

Ação do ácido pteroilglutâmico sobre o peso e a fosfatase alcalina do rim

Gilberto G. Villela & Maria Isabel Mello

Laboratório de Bioquímica da Divisão de Química e Farmacologia
do Instituto Oswaldo Cruz.

Os fatores necessários ao crescimento do "Lactobacillus casei" (fator L. casei), também denominados genericamente de ácido fólico, foram em parte isolados quimicamente e sintetizados. O fator L. casei sintético corresponde quimicamente ao ácido pteroilglutâmico (APG), sendo que os demais fatores como o de fermentação e o conjugado contêm 2 e 6 moléculas de ácido glutâmico (ácido pteroil-diglutamilglutâmico e pteroil-hexaglutamilglutâmico). O ácido pteroilglutâmico foi obtido sinteticamente por Angier & colaboradores e mostrou-se dotado de propriedades idênticas ao produto natural isolado anteriormente do fígado. O ácido fólico e os fatores a ele relacionados funcionam como vitaminas indispensáveis para a hematopoiese. Somente doses muito elevadas são tóxicas, bem que se tenham observado modificações histológicas dos rins de cobaias e coelhos tratados com doses acima de 5mg/Kg de peso (Harned & colaboradores) (1). Nenhuma outra referência relativa à ação do APG sobre os rins foi publicada até a presente data (2). No decorrer de estudos sobre a toxicidade do APG um de nós verificou o aumento dos rins nos camundongos injetados com o APG mesmo em doses subtóxicas (3). Foi observado que o peso dos rins aumentam sensivelmente e que este aumento talvez fosse devido à precipitação do APG nos túbulos renais dada a sua pouca solubilidade. No presente trabalho procuramos estudar o peso e o teor em fosfatase alcalina dos rins de camundongos injetados com doses variáveis do APG. Nossos resultados mostraram que a fosfatase alcalina baixa mesmo quando se ministram doses pequenas do APG (0,5mg/Kg). O aumento do peso dos rins não é devido à retenção de água, mas à diminuição dos sólidos excretados pelo rim (7).

Foram empregados camundongos brancos de 20-23gm pertencentes todos à uma mesma linhagem e stock. Os animais foram submetidos a jejum de

Trabalho apresentado ao V Congresso Nacional de Química realizado em Janeiro de 1949 em Recife.

16-20 hs. e sacrificados por exsanguinação. Os rins foram imediatamente removidos, pesados em balança de torsão e homogeneizados num gral de

QUADRO I

Peso e fosfatase "alcalina" dos rins de camondongos adultos e normais.

| Nº. DE CAMONDONGOS | IDADE EM DIAS | PESO MEDIO RINS mg | VALORES MEDIOS PARA A FOSFATASE "ALCALINA" EXPRESSOS EM UNIDADES POR PESO DOS RINS | |
|--------------------|---------------|-----------------------|--|------------|
| | | | Total | 1gm |
| 12..... | 80 | 249 | 102 | 401 |
| 15..... | 80 | 272 | 116 | 428 |
| 7..... | 90 | 316 | 156 | 491 |
| 9..... | 65 | 242 | 112 | 444 |
| 11..... | 70 | 280 | 129 | 559 |
| Médias..... | — | 269 ± 29.4 | 127 ± 21.3 | 464 ± 19.4 |

QUADRO II

Peso e fosfatase "alcalina" dos rins dos camondongos injetados com APG

| Nº. DE CAMONDONGOS | DOSE APG mg/Kg | PESO MEDIO RINS | VALORES MÉDIOS PARA A FOSFATASE "ALCALINA" EXPRESSOS EM UNIDADES PARA O PESO DOS RINS | |
|--------------------|-------------------|-----------------|---|---------------|
| | | | Total | 1gm de tecido |
| 10..... | 0,5 | 279 | 81 | 295 |
| 9..... | 0,75 | 295 | 133 | 454 |
| 8..... | 1,00 | 265 | 101 | 407 |
| 4..... | 5,00 | 272 | 100 | 313 |
| 13..... | 25,00 | 356 | 62 | 188 |
| 10..... | 50,00 | 370 | 58 | 168 |
| 6..... | 75,00 | 417 | 37 | 89 |
| 16..... | 125,00 | 457 | 50 | 112 |
| 13..... | 250,00 | 442 | 58 | 135 |
| 6..... | 375,00 | 409 | 82 | 162 |
| 3..... | 500,00 | 419 | 80 | 193 |
| 54..... | controles | 269 | 111 | 450 |

