



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfisio e-mail: ppgfisio@vortex.ufrgs.br

Rua Sarmento Leite, 500 - 2º andar

90050-170 - Porto Alegre – RS – Brasil

Fone/Fax: (051) 3316-3453



INFLUÊNCIAS LIGADAS AO SEXO E A SAZONALIDADE SOBRE A GLICONEOGÊNESE RENAL EM RATOS SUBMETIDOS AO JEJUM

GABRIELA MAURA CAVAGNI

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, 2005.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**INFLUÊNCIAS LIGADAS AO SEXO E A
SAZONALIDADE SOBRE A GLICONEOGÊNESE
RENAL EM RATOS SUBMETIDOS AO JEJUM**

Dissertação de Mestrado

Gabriela Maura Cavagni

Porto Alegre, 2005.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar um ensino público gratuito e de muita qualidade.

Ao meu querido orientador Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski pelo apoio, dedicação e ajuda incansável em todos os momentos.

À professora Dra. Roselis Silveira Martins da Silva por estar sempre presente e sempre prestativa.

Ao professor Marcelo Grillo, pelo gosto pela fisiologia e também aos outros professores do departamento, em especial à professora Maria Flávia Marques Ribeiro por todos os seus ensinamentos.

Às minhas queridas ajudantes e bolsistas de iniciação científica Daniele Kaiser e Fabiana Souza.

A todo o pessoal do laboratório pela amizade e convívio, especialmente à Ana Lúcia Chittó pelo aprendizado da técnica.

Ao Matheus pelo auxílio nos experimentos.

Aos meus sobrinhos amados Filipe e Matheus e minha babyzinha Maria Eduarda (Dada).

Aos meus gatos Mindy e Brighity e ao meu cão Blitzkrieg por me fazer, a cada dia, acreditar ainda mais na escolha da minha profissão e pelos momentos felizes que me proporcionam sempre.

Ao Rodrigo, por tudo (sem palavras!!!).

A todas aquelas pessoas especiais, que contribuíram sob todos os aspectos para minha formação pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Kathia, Alexandre e Adriana.

Ao meu pai.

À minha adorada mãe.

Ao meu Anjo da Guarda.

Deus, OBRIGADA.

SUMÁRIO

<u>AGRADECIMENTOS</u>	3
<u>RESUMO</u>	6
<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	8
<u>METABOLISMO DA GLICOSE E A VIA GLICONEOGÊNICA</u>	8
<u>PRECURSORES DA VIA GLICONEOGÊNICA</u>	13
<u>ORGÃOS GLICONEOGÊNICOS – A IMPORTÂNCIA DOS RINS</u>	21
<u>EFEITO DO JEJUM</u>	28
<u>REGULAÇÃO DO METABOLISMO DA GLICOSE</u>	32
<u>FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE METABÓLICA</u>	38
<u>Sazonalidade e Metabolismo</u>	39
<u>Diferenças Metabólicas entre Machos e Fêmeas</u>	41
<u>OBJETIVOS</u>	46
<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	47
<u>ANIMAIS</u>	47
<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	47
<u>Grupos</u>	47
<u>Jejum</u>	48
<u>Procedimentos Experimentais</u>	49
<u>ESTUDO IN VITRO</u>	50
<u>DETERMINAÇÃO DA GLICONEOGÊNESE RENAL</u>	53
<u>DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA</u>	54
<u>TRATAMENTO ESTATÍSTICO</u>	55
<u>ARTIGO CIENTÍFICO</u>	56
<u>ABSTRACT</u>	58
<u>INTRODUÇÃO</u>	60
<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	63
<u>ANIMAIS</u>	63

<u>PROCOLO EXPERIMENTAL</u>	63
<u>ESTUDO IN VITRO</u>	64
<u>DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA</u>	65
<u>TRATAMENTO ESTATÍSTICO</u>	65
<u>RESULTADOS</u>	67
<u>DISCUSSÃO</u>	76
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	87
<u>ANEXO 1</u>	94

RESUMO

A via gliconeogênica é uma via central no estudo dos processos biossintéticos celulares que, nos tecidos animais, leva à formação de glicose partindo de precursores não-carboidratos. Muitos estudos têm evidenciado que os rins aumentam a contribuição para a liberação de glicose na circulação durante períodos de jejum. Porém, são poucos os trabalhos que investigam este importante processo fisiológico em outras condições. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as influências sazonais e ligadas ao sexo sobre a via gliconeogênica renal em animais submetidos ao jejum prolongado. Os rins de ratos foram excisados, fatiados e divididos em duas regiões, cortical e medular. Incubou-se estas amostras separadamente em solução fisiológica acrescida com 0,2 μCi de ^{14}C -Ácido Lático ou ^{14}C -Glicerol. A ^{14}C -Glicose foi quantificada por meio de cromatografia em camada delgada e expressa em $\mu\text{moles/g}$ tecido/hora. Para avaliar a influência sazonal, os experimentos foram realizados em dois períodos do ano, no inverno e no verão e a atividade gliconeogênica demonstrada foi diferente entre as duas estações. No inverno, a gliconeogênese renal de ratos-controle foi significativamente menor do que no verão. Além disso, os animais submetidos a 48 horas e 72 horas de jejum apresentaram um decréscimo na gliconeogênese quando comparados ao grupo controle. Já durante um período maior de jejum, às 120 horas, a atividade gliconeogênica aumentou e foi semelhante entre as duas estações. Vários aspectos poderiam estar influenciando estas diferenças, tais como o metabolismo basal e a variação hormonal e enzimática sobre a via. Neste trabalho, também verificou-se que a gliconeogênese renal apresentou

diferenças entre ratos machos e fêmeas. Os resultados demonstraram que a formação de glicose a partir de lactato marcado nas fêmeas foi significativamente maior do que nos machos. Provavelmente, estas diferenças no perfil gliconeogênico entre ratos machos e fêmeas poderiam ser atribuídas em grande parte a variação hormonal e ao conjunto de fatores interligados a esta variação. Assim, este trabalho contribuiu para o esclarecimento de algumas questões ainda não investigadas na literatura, como a importância da variação sazonal e ligada ao sexo sobre a via gliconeogênica nos rins de ratos submetidos ao jejum.

Palavras Chave: glicose, gliconeogênese renal, jejum, sazonalidade, diferenças sexuais.

INTRODUÇÃO GERAL

O METABOLISMO DA GLICOSE E A VIA GLICONEOGÊNICA

A glicose é o principal nutriente para a manutenção e promoção da função celular em mamíferos. Este substrato leva à formação de ATP, NADPH e precursores para a síntese de macromoléculas, como os ácidos nucleicos e os fosfolípidos (Newsholme e cols., 2003a, 2003b).

Os valores normais de glicose no plasma precisam ser mantidos em limites estreitos ao longo do dia, apesar de amplas flutuações no aporte (p.e. refeição) e na remoção (p.e. exercício) de glicose da circulação.

A glicose é fonte de energia para células sanguíneas (5-10%), músculo esquelético (15-20%), rins (10-15%), órgãos esplâncnicos (3-6%), tecido adiposo (2-4%) e principalmente para o cérebro (45-60%), sendo que este órgão, em humanos, não pode estocar ou produzir glicose, o que o leva a depender exclusivamente da glicose presente no plasma (Gerich, 2000).

No período pós-absortivo (14-16 h pós-alimentação = *overnight*) a glicose é produzida a uma velocidade de aproximadamente $10-11 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ou em torno de 5 mM (concentração plasmática). Já em períodos de jejum de 20-24 horas a produção de glicose diminui 10-15 % (4-4,5 mM) e após um jejum de 72 horas ou mais é mantida em torno de 2,8 mM (Gerich, 2001).

A glicose é captada pelos tecidos e é completamente oxidada a CO_2 ou liberada na circulação como lactato, alanina e glutamina para posterior reincorporação em glicose pela via gliconeogênica (Gerich, 2000). Durante o período pós-absortivo a liberação de glicose na circulação é resultado de dois

processos: glicogenólise e gliconeogênese (Gerich e cols., 2001; Buczkowska, 2004). A glicogenólise envolve a quebra do glicogênio em glicose 6-fosfato e subsequente hidrólise em glicose livre, pela ação da enzima glicose 6-fosfatase. Já a gliconeogênese envolve a formação de glicose 6-fosfato mediante precursores tais como: lactato, glicerol e aminoácidos e consequente hidrólise pela enzima glicose 6-fosfatase em glicose livre (Gerich e cols., 2001). A produção de glicose através de gliconeogênese e de glicogenólise produz um importante impacto sobre a homeostase dos níveis de glicose no sangue (Herling e cols., 1999).

