

UNIVERSIDADE DE SAO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

A DOSAGEM DO ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO NA
URINA POR TÉCNICA CROMATOGRÁFICA MONODIMENSIONAL.
SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DE INDIVÍDUOS NORMAIS E
EM PORTADORES DE DOENÇA HIPERTENSIVA ARTERIAL
ESSENCIAL EM CONDIÇÕES BASAIS E DE HIPOGLICEMIA.



Tese de doutoramento apresentada ao
Departamento de Clínica Médica (Serviço
do Prof. A.B. de Ulhôa Cintra) Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo
Brasil _____ 1967

WILIAN NICOLAU

Orientador: António Barros de Ulhôa Cintra

1967

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REITOR - PROF. DR. LUIS ANTONIO DA GAMA E SILVA

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR - PROF. DR. JOÃO ALVES MEIRA

VICE-DIRETOR - PROF. DR. CARLOS DA SILVA LACAZ

SECRETÁRIO - DR. DANTE NESE

CADEIRAS

Anatomia (Descritiva e Topográfica)
Histologia e Embriologia
Química Fisiológica e Física Química Aplicada
Fisiologia
Parasitologia
Microbiologia e Imunologia
Farmacologia
Anatomia Patológica
Medicina Legal
Departamento de Clínica Cirúrgica

Departamento de Clínica Médica

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Clin. Pediatria
Clin. Doenças Tropicais e Infecciosas
Clin. Dermatologia e Sifilografia
Clin. Psiquiatria
Clin. Oftalmologia
Clin. Otorrinolaringologia
Clin. Urologia
Clin. Ortopedia e Traumatologia
Clin. Neurologia
Radiologia
Higiene e Medicina Preventiva

PROFESSORES

ODORICO MACHADO DE SOUZA
LUIZ CARLOS UGRÔA JUNQUEIRA
ISAIAS RAW
ALBERTO CARVALHO DA SILVA
ANTONIO DÁCIO FRANCO DO AMARAL
CARLOS DA SILVA LACAZ
CHARLES EDWARD CORBETT
CONSTANTINO MIGNONE
HILÁRIO VEIGA DE CARVALHO
EURICO DA SILVA BASTOS
ALÍPIO CORRÊA NETTO
EDMUNDO VASCONCELOS
ANTONIO BARROS DE ULHÔA CINTRA
LUIZ VENERE DÉCOURT
JOSÉ B. MEDINA
EDUARDO MARCONDES MACHADO
JOÃO ALVES MEIRA
S. DE ALMEIDA PRADO SAMPAIO
VAGA
PAULO BRAGA MAGALHÃES
RAPHAEL DA NOVA
J. GERALDO DE CAMPOS FREIRE
VAGA
ADHERBAL PINHEIRO MACHADO TOLOSA
PAULO DE ALMEIDA TOLEDO
GUILHERME RODRIGUES DA SILVA

PROFESSORES APOSENTADOS

BENEDITO MONTENEGRO
A.C. PACHECO E SILVA
SAMUEL B. PESSOA
RENATO LOCCHI
FLAMÍNIO FÁVERO
JOÃO DE AGUIAR PUPO

J.A. DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI
ANTONIO DE PAULA SANTOS
ERNESTO DE SOUZA CAMPOS
F.E. GODOY MOREIRA
CANTÍDIO DE MOURA CAMPOS
P. DE ALCANTARA MARCONDES MACHADO

NOTA - A Faculdade não aprova nem reprova as opiniões exaradas nas Teses que lhe são apresentadas.

A minha mãe

A minha esposa

À memória de:

I. D. N.

J. N.

N. N.

AGRADECIMENTOS

O autor é profundamente agradecido aos Senhores:

Prof. Dr. Antonio Barros de Ulhôa Cintra (mestre exemplar).

Prof. Dr. Emílio Mattar

Prof. Dr. Lício Marques de Assis

Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

dos quais segue a orientação científica, ética e profissional.

Drs. Paulo de Paula e Silva

Helga Maria Mazzarolo Cruz

Walter Bloise

Antonio da Silva Coelho Neto

Dorina R. Epps

Bernardo Léo Wajchenberg

Virgílio Gonçalves Pereira

Evaldo Hermínio de Lúcia Melo

Emil Sabbaga

Michel Jamra (Professor)

Tibor David (Professor)

Antonio Gouvea Soares

Maria Odete Ribeiro Leite

pelo auxílio e sugestões prestadas.

Farms. Emiko Muramoto, cuja colaboração técnica possibilitou a feitura deste trabalho.

Etsuko Ikeda

Srtas. Naoko Kadekaru
Deize Therezinha Nicolucci
Marina Ribeiro Leite

Sras. Lillian Amorim de Vilhena Nunes
Izabel P. Nabor

Ao Instituto de Energia Atômica pelas facilidades con
cedidas na execução do trabalho.

O autor a todos deve: aos pais, aos mestres, aos ami-
gos.

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - METODOLOGIA	14
CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE EXCREÇÃO URINÁRIA DE 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO EM INDIVÍDUOS NORMAIS E EM PORTADORES DE DOENÇA HIPERTENSIVA ARTERIAL ESSENCIAL. ESTUDO COMPARATIVO COM NÍVEIS OBTIDOS EM PACIENTES COM NEOPLASIAS DO TECIDO CROMAFÍNICO	23
CAPÍTULO III - ESTUDO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO EM INDIVÍDUOS NORMAIS E EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA HIPERTENSIVA ARTERIAL ESSENCIAL, SUBMETIDOS A UM ESTÍMULO HIPOGLICEMIANTE	32
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUÇÃO

Em 1945 Roth e Kvale⁷⁷ introduziram a primeira prova farmacológica para o diagnóstico de feocromocitoma e, em 1950, Engel e von Euler³² demonstraram a utilidade da dosagem das catecolaminas (CA) urinárias no diagnóstico desta entidade nosológica. Neste período o diagnóstico dependia, em grande parte, da interpretação das flutuações da pressão arterial sob a ação das diversas drogas, tais como histamina, piperoxana, brometo de tetraetilamônio, cloreto de metacolina, dibenammina e fentolamina.

Aos riscos e desconfortos^{34,69} ocasionados pela administração dessas substâncias somavam-se e somam-se ainda, visto não terem sido totalmente abandonadas, interpretações dúbias dos resultados limítrofes e inúmeros casos de respostas falsamente positivas ou negativas. Eram estas as condições que limitavam e reduziam o valor daquelas provas para o diagnóstico de tumor funcional do tecido cromafínico.

Com a introdução das novas técnicas de dosagem das CA na urina^{32,33,61} e no sangue, o diagnóstico tornou-se mais preciso ao mesmo tempo que se suprimia o desconforto para o paciente^{58,69}.

Os ensaios biológicos e fluorimétricos^{32,106}, utilizados na avaliação de quantidades extremamente pequenas de CA sanguíneas e urinárias, são demorados^{58,69} e exigem a colaboração de pessoal especializado, além do uso de material nem sempre acessível.

Armstrong e McMillan² demonstraram, em 1957, a presença na urina humana do ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA) produto do metabolismo da epinefrina (E) e norepinefrina (NE). A excreção urinária deste composto mostrou ser cerca de 10 a 100 vezes maior do que aquela da E e NE e, portanto, de mais fácil determinação pelos métodos colorimétricos.

Foi demonstrada também a relativa constância da excreção percentual do VMA: com a infusão de CA marcadas verificou-se que 27 a 36% eram excretados na urina sob forma daquele metabólito^{53,59}.

Seria de se esperar a utilização destas propriedades, na padronização de técnicas que viessem facilitar o diagnóstico dos tumores do tecido cromafínico e no estudo da fisiopatologia de algumas condições mórbidas em que estivessem em jôgo possíveis alterações da secreção de CA.

Os métodos cromatográficos bidimensionais^{3,38,52,90} e os eletroforéticos, seja em papel sob diferentes voltagens, ou em celulose^{1,45,81,93,96,97,111}, são considerados, geralmente, semi-quantitativos⁷⁹ em razão da baixa resolução dos compostos fenólicos.

A impraticabilidade de alguns métodos levou-nos ao desenvolvimento de uma técnica que, embora não divergindo fundamentalmente das análises cromatográficas já existentes, apresenta alguns pontos de originalidade.

O presente trabalho tem por objetivo a descrição de uma técnica cromatográfica em sistema butanólico para dosagem de VMA e apresentação dos resultados obtidos com sua aplicação:

- a) - Na análise dos valores de excreção diária nos indivíduos normais, nos portadores de doença hipertensiva arterial essencial (DHAE) e em pacientes portadores de neoplasias do tecido cromafínico;
- b) - No estudo da excreção urinária do VMA em indivíduos normais e portadores de DHAE, em resposta a um estímulo do sistema nervoso simpático provocado pela hipoglicemia.

É de todos os pontos de vista útil que sejam referidos, embora rapidamente, alguns dados básicos e atuais sobre o me

tabolismo das CA.

Para a síntese das aminas pressoras é necessária a presença da tirosina, amino-ácido derivado da fenilalanina por hidroxilação hepática e de todo um sistema enzimático íntegro.

A etapa inicial na biossíntese das CA é a transformação da tirosina em dihidroxifenilalanina (DOPA) (Figura 1). À tirosinase, enzima responsável pela mesma reação nos tecidos formadores de melanina, foi atribuída a responsabilidade desta reação. Entretanto, os trabalhos de Nagatsu e col.⁶⁵, em 1964, demonstraram a existência de uma outra enzima, a tirosina hidroxilase, responsável pela formação da DOPA a partir daquele amino-ácido. A ela dá-se a importância fisiológica de representar o fator limitante na formação de NE no tecido nervoso simpático; e seus inibidores tais como a α -metil dopa, a α -metil tirosina, a 3-iodotirosina e a 3,5 diiodotirosina diminuem, como seria de se esperar, a produção endógena de NE e dopamina nos tecidos humanos¹⁰².

A descarboxilação da DOPA, segunda etapa na biossíntese, dando como resultado a dopamina, é mediada pela enzima dopa-descarboxilase, devidamente caracterizada nos trabalhos de Holtz, Heise e Lüdtke⁴⁹.

Esta enzima é dotada de pouca especificidade, o que ficou constatado pelas experiências de Yuwiler¹¹⁴ e col. que demonstraram a sua ação na síntese da serotonina a partir do 5-hidroxitriptofano e na descarboxilação de outros substratos, tais como a α -metil dopa e amino-ácidos.

Esta enzima é ativada pela piridoxina⁸² e a carência desta vitamina leva a uma diminuição na síntese de CA. Os seus inibidores, a ℓ - α -metil dopa e a ℓ - α -metil tirosina, apresentam interesse não só devido as suas propriedades bioquímicas e farmacológicas como também pela sua introdução no arsenal de drogas anti-hipertensivas.

Pela introdução de um grupamento hidroxílico a dopamina é transformada em NE. A enzima mediadora desta reação é a dopamina- β -hidroxilase e sua pouca especificidade faz com que ela aceite como substrato uma série de compostos estruturalmente relacionados à dopamina^{23,43}. Assim ela poderia mediar a β -hidroxilação de uma série de aminas simpatomiméticas que, sob esta forma, β -hidroxilada, poderiam penetrar nos locais de estocagem das CA, deslocando os neurotransmissores adrenérgicos. Estaria assim explicada a ação destas drogas simpatomiméticas.

A dopamina- β -hidroxilase é inibida pelos análogos da E e NE (arterenona e adrenalona) e pelos agentes quelantes que atuam sobre o cobre ao qual está ligada a sua atividade enzimática.

A etapa final da síntese das CA é a N-metilação da NE dando como resultado a E. O doador do grupo metílico foi identificado como sendo a S-adenosil metionina⁵. A enzima mediadora mostra uma absoluta especificidade para metilar os derivados da feniletanolamina, razão pela qual lhe foi dado o nome de feniletanolamina N-metil transferase.

A sua atividade foi encontrada nas frações solúveis sobrenadantes de homogenados de medular de supra-renal⁵. Deduz-se, em vista disto, que a NE, para ser metilada, deve deixar os seus grânulos de estocagem e penetrar no citoplasma. Após sofrer a N-metilação, a E assim formada retorna a grânulos possivelmente diferentes daqueles que contêm a NE.

Foi recentemente verificado, em ratos, que os níveis de feniletanolamina-N-metil transferase dependem da secreção de glicocorticóides¹¹². A capacidade de formar E se reduz acentuadamente nos animais hipofisectomizados, concomitantemente à diminuição da atividade enzimática. Esta é totalmente restabelecida pela administração de hormônio adrenocorticotrófico em doses substitutivas ou por grandes doses de glicocorticóides.

A NE e E assim formadas e estocadas em grânulos¹¹⁰ no interior de vesículas citoplasmáticas devem ser liberadas ou da medular da supra-renal ou das terminações nervosas do sistema nervoso simpático, para produzirem os seus efeitos metabólicos e sobre a pressão arterial.

Secretados pela supra-renal diretamente na circulação (NE e E) ou pelas terminações nervosas em contato com os órgãos efetores (NE), as CA devem ser submetidas a processos múltiplos tendentes a diminuir suas atividades. Nestes processos incluem-se: a difusão rápida das CA, liberando o receptor da alta concentração local; a recaptação e ligação pelas terminações nervosas simpáticas da CA livre; a ação intra-axônica de monoamino oxidase ... (MAO) e a ação extra-axônica de catecol-O-metil-transferase⁷⁶ (COMT).

Os estudos compartimentais e cinéticos, com a utilização de NE marcada, aliados à administração de várias drogas tendentes a liberarem os estoques de CA, puseram em evidência a existência de diversos compartimentos. Êstes experimentos vieram lançar alguma luz sobre a maneira de secreção e metabolização das CA.

Foi descrito um primeiro compartimento (Figura 2) de dimensões maiores, intra-axônico, no qual a NE se encontra firmemente ligada e do qual é liberada fisiologicamente. A reserpina é capaz de reduzir lentamente êstes estoques, o que não é conseguido pela administração de tiramina ou pela excitação do nervo.