porcelana com agua distilada. O homogeneizado do rim diluido com 40 ml de agua distilada por gm de tecido conforme recomendam Kochakian &

Fox (4). Os extratos foram filtrados a fim de retirar o tecido conjuntivo e diluídos 10 vezes. A determinação da fosfatase foi feita pelo método de King & Armstrong ligeiramente modificado usando o fenilfosfato de sódio como substrato (5). A atividade fosfatásica foi determinada em 0.25 ml do filtrado limpido tamponado para o pH de 9.8 e incubado com o substrato 15 minutos a 37°. O desenvolvimento da cor foi obtido com o reativo de Folin & Ciocalteu; completou-se o volume para 10 ml e a cor medida no fotocolorimetro Lumetron com o filtro vermelho 650. As provas em branco foram feitas simultaneamente sendo omitido o período de incubação. Os resultados estão expressos em atividade de fosfatase alcalina, uma unidade

QUADRO III

Valores medios para o peso e a fosfatase "alcalina" dos rins dos camundongos normais e injetados com APG.

| APG mg/Kg | PESO DOS RINS mg | σ | E. P. | FOSFATASE ALCALINA EM UNIDADES | | | | | |
|----------------|---------------------------|----------|-------|--------------------------------|----------|-------|--------------------|----------|-------|
| | | | | TOTAL | σ | E. P. | por peso gm. | σ | E. P. |
| 0.5-5.0..... | 292 | 14.3 | 3.97 | 104 | 21.5 | 5.96 | 367 | 75.9 | 2.10 |
| 25-500..... | 416 | 11.2 | 1.67 | 61.5 | 17.3 | 2.58 | 146 | 14.6 | 2.16 |
| controles..... | 269 | 29.4 | 13.36 | 127 | 21.3 | 9.68 | 469 | 19.4 | 8.81 |

$$\sigma = \text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{\sum (x-m)^2}{N-1}}$$

$$\text{E.P} = \text{Erro padrão} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

sendo equivalente a 1mg de fenol libertado pela hidrólise. Os valores obtidos são lidos numa curva padrão, previamente calibrada com quantidades conhecidas de fenol e tratadas pelo mesmo reagente e diluída para o volume de 10 ml. A solução do substrato de fenilfosfato de sódio foi preparada cada dois dias e guardada na geladeira. Em nossas experiências as soluções mais velhas deram valores elevados.

Nestas experiências empregamos sempre animais selecionados tendo o mesmo limite de idade e peso e submetidos a uma dieta padrão porque a idade

influe no teor de fosfatase do rim conforme demonstraram Kochakian & Fox (4). Os camundongos usados foram de preferencia os de 65-80 dias de idade e pesando de 20-22gm. No quadro I acham-se sumariados os valores para o peso e o teor em fosfatase alcalina dos rins de 54 camundongos normais em bom estado de nutrição. Os valores da ultima linha do quadro I referem-se a animais em jejum de 24 hs. que mostraram um ligeiro aumento da enzima calculada por gm de tecido.