O fígado e o músculo esquelético possuem os maiores estoques de glicogênio do organismo. Devido à presença da enzima glicose 6-fosfatase no fígado, a hidrólise do glicogênio hepático produz glicose que é liberada para a circulação. Já no músculo, a quebra do glicogênio após sua mobilização, termina com a liberação de lactato. Este lactato juntamente com o lactato produzido via glicólise nas células sangüíneas, na medula renal e em outros tecidos pode ser captado por órgãos gliconeogênicos e transformado em glicose (Gerich e cols., 2001).

Estudos utilizando ressonância magnética em humanos indicam que, no estado pós-absortivo, a glicogenólise hepática contribui com cerca de $45 \pm 6\%$ da liberação de glicose. Este dado indica que aproximadamente 55% de toda glicose liberada na circulação durante este período é um resultado da atividade gliconeogênica (Gerich e cols., 2001).

Além disso, foi mostrado que a contribuição da gliconeogênese para a produção hepática de glicose aumenta cerca de 90% após 40-60 horas de jejum em humanos em repouso. Já durante o exercício, tanto a

gliconeogênese quanto a glicogenólise aumentam e a produção e utilização de glicose pelo organismo se igualam (Trimmer e cols., 2001).

Durante o período pós-absortivo, a produção de glicose protege o organismo contra a hipoglicemia. Entretanto, um aumento inapropriado na produção hepática de glicose é comum em indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 e contribui significativamente para a hiperglicemia no jejum (Herling e cols., 1999).

O aumento da utilização de glicose pelo músculo esquelético durante o exercício também propõe um desafio na homeostase da glicose. O fígado é responsável pela maior parte da produção de glicose liberada na circulação durante o estado pós-absortivo. Embora hiperglicemia e hipoglicemia possam ocorrer durante exercícios em certas condições, a concentração de glicose plasmática usualmente se mantém constante. Este equilíbrio entre a utilização de glicose e a produção requer um aumento na glicogenólise hepática e na gliconeogênese, paralelo ao grande aporte de glicose para o trabalho muscular (Drouin e cols., 1998).

A via gliconeogênica é uma via central no estudo dos processos biossintéticos celulares que, nos tecidos animais, leva à formação de glicose partindo de precursores não-carboidratos. A biossíntese de glicose é uma necessidade absoluta nos mamíferos, porque o cérebro e o restante do sistema nervoso, bem como medula renal, testículos, eritrócitos, cristalino, córnea e tecidos embrionários, necessitam da glicose fornecida através do sangue como sua única ou principal fonte de energia. As células dos mamíferos sintetizam glicose de forma constante e direta, iniciando este processo com precursores mais simples e então liberam esta glicose para o sangue (Lehninger, 1995).

A gliconeogênese permite a manutenção dos níveis de glicose no sangue, muito tempo depois de toda a glicose da dieta ter sido absorvida e completamente oxidada (Devlin, 2003).

Segundo Moon (1988), a gliconeogênese é a via responsável pela síntese *de novo* de glicose (ou de glicogênio, chamada de gliconeogeniogênese). A gliconeogênese é uma via filogeneticamente antiga, encontrada em todos os animais, vegetais, fungos e microrganismos, e as reações que dela fazem parte são as mesmas em todos os casos. Além disso, cabe ressaltar que, embora as reações da gliconeogênese sejam as mesmas em todos os organismos vivos, a precisa contribuição desta via na manutenção da glicemia difere conforme a espécie e sua capacidade de adaptação bioquímica às mudanças nos níveis glicêmicos. Isto é, o contexto metabólico e a regulação da via diferem de organismo para organismo e de tecido para tecido (Moon, 1988; Lehninger, 1995).

A gliconeogênese é o processo pelo qual a glicose é formada a partir de precursores metabólicos tais como lactato (Quadro 1) e alanina. Esta via metabólica ocorre predominantemente no fígado e no rim e é essencial para a produção de glicose durante o jejum prolongado ou quando os estoques de glicogênio se encontram quase totalmente depletados (Stumvoll e cols., 1999). O passo chave na gliconeogênese é a formação de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato, que é catalisado pela enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (She e cols., 2000). Esta enzima apresenta duas formas, mitocondrial e citosólica, que são codificadas por genes nucleares separados, fornecendo um exemplo de duas enzimas distintas que catalisam a mesma reação, porém com diferentes locais de ação e diferentes funções metabólicas (Lehninger,

1995). Apesar de ambas as formas, mitocondrial e citosólica da PEPCK serem expressas em roedores, a atividade da forma citosólica ocorre acima de 95% em órgãos como o fígado e o rim (She e cols., 2000).

Quadro 1

SÍNTESE DE GLICOSE A PARTIR DE LACTATO

A gliconeogênese a partir de lactato é um processo que requer ATP, com a seguinte equação geral:



Muitas enzimas da glicólise são comuns à via gliconeogênica. Reações adicionais devem estar envolvidas porque a glicólise produz 2 ATP e a gliconeogênese requer 6 ATP por molécula de glicose. Além disso, algumas etapas da glicólise são irreversíveis nas condições intracelulares e são diferentes das etapas irreversíveis da via gliconeogênica. As reações da gliconeogênese, a partir de lactato, são apresentadas na **Figura 2**. A etapa inicial é a conversão de lactato em piruvato pela lactato desidrogenase. NADH gerado nesta etapa é necessário numa etapa subsequente da via. Piruvato não pode ser convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) pela piruvato quinase porque a reação é irreversível nas condições intracelulares. Piruvato é convertido no composto de fosfato de alta energia PEP pelo acoplamento de duas reações que requerem compostos de fosfato de alta energia (um ATP e um GTP). A piruvato carboxilase catalisa a primeira reação, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) a segunda reação. GTP, requerido pela PEPCK, é equivalente a um ATP por ação da nucleosídeo difosfato quinase ($\text{GDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{GTP} + \text{ADP}$). O CO_2 gerado pela PEPCK e HCO_3^- requerido pela piruvato carboxilase são ligados pela reação catalisada pela anidrase carbônica ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$). Somando estas reações com as reações da **Figura 2** resulta em:



Portanto, a conversão de piruvato em PEP durante a gliconeogênese custa à célula duas moléculas de ATP. Isto contrasta com a conversão de PEP a piruvato, durante a glicólise, que rende à célula apenas uma molécula de ATP.

A localização intracelular da piruvato carboxilase torna a mitocôndria obrigatória para a conversão de piruvato citosólico em PEP citosólico. Uma vez que a PEPCK está presente tanto no compartimento citosólico como no mitocôndrio, há duas vias que podem ser adotadas pelo oxalacetato (OAA) para chegar à glicose. Para a via que envolve a PEPCK mitocondrial, OAA é convertido, dentro da mitocôndria, em PEP que, então, atravessa a membrana mitocondrial interna. A segunda via seria igualmente simples se OAA pudesse atravessar a membrana mitocondrial interna, entretanto, isto não ocorre pela ausência de um transportador de OAA. Então, OAA é convertido em aspartato, que é transportado para o citosol pelo antiporte glutamato-aspartato. Aspartato é transaminado com α -cetoglutarato no citosol produzindo OAA, que é usado pela PEPCK citosólica na síntese de PEP.

A partir daí, as enzimas da via glicolítica operam na direção inversa para converter PEP até frutose 1,6-bifosfato. O NADH gerado pela lactato desidrogenase é utilizado pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, estabelecendo um equilíbrio igual de geração e utilização de equivalentes de redução.

A 6-fosfofruto-1-quinase catalisa uma etapa irreversível da glicólise e não pode ser usada para conversão de frutose 1,6-bifosfato em frutose 6-fosfato. Um modo de contornar esta etapa é obtido pela frutose 1,6-bifosfatase, que catalisa a hidrólise irreversível de frutose 1,6-bifosfato a frutose 6-fosfato.

A fosfoglicose isomerase é completamente reversível e funciona em ambas as vias, glicolítica e gliconeogênica. A glicose 6-fosfatase, usada no lugar da glicoquinase como última etapa da gliconeogênese, catalisa uma reação de hidrólise irreversível, nas condições intracelulares. Os nucleotídeos não desempenham nenhum papel nesta reação; a função desta enzima é gerar glicose, não converter glicose em glicose 6-fosfato. A glicose 6-fosfatase é uma enzima ligada à membrana, no retículo endoplasmático, com seu sítio ativo disponível para a hidrólise de glicose 6-fosfato na superfície cisternal dos túbulos. Uma translocase para glicose 6-fosfato é necessária para transportar glicose 6-fosfato do citosol para seu local de hidrólise, dentro do retículo endoplasmático. Por fim, glicose livre é liberada do lúmen do retículo endoplasmático para o citosol para ser utilizada como fonte de energia para os tecidos.

PRECURSORES DA VIA GLICONEOGÊNICA

Os principais precursores gliconeogênicos em humanos são: lactato, glicerol e os aminoácidos gliconeogênicos, tais como a glutamina e a alanina (Gerich, 2000; Gerich e cols., 2001; Corssmit e cols., 2001; Cano, 2002).