A CA liberada por êste processo no líquido citoplasmático axônico pode sofrer a ação da MAO⁵⁶. Assim, uma porção desta CA que ganha a circulação ou o órgão efetor já é desaminada e, portanto, de fraca atividade simpática. O mesmo processo metabólico ocorre na medular da supra-renal em relação à MAO e E.

A fração da NE que não sofreu a ação da MAO alimentará dois outros compartimentos menores: um resistente à ação da reserpina, porém, esgotável pela administração de tiramina⁷, e outro

que sômente libera a amina pressora pela estimulação nervosa.

A administração de CA marcadas demonstra que êstes com postos não são eliminados rapidamente¹⁰⁷, mas, pelo contrário, fi cam retidos nos tecidos, por longo tempo, sob a forma ligada e por tanto inativos. Êste é, talvez, o mecanismo mais importante na pro teção do organismo contra os excessos de secreção simpática.

Trendelenburg¹⁰¹ mostrou que a taquifilaxia à tiramina só podia ser observada após uma administração muito prolongada de reserpina, situação em que os estoques de NE teriam quase se esgotado do compartimento maior.

A administração adequada de reserpina, por tempo prolongado, resulta num quase total esgotamento de NE¹⁹.

O compartimento responsável pela liberação de NE, sob a ação do estímulo nervoso, é resistente à tiramina e à reserpina. Mesmo quando se administram aminas simpaticomiméticas até o ponto da taquifilaxia, êste compartimento ainda possui CA suficiente para ser liberada pelos impulsos nervosos²².

Das diversas alternativas de ação da COMT e da MAO sôbre as CA e compostos afins secretados pelos diversos compartimen tos, resultam:

- a) - Metabólitos como o VMA (Figura 3) (provenientes da NE e E), ácido homovanílico (HVM) provenientes da dopa e dopamina etc, (Figura 4).

Para chegar até a forma dêstes metabólitos, os compostos de origem devem sofrer, primeiramente, a desaminação resultante da ação da MAO e posteriormente, nas células parenquimatosas, a O-metilação mediada pela COMT.

- b) - Metabólitos que não sofreram a ação da MAO por serem secretados em sua forma ativa principalmenen

te pelos dois compartimentos menores. Estas formas ativas, após caírem em circulação, sofrem a ação da COMT⁵⁷ em contato com o efetor ou em órgãos mais distantes como o fígado e são excretados sob a forma de metanefrina (MN) e normetanefrina (NMN) (Figuras 2 e 3).

- c) - Metabólitos que são desaminados pela MAO, que não são metilados pela COMT como o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e 3,4-dihidroxi mandélico, (Figura 3 e 4).

Catecol-O-metil transferase

O achado de Armstrong³ de que indivíduos com feocromocitoma excretavam, na urina, grandes quantidades de um composto O-metilado, o VMA, abriu o caminho no estudo de enzimas que pudessem O-metilizar as CA.

Verificou-se que a enzima purificada¹⁰, responsável pela reação, quando colocada em presença de E, S-adenosilmetionina e Mg^{++} dava origem à MN, reação que se processava em quantidades equimolares.

Todos os catecóis podem ser O-metilados independentemente do radical substituinte do núcleo aromático.

Incluem-se neste grupo aqueles que ocorrem naturalmente no organismo, tais como a NE, E, dopamina, dopa, ácido 3,4-dihidroxi mandélico e ácido e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (Figura 4). Os monofenóis não são metilados por esta enzima.

Em razão da sua especificidade para O-metilizar catecóis, ela foi chamada de catecol-O-metil transferase. Largamente distribuída no organismo (glândulas, vasos sanguíneos, nervos e gânglios simpáticos e parassimpáticos e áreas do cérebro)⁶ ela se encontra confinada principalmente nas frações solúveis sobrenadantes dos te

cidos¹⁰.

O VMA resulta da ação da COMT sobre o ácido 3,4-dihidroxi-mandélico, produto este proveniente da NE e E que já sofreram a ação da MAO (Figura 3).

Axelrod e col. mostraram em 1958^{4,9}, utilizando CA marcadas, que a MN e NMN, metabólitos O-metilados que não sofreram a desaminação pela MAO, eram compostos excretáveis na urina de indivíduos normais. Os fatos sugerem que a O-metilação pode ser a etapa inicial no metabolismo das CA liberadas.

Os estudos metabólicos com NE e E marcadas⁴⁶ e injetadas na veia porta indicam que o fígado é o principal responsável pela O-metilação, ainda que esta inativação possa ocorrer em outros tecidos.

A inibição da COMT pelo pirogalol resulta num prolongamento do efeito pressor das CA, como demonstrou Bacq^{11,113} há muitos anos. As experiências com esta droga foram retomadas e esta inibição interpretada como sendo competitiva para a enzima⁸.

Os inibidores da COMT aumentam a excreção de CA intactas e metabólitos ácidos não metilados (Figura 3), (ácido 3,4-dihidroxi-mandélico) enquanto os inibidores da MAO aumentam a eliminação de MN e NMN (produtos metilados que não foram desaminados pela MAO)⁵⁵.

Monoamino-oxidase

O termo "monoamino-oxidase" é usado para designar um grupo de enzimas que catalizam a desaminação da tiramina, triptofano, serotonina, norepinefrina, epinefrina, dopamina e outras monoaminas.

Ela se acha ligada principalmente às mitocôndrias¹⁴ que encerram cerca de 70% do total contido em homogenados de células hepáticas¹².

A inibição da MAO resulta num aumento tanto de monoamí-
nas endógenas como daquelas administradas exógenamente. Concomitan-
temente, há uma diminuição de metabólitos desaminados (VMA, ácido
homovanílico, ácido 3,4-dihidroxi mandélico, ácido 5-hidroxi indolacé-
tico).

A dopamina constitui-se no melhor substrato para a MAO,
dando como resultado o ácido 3,4-dihidroxi fenilacético (DOPAC). Es-
te composto, quando O-metilado, dará origem ao ácido homovanílico
(HVA)²⁷ (Figura 4).

A ausência quase total de dopamina na medular da su-
pra-renal pode ser devida a sua rápida metabolização como provável
mecanismo de defesa para a superprodução de CA.

Todos os metabólitos são excretados pelos rins "in na-
tura" e sob a forma conjugada (glicuronidatos).

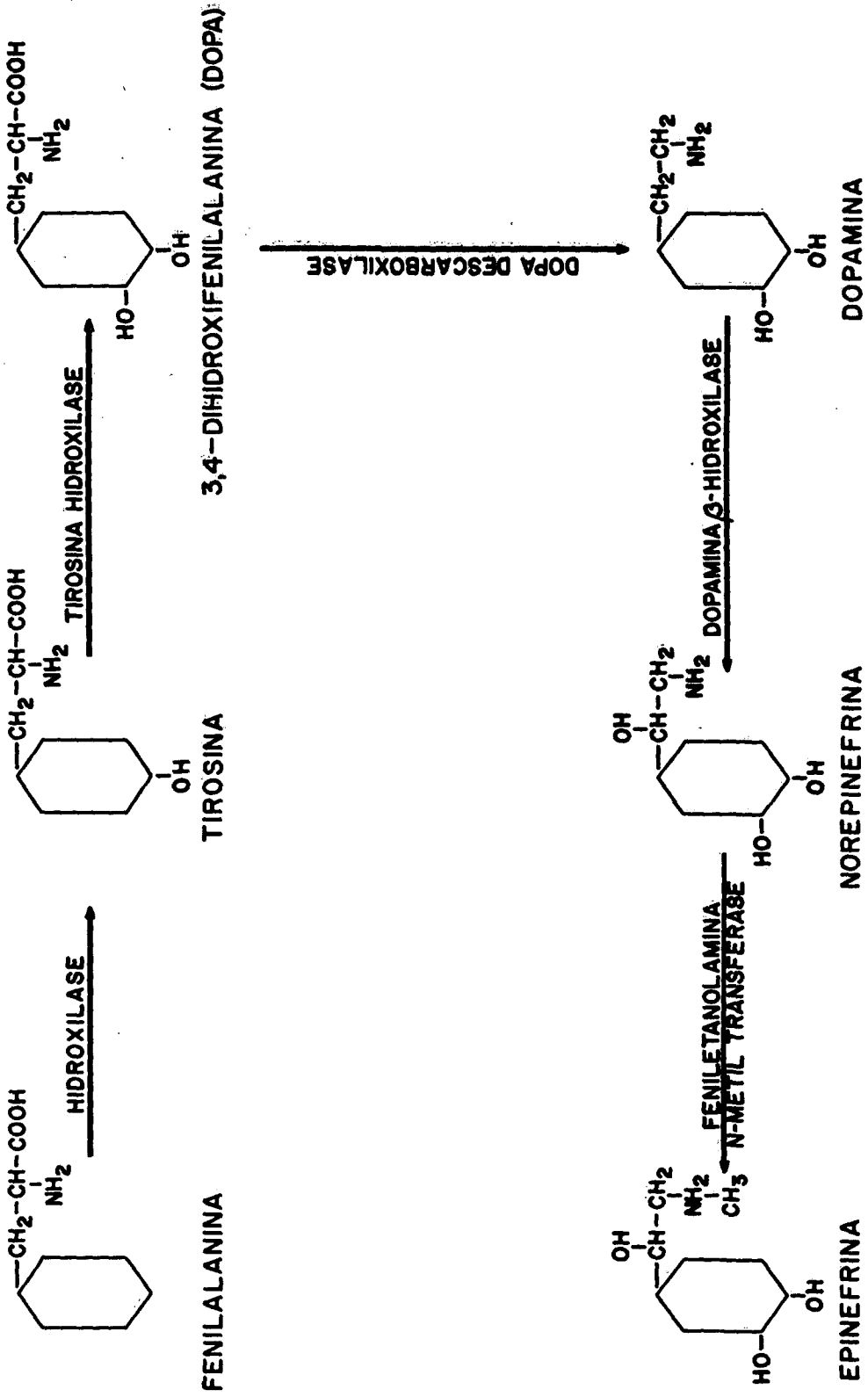


Figura 1 - Biossíntese da norepinefrina e epinefrina

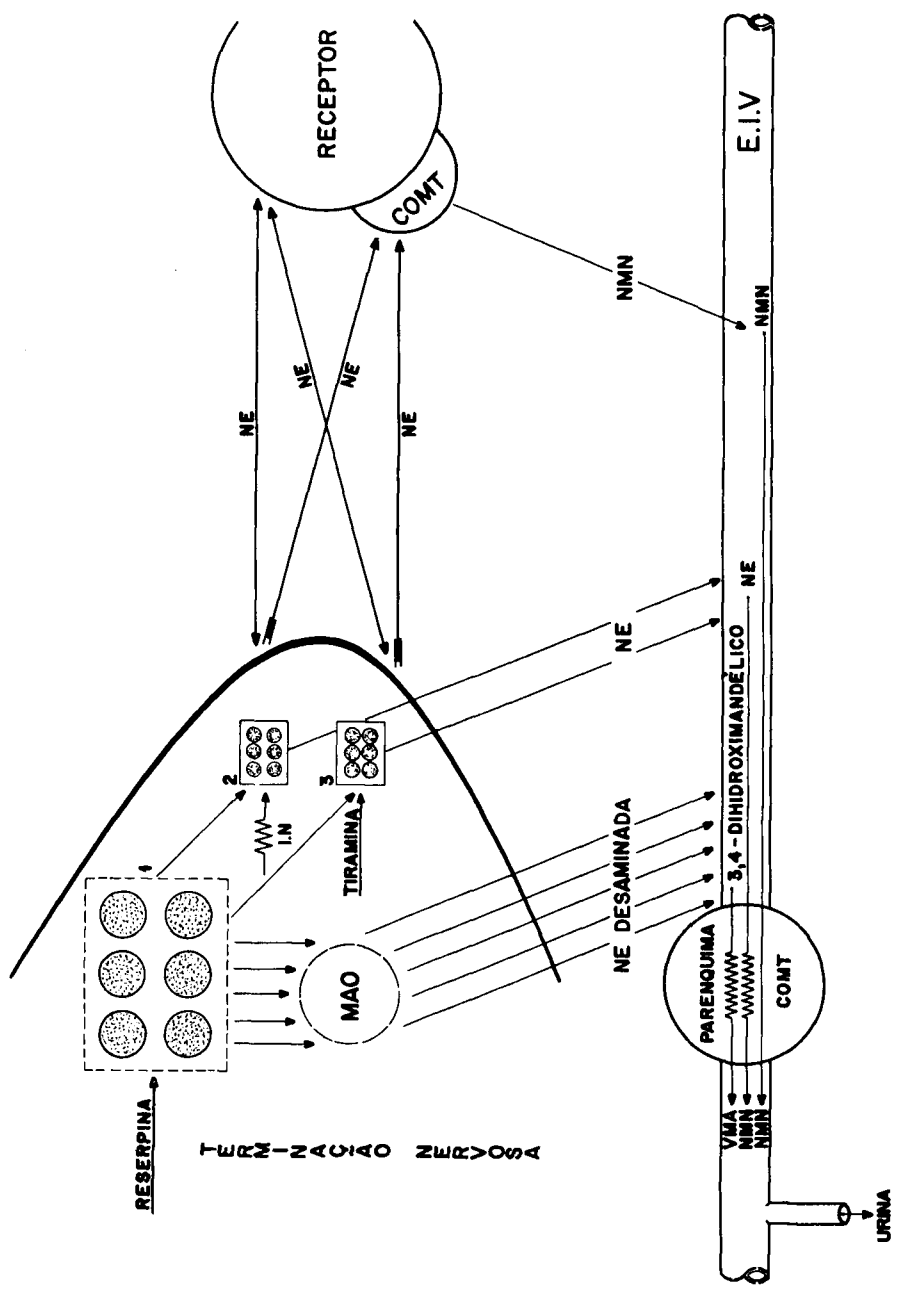


Figura 2 - Representação esquemática dos compartimentos de NE e seu ciclo metabólico.