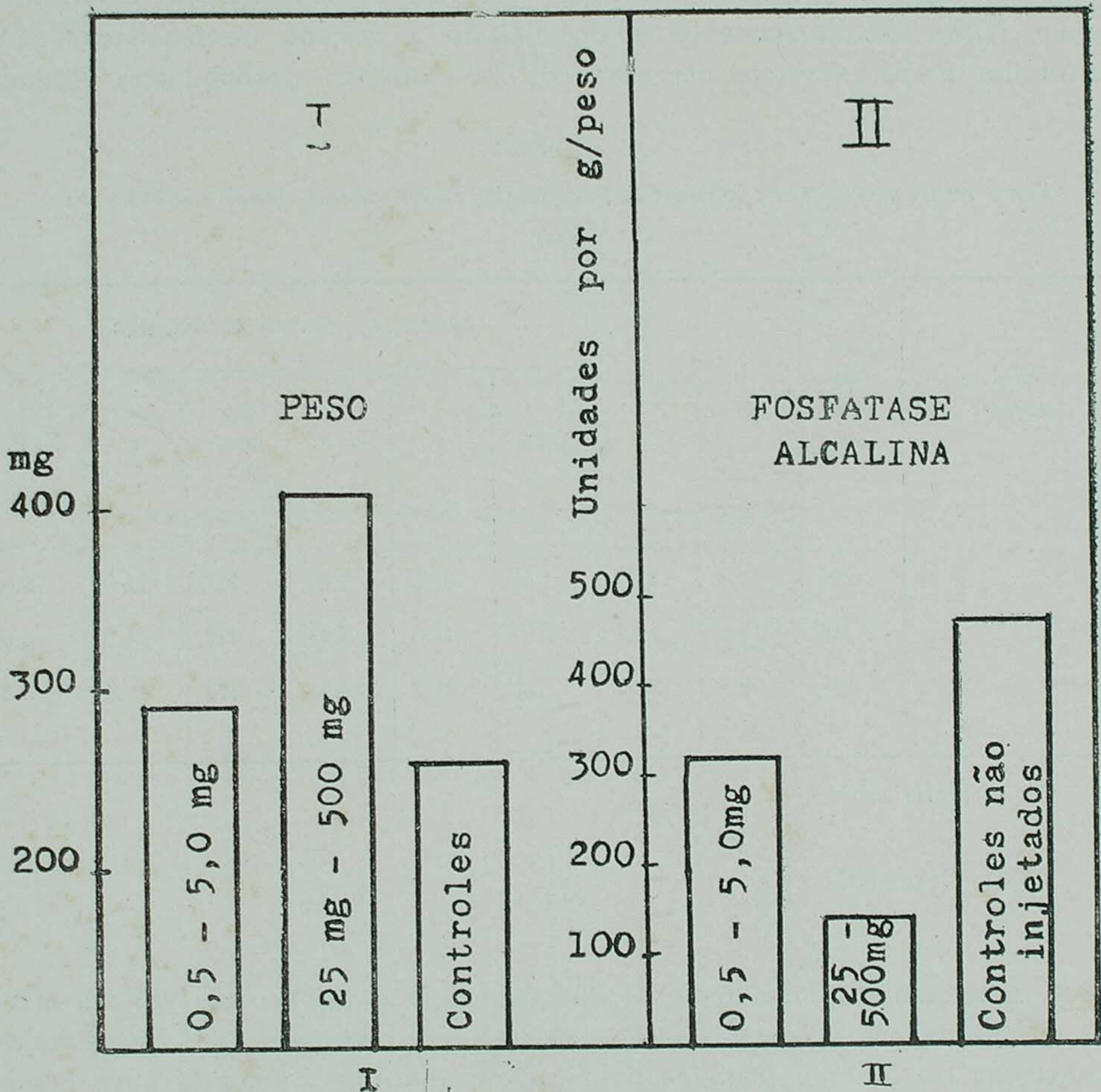


FIGURA I

- I Peso dos rins dos camundongos injetados com APG e dos animais controles não injetados.
- II Fosfatase "alcalina" dos rins dos animais injetados com APG e dos controles não injetados.