O lactato é produzido pela glicólise não oxidativa a partir da glicose armazenada ou da glicose circulante. É produzido não somente nos tecidos com glicólise anaeróbia obrigatória, mas também em condições fisiológicas em tecidos como músculo e cérebro. Em humanos normais, a contribuição do lactato (Ciclo de Cori), é estimada em aproximadamente 15% da produção total de glicose no estado pós-absortivo. De qualquer modo, a quantificação exata da contribuição do lactato para a produção de glicose em humanos *in vivo*, é impedida pela cinética complexa do lactato (Corssmit e cols., 2001).

Porém, estudos utilizando técnicas de balanço arteriovenoso de liberação de glicose e substratos em humanos, mostram que o lactato é o principal precursor gliconeogênico, seguido da glutamina e do glicerol. De acordo com estes dados, o lactato é responsável por aproximadamente 50% da gliconeogênese renal (Figura 1) (Cano, 2002; Meyer e cols., 2002a, 2002b). Estimou-se que a liberação renal de glicose a partir do lactato foi 4,7; 2,5 e 9,6 vezes maior do que a partir de glicerol, glutamina e alanina, respectivamente (Meyer e cols., 2002b).

Entre os órgãos do corpo, o rim é o que apresenta o papel mais importante no metabolismo do lactato. Tal evidência está baseada em estudos

de infusão exógena de lactato e de nefrectomia realizados em ratos, cães e ovinos. Estes estudos sugerem que a contribuição renal para a remoção do lactato circulante seja substancial, particularmente em várias condições patológicas, como a acidose e a endotoxemia. Além disso, esta remoção parece estar essencialmente confinada ao córtex renal. Sendo assim, na ausência de glicose ou durante o jejum, o córtex produz negligenciável quantidade de lactato. Na medula, pelo contrário, a glicose gera lactato a partir da glicólise. O córtex simultaneamente capta o lactato liberado pela medula e utiliza-o para a oxidação e gliconeogênese. Estes dados sugerem a presença de um sistema recíproco entre córtex/medula e glicose/lactato. O córtex utiliza lactato para oxidar e gerar glicose e libera para a medula para que esta por meio da glicólise produza energia (Bellomo, 2002).

Portanto, a liberação de glicose em rins normais de humanos está principalmente (se não exclusivamente) relacionada à gliconeogênese renal no córtex, enquanto que a utilização ocorre em outras partes do rim (Gerich e cols., 2001).

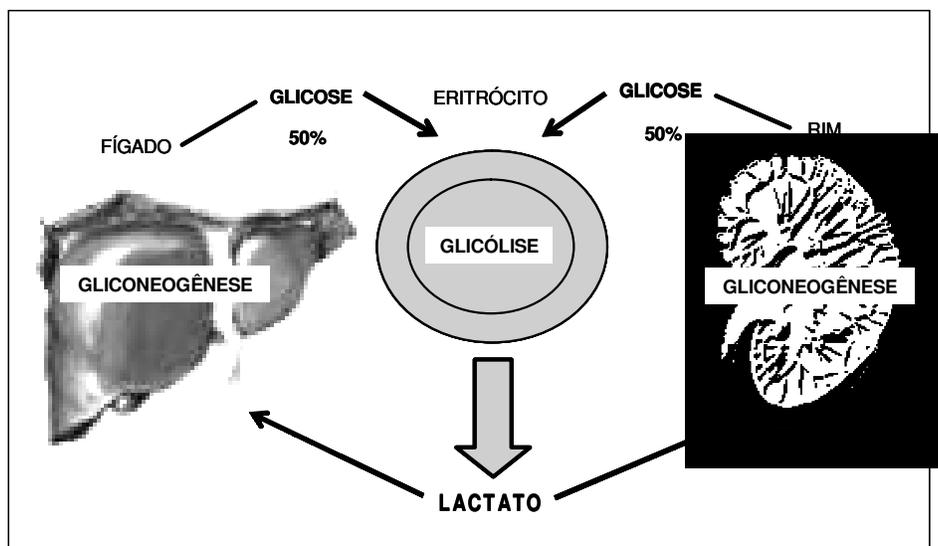


Figura 1. Contribuição renal para a liberação de glicose endógena a partir de lactato durante a fase pós-absortiva (Cano, 2002).

Os passos enzimáticos da gliconeogênese renal refletem àqueles constatados no fígado. Porém, várias diferenças em relação à especificidade de substratos entre estes dois tecidos foram relatadas: o lactato e o glicerol são substratos utilizados por ambos os órgãos, contudo a conversão de aminoácidos em glicose difere entre os rins e o fígado (Cersosimo e cols., 2000b).

Estudos demonstram que a glutamina é o mais abundante aminoácido do corpo e está envolvida em mais processos metabólicos do que qualquer outro aminoácido, apresentando um papel-chave em processos fisiológicos de vários órgãos (Stumvoll e cols., 1999). Sendo assim, a glutamina parece ser o substrato predominantemente utilizado na gliconeogênese renal, enquanto que a alanina está essencialmente relacionada à gliconeogênese hepática (Nurjhan, 1995; Meyer e cols., 1998; Stumvoll e cols., 1998, 1999; Cersosimo e cols., 2000a, 2000b).

Dados indicam que a conversão da alanina em glicose pelo rim (ao contrário do que acontece no fígado), é negligenciável, no entanto, a gliconeogênese a partir da glutamina parece estar aumentada em condições hipoglicêmicas. Além disso, a utilização da alanina pelo fígado e da glutamina pelo rim pode refletir diferenças na captação e no transporte de aminoácidos em cada órgão. O transporte de glutamina através da membrana da célula tubular é sensível à hormônios, enquanto isto não ocorre nos hepatócitos. (Cersosimo e cols., 2000b).

A glutamina é o principal aminoácido transportador de nitrogênio de locais de síntese (músculo esquelético, fígado e pulmões) para locais de utilização, incluindo rins, intestinos, neurônios, células do sistema imune e, em

condições ácido-básicas apropriadas, fígado. Nos rins, a glutamina tem um papel central no transporte de carbono e nitrogênio sendo precursora de íons amônio, que são excretados na urina e preservam o balanço ácido-básico do organismo (Conjard e cols., 2002; Newsholme e cols., 2003a, 2003b; Vercoutère e cols., 2003; Vittorelli e cols., 2004). Medidas das diferenças arteriovenosas demonstram que, diferentemente dos rins de homens, cães e macacos, os rins de ratos captam e liberam pouca quantidade de glutamina *in vivo*, sob condições normais. Porém, aminoácidos como a glutamina são considerados os principais substratos para a gliconeogênese e amoniogênese em ratos em condições de acidose metabólica (Lietz e Bryla, 1995), diabete, alimentação com dieta rica em caseína, ou jejum de 72 horas (Vercoutère e cols., 2003).

Estudos *in vitro* e experimentos feitos em mamíferos mostram que a glutamina é um dos mais eficientes precursores para a gliconeogênese renal (Nurjhan e cols., 1995). Quando usada como substrato, a glutamina adiciona mais carbonos para o *pool* de glicose do que outros substratos como lactato e alanina. Isto se deve ao fato de que o lactato e a alanina são em grande parte derivados da glicose, enquanto que a glutamina é predominantemente derivada do *pool* de aminoácidos livres do corpo, que depende em grande extensão da proporção de proteólise, ou da proteólise diretamente. Assim, a glutamina torna-se quantitativamente mais importante do que a alanina para o transporte de proteínas derivadas de carbono através do plasma e para adicionar estes carbonos para o *pool* de glicose (Meyer e cols., 2004b).

Estudos recentes em humanos têm demonstrado que a conversão da glutamina plasmática em glicose plasmática (gliconeogênese a

partir da glutamina) é suprimida por insulina e estimulada por processos contrarregulatórios. Entretanto, contrariamente à expectativa de que a insulina poderia diminuir a liberação de glutamina no plasma por suprimir a proteólise, estudos sugerem que a glutamina no plasma permanece inalterada ou pode aumentar durante hiperinsulinemia euglicêmica fisiológica. A partir destes dados, tem-se que durante a hiperinsulinemia euglicêmica o músculo esquelético é em grande extensão responsável por aumentar a liberação de glutamina no plasma e que isto talvez seja devido ao aumento na conversão de glicose em glutamina como parte do ciclo glicose-glutamina. Durante a hipoglicemia, o decréscimo do uso de glutamina pelo músculo esquelético talvez seja importante para fornecer um mecanismo que aumente a demanda de glutamina para a gliconeogênese (Meyer e cols., 2004b).