A reserpina, os impulsos nervosos (I.N) e a tiramina atuam respectivamente sobre os compartimentos 1-2-3. MAO - monoamino-oxidase; COMT - catecol-O-metil transferase; VMA - ácido vanil-mandélico; NMN - normetanefrina; MN - metanefrina; NE - norepinefrina; E.I.V. - espaço intravascular. Mod. de Kopin, J.D. Pharm. Rev., 16: 179 (1964).

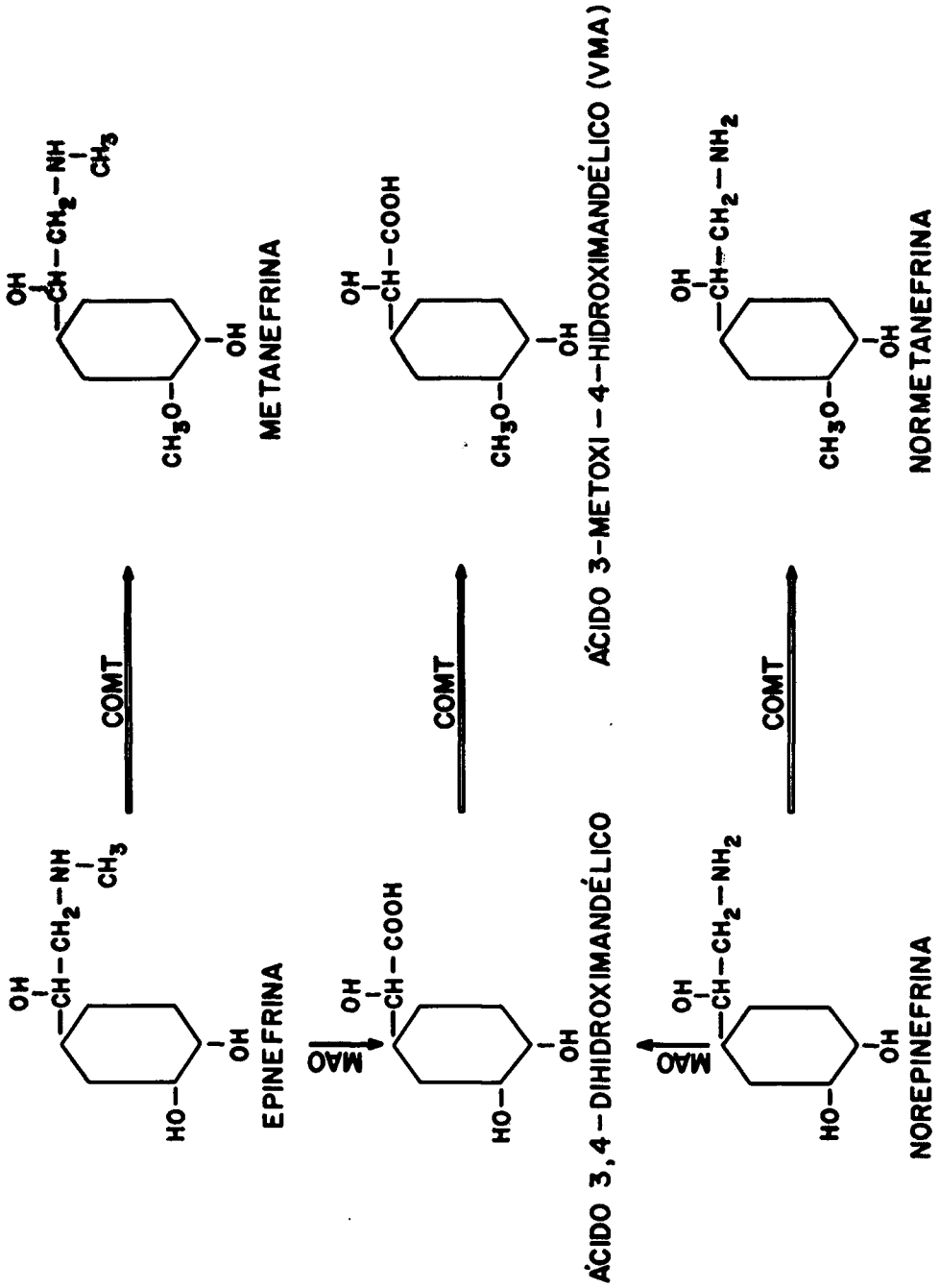


Figura 3 - Principais vias de metabolização das catecolaminas

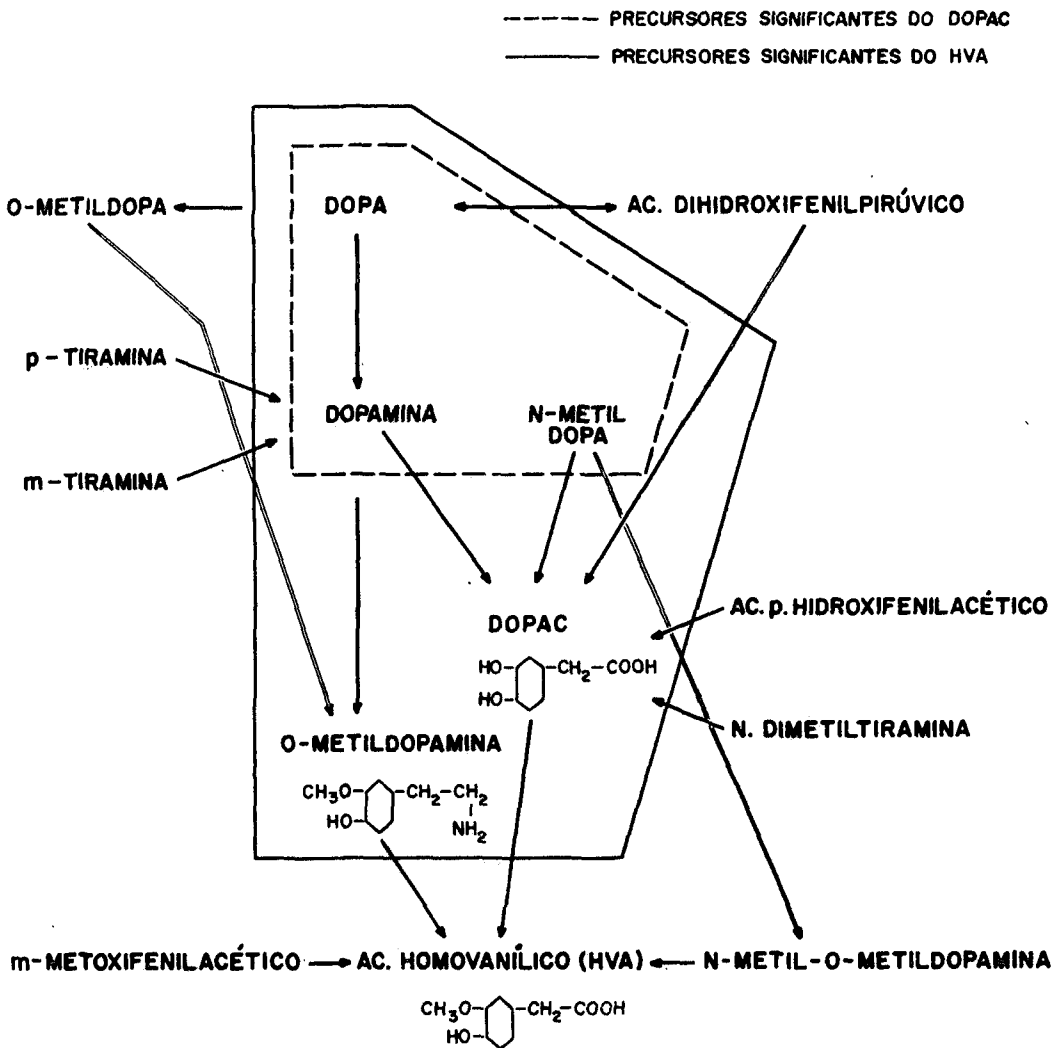


Figura 4 - Possíveis vias na formação do ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (ácido homovanílico, HVA) e do ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC, ácido dopacético).

Modificado de Wiseman - Distler, M.H., Sourkes, T.L. and Carabin, S.: Precursors of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxy-3-methoxy phenylacetic acid in rat. *Clin.chim.Acta*, 12: 335, 1965.

Dois são os tipos principais de análise bioquímica que vêm sendo aplicados na dosagem do VMA na urina: os métodos que utilizam a separação física dos diversos componentes fenólicos urinários e aqueles que, transformando a molécula do VMA em outro composto, utilizam reações específicas para a mensuração.

Estes processamentos não são exclusivos, existindo métodos em que concomitantemente se pode encontrar a separação física do VMA associada a sua transformação molecular.

Entre os métodos baseados na modificação da molécula encontra-se o de Sandler e Ruthven⁷⁸, no qual uma oxidação é realizada em autoclave na presença de catalizador, após o que a vanilina formada a partir do VMA é colocada na presença de indol e ácido fosfórico, produzindo-se assim um complexo corado.

A oxidação do VMA pode ser realizada na presença de periodato, com leitura espectrofotométrica ultra violeta como no método de Pisano²⁴ ou, alternativamente, como utilizam Sunderman e col.⁹⁸ com o ferrocianeto de potássio, fazendo-se colorimetria com uma modificação do método de Sandler e Ruthven⁷⁸.

Nos métodos que utilizam a separação física as técnicas utilizadas são: a cromatografia bidimensional em papel, a cromatografia em camada delgada^{83, 84}, a cromatografia em fase gasosa⁴⁰ e a eletroforese em baixa ou alta voltagem.

A simplicidade das técnicas cromatográficas fazem com que elas sejam largamente utilizadas.

A existência de muitos grupos fenólicos, não relacionados ao metabolismo das CA, na urina de indivíduos normais, faz que seja necessária a extração preliminar destes compostos com ace

tato de etila em pH básico, embora muitos autores omitam esta fase da metodologia.

Na maioria das técnicas de cromatografia bidimensional os sistemas de solventes utilizados são os do isopropanol-amônia-água (20:1:2) e os do benzeno-ácido-propiónico-água (2:2:1), originalmente descrito por Armstrong³. Nestes métodos de separação física, executando-se o de cromatografia em fase gasosa, a colorimetria é realizada pela reação do VMA com p-nitroanilina diazotada e a leitura feita em densitometria quando houver boa separação dos compostos fenólicos. Em caso contrário o cálculo é semi-quantitativo, feito por comparação visual com padrões que se desenvolvem paralelamente às amostras analisadas.

Em 1964, Nicolau e Col.^{67,68}, apresentaram um método de separação do VMA por processo de cromatografia monodimensional em sistema n-butanol-ácido acético-água. Concomitantemente, Gbdicke e Col.⁴¹, descreveram a boa e específica separação do VMA em fase butanólica do sistema n-butanol-acetato de n-butila-ácido acético a 10% (2:8:10). Estes últimos autores, contudo, não apresentaram dados de padronização metodológica nem de aplicação clínica do método, mas puseram em evidência a sua especificidade, utilizando diversos sistemas cromatográficos.

Apresentamos pormenorizadamente neste capítulo a padronização do nosso método no estudo de controles normais, de portadores de DHAe e nos indivíduos com tumores do tecido cromafínico.

Material

- 1 - Hidróxido de Sódio - N
- 2 - Ácido Clorídrico - 2N
- 3 - Acetato de Etila
- 4 - Cloreto de Sódio
- 5 - Ácido Clorídrico - 0, 1N, saturado com cloreto de sódio.

- 6 - Metanol
- 7 - n-Butanol
- 8 - Ácido Acético
- 9 - p-Nitroanilina: 500 mg são dissolvidos em 10 ml de ácido clorídrico fumegante e o volume completado a 500 ml com água bidistilada.

- 10 - Nitrito de Sódio - 0,2%
- 11 - Carbonato de Potássio a 10%
- 12 - p-Nitroanilina Diazotada: misturar 10 ml de nitrito de sódio a 0,2% com 10 ml de p-nitroanilina. Juntar lentamente 20 ml de carbonato de potássio a 10%.
Usar até 2 minutos após o preparo.

- 13 - Padrão de VMA: Dissolver 1 mg de padrão de VMA* em 10 ml de água bidistilada levada previamente a pH 2 com ácido clorídrico.

Todos os reativos devem ser produtos analíticos.

Os solventes devem ser suficientemente puros para utilização em cromatografia.

Método

Os indivíduos submetidos aos estudos abstiveram-se da ingestão de alimentos sabidamente ricos em compostos fenólicos, tais como: café, chá, chocolate, vanilina, verduras e frutas e de

* DL-3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid; M.A.
Mann Research Laboratories, Inc. New York 6, N.Y.

qualquer medicamento por um período de 72 horas.

No Hospital das Clínicas organizamos uma dieta padrão que convencionamos chamar de "hipofenólica" que consistia no seguinte:

Desjejum: pão, manteiga e ovo.

Merenda: leite integral e açúcar.

Almôço e jantar: arroz, carne e ovo.

A urina do período de 24 horas foi colhida em frasco escuro mantido sobre gelo ou em geladeira. A preservação de uma amostra foi feita a pH 2, utilizando-se para este fim ácido clorídrico.

As análises foram realizadas em laboratório isento de vapores de substâncias que contivessem grupos fenólicos os quais obviamente reagiriam com a p-nitroanilina diazotada.