Os camundongos grupados e injetados subcutaneamente com doses crescentes de APG foram sacrificados 24 hs após a injeção. O LD50 (dose mortal 50%) obtido para o APG por Harned & colaboradores por via intraperitoneal foi de 600mg/Kg (1). Para as doses injetadas subcutaneamente obtivemos o LD50 de 375mg/Kg de peso. Por conseguinte usámos neste trabalho doses menores para evitar a intoxicação aguda. Só verificamos a

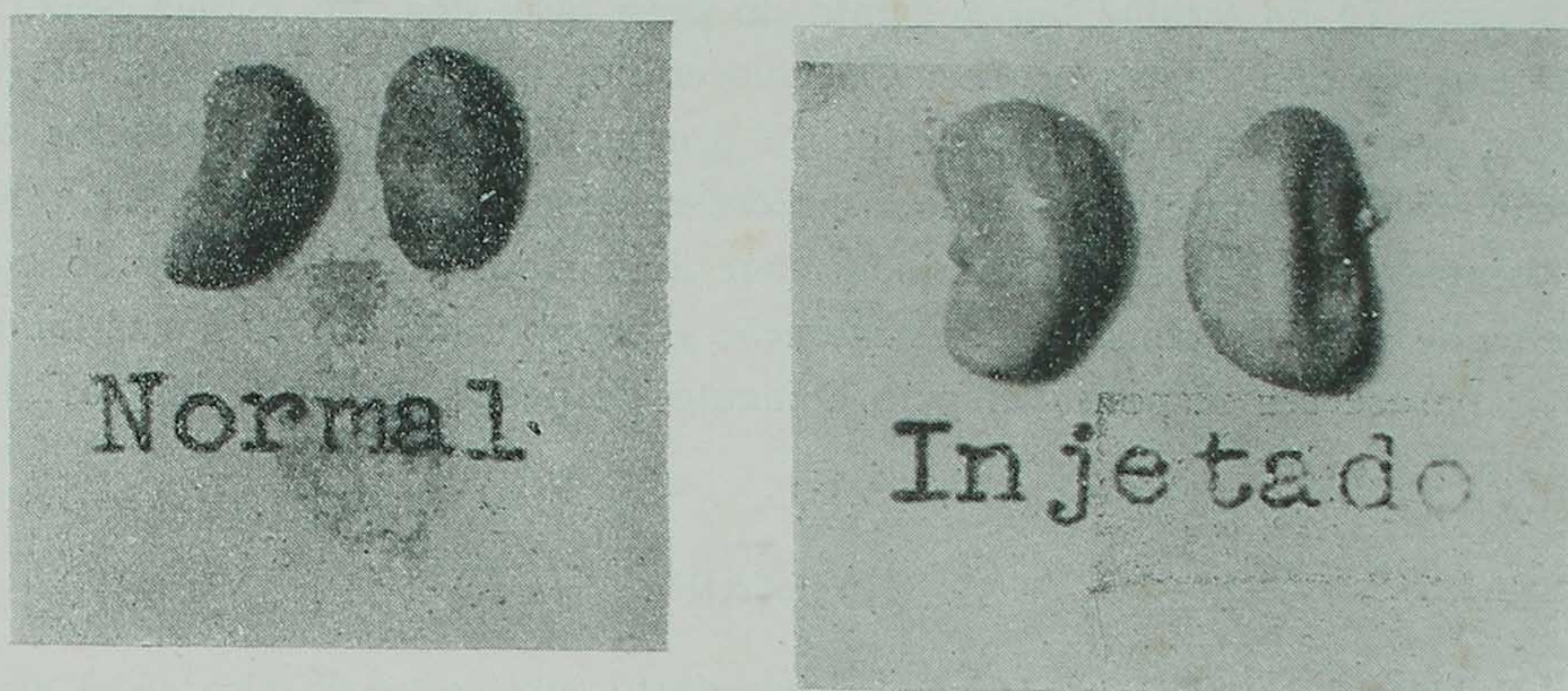


FIGURA II

Fotografias dos rins dos camundongos

I rins normais — II injetados

morte de animais com dose acima de 375mg/Kg. Como a dose de 0,5mg/Kg tem um efeito pouco acentuado procurámos verificar si doses repetidas teriam ação cumulativa. Animais pesando 20-21gm foram injetados diariamente com 0,5mg/Kg até completar a quantidade total de 5mg/Kg. O peso medio dos rins destes animais foi de 331 mg. e os valores da fosfatase alcalina de 100-312 U. para o rim total e gm de tecido.