A conversão dos aminoácidos gliconeogênicos é responsável por 6 a 12% do total da produção de glicose sistêmica no estado pós-absortivo. A predominância da alanina no fluxo de aminoácidos a partir do músculo e a evidência da síntese de glicose derivada de piruvato têm levado a reconhecer que o ciclo glicose-alanina é análogo ao ciclo de Cori. Nos rins, a glutamina torna-se responsável por aproximadamente 5 a 8% da produção total de glicose (Corssmit e cols., 2001).

A importância da gliconeogênese renal para todo o balanço da glicose e para a manutenção da sua homeostase foi estudada em detalhes dentro de condições fisiológicas normais e também durante a hipoglicemia induzida pela insulina em cães e em humanos, pela canulação da veia renal (Cersosimo e cols., 1998, 2000b, 2000c). Os dados destas investigações indicam que a captação renal de lactato é responsável por aproximadamente

40% da produção renal de glicose no estado pós-absortivo e por 60% da produção renal de glicose durante a hipoglicemia. Tal produção de glicose resulta num aumento de cinco a dez vezes na liberação de glicose pela veia renal após a hipoglicemia induzida, o qual promove a adição de aproximadamente 4 g de glicose na circulação sistêmica (Bellomo, 2002). Sendo assim, o lactato se torna o maior precursor gliconeogênico no rim dentro de muitas condições e ainda contribui significativamente para a manutenção da glicemia a partir de outros precursores gliconeogênicos específicos, tais como o glicerol (Cersosimo e cols., 1998), alanina e glutamina (Stumvoll e cols., 1998).

Durante o estado pós-absortivo em humanos, o lactato é considerado o precursor dominante, tanto para a gliconeogênese renal quanto para a gliconeogênese sistêmica (Figura 2). A gliconeogênese a partir do lactato excede a soma da gliconeogênese renal a partir de glicerol, glutamina e alanina. A proporção de gliconeogênese a partir de um substrato pelo rim depende da distribuição, captação e da sua eficiência em converter-se em glicose. A distribuição de substratos pelo rim, por sua vez, depende da disponibilidade na circulação e do fluxo sanguíneo renal. Sendo assim, a distribuição de lactato pelo rim seria maior do que a de outros substratos e isto poderia explicar a sua maior utilização pela via gliconeogênica (Meyer e cols., 2002b).

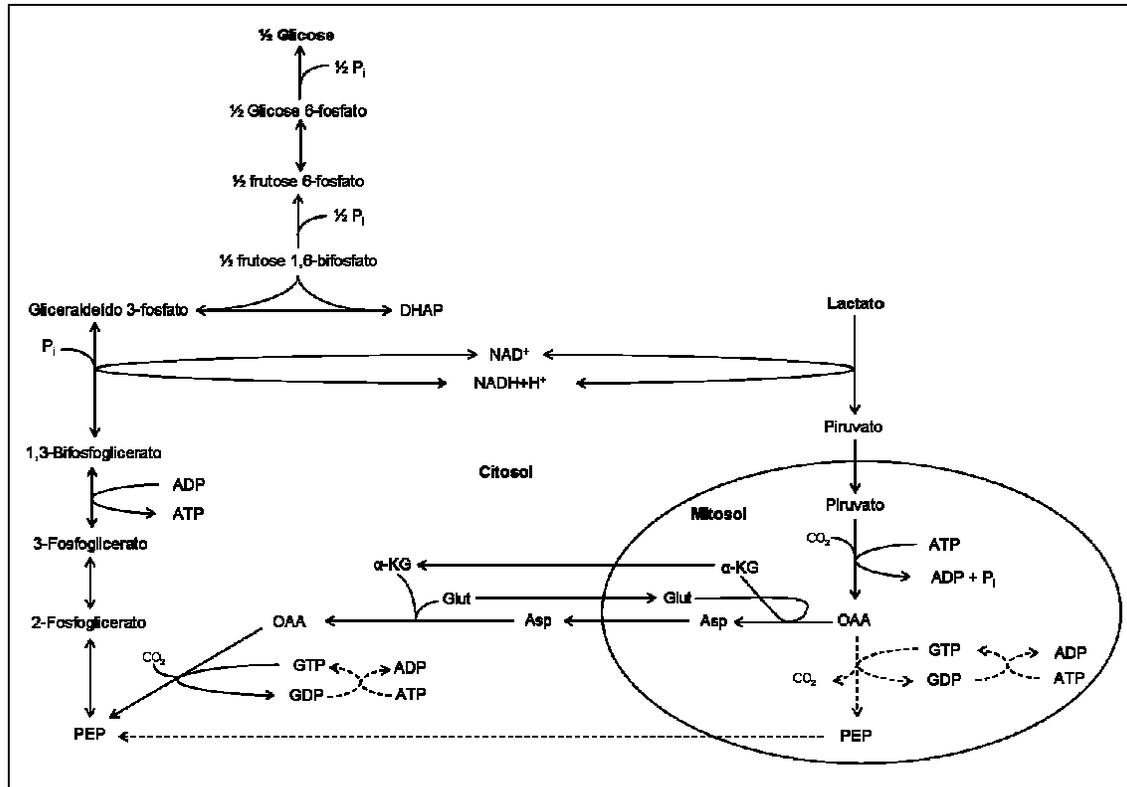


Figura 2. Via da gliconeogênese, a partir de lactato. O envolvimento da mitocôndria no processo é indicado. As setas tracejadas referem-se a uma via alternativa, que usa a PEP carboxiquinase mitocondrial em lugar da isoenzima citosólica. Abreviaturas: OAA, oxalacetato; α-KG, α-cetoglutarato; PEP, fosfoenolpiruvato; DHAP, di-hidroxiacetona fosfato (Devlin, 2003).

Além do lactato e dos aminoácidos gliconeogênicos, outros precursores tais como o glicerol (Figura 3) e os ácidos graxos livres têm sido estudados. Foi proposto que o glicerol estimula a formação de glicose a partir de piruvato, malato e glutamato (Lietz e Bryla, 1995). O glicerol é derivado da hidrólise dos triglicerídeos no tecido adiposo. A produção de glicose no estado pós-absortivo a partir do glicerol é limitada. Sendo assim, o glicerol torna-se quantitativamente mais importante quando a lipólise é acelerada, tal como ocorre no diabetes e após um jejum prolongado (Stumvoll e cols., 1999; Corssmit e cols., 2001). Estudos confirmam que o glicerol é responsável por aproximadamente 10% da produção renal de glicose e que 20% da conversão total de glicerol em glicose ocorre nos rins (10% em cada rim) no estado pós-

absortivo de cães. Entretanto, a captação renal e a conversão de glicerol em glicose nos rins dobram durante a hipoglicemia. Estes dados sugerem que a lipólise pelo tecido adiposo foi estimulada pelos hormônios contrarreguladores. Isto demonstra que o aumento da lipólise durante a hipoglicemia, é uma importante fonte de glicerol para o rim. Similarmente ao lactato, a captação de glicerol pelo rim não muda significativamente durante a hipoglicemia, ainda que a eficiência da conversão de glicerol em glicose e a quantidade de glicerol disponível para o rim aumentem (Cersosimo e cols., 1998).

Por outro lado, os efeitos dos ácidos graxos livres na gliconeogênese em humanos são ainda controversos. Em animais, os efeitos dos ácidos graxos livres na gliconeogênese parecem ser espécie-específicos. Efeitos estimulatórios têm sido relatados em ratos, entretanto efeitos inibitórios são referidos em gatos, cães e cobaias. Em humanos, os ácidos graxos livres estimularam a gliconeogênese a partir de lactato e alanina, porém, diminuíram a gliconeogênese a partir da alanina após quatro dias de jejum. Pelo uso de $^2\text{H}_2\text{O}$, um método para quantificar a gliconeogênese a partir de qualquer precursor, demonstrou-se que os ácidos graxos livres aumentam a gliconeogênese (Corssmit e cols., 2001).

Portanto, os dados apresentados demonstram que o lactato e o glicerol parecem ter um importante papel regulatório na gliconeogênese renal dentro de condições fisiológicas. Além disso, o glicerol pode ser usado como fonte de carbono para a produção renal de glicose enquanto a utilização de lactato para a gliconeogênese é notadamente acentuada.

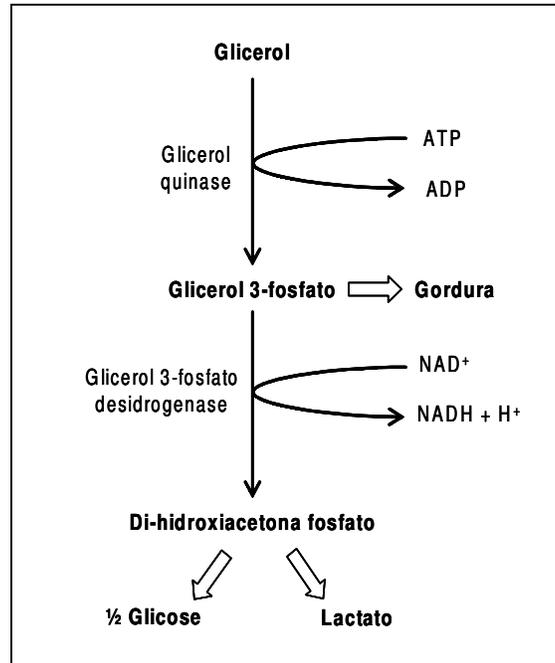


Figura 3. Via da gliconeogênese, a partir de glicerol, juntamente com vias concorrentes (Devlin, 2003).