A quantidade de urina tomada para a análise variou com a diurese. Para cada litro de diurese tomaram-se 2 ml de urina, transferindo-se para um tubo de tampa esmerilhada de 15 ml de capacidade.

a) - Extração

Completoou-se o volume até 4 ml com água destilada e ajustou-se o pH a 8 com Na OH $1N^{62}$. Colocou-se 4 ml de acetato de etila, agitou-se por 30 segundos, centrifugou-se rapidamente, para melhor separar as fases, desprezando-se o solvente orgânico no qual estariam as substâncias fenólicas, não ácidas, eventualmente presentes. Ajustou-se o pH da urina a 2 com ácido-clorídrico 2N, saturou-se com NaCl e extraiu-se com 4,2,2 ml de acetato de etila. Tomaram-se os extratos em conjunto os quais foram evaporados à temperatura abaixo de 45° C, após terem sido purificados com 2 ml de HCl 0,1N saturado com NaCl.

b) - Cromatografia

O resíduo foi dissolvido em 0,3 ml de metanol mantido a baixa temperatura (cêrca de 4^o C) e 0,1 ml foi aplicado em duplicata em papel Whatman nº 1 e desenvolvido paralelamente a padrões de 2,3 e 4 µg de VMA. Usou-se a tēcnica de cromatografia ascendente em sistema n-butanol-ácido acético-água (40:10:50).

Após 18 horas de desenvolvimento deixou-se secar o cromatograma à temperatura ambiente e corou-se com p-nitroanilina diazotada. Uma hora depois as manchas correspondentes ao VMA foram lidas em densitômetro. As áreas correspondentes aos padrões e desconhecidos foram comparadas e os valôres corrigidos para as diureses respectivas.

Várias amostras podem ser desenvolvidas ao mesmo tempo em papel disposto sob a forma cilíndrica na cuba cromatográfica.

Resultados

a) - Especificidade

A região cromatográfica possuindo o mesmo R_f de VMA padrão, desenvolvido paralelamente, mostrou ser constituída de um único composto quando desenvolvida em dois outros sistemas cromatográficos originariamente descrito por Armstrong e col.³, isto é, álcool isopropílico-amônia-água (8:0,2:1,8) e benzeno-ácido propiônico-água (100:70:5).

b) - Recuperação

A prova de recuperação realizada em 8 amostras de urina, adicionando-se 2,5 e 10 µg de VMA padrão, mostrou que o método recupera em média 86% do composto adicionado. Testou-se a recuperação¹³ através da construção de um gráfico cartesiano figurando no eixo das abscissas valôres urinários conhecidos aos quais foram adicionadas quantidades variáveis de padrão e no das ordenadas os valôres recuperados. Como houve compatibilidade, calculou-se a equação de regressão e verificou-se se o coeficiente diferia ou não da unidade (Figura 5).

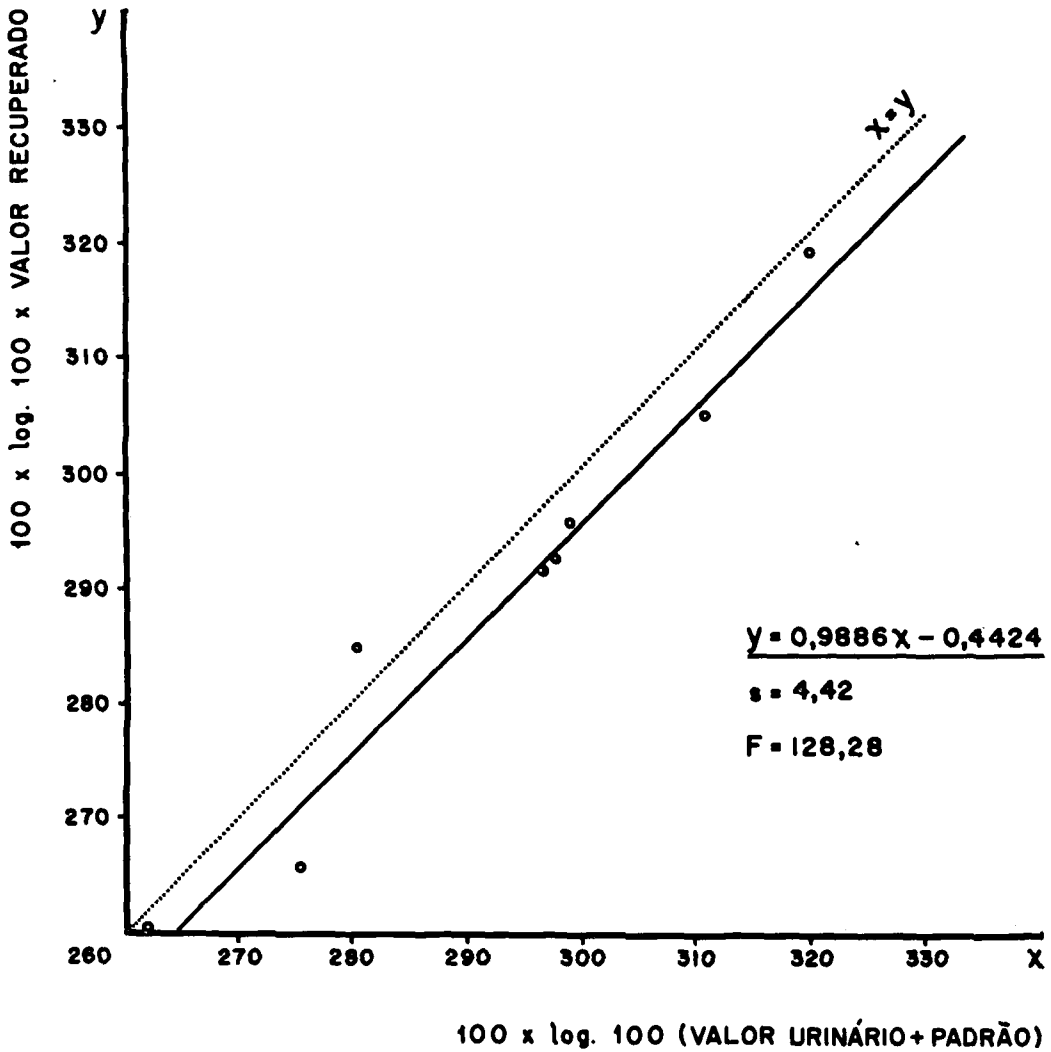


Figura 5 - Representação gráfica do estudo da prova de recuperação

Em x colocaram-se os valores esperados correspondentes à soma de padrão mais valores urinários conhecidos.

Em y foram lançados os valores obtidos.

Para facilidade de construção gráfica utilizou-se 100 x log. 100 x VMA

A análise estatística mostrou ser altamente significativa a relação entre os dois valores; o colocado e o recuperado.

c) - Reprodutibilidade

Foram realizadas 30 dosagens em amostras de uma mesma urina em dias consecutivos. A urina foi mantida a pH 2 em refrigerador. A precisão foi verificada através de cálculo do coeficiente de variabilidade. Verificou-se que este foi de $\pm 5,9\%$.

Os dados relativos aos valores obtidos e o tratamento estatístico estão resumidos na tabela 1.

Discussão

Em alguns métodos eletroforéticos e cromatográficos a urina é colocada diretamente no papel sem utilizar a extração com acetato de etila. Gbdicke e col.⁴¹ que descreveram um método semelhante ao nosso, não se utilizam dos processos extrativos, no que são criticados^{74,85} por Sandler e Ruthven⁷⁹ que admitem esta atitude quando da avaliação do VMA em líquidos que tenham poucos compostos interferentes como no caso do líquido.

Na metodização em pauta, a purificação da urina e dos extratos são fatores que contribuem para a boa separação do VMA.

A introdução de uma técnica de cromatografia monodimensional oferece vantagens sobre a bidimensional em economia de material, tempo e trabalho.

O sistema de solvente sob a forma ácida evita a destruição do VMA o que não acontece nos sistemas básicos comumente utilizados. Alimentos e drogas podem interferir na metodologia. Assim, a aspirina (excretada como ácido salicílico), o chá, o café (portador de ácido caféico excretados provavelmente como vanilina) a vanilina, as sulfas, a penicilina, a banana^{86,103} e as frutas cítricas⁹² não devem ser ingeridas antes da colheita do material para a análise. Estas interferências não se limitam às análises cro-

TABELA 1

**Reprodutibilidade. Dados relativos a 30 replicatas
de uma mesma urina feitas em dias diferentes**

DOSAGEM	RESULTADO em $\mu\text{g/ml}$
1	1,90
2	2,00
3	1,76
4	1,94
5	2,05
6	2,08
7	1,80
8	2,10
9	1,99
10	1,78
11	1,80
12	1,86
13	1,86
14	1,90
15	2,10

DOSAGEM	RESULTADO em $\mu\text{g/ml}$
16	1,70
17	1,96
18	1,90
19	1,90
20	2,00
21	2,08
22	1,80
23	1,90
24	1,85
25	1,86
26	1,80
27	1,75
28	2,01
29	2,02
30	1,93

MÉDIA	1,91 $\mu\text{g/ml}$
DESVIO PADRÃO (σ)	0,1128
ERRO PADRÃO ($\frac{\sigma}{\bar{x}}$)	0,0206
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	+ - 5,9 %

matográficas, mas se estendem às separações eletroforéticas, particularmente àquelas que utilizam tampões básicos. A boa separação eletroforética somente é conseguida em tampões de pH ácido⁷⁹; o tempo de migração é porém longo, mesmo que se utilizem aparelhos

de alta voltagem⁷³.

Os métodos discriminativos^{36, 37, 39, 62}, pretensamente rápidos, descritos por diversos autores, não resistem à análise crítica por não serem específicos e particularmente muito sensíveis à interferência de drogas e de alimentações ricas em grupos fenólicos⁷⁹.

Os métodos baseados na formação de vanilina a partir do VMA, considerados específicos, têm sido criticados em vista da comprovação de que outros ácidos aromáticos presentes na urina podem produzir aquele derivado.

O método por nós proposto apresenta uma recuperação, reprodutibilidade e especificidade suficientemente boas para que logicamente o aplicássemos na rotina clínica e na pesquisa.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DOS VALÔRES DE EXCREÇÃO URINÁRIA DE VMA EM INDIVÍDUOS
NORMAIS E EM PORTADORES DE DOENÇA HIPERTENSIVA ARTERIAL ESSENCIAL.

ESTUDO COMPARATIVO COM NÍVEIS OBTIDOS EM PACIENTES COM
NEOPLASIAS DO TECIDO CROMAFÍNICO.

O estudo da excreção urinária de VMA em indivíduos normais e em portadores de DHAE foi realizado em duas etapas. Uma de que trata êste capítulo e em que estudamos a excreção de 24 horas dos dois grupos, mantidos intactos quanto à administração de drogas, e outra de que se ocupa o capítulo seguinte em que os indivíduos são submetidos a uma prova de hipoglicemia provocada pela administração de insulina.

A fim de permitir uma análise comparativa, colocamos os valores obtidos em 11 casos de pacientes comprovadamente possuidores de neoplasias do tecido cromafínico.

Material

Foram estudados 19 indivíduos adultos de ambos os sexos, sem distinção de cor, considerados normais pelos parâmetros clínicos, para serem comparados a outro grupo de pacientes em que houvesse na anamnese comemorativos de DHAE. Na seleção dêste segundo grupo servimo-nos do critério clínico e laboratorial e em nenhum dêles foram encontrados estigmas de síndrome de Cushing, doença renal crônica, feocromocitoma, hiperaldosteronismo primário ou coarctação da aorta.

Dos 11 pacientes com tumores do tecido cromafínico 7 eram portadores de feocromocitoma, 3 de neuroblastoma e 1 de ganglioneuroblastoma. Os dados referentes a êstes pacientes encontram-se nas tabelas 3 e 4.

Tôdas as dosagens foram realizadas em duplicata.

Resultados

Os valores obtidos para os dois grupos estão representados na tabela 2. A análise estatística¹³ dos resultados mostrou para o grupo normal uma média de 3,56 mg de excreção urinária de VMA com um desvio padrão de \pm 1,55 mg e um erro padrão de 0,35 mg.

O grupo de DHAE apresentou uma média de 3,66 mg com um desvio e um erro padrão de \pm 1,34 mg e 0,31 mg, respectivamente. A distribuição dos valores mostrou-se ser normal quando se tomam os logaritmos respectivos. Pela análise de variância simples verificou-se que os dois grupos não diferiam significativamente.

Nos indivíduos portadores de feocromocitoma verificou-se que todos eram de cor branca, suas idades variaram de 27 a 48 anos com uma média de 40,5 anos \pm 7,17, quatro eram do sexo feminino. Dentre os sete, dois apresentaram pressões arteriais estáveis em níveis altos. As alterações do metabolismo de hidratos de carbono foram verificadas em seis, quer pela glicemia de jejum ou através de curvas glicêmicas. Em um deles (AAR) esta dosagem não foi realizada. O retroperitônio evidenciou a presença do tumor pré-operatõriamente em 6 pacientes.

No paciente C.P.L. a evidência radiográfica do tumor só pôde ser conseguida pela aortografia.

Em 5 casos a patologia estava instalada na supra-renal D e apenas em 2 na esquerda. Dois pacientes apresentaram sinais de malignidade.

A média de VMA urinário foi de 28,56, variando de 12,1 a 50 mg nas 24 horas.

Os dados relativos aos neuroblastomas e ganglioneuromas encontram-se na tabela 4. O número pequeno de casos não permitiu análise estatística.

TABELA 2

Valores da excreção diária de VMA em indivíduos normais e em portadores de doença hipertensiva arterial essencial (DHAE).

