-1586
14049-900 - RIBEIRÃO PRETO - Est. São Paulo

- 3 -

nome da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, a colaboração prestada pelos ilustres Professores que muito gentilmente aceitaram participar dos trabalhos da Comissão Julgadora, estendendo os agradecimentos a todos os presentes. A seguir, a Comissão Julgadora, reuniu-se na Sala de Reuniões da Diretoria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, a fim de elaborar o Relatório Final. Eu, Cleide Filipini, Assistente para Assuntos Acadêmicos da Faculdade, redigi a presente Ata que vai assinada por mim e por todos os Membros da Comissão Julgadora. Ribeirão Preto, oito de junho de mil, novecentos e noventa e três.