ÓRGÃOS GLICONEOGÊNICOS - A IMPORTÂNCIA DOS RINS

Somente dois órgãos no corpo humano - o fígado e o rim - possuem suficiente atividade das enzimas gliconeogênicas e atividade da glicose 6-fosfatase para fazer com que a glicose seja liberada para a circulação como um resultado de gliconeogênese (Stumvoll e cols., 1999; Gerich e cols., 2001).

Durante muito tempo foi postulado que o fígado era o único sítio de atividade gliconeogênica em indivíduos normais e durante o período pós-absortivo. Entretanto, estudos conduzidos por mais de 60 anos em animais evidenciaram que o rim pudesse sintetizar glicose sob várias condições. Porém, até recentemente se acreditava que o rim humano não era uma

importante fonte de glicose exceto durante a acidose e o jejum prolongado (Cryer, 1994; Stumvoll e cols., 1997; Gerich, 2000; Gerich e cols., 2001; Meyer e Gerich, 2002; Cano, 2002).

Em 1938, Bergman e Drury em um experimento feito em coelhos, mostraram a primeira evidência que o rim liberaria glicose e seria importante para a manutenção da glicemia.

Em 1954, Teng demonstrou que fatias de córtex renal de ratos com diabetes induzida não só liberavam glicose como também aumentavam a atividade gliconeogênica e que após o tratamento com insulina estes efeitos eram revertidos.

Em 1960, usando um modelo similar, Landau demonstrou que a gliconeogênese renal a partir de piruvato aumentou mais do que o dobro em rins de animais diabéticos.

Neste mesmo período, em 1963 (1963a, 1963b, 1963c), Krebs realizou uma série de experimentos caracterizando os substratos usados pela gliconeogênese renal, a capacidade gliconeogênica no rim de diferentes espécies e vários aspectos da regulação da gliconeogênese renal, incluindo a estimulação por ácidos graxos livres. Assim, o autor propôs o rim como um importante órgão gliconeogênico, baseando-se nas seguintes observações:

1) em termos de peso e pela concentração enzimática, a capacidade gliconeogênica do rim excederia à do fígado e,

2) como o aporte sanguíneo para estes órgãos é semelhante, a distribuição dos precursores gliconeogênicos seria similar.

Está estabelecido que no estado pós-absortivo em humanos, ambos os órgãos, fígado e rim, liberam glicose na circulação. O fígado é

responsável por 70-80% de toda liberação de glicose sistêmica nessas condições. Contudo, como praticamente toda glicose liberada pelos rins é devido à gliconeogênese, a contribuição do fígado e dos rins para a gliconeogênese total pode ser comparada (Meyer e cols., 1998). Além disso, o fluxo sanguíneo e a quantidade de enzimas gliconeogênicas presentes no córtex renal são compatíveis, com atividade gliconeogênica similar à do fígado (Cano, 2002).

Observando o mecanismo renal de liberação de glicose, temos que o rim humano não é capaz de armazenar quantidade significativa de glicogênio, assim praticamente toda a glicose liberada pelo rim seria devido principalmente, se não exclusivamente, à atividade gliconeogênica (Stumvoll e cols., 1997, 1998, 1999; Gerich, 2000; Gerich e cols., 2001; Meyer e cols., 2002a, 2002b; Gustavson e cols., 2004).

Corroborando com estes dados estão os relatos feitos a partir de pacientes transplantados, que mostraram que os níveis de glicose não caíram à zero após a remoção do fígado (Joseph e cols., 2000; Gerich e cols., 2001). Foi sugerido que durante o transplante hepático, os rins aumentam a liberação de glicose e compensam a baixa liberação de glicose pelo fígado, assim, pouca ou nenhuma glicose exógena é necessária para a manutenção da glicemia. Esta compensação renal pode explicar porque a hipoglicemia não é freqüente em pacientes com doença hepática severa e sugerem a existência de um sistema recíproco entre o fígado e os rins (Woerle e cols., 2003a, 2003b).

A atividade gliconeogênica do organismo contribui com aproximadamente 40% da glicose circulante durante o período pós-absortivo em humanos (Stumvoll e cols., 1995; Landau e cols., 1996).

Durante o período pós-prandial, a liberação endógena de glicose pelo fígado diminui rapidamente e está suprimida quase que 80% após 4-5 horas. Como resultado, quase 20g a menos de glicose deixa de circular durante este intervalo. Em contraste, recentes estudos indicam que a liberação endógena de glicose pelo rim não está suprimida e, além disso, aumenta durante este período (Gerich, 2000).

Muitos trabalhos têm demonstrado que a gliconeogênese renal teria uma participação de 20-25% dos valores da glicose circulante durante o período pós-absortivo podendo o rim ser considerado um importante órgão gliconeogênico, tal qual o fígado (Stumvoll e cols., 1995, 1997, 1998, 1999; Cersosimo e cols., 1999; Meyer e cols., 1999, 2002a, 2002b; Gerich, 2000; Gerich e cols., 2001; Conjard e cols., 2001; Cano, 2002; Buczkowska, 2004).

Estudos feitos por Kida e cols. (1978) demonstraram que a liberação de glicose pelo rim de ratos normais *in vivo* foi de $0,75 \pm 0,13$ mg/dL por minuto, e que esta contribuição para a manutenção da glicose sanguínea foi de aproximadamente 25%.

Quanto ao metabolismo da glicose, o rim pode ser considerado como dois órgãos distintos: a utilização ocorre principalmente na medula, enquanto que a liberação (síntese/produção) ocorre principalmente no córtex. Assim, a medula, pobremente vascularizada, é o principal local de glicólise (Figura 4) e o córtex uma região principalmente gliconeogênica (Stumvoll e cols., 1997; Gerich e cols., 2001; Cano, 2002). Esta divisão funcional é um resultado de diferenças na distribuição de várias enzimas ao longo do néfron. Por exemplo: células da medula renal têm apreciável atividade de enzimas glicolíticas. Nestas células, no entanto, faltam glicose 6-fosfatase e outras

enzimas gliconeogênicas. Assim, elas podem fazer glicólise, porém não podem liberar glicose livre para a circulação. Por outro lado, as células do córtex renal possuem enzimas gliconeogênicas (inclusive glicose 6-fosfatase) e assim podem liberar glicose para a circulação (Stumvoll e cols., 1997; Gerich e cols., 2001). Evidências obtidas *in vitro* indicam que o rim é capaz de produzir e utilizar glicose simultaneamente. Entretanto, o mecanismo que regula a produção e utilização de glicose pelo órgão ainda é desconhecido e a distribuição enzimática ao longo do néfron ainda é controversa (Cersosimo e cols., 1999).

Experimentos realizados em animais demonstraram que ao longo do néfron, somente as células do túbulo proximal são capazes de sintetizar glicose e que somente este segmento contém as enzimas chaves da gliconeogênese. Com base em dados de diversas espécies, foi estabelecido que o túbulo proximal é metabolicamente heterogêneo e que os três segmentos distintos (S1, S2 e S3) podem contribuir individualmente para a síntese de glicose e que esta síntese pode variar conforme as condições experimentais (Guder e Ross, 1984). Em 2001, Conjard e cols. realizaram trabalhos com túbulos proximais isolados de rins humanos e observaram que os três segmentos (S1, S2 e S3) possuem a mesma capacidade de sintetizar glicose a partir de glutamina, entretanto, os segmentos S2 e S3 sintetizam mais glicose a partir de lactato do que o segmento S1. Estes resultados indicaram que, nos rins humanos *in vivo*, o lactato parece ser o principal precursor gliconeogênico.

Na década de 60, Krebs e cols. (1963b), demonstraram que a maquinaria envolvida neste processo está nas células do túbulo contorcido proximal que convertem eficientemente precursores de três carbonos em

glicose. Ao mesmo tempo, as células do néfron distal e aquelas da medula intersticial são muito ativas na captação e na oxidação de glicose.