N O R M A I S	
Nº	V M A mg/24 h
1	7,3
2	2,1
3	2,5
4	6,2
5	1,9
6	3,7
7	3,8
8	3,2
9	2,2
10	2,6
11	2,4
12	6,0
13	4,3
14	3,4
15	5,1
16	3,4
17	2,1
18	2,6
19	2,8
M	3,56
s	1,55
e	0,35

D H A E	
Nº	V M A mg/24 h
1	4,1
2	5,2
3	6,3
4	3,8
5	3,6
6	4,0
7	4,4
8	3,8
9	6,7
10	2,6
11	3,0
12	1,3
13	3,2
14	2,2
15	2,6
16	3,5
17	2,3
18	3,4
19	3,7
M	3,66
s	1,34
e	0,31

FEOCROMOCITOMA

PACIENTE	IDADE anos	COR	SEXO	P.A.* mm de Hg TIPO	PULSO	GLICEMIA mg/100ml	GLICOSURIA g/24 h	PROVAS			RX	ACHADO CIRÚRGICO	ANATOMO PATOLÓGICO	V M A mg/24 h
								GÉLO	FENTO- LAMINA	HISTÁ MINA				
A M P	46	B	F	180/100 Instável	100	194	-	-	+	+	+	Feocromocitoma	34,0	
M R P	27	B	F	190/130 Estável	108	152	15			+	+	Feocromocitoma Maligno	15,0	
C S G	44	B	M	240/115 Instável	160	260	-	-	-	+	+	Feocromocitoma	20,6 25,7 46,5	
T A	43	B	M	180/110 Instável	128	242	18,1			+	+	Feocromocitoma	50,0	
M A B M	36	B	F	270/180 Instável	88	120 (GTT +)	-	-	-	+	+	Feocromocitoma Sinais de Malignidade	26,1	
A A R	40	B	M	280/180 Estável	120	?	-			+	+	Feocromocitoma	32,0	
G P L	48	B	F	220/110 Instável	96	172	-	-	+	-**	-**	Feocromocitoma	12 8,7 15,8 11,0	
MÉDIA	40,5 ⁺ 7,17												28,57	

RX - Retroperitoneo

* - Máxima pressão arterial observada

** - Aortografia revelou tumoração supra-renal D

*** - Média

TABELA 4

NEUROBLASTOMAS e GANGLIONEUROBLASTOMA

PACIENTE	IDADE anos	CÔR	SEXO	ACHADO CIRÚRGICO	ANÁTOMO PATOLÓGICO	VMA mg/24 h
M M D	2	B	F	Tumoração Supra-Renal Metástases Linfáticas	Neuroblastoma	125,0
A E F	5	B	M	Metástases Linfáticas Disseminadas	Neuroblastoma	29,4
T M M P	1	B	F	Metástases Linfáticas Disseminadas	Ganglioneuroblastoma	11,1
H O	8	B	M	Metástases Disseminadas	Neuroblastoma	8,5

Discussão

Seria de se esperar que se tentasse relacionar os níveis de excreção de CA e seus metabólitos com estados patológicos outros que não o feocromocitoma, em que a pressão arterial estivesse alterada.

Dêste ponto de vista uma das primeiras correlações sugeridas foi dada pelo trabalho de Luft e von Euler⁶⁰, no qual estes autores demonstraram uma menor excreção de NE em pacientes com hipotensão postural por bloqueio do sistema nervoso simpático.

Na DHAE vários autores têm estudado a excreção urinária de VMA. Os achados são, contudo, contraditórios. Os níveis altos encontrados por von Studinitz⁹³ contrastam com os dados de outros investigadores. Para Brunjes e Col.¹⁶ os valores urinários de VMA na DHAE são menores que nos indivíduos normais. A maioria dos trabalhos^{38,62,98,100}, entretanto, não relata diferenças significantes entre os dois grupos estudados.

Aos mesmos resultados chegaram Dotti e Col.²⁸ que verificaram diferenças de excreção urinária de VMA somente em indivíduos

do sexo masculino, portadores de moléstia cardíaca coronariana. Nestes o VMA era maior que no grupo de indivíduos normais e nos portadores de DHAE de ambos os sexos.

Nos resultados por nós apresentados verifica-se que não houve diferenças entre os dois grupos. Estes dados não nos autorizam a concluir que o sistema nervoso simpático não tenha o seu papel na etiopatogenia da doença.

A excreção de CA ou seus metabólitos pode sofrer a influência de diversos fatores, fisiológicos e patológicos. Assim a cinética compartimental mostra que, após a sua liberação, uma grande parte das CA é captada pelas terminações nervosas. O bloqueio desta captação em condições patológicas ou pela administração de drogas poderia aumentar os níveis escrotórios de VMA, sem que isto representasse hiperatividade do sistema nervoso simpático. Em ratos, levados a estados hipertensivos pela administração de acetato de desoxicorticosterona e dieta rica em sal, Champlain e Colaboradores²⁰ demonstraram uma menor captação de epinefrina radioativa em diversos órgãos como baço, coração, intestinos, músculo esquelético e rim. Inversamente, uma maior secreção de CA, acompanhada por sua vez de maior estocagem ou reciclagem entre os vários compartimentos, poderia não alterar a excreção de VMA apesar de uma hiperatividade do sistema nervoso simpático.

Aos mesmos resultados finais já expostos poderiam nos levar as variações da atividade das enzimas catabolizantes COMT e MAO. Esta atividade enzimática foi, contudo, investigada⁸⁹ nos casos de DHAE sem que se pudesse evidenciar sua diminuição, o que poderia explicar uma maior exposição do organismo às formas ativas das aminas simpáticas.

Deve-se levar, também, em consideração as possíveis alterações de depuração renal, quando se tem conhecimento que frequentemente nos casos de DHAE se encontram alterações naquele órgão, ainda que Von Studinitz⁹³ não tenha achado diferenças de ex-

creção de VMA nos casos de insuficiência renal.

Na suposição de que todos êstes mecanismos de interferência aqui aventados não influenciassem os níveis de CA e seus metabólitos excretados, e que os nossos dados de excreção urinária fôsem representação fiel da secreção simpática, restaria ainda a hipótese de uma maior sensibilidade dos hipertensos à ação das aminas pressoras, como sugerem os trabalhos de Doyle e Fraser²⁹.

Todos os casos de feocromocitomas comprovados apresentaram VMA acima dos valores dos indivíduos normais e portadores de DHAE. Verifica-se pela Tabela 3 que, considerados isoladamente, todo e qualquer valor de VMA em feocromocitoma se situou, pelo menos, três desvios-padrões acima da média obtida nos indivíduos normais.

Têm sido referido na literatura valores falsamente positivos e negativos de VMA. Shepo e Col.⁸⁷, em estudo de 189 casos de indivíduos não portadores de feocromocitoma, encontraram 2 com valores falsos positivos pela dosagem do VMA, 20 falsos positivos pela dosagem da MN e 40 falsos positivos pela de CA. Os pacientes que possuíam aumento concomitante de CA e MN tinham recebido E ou um inibidor de MAO que reduz a formação do VMA, com aumento concomitante da amina pressora intacta e de seu produto metilado.

No mesmo trabalho os autores encontraram 6 falsos negativos em 28 casos de feocromocitoma pela dosagem de VMA e apenas 1 caso em 14 pela dosagem de MN.

Segundo Crout e Col.²⁵ em 90% ou mais dos casos o diagnóstico pôde ser claramente estabelecido com uma única determinação na urina da NE + E ou da MN + MN ou do VMA.

As quantidades dos metabólitos, encontrados nas urinas nos casos de feocromocitoma, variam de acôrdo com o grau de metabolização que apresenta o próprio tumor. Assim, os tumores menores tendem a secretar menor quantidade de VMA em relação à secreção de NE + E, ao passo que os tumores maiores apresentam uma secreção mais

elevada de VMA. Nestes últimos a NE + E seriam metabolizadas em grande parte na massa tumoral²⁶.

Os tumores funcionantes da linha neural simpática que possuem células aparentadas aos feocromócitos, foram considerados, por muito tempo, não secretantes.

Mason e Col.⁶⁴ descreveram, em 1957, o primeiro caso de neuroblastoma no qual encontraram quantidades aumentadas de aminas pressoras. Desde então, muitos casos têm sido relatados e os neuroblastomas e ganglioneuromas passaram a ser classificados como tumores funcionantes neurais.

Além do VMA aumentado na urina pode-se encontrar nestes casos diversos outros metabólitos provenientes da dopamina⁴⁴, principalmente o ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (HVA) (Figura 4). Estes últimos compostos raramente têm sido encontrados aumentados no feocromocitoma e êsse achado, quando presente, tem sido relacionado à malignidade do tumor⁷⁵.

Em um grupo de 25 pacientes com neuroblastoma, Von Studnitz⁹⁶ encontrou 17 com níveis urinários aumentados de HVA ao passo que o VMA estava alterado em 24 dos indivíduos.

Outras substâncias podem estar incrementadas na urina nos casos de neuroblastomas e ganglioneuroblastomas⁹⁴, tais como a própria DOPA, a 3-metoxi-4-hidroxifenilalanina⁹⁵, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético⁹⁴, o 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, o ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzóico e a N-metilmetanefrina.

É de se concluir que a dosagem do VMA se constitui num excelente método auxiliar para o diagnóstico dos tumores funcionantes do tecido cromafínico. O fato de não terem sido encontrados resultados falsos positivos com o nosso método não nos autoriza a considerá-lo melhor que outros, visto que o número de casos não é suficiente para permitir tal conclusão.

Em raros casos, no decorrer das inúmeras dosagens que

realizamos nos últimos 4 anos, encontramos valôres limítrofes. A repetição dêstes exames, submetendo o paciente a melhores condições de preparo, revelava uma normalidade dos níveis excretórios de VMA. Em nenhum dêstes pacientes, em seguimento nos diversos ambulatórios da 1a. Clínica Médica, foi evidenciada patologia do tecido cromafínico, até o momento.

ESTUDO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE VMA EM INDIVÍDUOS NORMAIS E EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA HIPERTENSIVA ARTERIAL ESSENCIAL, SUBMETIDOS A UM ESTÍMULO HIPOGLICEMIANTE.

O aumento da secreção de aminas simpáticas que ocorre em resposta a uma hipoglicemia, foi pôsto em evidência concomitantemente por Cannon e Col.¹⁸ e Houssay e Col.⁵¹.

Em cães, induzidos à hipoglicemia, Satake⁸⁰ encontrou aumento destas substâncias no sangue coletado diretamente da veia supra-renal, enquanto Holzbauer e Vogt⁵⁰, utilizando as mesmas pre-parações, punham em evidência o incremento plasmático da E.

Com a demonstração da presença da NE na medular da supra-renal por Holtz e Col.⁴⁸ e no sangue da veia supra-renal por Bulbring e Col.¹⁷, experiências foram realizadas em gatos em hipoglicemia, tendentes a demonstrar o incremento desta amina simpática. Ficou evidenciado que o aumento da NE era de pequena magnitude ao passo que a E era responsável pela maior parte da secreção glandular³¹.

Trabalhos posteriores de Golfien e Col.⁴², utilizando-se de técnicas fluorimétricas para CA totais E e NE, vieram confirmar êstes achados. A secreção que se segue à hipoglicemia é rápida e acentuada e os níveis secretórios retornam à normalidade com a administração de glicose.

O incremento de NE ocorre, mais tardiamente, cêrca de 2 1/2 a 4 horas após a insulina.

Nós nos propusemos a estudar a reatividade do sistema nervoso simpático através da excreção urinária do VMA em indivíduos normais e hipertensos, submetidos a uma hipoglicemia provocada pela insulina.

Material e Métodos

a) - Indivíduos normais

Selecionamos 8 indivíduos (Tabela 5) clinicamente normais, do ambulatório de Moléstias da Nutrição e Dietética da la. Clínica Médica do Hospital das Clínicas. Os indivíduos eram do sexo feminino, sendo 7 de cor branca e 1 de cor preta.

Afastaram-se diabetes mellitus em todos os casos estudados. O paciente DBS, que apresenta glicemia de jejum discrepante do grupo, foi considerado normal pela prova de tolerância à glicose.

b) - Pacientes portadores de DHAE

Foram escolhidos 8 pacientes (Tabela 6) em bom estado geral e com níveis de hipertensão arterial essencial moderada. Foi afastado comprometimento renal clínico ou laboratorial. Não havia história de diabetes mellitus e suas curvas glicêmicas foram normais. Todos eram de cor branca e do sexo feminino.

Em todos os indivíduos foi realizada uma prova de tolerância à insulina. Concomitantemente foram colhidas urinas antes e após a administração do hipoglicemiante para determinação do VMA.

Os indivíduos encontravam-se em jejum; pelo menos há uma semana não recebiam medicações, e tinham sido submetidos a dieta "hipofenólica" durante 72 horas.

A prova foi realizada da seguinte maneira:

Tendo o indivíduo esvaziado a bexiga, recebeu por via oral 500 ml de água, a fim de forçar uma diurese aquosa. Permanecia em repouso, e após 45 minutos recolhia-se a urina deste período para a análise dos valores basais de VMA.

Colhia-se sangue para glicemia de jejum e adminis

Indivíduos normais. Identificação e dados relativos a glicemias, reações hipoglicêmicas e VMA basais e durante a hipoglicemia.

INICIAIS	IDADE anos	PESO Kg	CÓR	PRESSÃO ARTERIAL mm Hg.	GLICEMIAS mg/100: MIN. APÓS INSULINA				REAÇÃO HIPOGLICÊMICA	V M A ANTES µg/mg	V M A APÓS µg/mg
					0	15	30	45			
A V P	32	68	B	120/70	75	26	26	32	++	1,1	0,9
E A	32	72	P	100/70	80	28	36	46	-	3,2	3,8
M B G	18	52	B	110/75	73	24	28	49	++	1,8	1,4
M C F	33	54	B	130/75	81	34	44	67	++	2,6	3,4
G B	24	50	B	120/80	75	49	33	44	+	1,2	1,0
A F	30	52	B	120/90	98	33	35	46	+++	3,6	4,5
O S B	36	65	B	110/70	82	19	22	33	++	4,0	5,2
D B S	53	55	B	140/90	118	76	56	41	+	4,4	7,5
MÉDIA	32,3	59,5			85,2	36,1	35	44,7		2,73	3,46
QUEIDA ABSOLUTA mg/100 ml						49,1	50,2	40,5			
QUEIDA						57,2	58,9	47,5			

TABELA 6

Indivíduos portadores de DM2. Identificação e dados relativos a Glicemias,

reações hipoglicêmicas e VMA basais e durante a hipoglicemia.