A inspeção dos quadros II e III e das Figs. 1 e 2 mostra o efeito do APG sobre o peso e a fosfatase alcalina dos rins. A diferença entre as medias dos animais injetados e não injetados é duas vezes maior que o erro padrão da media para todos os grupos analisados (Quadro III). Estes resultados são portanto estatisticamente significantes (6). Mesmo que seja incluído o grupo de animais injetados com pequenas doses obtem-se um valor significativo. O aumento do peso dos rins não se relaciona com o teor em agua dos mesmos desde que os valores médios para os animais normais e injetados não foi significativo.

Em uma experiência foram usados 20 camundongos normais e 20 outros injetados com 0.5-25mg/Kg sendo que os resultados para o 1.º grupo mostraram $76,3 \pm 0,3\%$ de água e para o 2.º grupo $75,4 \pm 0,8\%$.

SUMARIO

O APG ministrado subcutaneamente a camundongos normais em injeção única após 24 hs produz um aumento do peso total dos rins e uma baixa da fosfatase alcalina destes órgãos. Os valores normais foram baseados em experiências feitas em 54 camundongos e comparados com outros obtidos com 88 camundongos injetados com doses crescentes de APG (0,5-500mg/K). A fosfatase alcalina foi determinada por uma modificação do método colorimétrico de King & Armstrong. A retenção e precipitação do APG nos tubulos renais parece ser responsável pelo aumento de peso e a baixa das fosfatase dos rins.

SUMMARY

PGA when administered subcutaneously into normal mice in a single injection produces after 24 hours an effective increase of the total weight and a decrease of the "alkaline" phosphatase of the Kidneys. Normal values based on 54 mice are reported and compared with those obtained from 88 mice injected with graded doses of PGA (0.5mg/Kg to 500mg/Kg body weight). The "alkaline" phosphatase was determined by a slight modification of the colorimetric method of King & Armstrong using disodium phenylphosphate as a substrate. It is suggested that the retention and precipitation of PGA in the renal tubuli could be responsible for the increased weight and decreased phosphatase activity of the kidneys.

BIBLIOGRAFIA.

1. HARNED, B. K., CUNNINGHAM, R. W. SMITH, H. D., & CLARK, M. C.
1946. Pharmacological studies of Pteroylglutamic Acid, Ann. New York Acad. Sc. 48.289.
2. JUKES, T. H. & STOKSTAD, E. L. R.
1948. Pteroylglutamic acid and related compounds, Physiol. Rev. 28,51.
3. VILLELA, G. G.
1947. Pteroylglutamic Acid (Folic acid) and Neoarsphenamine Toxicity, Arch. Bioch. 15.157.

4. KOCHAKIAN, C. D., & FOX, P.
1944. The effect of castration and testosterone propionate on the "Alkaline" and "acid" phosphatase of the kidney, liver and intestine of the mouse, *J. Biol. Chem.* 153.669.
5. KING, E. J.
1948. *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*, London, 1946, J. & A, Churchill Ltd. pag. 57. e Villela, G. G., & Mello M.I. : Determinação das fosfatases "Acida" e "Alcalina" do sôro, *O Hospital* 34,3,433.
6. FISHER, R. A.
1934. *Statistical Methods for Research Workers*, London, Oliver & Boyd, pag. 112.
7. VILLELA, G. G., e MELLO, M. I.
1949. Effect of pteroylglutamic acid on weight and "alkaline" phosphatase of kidneys of the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70, 453-454.