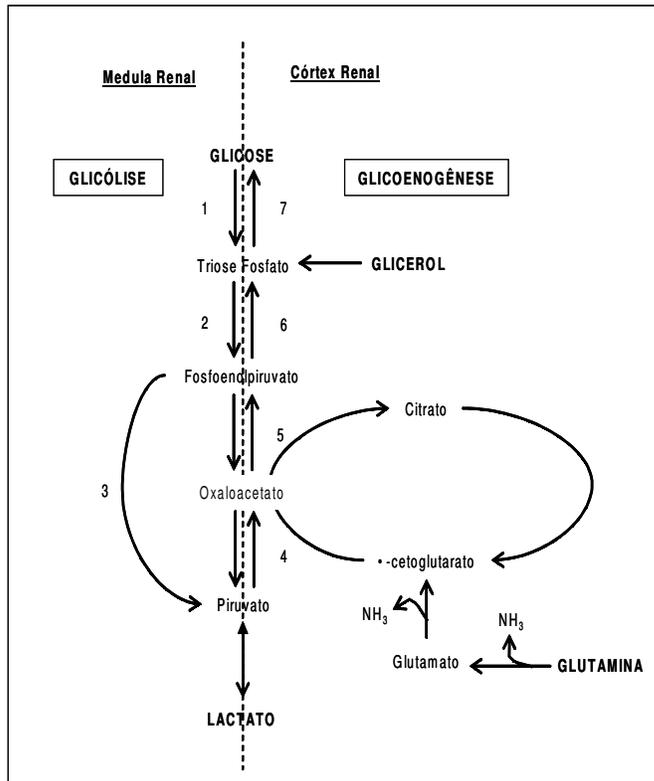


Figura 4. Glicólise e Gliconeogênese Renal – rota e localização enzimática. As enzimas glicolíticas (1) hexoquinase, (2) fosfofrutoquinase e (3) piruvato quinase estão localizadas predominantemente nas células da medula renal. As enzimas chaves da gliconeogênese (4) piruvato carboxilase, (5) fosfoenolpiruvato carboxiquinase, (6) frutose 1,6-bifosfatase e (7) glicose 6-fosfatase estão principalmente nas células do córtex renal (Stumvoll e cols., 1997).

Como os rins não possuem estoques de glicogênio, a produção de glicose ocorre somente mediante atividade gliconeogênica. No período pós-absortivo (*overnight*), os rins são responsáveis por aproximadamente 5 a 30% do total da produção de glicose do organismo. Entretanto, tem sido demonstrado que após o período pós-absortivo, os rins consomem aproximadamente a mesma quantidade de glicose que eles produzem, portanto, pouca ou nenhuma liberação de glicose foi observada (Gustavson e cols., 2004).

A contribuição do rim na produção de glicose liberada na circulação não era considerada importante quando comparada com a

capacidade gliconeogênica do fígado até o final dos anos 90. Recentemente, estudos realizados *in vivo* pela técnica de diferença arteriovenosa em humanos demonstraram que a síntese de glicose pelo rim durante o estado pós-absortivo pode estar entre 5 e 25% de toda a glicose produzida pela gliconeogênese no corpo. Também demonstrou-se que a síntese renal de glicose *in vivo* foi estimulada após 60 h de jejum, hipoglicemia e diabetes mellitus. Estes resultados salientam não somente a importância da gliconeogênese renal humana em vários estados fisiopatológicos, em que a homeostase da glicose é perturbada, mas também a necessária busca pela caracterização destes processos em humanos (Conjard e cols., 2001).

Foi demonstrado também que a quantidade renal de glicose exportada aumentava substancialmente durante o jejum prolongado, contribuindo com cerca de uma vez e meia da glicose sistêmica diária após 7-10 semanas de jejum em humanos. Atualmente, a divisão entre a produção de glicose e sua utilização pelo rim indicam que a produção renal de glicose iguala a utilização e, além disso, é responsável por aproximadamente 15-25% da produção endógena de glicose. Estes experimentos *in vivo* estão de acordo com o que foi observado em condições de jejum e sugerem que a glicose liberada pelo rim no estado pós-absortivo pareça um reflexo da gliconeogênese renal, principalmente a partir de lactato, glicerol e aminoácidos circulantes. Existem várias evidências *in vitro* indicando que o rim é capaz de produzir e utilizar glicose simultaneamente (Cersosimo e cols., 1999).

Recentes estudos realizados em indivíduos portadores de diabetes tipo 2, após ingestão de glicose, indicam que o rim possui um importante papel na homeostase pós-prandial da glicose. Estes dados

revelaram que aproximadamente 40% dos indivíduos diabéticos aumentaram a liberação de glicose endógena e este aumento foi devido ao aumento na liberação renal de glicose. Além disso, a distribuição da glicose sistêmica foi alterada; a captação renal de glicose aumentou, enquanto a captação pelo músculo foi normal. A partir destes dados, demonstrou-se que tanto o fígado quanto o rim contribuem para a produção pós-prandial de glicose e que a captação de glicose pelo rim aumenta, resultando numa mudança na importância relativa do músculo e do rim para a disponibilidade de glicose (Meyer e cols., 2004a).

Desse modo, este conjunto de dados demonstra a importância fisiopatológica da gliconeogênese renal na manutenção da homeostase da glicose no organismo.

EFEITO DO JEJUM

Existem muitos fatores que estão envolvidos com a disponibilidade ao aporte de alimentos. Em humanos saudáveis, por exemplo, o consumo de alimento no dia-a-dia pode ser regulado por fatores sociais, níveis de atividades e controle hormonal do apetite; todos eles interligados para promoção da regulação do metabolismo bioquímico da glicose. Entretanto, existem animais que estão adaptados a resistir por longos períodos sem comida e sem água. Alguns destes períodos de jejum estão relacionados à baixa disponibilidade de comida enquanto outros são partes da história natural das espécies (Castellini e Rea, 1992). Foi demonstrado que o metabolismo basal decresce durante o jejum prolongado e esta depressão metabólica é

aumentada em animais que precisam sobreviver por longos períodos em jejum. Isto sugere que animais em jejum poupam energia durante condições de repouso pela diminuição do metabolismo basal (Fuglei e Oritsland; 1999).

Os fatores específicos e os processos fisiológicos que levam os animais à morte durante o jejum prolongado ainda não são totalmente esclarecidos. Porém, torna-se visível que a massa corporal pode funcionar como limite e também que a temperatura ambiental pode afetar o tempo de sobrevivência. A medida de massa corporal pode ser afetada pelo nível metabólico e pelo tipo de tecido corporal que é catabolizado (Fuglei e Oritsland; 1999). Estudos feitos com ratos por Kouda e cols. (2004) sugerem que episódios curtos de jejum (48 horas) não induzem anormalidades no metabolismo de proteínas no fígado. Entretanto, nestes animais, cinco dias de jejum em uma temperatura ambiente de 26° C é um episódio severo, mas dentro dos limites de sobrevivência, que fica em torno de dez dias para ratos em laboratório. Após cinco dias de jejum há um declínio linear de 17% na massa corporal de um rato Wistar macho e adulto. A análise da composição corporal demonstra que 83% da energia utilizada durante o jejum foi derivada da degradação dos triglicerídeos e que 14% foi derivada do catabolismo protéico. Assim, ratos Wistar de laboratório utilizam principalmente o tecido adiposo como fonte de energia durante os primeiros cinco dias de jejum, além de produzirem uma redução na taxa metabólica em repouso (Fuglei e Oritsland; 1999).

Os processos que são usados para manter a homeostase da glicose durante o jejum são divididos arbitrariamente em cinco fases. A fase I é o estado bem alimentado, no qual a glicose é fornecida pelos carboidratos da

dieta. Uma vez esgotado este suprimento, a glicogenólise hepática mantém os níveis de glicose sanguínea durante a fase II. Quando esse suprimento de glicose começa a se esgotar, a gliconeogênese hepática a partir de lactato, glicerol e alanina torna-se cada vez mais importante, até, na fase III, a gliconeogênese tornar-se a principal fonte de glicose sanguínea. Essas mudanças ocorrem em 20 horas, mais ou menos, de jejum para o homem, dependendo de quão bem alimentado o indivíduo estava antes do jejum, de quanto glicogênio hepático estava presente e do tipo de atividade física que ocorre durante o jejum. Vários dias de jejum levam à fase IV, quando a dependência da gliconeogênese hepática realmente diminui. Os corpos cetônicos acumulam-se até concentrações suficientemente elevadas para que no cérebro possam suprir parte de suas necessidades energéticas. A gliconeogênese renal torna-se importante e significativa durante esta fase. A fase V ocorre após jejum muito prolongado, em indivíduos extremamente obesos, e caracteriza-se por dependência ainda menor da gliconeogênese. As necessidades energéticas de quase todos os tecidos são supridas, em grande parte, por oxidação de ácidos graxos ou de corpos cetônicos nessa fase. Enquanto as concentrações de corpos cetônicos estiverem elevadas, a proteólise será restrita, e ocorrerá preservação de proteínas musculares e enzimas. Isso continua até que todos os lipídios tenham sido consumidos, como consequência do jejum. Depois que todos os lipídios se esgotaram, o corpo precisa utilizar proteína muscular e, antes que estas reservas terminem, a morte ocorre na maioria dos casos (Devlin, 2003).