INICIAIS	IDADE anos	PESO kg	COR	PRESSÃO ARTERIAL mm Hg	GLICEMIAS mg/100: MIN. APÓS INSULINA				REAÇÃO HIPOGLICÊMICA	V M A ANTES g/mg	V M A APÓS g/mg
					0	15	30	45			
C S	60	76	B	170/75	99	66	39	49	+++	1,9	8,4
S M	35	83	B	190/100	95	60	67	66	+++	4,4	4,5
M J M	31	63	B	150/80	101	76	60	86	+	1,2	2,9
Z C	28	47	B	170/100	83	45	28	41	++	3,4	6,3
A F	30	83	B	160/90	96	47	63	55	+	1,2	2,2
L M	22	41	B	170/100	81	39	24	39	++	3,9	6,1
I A S	63	73	B	150/100	90	37	34	36	++	3,9	8,4
E V L	49	74	B	170/100	107	77	42	75	+++	0,9	2,7
MÉDIA	39,7	67,5			94	55,9	44,6	55,9		2,6	5,19
QUEDA ABSOLUTA mg/100 ml						38,1	49,6	38,1			
QUEDA %						40,5	52,8	40,5			

trava-se endoflêbicamente insulina isenta de glucagon* numa dosagem de 0,1 unidades por quilograma de pêsô real. Amostras de sangue de 15, 30 e 45 minutos eram retiradas para análises das glicemias respectivas.

Contrôles da pulsação, pressão arterial, sinais e sintomas de hipoglicemia eram realizados constantemente. Findo este nôvo período de 45 minutos, nova micção era efetuada e a urina, recolhida para análise de VMA excretado.

Os valôres de VMA foram expressos em microgramas (μg) de VMA por miligramas (mg) de creatinina urinária¹⁰⁹.

A creatinina foi dosada pelo método de Peters⁷¹ e as glicemias, pelo método de Somogyi-Nelson⁶⁶.

Tratamento estatístico: utilizou-se para a análise comparativa das glicemias e dos valôres de VMA os testes de Student¹³ para n-2 graus de liberdade.

Resultados

Os resultados estão sumariados nas tabelas 5 e 6 e nas figuras 6 e 7.

Em nenhum dos pacientes foi necessária a interrupção da prova. As reações hipoglicêmicas, quando presentes, foram classificadas empiricamente em uma, duas e três cruces.

Classificaram-se, no grupo rotulado com uma cruz, aqueles indivíduos que apenas apresentaram ligeira cefaléia e sensação de fome, sem sinais objetivos. Em duas e três cruces colocaram-se aqueles pacientes que apresentaram sinais objetivos como sudorese e taquisfigmia. Optamos entre duas e três cruces conforme a intensidade dos sinais.

Como se pode notar pelas tabelas, os grupos se compor

*Iletin. (Laboratory Eli Lilly do Brasil)

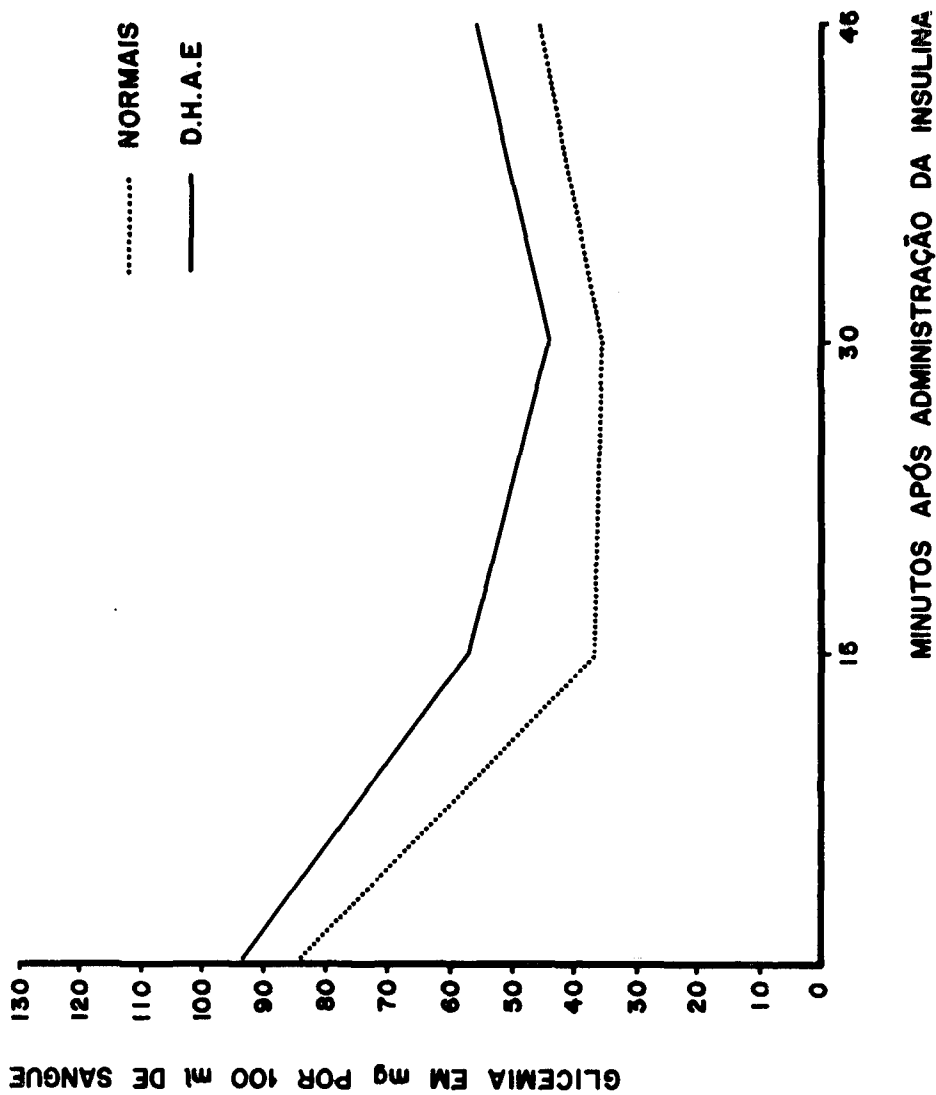


Figura 6 - Curvas traçadas tomando-se as médias dos valores das glicemias dos indivíduos normais e portadores de DHAE sob a ação da insulina.

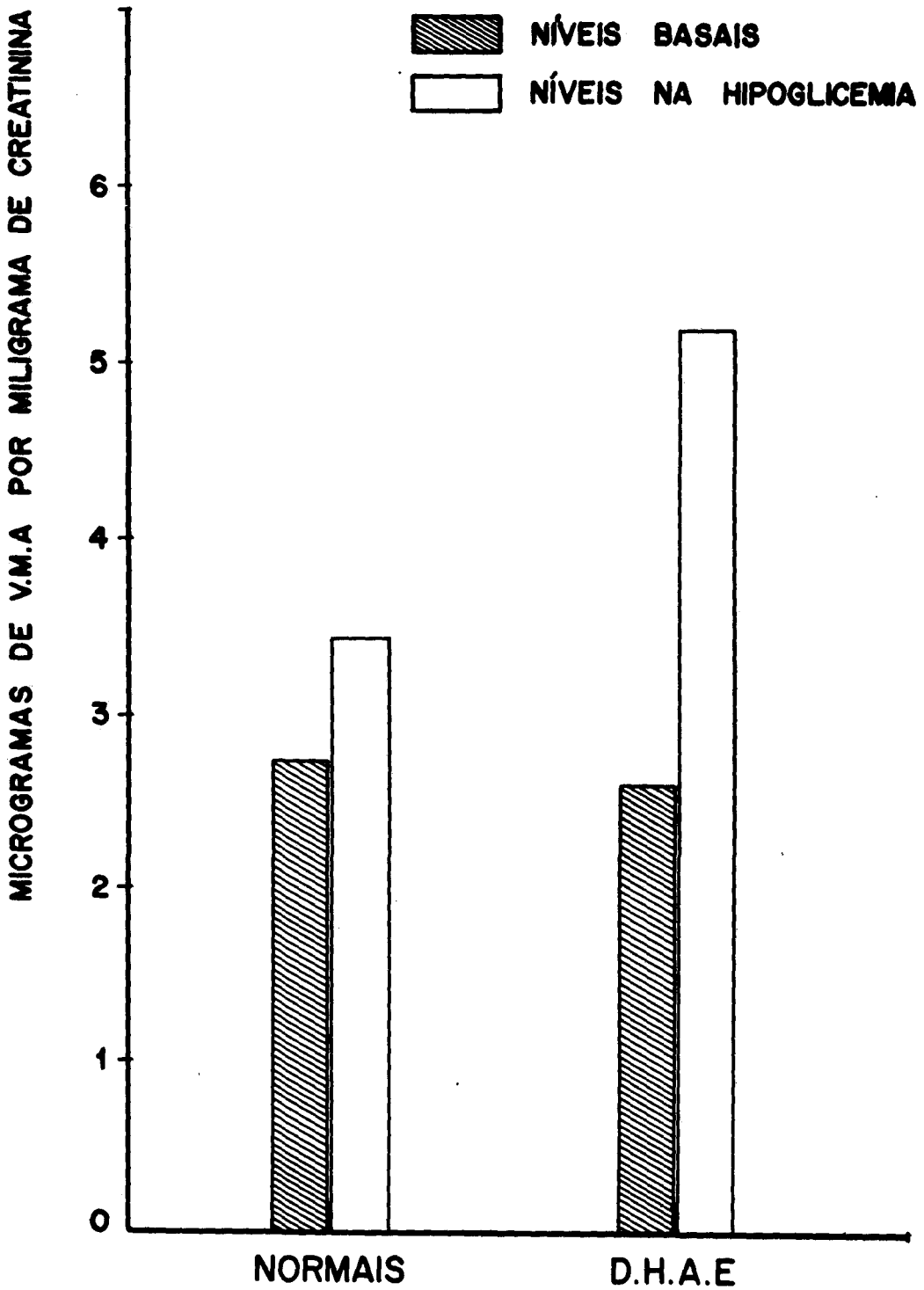


Figura 7 - Comparação das médias dos valores basais de VMA urinário com os de hipoglicemia em indivíduos normais e em portadores de DHAE.

taram de maneira a não nos permitir verificar nenhuma diferença clínica quanto às reações hipoglicêmicas. Nenhum dos indivíduos apresentou variação de pressão durante a prova.

O grupo de indivíduos normais apresentou uma média de excreção basal de VMA de $2,73 \pm 1,27$ $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{creat}$. tendo havido incremento para $3,46 \pm 2,31$ $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{creat}$. Nota-se que em 5 deles os níveis de VMA aumentaram enquanto em 3 outros houve ligeira queda. O incremento deste grupo, contudo, não se revelou significativo quando submetido à análise estatística.

Quanto aos indivíduos com DHAE nota-se que todos eles elevaram os níveis urinários de VMA quando submetidos à prova. A média dos valores basais que era de $2,6 \pm 1,44$ $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{creat}$ passou a $5,19 \pm 2,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}.\text{creat}$ (Figura 7).

A análise estatística mostra que os valores de VMA do grupo dos portadores de DHAE obtidos durante a hipoglicemia é significativamente maior do que os seus níveis basais ($p < 0,05$).

As médias das glicemias dos dois grupos, nos vários períodos, estão representadas na figura 6.

Verifica-se que nos indivíduos com DHAE as médias foram maiores tanto no jejum como aos 15, 30 e 45 minutos (Tabelas 5 e 6).

Estatisticamente, no entanto, só se consegue significância ($p < 0,02$) quando se comparam as glicemias de 15 minutos após a insulina. Neste tempo o grupo de indivíduos com DHAE apresenta glicemias maiores. Esta diferença continua significativa neste tempo ($p \leq 0,01$) quando se considera a queda absoluta da glicemia expressa em mg de glicose por 100 ml de sangue.

Quando se compara a queda máxima das glicemias de ambos os grupos, não se levando em conta o tempo decorrido, estas diferenças desaparecem do ponto de vista estatístico.

Discussão

Está demonstrado o incremento da secreção da medular da supra-renal em resposta a uma hipoglicemia e que, apesar de haver um aumento de NE, é a E que mais substancialmente participa dêste fenômeno.

Os nossos resultados, obtidos em indivíduos normais, mostraram que apesar de ter havido um incremento durante a prova, êste não foi estatisticamente significante, o que não aconteceu com os portadores de DHAE nos quais a significância do incremento foi verificada.

Vários mecanismos, mal conhecidos, poderiam ser responsáveis por esta excreção aumentada de VMA, sem que isto representasse, de fato, uma hipersecreção da medular da supra-renal. Êstes mecanismos já foram pormenorizadamente referidos no capítulo II. Entretanto, os trabalhos realizados com canulação de veia supra-renal^{17, 80} mostraram que há um aumento de aminas simpáticas durante a hipoglicemia, e será mais lógico que relacionemos os incrementos de VMA urinários à hipersecreção medular e não a mecanismos hipotéticos ou mal conhecidos.

A literatura é escassa em trabalhos que estudam o comportamento do sistema nervoso simpático em indivíduos com DHAE e qualquer discussão a respeito se, por um lado, adquire uma certa originalidade, por outro, encontra poucas referências por onde se pautar.

Quando se compararam os níveis mínimos atingidos pelas glicemias em resposta a administração da insulina, não se levando em consideração o tempo, notou-se que, apesar das médias glicêmicas serem maiores nos indivíduos com DHAE, as diferenças não foram significantes. Sob êste aspecto a resposta à insulina foi normal, tendo ocorrido entre 15 a 30 minutos. Não obstante a prova glicêmica tenha sido normal em ambos os grupos, existem razões que jus

tificam diferenciar o comportamento dessa prova nos grupos normal e hipertenso, desde que se admita como válido o fator "velocidade de queda da glicemia"; neste sentido pode-se postular uma queda glicêmica mais lenta na DHAE:

- a) - As glicemias de jejum não se mostraram diferentes estatisticamente em ambos os grupos e se tornaram significativamente diversas aos 15 minutos, tendo sido maior no grupo de indivíduos com DHAE.
- b) - Seis dos oito indivíduos do grupo DHAE apresentaram níveis glicêmicos mais elevados aos 15 minutos que aos 30.
- c) - Do grupo normal 5 indivíduos apresentaram glicemias menores, aos 15 minutos, e um apresentou-a igual à de 30 minutos.