Diversos trabalhos têm revelado a importância do jejum para o metabolismo de carboidratos. Um tempo de 24 horas de jejum, por exemplo,

comparado ao estado pós-absortivo, é caracterizado pela diminuição de 60% na utilização e na produção endógena de glicose (Cano, 2002).

No jejum prolongado, os estoques de glicogênio no fígado são depletados e a gliconeogênese se torna o processo mais importante para sustentar e suprir a glicose para o cérebro e para outros tecidos dependentes obrigatoriamente de glicose (Gerich e cols., 2001). A glicogenólise hepática é responsável pelo aumento inicial na produção de glicose, entretanto, é devido à gliconeogênese que a produção de glicose é mantida quando a hipoglicemia é prolongada (Cersosimo e cols., 1998).

Estudos realizados em 1969 por Owen e cols., demonstraram que há uma redução na quantidade total de glicose produzida durante o jejum prolongado. A produção hepática e renal de glicose foi estimada em uma média de 3,6 gramas/hora e calculada através de medidas de captação de substratos como lactato, piruvato e glicerol. A contribuição do fígado para a produção sistêmica de glicose foi de aproximadamente 55% e dos rins de aproximadamente 45%.

Muitos estudos têm evidenciado que os rins aumentam a contribuição para a liberação de glicose na circulação durante períodos de jejum. A participação deles na produção de glicose durante estes períodos foi recentemente investigada utilizando técnicas de balanço arteriovenoso combinadas com infusão intravenosa de glicose. Estes resultados demonstraram que a liberação renal de glicose aumenta aproximadamente duas vezes e meia em indivíduos submetidos a 60 horas de jejum comparado com o jejum *overnight* de 12 horas, considerando que, ao mesmo tempo, a liberação de glicose hepática diminui em torno de 25%. Estes dados enfatizam

o papel do rim na homeostase da glicose durante o jejum, mas também aumentam o risco de hipoglicemia em casos de falência renal (Gerich e cols., 2001; Cano, 2002; Gustavson e cols., 2004).

Foi demonstrado também que a atividade de algumas das enzimas-chave da gliconeogênese, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase, aumentou 443 e 38%, respectivamente, no córtex renal de camundongos submetidos ao jejum (Conjard e cols., 2002). Além disso, Sumida e cols. (2004) demonstraram aumento na atividade da enzima PEPCK em ratos submetidos ao exercício crônico e ao jejum de 24 horas e na enzima piruvato carboxilase em animais controles e treinados, sugerindo que as atividades destas enzimas podem estar aumentadas como resultado do jejum, independentemente do treinamento.

Garcia-Salguero e Lupianez em 1988, também estudando os efeitos do jejum, demonstraram em túbulos proximais renais que o fluxo gliconeogênico foi progressivamente estimulado durante um período de 48 horas de jejum, devido, em parte, ao aumento significativo na atividade das enzimas frutose 1,6-bifosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

REGULAÇÃO DO METABOLISMO DA GLICOSE

Na manutenção homeostática da glicose, o fígado e o rim são dependentes da interação de diferentes mecanismos regulatórios, tais como hormônios clássicos para a manutenção da glicemia, a glicose por si só, e o suprimento de substratos gliconeogênicos. Na última década, tem se tornado claro que mediadores parácrinos e o sistema nervoso autonômico também

exercem um potente papel regulatório. Alterações funcionais em diferentes partes deste sistema (p.e. na doença hepática e no diabetes mellitus) perturbariam o metabolismo da glicose. Assim, o conhecimento de como a gliconeogênese é regulada é de fundamental importância clínica e fisiológica (Corssmit e cols., 2001).

Existem muitas diferenças nos efeitos destes sistemas regulatórios tanto na produção hepática quanto na produção renal de glicose. A produção renal e hepática de glicose pode ser inibida pela insulina e estimulada pelas catecolaminas, pelo cortisol e pelo hormônio do crescimento (Cersosimo e cols., 1998, 2000c; Meyer e cols., 1998, 2002a; Corssmit e cols., 2001). Já o glucagon tem efeito estimulatório somente na produção de glicose hepática (Gerich, 2000; Corssmit e cols., 2001). Durante o período pós-absortivo, os níveis de glucagon aumentam, contudo, estes níveis elevados de glucagon não exercem efeito sobre a atividade gliconeogênica renal (Stumvoll e cols., 1998).

Muitos experimentos *in vitro* levaram a acreditar que a produção renal de glicose era insensível aos hormônios e que era regulada primariamente pela disponibilidade de substratos. Entretanto, estudos feitos em cães demonstraram que a hiperinsulinemia fisiológica pode, simultaneamente, inibir a produção de glicose e estimular a utilização de glicose pelo rim (Cersosimo e cols., 1994). A hipoglicemia induzida pela insulina está associada a um aumento duplicado na produção renal de glicose. Estas observações sugerem que a produção de glicose pelo rim, semelhante ao fígado, é inibida pela insulina e estimulada por hormônios contrarreguladores, particularmente as catecolaminas (Cersosimo e cols., 1997, 1999).

Cersosimo e cols. (1999, 2000a) também demonstraram a influência hormonal sobre a gliconeogênese. Em estudos utilizando diferença arteriovenosa em humanos foi estabelecida a ação inibitória da insulina sobre a gliconeogênese renal. Assim, durante a hiperinsulinemia fisiológica, a produção renal de glicose é suprimida e a utilização de glicose pelo órgão é estimulada. Concomitantemente, a redução na circulação de ácidos graxos livres e na gliconeogênese sistêmica e renal a partir de glicerol, sugerem que a insulina exerce efeitos periféricos na produção e utilização de glicose, em parte por reduzir a produção e aumentar a utilização de glicose pelo rim.

Resultados de trabalhos recentes indicam que tanto a liberação renal de glicose quanto a liberação hepática estão sob comando da insulina. Estas observações sugerem que pode haver diferenças entre a liberação hepática e renal de glicose. Uma parte da glicose liberada pelo fígado é resultado da glicogenólise, um processo que parece não ser tão sensível à ação da insulina quanto à gliconeogênese. Entretanto, a liberação de toda a glicose pelo rim decorre deste processo. A infusão de insulina na artéria esplâncnica não aumenta a liberação de glicose hepática, porém isto foi observado quando a insulina foi injetada na artéria renal, sugerindo um efeito direto da insulina sobre o órgão (Meyer e cols., 1998). Além disso, estudos indicam que a gliconeogênese renal é, de fato, mais sensível à ação da insulina do que a gliconeogênese hepática (Cersosimo e cols., 2000a; Gustavson e cols., 2004).

Em outros experimentos feitos em pacientes com diabetes insulino-dependente, a insulina suprimiu a produção de glicose renal em 50%, enquanto que a produção de glicose hepática diminuiu em 80%. Isto sugere

que no diabetes, o rim é menos sensível ao efeito supressor da insulina na produção de glicose do que o fígado (Stumvoll e cols., 1997).

Meyer e cols. (1998) realizaram estudos em humanos onde foi demonstrado que concentrações fisiológicas de insulina exercem importantes ações sobre a utilização dos substratos gliconeogênicos, particularmente no metabolismo da glutamina. Assim, ficou estabelecido que a gliconeogênese a partir da glutamina é mais sensível à ação da insulina nos rins do que no fígado, sugerindo uma ação indireta da insulina (mediada por mudanças no fluxo sanguíneo renal e na captação renal de ácidos graxos livres) em vez de um mecanismo direto sobre o transporte renal de glicose.

O maior estímulo para a gliconeogênese renal parece resultar da estimulação α_1 -adrenérgica (Corssmit e cols., 2001). Estudos feitos por Stumvoll e cols. (1995, 1998) demonstraram que concentrações fisiológicas de adrenalina estimulam a liberação renal de glicose. A adrenalina aumenta em até 60% a produção de glicose sistêmica no homem. No fígado, a adrenalina aumenta a produção de glicose em 50%, enquanto que no rim a produção aumenta em 100%. As concentrações circulantes de adrenalina, após a sua infusão no sangue, foram similares às aquelas encontradas durante o período hipoglicêmico. A adrenalina infundida foi capaz de promover um aumento sustentado na liberação de glicose pelo rim, e após três horas, essencialmente todo o aumento na produção de glicose foi proveniente do rim. O efeito estimulatório da adrenalina sobre a produção de glicose renal ocorreria por um mecanismo direto, pela mediação de AMPc, ativando as enzimas da via gliconeogênica renal, como foi demonstrado *in vitro* por Kurokawa e Massry (1973). A regulação também poderia ser indireta, pelo aumento da

disponibilidade de substratos, uma vez que a adrenalina aumenta a disponibilidade de precursores gliconeogênicos (Sacca e cols., 1983; Stumvoll e cols., 1997).