Estes fatos nos levam a crer numa maior reatividade do sistema nervoso simpático nos portadores de DHAE quando submetidos a uma hipoglicemia.

Por outro lado, dados de literatura têm mostrado que , em animais, a infusão de E diminui a captação periférica de glicose. Assim Fritz e Col.³⁵ descreveram que a infusão de E inibe o desaparecimento da glicose em cães eviscerados e sujeitos à ação da insulina. Este efeito foi verificado tanto nos estados de hipo como de hiperglicemia. A administração simultânea da insulina era necessária para a verificação dos efeitos.

Waalas e Col.^{104,105}, trabalhando em meios de incubação, verificaram que o fenômeno se processava mesmo na ausência de insulina, sendo contudo, de menor magnitude.

Sutherland⁹⁹ sugere que a E atua induzindo a glicogenólise nos tecidos periféricos com subsequente aumento da glicose 6-fosfato, inibindo assim a ação da hexoquinase.

Por outro lado, é conhecida a ação da E sobre a glicose

genólise hepática. Sokal e Col.⁹² verificaram que o efeito sobre o glicogênio muscular se fazia sentir com doses muito menores de E daquelas necessárias para produzir a glicogenólise hepática. Mesmo quando a administração de E era feita por via intraperitoneal, o que leva a uma concentração hepática muito maior, o efeito observado era mais intenso na glicogenólise muscular.

Alguns trabalhos^{30,47,54,88} vêm mostrando alterações no metabolismo de hidratos de carbono em indivíduos com DHAE. Nos estudos populacionais realizados por Ostrander e Col.⁷⁰, a frequência de "hiperglicemias" na população hipertensa era significativamente maior que na população geral.

Embora nos estados hipoglicêmicos se possa postular uma ação da E, tal mecanismo seria difícil de se explicar nos indivíduos nos quais a alteração do metabolismo de hidratos de carbono foi verificada por curvas de tolerância à glicose. Contudo, Bolinger e Col.¹⁵ mostraram que indivíduos submetidos a provas de tolerância à glicose apresentavam, na fase de recuperação dos níveis glicêmicos basais, uma maior excreção de VMA coincidente com um incremento de ácidos graxos livres. Os dados sugerem que os indivíduos, nos quais a queda glicêmica era mais lenta, exibiam maiores incrementos de VMA, e estariam assim melhor protegidos de uma hipoglicemia.

Duas hipóteses têm sido levantadas para explicar a alta incidência de alteração de metabolismo de hidratos de carbono em pacientes com DHAE.: o criptohiperaldosteronismo primário²¹ e inibição da secreção insulínica pela E atuante sobre os receptores adrenérgicos pancreáticos^{13,72}.

Os nossos pacientes com DHAE não apresentaram níveis basais de VMA maiores do que os normais e uma hipótese de bloqueio de captação periférica de glicose por hipersecreção epinefrínica (que concomitantemente inibiria a secreção pancreática), só poderia encontrar fundamento numa desregulação secretória neuro-hormonal simpática, na vigência de variações amplas dos níveis glicêmicos.

CONCLUSÕES

1 - O método apresentado para a dosagem do ácido 3-metoxi-4-hidroxi mandélico (VMA) possui especificidade, reprodutibilidade e recuperação suficientes para a sua boa aplicação na rotina clínica e na investigação científica.

2 - Os valores de excreção urinária de VMA nos indivíduos normais não diferem daqueles dos portadores de doença hipertensiva arterial essencial (DHAE), e podem ser considerados como variando de 0,5 a 6,7 mg nas 24 horas.

3 - A dosagem em pauta constitui-se num excelente meio auxiliar para o diagnóstico de neoplasias do sistema cromafínico, visto que todos os 11 casos apresentados tiveram níveis que se situaram pelo menos três desvios-padrões acima da média obtida para os indivíduos normais.

4 - O incremento observado nos indivíduos normais submetidos a uma hipoglicemia provocada pela insulina (0,1 unidade por quilo de peso real) não se revelou ser significante estatisticamente.

5 - Os pacientes portadores de DHAE aumentaram de maneira significativa os seus níveis excretórios de VMA, quando submetidos às mesmas condições expostas no item 4.

6 - A "velocidade de queda glicêmica" observada nos pacientes portadores de DHAE, quando submetidos à ação insulínica, revelou ser, pelos parâmetros usados, mais lenta que a dos indivíduos normais.

INFERÊNCIA

Infere-se uma desregulação secretória neuro-hormonal, nos indivíduos portadores de DHAE, com secreções exageradas de E, quando sujeitos a fatores tendentes a produzir quedas glicêmicas. A amina simpática poderia produzir seus efeitos por bloqueio da captação periférica de glicose, por aumento da glicogenólise hepática e - atuando sobre os receptores adrenérgicos pancreáticos - diminuir a secreção endógena de insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AGUAYO, S.E. - Rapid determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid (VMA) by electrophoresis on cellulose polyacetate strip. Clin.Chem., 10: 637, 1964.
- 2 - ARMSTRONG, M.D. and McMILLAN, A. - Identification of a major urinary metabolite of norepinephrine. Fed.Proc., 16: 146, 1957.
- 3 - ARMSTRONG, M.D., McMILLAN, A. and SHAW, K.N.F. - 3-methoxy-4-hydroxy-d-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. Biochem.et biophys. Acta, 25: 422, 1957.
- 4 - AXELROD, J. - O-methylation of epinephrine an other catechols "in vitro" and "in vivo". Science, 126: 400, 1957.
- 5 - AXELROD, J. - Purification and properties of phenylethanolamine N-methyl transferase. J.biol.Chem., 237: 1657, 1962.
- 6 - AXELROD, J., ALBERS, W. and CLEMENTE, C.D. - Distribution of catechol O-methyl transferase in the nervous system and other tissues. J.Neurochem., 5: 68, 1959.
- 7 - AXELROD, J., GORDON, E., HERTING, G., KOPIN, I.J. and POTTER, L.T. - On the mechanisms of tachyphylaxis to tyramine in isolated rat heart. Brit.J.Pharmacol., 19: 56, 1962.
- 8 - AXELROD, J. and LAROCHE, J.M. - Inhibition of O-methylation of epinephrine and norepinephrine "in vitro" and "in vivo". Science, 130: 800, 1959.
- 9 - AXELROD, J., SENOH, S. and WITKOP, B. - O-methylation of catechol amines "in vivo". J.biol.Chem., 233: 697, 1958.

- 10 - AXELROD, J. and TOMCHICK, R. - Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. J. biol.Chem., 233: 702, 1958.
- 11 - BACQ, Z.M. - Sensibilization a l'adrenaline et a l'excitation des nerfs adrenergiques par les anti-oxigènes. Bull. Acad. Roy. Med. Belgiques, 15: 627, 1935.
- 12 - BAUDHUIN, P., BEAUFAY, H., RAHMAN -Li, V., SELLINGER, O.Z., WATTIAUX, R., JACQUES, P. and de DUVE, C. - Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. Biochem. J., 92: 179, 1964.
- 13 - BERSTEIN, L. and WEATHERALL - Statistics for medical and other biological students. E. and S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 1952.
- 14 - BLASCHKO, H. - Amineoxidase. In: The enzymes.ed. by Boyer, P.O., Lardy, H.A. and Myrbäck , K., Academic Press, Inc., New York, 8: 337, 1963.
- 15 - BOLINGER, R.E., SHANE, S.R. and KIRKPATRICK, C.H. - Secondary rise in plasma free fatty acids following glucose load. J. Clin. Endocr. and Metab., 22: 873, 1962.
- 16 - BRUNJES, S., HAYWOOD, L.J. and MARONELE, R.E. - Controlled study of antihypertensive response to MAO inhibitor. B. Urinary excretion of catecholamines and their metabolites. Ann. New York Acad. Sc., 107: 983, 1963.
- 17 - BULBRING, E. and BURN, J.H. - Liberation of noradrenaline from the suprarenal gland. Brit. J. Pharmacol., 4: 202, 1949.

- 18 - CANNON, W.B., McIVER, M.A. and BLISS, S.W. - Studies on the conditions of activity in endocrine glands. Am.J.Phisiol., 69: 46, 1924.
- 19 - CARLSSON, A., ROSENGREN, E., BERTTER, R. and NILSSON, J. - Effect of reserpine on the metabolism of catecholamines. In: Psychotropic drugs, ed. by S. Garattini and V. Ghetto. Elsevier Publ. Co., Amsterdam, pg. 363, 1957. Apud, Kopin, I.J. Storage and metabolism of catecholamines: The role of monoamine oxidase. Pharmacol. Rev., 16: 179, 1964.
- 20 - de CHAMPLAIN, J., KRAKOFF, R. and AXEROLD, J. - Catecholamine metabolism in experimental hypertension in the rat. Circulation Res. 20: 136, 1967.
- 21 - CONN, J.W. - Hypertension, the potassium ion and impaired carbohydrate tolerance. New.Eng.J.Med., 273: 1135, 1965.
- 22 - COWAN, F.F., CANNON, C., KOPPANYI, T. and MAENGWIN - DAVIES, G.R. - Reversal of phenylalkylamine tachyphylaxis by norepinephrine. Science, 134: 1069, 1961.
- 23 - CREVELING, C.R., DALY, J.W., WITKOP, B. and UDENFRIEND, S.- Substrates and inhibitors of dopamine β -hydroxylase. Biochem. biophys. Acta, 64: 125, 1962.
- 24 - CROUT, J.R., PISANO, J.J. and SJOERDSMA, A. - Catecholamine metabolism in pheochromocytoma. Clin. Res., 8: 24, 1960.
- 25 - CROUT, J.R., PISANO, J.J. and SJOERDSMA, A. - Urinary excretion of catecholamines and their metabolites in pheochromocytoma. Amer. Heart.J., 61: 375, 1961.
- 26 - CROUT, J.R. and SJOERDSMA, A. - Turnover and metabolism of catecholamines in patients with pheochromocytoma. J.clin. Invest., 43: 94, 1964.

- 27 - DeEDS, F., BOOTH, A.N. and JONES, F.T. - Methylation and dehydroxylation of phenolic compounds by rats and rabbits. J. biol. Chem., 225: 615, 1957.
- 28 - DOTTI, L.B., SCHILLING, F. and HASHIM, S.A. - Urinary excretion of vanillylmandelic acid (VMA) in normal subjects and patients with coronary heart disease. In 48th annual meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology. Chicago, 1964, Fed. Proc., 23: 566, 1964 (Abstract).
- 29 - DOYLE, A.E. and FRASER, J.R.E. - Vascular reactivity in hypertension. Circulation Res., 9: 755, 1961.
- 30 - DRAZIN, M.L. - Glucose tolerance in hypertension and obesity. Diabetes, 2: 433, 1953.
- 31 - DUNER, H. - The effect of insulin hypoglycemia on the secretion of adrenaline and noradrenaline from the suprarenal of cat. Acta Physiol. Scandinav., 32: 62, 1954.
- 32 - ENGEL, A. and EULER, U.S. von - Diagnostic value of increased urinary output of noradrenaline and adrenaline in pheochromocytoma. Lancet, 259: 387, 1950.
- 33 - EULER, U.S. von and FLODING, I. - Diagnosis of pheochromocytoma by fluorimetric estimation of adrenaline and noradrenaline in urine. Scand. J. clin. and Lab. Invest., 8: 288, 1956.
- 34 - EULER, U.S. von and STRÖM, G. - Present status of diagnosis and treatment of pheochromocytoma. Circulation, 15: 5, 1957.
- 35 - FRITZ, I.B., SHATTON, J., MORTON, J.V. and LEVINE, R. - Effects of epinephrine and insulin on glucose disappearance

in eviscerated dogs. Am. J. Physiol., 189: 57, 1957.

- 36 - GEORGES, R.J. - A modification of Gitlow screening test for the detection of increased excretion of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid (VMA) in urine. J.med. Lab. Tech., 21: 126, 1964.
- 37 - GITLOW, S.E. and KRUK, E. - Rapid urine test for pheochromocytoma. J. clin. Invest., 39: 990, 1960.
- 38 - GITLOW, S.E., MENDLOWITZ, M., KHASSIS, S., COHEN, G. and SHA, J. - The diagnosis of pheochromocytoma by determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid. J.clin. Invest., 39: 221, 1960.
- 39 - GITLOW, S.E., ORNSTEIN, L., MENDLOWITZ, M., KHASSIS, S. and KRUK, E. - A simple colorimetric urine test for pheochromocytoma. Am. J. Med., 28: 921, 1960.
- 40 - GITLOW, S.E., WILK, S., FRANKLIN, M., CARR, H. and MENDLOWITZ, M. - Quantitative determination of vanillyl mandelic acid (VMA) by gas-liquid chromatography. Fed. Proc., 24: 389, 1965.
- 41 - GÜDICKE, W. and BROSKOVSKY, K.H. - Die Isolierung der 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsture aus dem urin unter Verwendung der Keilstreifenmethod. J. Chromatog., 15: 88, 1964.
- 42 - GOLDFIEN, A., ZILELI, S.M., DESPOINTES, R.H. and BTHUNE, J. E. - Effect of hypoglycemia on the adrenal secretion of epinephrine and norepinephrine in the dog. Endocrinology, 62: 749, 1958.
- 43 - GOLDSTEIN, M. and CONTRERA, J.F. - The substrate specificity

- of phenylamine β -hydroxylase. J. biol. Chem., 237: 1898, 1961.
- 44 - GREENBERG, R.E. and GARDNER, L.I. - Catecholamine metabolism in a functional neural tumor. J. clin. Invest., 39: 1729, 1960.
- 45 - HERMANN, G.A. - The determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic (vanilmandelic) acid by means of electrophoresis with cellulose acetate membrane. Am. J. clin. Path., 41: 373, 1964.
- 46 - HERTTING, G. and LA BROSSE, E.H. - Biliary and urinary excretion of metabolites of 7H^3 -epinephrine in the rat. J. biol. Chem., 237: 2291, 1962.
- 47 - HIRATA, Y., HORINO, M., ITO, M., YAMAUCHI, M., MAKINO, N., ISHIMOTO, M., SATO, T. and HOSOSACO, A. - A diabetes detection study in Kyushu, Japan: relation of diabetes to hypertension. Diabetes, 2: 44, 1962.
- 48 - HOLTZ, P., CREDNER, K. and KRÖNEBERG, G. - Arch. exper. Path. Pharmacol., 204: 228, 1947. Apud. Goldfien et al., Referência 42.
- 49 - HOLTZ, P., HEISE, R. and LÜDTKE - Fermentativer Abbau von L-Dioxyphenylalanine (DOPA) durch Niere. Arch. exp. Path. Pharmacol., 191: 89, 1938. Apud, SOURKES, T.L. - Dopa decarboxylase: Substrates, coenzyme, inhibitors. Pharmacol. Rev., 18: 53, 1966.
- 50 - HOLZBAUER, M. and VOGT, M. - The concentration of adrenaline in the peripheral blood during insulin hypoglycemia. Brit. J. Pharmacol., 9: 249, 1954.

- 51 - HOUSSAY, B.A., MOLINELLI, E.A. and LEWIS, J.T. - Acción de la insulina sobre la secreción de adrenalina. Rev. Assoc. Med. Argent. 37: 486, 1924.
- 52 - JACOBS, S.L., SOBEL, C. and HENRY, R.J. - Excretion of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and catecholamines in patients with pheochromocytoma. J. Clin. Endocrin., 21: 315, 1961.
- 53 - KIRSHNER, N., GOODALL, M.C., and ROSEN, L. - Metabolism of dl-adrenaline-2-C¹⁴ in the human. Proc.Soc. exp.Biol. (N.Y.), 98: 627, 1958.
- 54 - KOBAYASHI, Y. - The frequency of diabetes in Japan and therapy of diabetes in early stages. Medicine of Japan in 1959, I: 641, 1959. Apud CONN, J.W., Referência 21.
- 55 - KOPIN, I.J., AXELROD, J. and GORDON, E. - The metabolic fate of H³-epinephrine and C¹⁴-metanephrine in the rat. J.biol.Chem., 236: 2109, 1961.
- 56 - KOPIN, I.J. and GORDON, E.K. - Metabolism of norepinephrine H³ released by tyramine and reserpine. J. Pharmacol., 138: 351, 1962.
- 57 - KOPIN, I.J. and GORDON, E.K. - Metabolism of administered and drug-released norepinephrine-7-H³ in the rat. J. Pharmacol., 140: 207, 1963.
- 58 - KVALE, W.F., ROTH, G.M., MANGER, W.M. and PRIESTLEY, J.T.- Pheochromocytoma. Circulation, 14: 622, 1956.
- 59 - La BROUSSE, E.H., AXELROD, J. and KETY, S.S. - O-Methylation. The principal route of metabolism of epinephrine in man. Science, 128: 593, 1958.

- 60 - LUFT, R. and EULER, V.S. von - Two cases of postural hypotension showing deficiency in release of norepinephrine and epinephrine. J. clin. Invest., 32: 1065, 1953.
- 61 - LUND, A. - Adrenaline and noradrenaline in blood and urine in cases of pheochromocytoma. Scand.J.clin. and Lab. Invest., 4: 263, 1952.
- 62 - MAHLER, D.J. and HUMOLLER, F.L. - A comparison of methods for determining catecholamines and 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid in urine. Clin.Chem., 8: 47, 1962.
- 63 - MALAISSE, W., MALAISE-LAGAE, F., WRIGHT, P.H. and ASHMORE, J. - Effects of adrenergic and cholinergic agents upon insulin secretion "in vitro". Endocrinology, 80: 975, 1967.
- 64 - MASON, G.A., HART-MERCER, I., MILLAR, E.I., STRANG, B., and WYNNE, N.A. - Adrenaline - Secreting neuroblastomas in an infant. Lancet, 2: 322, 1957.
- 65 - NAGATSU, T. LEVITT, M. and UNDEFRIEND, S. - Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. J.biol.Chem., 239: 2910. 1964.
- 66 - NELSON, N. - A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J.biol.Chem., 153: 275, 1944.
- 67 - NICOLAU, W. e ULHÔA CINTRA, A.B. - Cromatografia do ácido vanilmandêlico na urina. Apresentado na Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 31 de Janeiro de 1964.
- 68 - NICOLAU, W. e ULHÔA CINTRA, A.B. - Avaliação da excreção urinária do ácido-vanilmandêlico. Suas implicações no diag-

nóstico da hiperfunção do tecido cromafínico. Apresentado no VI Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, 10 de Dezembro de 1964.

- 69 - ORGAIN, E.S. - Pheochromocytoma: the value of certain test used routinely in diagnosis. Ann.Int.Med., 43: 1178, 1955.
- 70 - OSTRANDER, L.D., Jr., FRANCIS, T., Jr. HAYNER, N.S., KJELSBURG, M.O. and EPSTEIN, F.H. - Relationship of cardiovascular disease to hyperglycemia. Ann.Int.Med., 62: 1188, 1965.
- 71 - PETERS, J.H. - The determination of creatinine and creatine in blood and urine with the Photoelectric Colorimeter. J.biol.Chem., 146: 179, 1942.
- 72 - PORTER, D., Jr., GRABER, A., KUZUYA, T. and WILLIAMS, R.H. - Epinephrine inhibition of insulin release. J.clin.Invest., 44: 1087, 1965.
- 73 - RANDRUP, A. - Determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic (vanilmandelic) acid by electrophoresis at low pH. Scand.J.clin.Lab.Invest., 14: 262, 1962.
- 74 - ROBINSON, R., RATCLIFFE, J. and SMITH, P. - A screening test for pheochromocytoma. J.clin.Path., 12: 541, 1959.
- 75 - ROBINSON, R., SMITH, P., WHITTAKER, S.R.F. - Secretion of catecholamines in malignant pheochromocytoma. Brit.med.J., 1: 1422, 1964.
- 76 - ROSELL, S., KOPIN, I.J. and AXELROD, J. - Fate of H^3 -noradrenaline in skeletal muscle before and following sympathetic stimulation. Am.J.Physiol., 205: 317, 1963.

- 77 - ROTH, G.M. and KVALE, W.F. - A tentative test for pheochromocytoma. Amer. J. Med. Sci., 210: 653, 1945.
- 78 - SANDLER, M. and RUTHVEN, C.R.J. - Quantitative colorimetric method for estimation of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. Value in diagnosis of pheochromocytoma. Lancet, 2: 114, 1959.
- 79 - SANDLER, M. and RUTHVEN, C.R.J. - The measurement of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid and homovanillic acid. Pharmac. Rev., 18: 343, 1966.
- 80 - SATAKE, Y. - Secretion of adrenaline and sympathins. Nazando, Tokyo, 1955. Apud, GOLDFIEN et al., Referência 42.
- 81 - SATO, T., WADA, Y. and MAEBASHI, M. - Simultaneous determination of urinary vanillyl mandelic acid and 5-hydroxyindol-acetic acid. Tohoku J. exp. Med., 80: 1, 1963. Apud, SANDLER, M. and RUTHVEN, C.R.J. - Referência 79.
- 82 - SCHALES, O. and SCHALES, S.S. - Dihydroxyphenylalanine decarboxylase: preparation and properties of a stable dry powder. Arch. Biochem., 24: 83, 1949.
- 83 - SCHMID, E. and HENNING, N. - Über den Nachweis der 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure im Harn. Klin. Wschr., 41: 566, 1963.
- 84 - SCHMID, E., ZICHA, L., KRAUTHEIM, J. and BLUMBERG, J. - Dunnschicht-Chromatographische Trennungen von Substanzen des Katecholamin-und-Serotonin - stoffwechsels. Med. exp., 7: 8, 1962.
- 85 - SHAW, K.N.F., McMILLAN, A. and ARMSTRONG, M.D. - The metabolism of 3,4-dihydroxyphenylalanine. J. biol. Chem., 226: 255, 1957.

- 86 - SHAW, K.N.F. and TREVARTHEN, J. - Exogenous sources of urinary phenol and indole acids. Nature, Lond. 182: 797, 1958.
- 87 - SHEPO, S.G., GERTRUDE, T.M. FLOCK, E.V., MABER, F.T. - Current experience in the diagnosis of pheochromocytoma. Circulation, 24: 473, 1966.
- 88 - SHIOTA, T. and IGUCHI, M. - Statistical studies on hypertension and diabetes mellitus. Jap. Circ. J., 19: 314, 1955. Apud HIRATA et al., Referência 47.
- 89 - SJOERDSMA, A. - Relationships between alterations in amine metabolism and blood pressure. Circulation Res., 9: 734, 1961.
- 90 - SJOERDSMA, A., LEEPER, L.C., TERRY, L.L. and UDENFRIEND, S. - Studies on the biogenesis and metabolism of norepinephrine in patients with pheochromocytoma. J. clin. Invest., 38: 31, 1959.
- 91 - SOKAL, J.E. and SARCIONE, E.J. - Effect of epinephrine on glycogen stores. Am.J.Physiol., 196: 1253, 1959.
- 92 - STEWART, I., NEWHALL, W.F. and EDWARDS, G.J. - The isolation and identification of *l*-synephrine in the leaves and fruits of citrus. J. biol. Chem., 239: 930, 1964.
- 93 - STUDNITZ, W. von - Methodische und Klinische Untersuchungen über die Ausscheidung der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im Urin. Scand. J.clin.Lab.Invest., 12 (suppl. 48): 3, 1960.
- 94 - STUDNITZ, W. von - Methodische und Klinische Untersuchungen über die Ausscheidung der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im Urin. Scand.J.clin.Lab.Invest., 12(suppl.48):58, 1960.

- 95 - STUDNITZ, W. von - Occurrence, isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxyphenylalanine. Clin.Chim.Acta, 6: 526, 1961.
- 96 - STUDNITZ, W. von - Über die Ausscheidung der 3-Methoxy-4-hydroxyphenyllessigsäure (Homovanillinsäure) beim Neuroblastoma und anderen Neuralen Tumoren. Klin.Wschr., 3: 163, 1962.
- 97 - STUDNITZ, W. von and HANSON, A. - Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine by high-voltage paper electrophoresis. Scand.J.clin.Lab.Invest., 11: 101, 1959.
- 98 - SUNDERMAN, F.W. Jr., CLEVELAND, P.D., LAW, N.C. and SUNDERMAN, F.W. - A method for the determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid ("vanilmandelic") for the diagnosis of pheochromocytoma. Am.J.clin.Path., 34: 293, 1960.
- 99 - SUTHERLAND, E. - Phosphorus metabolism, edited by W.D. Mc Elroy and B. Glass. Baltimore. Johns Hopkins Press, II: 577, 1952. Apud FRITZ et al., Referência 35.
- 100 - THEIL, G.B. and GARCIA, V.C. - The effect of intravenous histamine on the urinary excretion of epinephrine, norepinephrine and 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in essential hypertension. Am.J.Med.Sci., 249: 654, 1965.
- 101 - TRENDELENBURG, U. - Modification of the effect of tyramine by various agents and procedures. J.Pharmacol., 134: 8, 1961.
- 102 - UNDEFRIED, S. - Tyroxine hydroxylase - Pharmacol.Rev., 18: 43, 1966.

- 103 - WAALKES, T.P., SJOERDSMA, A., CREVELING, C.R., WEISSBACH, H. and UDENFRIEND, S. - Serotonin, norepinephrine and related compounds in bananas. Science, 127: 648, 1958.
- 104 - WALAAS, E. - The effect of adrenaline on the uptake of glucose, mannose and fructose in the rat diaphragm. Acta physiol.scandinav., 35: 109, 1955.
- 105 - WALAAS, O. and WALAAS, E. - Effect of insulin on rat diaphragm under anaerobic conditions. J.biol.Chem., 195: 367, 1952.
- 106 - WEIL MALHERBE, H. and BONE, A.D. - The fluorimetric estimation of adrenaline and noradrenaline in plasma. Biochem. J., 67: 65, 1957.
- 107 - WHITBY, L.G., AXELROD, J. and WEIL-MALHERBE, H. - Fate of H^3 -norepinephrine in animals. J. Pharmacol., 132: 193, 1961.
- 108 - WILLIAMS, C.M. and GREER, M. - Gas chromatography of urinary vanilmandelic acid in pheochromocytoma. Clin.Clin.Acta, 11: 495, 1965.
- 109 - WISE, V.K., MAC DONALD, R.K. and LaBROSSE, E.H. - Determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in man. Clin. chim.Acta, 6: 79, 1961.
- 110 - WOLFE, D.E., POTTER, L.T., RICHARDSON, K.C. and AXELROD, J. - Localizing tritiated norepinephrine in sympathetic axons by electron microscopic autoradiography. Science, 138: 440, 1962.
- 111 - WOLFF, R.L., MENDLOWITZ, M., ROBOZ, J. and GITLOW, S.E. - New rapid test for pheochromocytoma, urinary assay of normetanephrine, metanephrine and 3-methoxy-4-hydroxy-

- . phenylglycol. J.Amer.Med.Ass., 188: 859, 1964.
- 112 - WURTMAN, R. and AXELROD, J. - Enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla. Control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. Science, impress. Apud AXELROD, J. - Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amine. Pharmacol. Rev., 18: 95, 1966.
- 113 - WYLIE, D.W., ARCHER, S. and ARNOLD, A. - Augmentation of pharmacological properties of catecholamines by O-methyl transferase inhibitors. J.Pharmacol., 130: 239, 1961.
- 114 - YUWILER, A., GELLER, E. and EIDUSON, S. - Studies on 5-hydroxytryptophan decarboxylase. II Additional inhibition studies and suggestions on the nature of the enzymic site. Arch.Biochem.Biophys., 89: 143, 1960.