Mediante experimentos feitos em humanos após a infusão de adrenalina (Meyer e cols., 2003), foi concluído que: 1) o lactato é o substrato predominante na gliconeogênese estimulada por adrenalina tanto no fígado quanto nos rins; 2) a gliconeogênese hepática e renal a partir de lactato e glicerol são similarmente sensíveis à estimulação com adrenalina e, 3) a adrenalina aumenta a gliconeogênese a partir de lactato e glicerol por aumentar a disponibilidade de substratos e a eficiência gliconeogênica pelo rim. Sugere-se que este aumento na capacidade gliconeogênica renal seja devido aos efeitos diretos e indiretos da adrenalina sobre os rins. Em estudos realizados *in vitro* nos quais a disponibilidade de substratos foi constante, foi demonstrado que a adrenalina estimula diretamente a gliconeogênese renal em diversas espécies animais. Em contraste, Conjard e cols. (2001) relataram que a gliconeogênese renal não responderia à estimulação direta pela adrenalina em humanos e sim seria devido à estimulação indireta (mecanismo α -adrenérgico). A análise destes dados permite estimar a importância da regulação da via gliconeogênica pela adrenalina, principalmente durante o estado pós-absortivo em humanos.

O papel do fornecimento do substrato na manutenção da produção de glicose é limitado durante o estado pós-absortivo e após um curto período de jejum (menor do que 86 h). Durante 86 horas de jejum a produção de glicose não pode ser estimulada pelo aumento do suprimento de substrato. A produção de glicose diminui somente quando o suprimento de substrato é

diminuído para níveis abaixo dos fisiológicos. Conseqüentemente, a produção de glicose durante um curto tempo de jejum não é dependente do fornecimento de precursores. Após um jejum prolongado, entretanto, o reabastecimento dos estoques de precursores gliconeogênicos resultam em um aumento na produção de glicose (Corssmit e cols., 2001).

Hormônios menos conhecidos por seus efeitos glicorregulatórios, tais como o hormônio tireóideo e a vasopressina, estimulam somente a produção hepática de glicose, enquanto o hormônio da paratireóide exerce efeitos estimulatórios somente sobre a gliconeogênese renal (Meyer e cols., 1998; Corssmit e cols., 2001).

A partir destes dados, torna-se clara a participação hormonal sobre a regulação da via gliconeogênica no rim, evidenciando uma importante participação deste órgão na manutenção da homeostase da glicose.

Além dos mecanismos hormonais, foi determinado que a liberação de glicose é regulada predominantemente pela concentração de glicose plasmática. Este processo, freqüentemente referido como autorregulação, tem sido abordado em muitos estudos *in vivo* e *in vitro*. O aumento na concentração de glicose inibe a liberação de glicose *in vitro* em fígado de rato e hepatócitos isolados e inibe a produção de glicose *in vivo* em humanos, independente de mudanças nos hormônios glicorregulatórios. No estado pós-absortivo, a redução na glicogenólise hepática e o aumento da glicose circulante são os primeiros mecanismos pelos quais ocorre a resposta autorregulatória (Corssmit e cols., 2001).

Segundo o mecanismo de autorregulação, um aumento na concentração plasmática de glicose, comparado com a concentração

euglicêmica, inibe a produção hepática de glicose em ratos *in vitro* e em humanos *in vivo*, em parte por mecanismos ainda não conhecidos. O decréscimo na concentração plasmática de glicose aumenta a produção hepática de glicose *in vitro* em ratos e *in vivo* em humanos (somente quando existe hipoglicemia severa), também por mecanismos ainda desconhecidos (Corssmit e cols., 2001).

Portanto, a produção de glicose, essencial para a homeostase durante o período pós-absortivo, é regulada pela interação delicada entre diferentes mecanismos glicorregulatórios, que exercem suas influências sobre a glicogenólise e a gliconeogênese hepática e a gliconeogênese renal.

FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE METABÓLICA

De acordo com os dados até aqui relatados, está estabelecido que a gliconeogênese é uma via chave para a homeostase da glicose. Além disso, está clara a participação dos rins neste processo, bem como estabelecidos os seus principais precursores. As conseqüências de alguns aspectos metabólicos que levam a alterações no equilíbrio desta via e como estes aspectos perturbam o metabolismo da glicose também foram expostos. Porém, são poucos os trabalhos que investigam este importante processo fisiológico em outras condições, tais como a influência da sazonalidade e a influência sexual quando comparamos machos e fêmeas. Sendo assim, relacionaremos estudos que influenciam a atividade metabólica com a via gliconeogênica e suas implicações fisiológicas.

Sazonalidade e Metabolismo

A incidência de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, tende a agravar-se num padrão circadiano. Por exemplo, a pressão arterial é caracterizada por uma diminuição noturna e um aumento diurno. Esta oscilação parece ser mediada principalmente pelas variações circadianas no tônus simpático ligado a mudanças nas atividades físicas e mentais. A literatura está repleta de estudos sobre as mudanças circadianas, tais como o ritmo circadiano da temperatura corporal e muitas outras variáveis, porém pouco se sabe sobre as variações sazonais. Belló-Klein e cols. (2000) estudaram as mudanças sazonais que ocorrem durante o estresse oxidativo no coração e no fígado de ratos. Os resultados obtidos com este estudo demonstraram que a atividade das enzimas antioxidantes no coração e no fígado de ratos foi diferente entre as estações. As atividades das enzimas glutathione peroxidase e catalase estavam significativamente aumentadas no verão, comparadas com as outras estações nos dois órgãos. Além disso, diferenças na peroxidação de lipídios foram observadas durante a primavera no coração, onde os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúico (TBARS) foram máximos.

A atividade das enzimas glicolíticas (lactato desidrogenase, piruvato quinase, hexoquinase) também foi examinada em ratos após a irradiação crônica por raios X. Foi demonstrado que a atividade das enzimas glicolíticas em fêmeas era diferente, e não só era diferente como também variava muito ao longo das estações. Os dados obtidos provam que as mudanças na atividade das enzimas glicolíticas, após irradiação, são causadas

pelas peculiaridades sazonais do estado fisiológico desses animais (Starykovych e cols., 1996).

Muitos aspectos do sistema endócrino também estão sujeitos à variação sazonal. Entre eles, a liberação plasmática de cortisol e a sensibilidade tecidual aos glicocorticóides. Estudos feitos em humanos por Walker e cols. em 1997, confirmaram que os níveis de cortisol foram mais altos no inverno. Este aumento na atividade dos glicocorticóides pode contribuir para o aumento do número de doenças, tais como doenças infecciosas, depressão e doenças cardiovasculares, que possuem maior incidência durante o inverno.

Cuendet e cols. (1975) também investigaram a resposta hormonal em camundongos ao longo do ano. Demonstraram que, durante o inverno, os camundongos magros mobilizavam gordura insuficiente (devido aos estoques deficitários) para permitir sobrevivência ao longo do jejum de três dias. Em contraste, no verão, o mesmo animal sobreviveu durante sete dias e demonstrou evidências de grande mobilização lipídica, cetose e capacidade de conservar proteína. A insulina, o glucagon e a proporção insulina/glucagon provavelmente foram responsáveis pela conversão ao estado catabólico e pela mobilização de substratos e estimulação da gliconeogênese e da cetogênese. Assim, estes dados enfatizam as mudanças ocorridas no metabolismo hormonal particularmente em diferentes estações do ano.

Com relação às alterações imunológicas, tem sido observado em indivíduos normais que a resposta humoral aumenta na primavera-verão e diminui no outono-inverno. Desse modo, foi demonstrado em ratos que o estresse aumenta a resposta imune no período mais quente do ano e diminui durante o período mais frio. Isto demonstra a influência do estresse e também

da variação sazonal no ritmo anual básico deste tipo de resposta (Amat e Torres, 1993).

A partir destes dados, está clara a influência das estações do ano em muitas atividades metabólicas em mamíferos e a necessidade de se considerar estas variações sazonais em muitos outros processos fisiológicos, tais como a via gliconeogênica.

Diferenças Metabólicas entre Machos e Fêmeas

Muitos mamíferos exibem diferenças fenotípicas óbvias entre machos e fêmeas, e muitas diferenças hormonais, químicas e anatômicas têm sido atribuídas ao sexo. As diferenças envolvendo machos e fêmeas na expressão gênica ligada a fatores tais como anemia, hipertensão e disfunção renal, têm sido investigadas. Rinn e cols. (2004) realizaram pesquisas de expressão gênica em camundongos machos e fêmeas e analisaram diferenças no hipotálamo, fígado, rins e gônadas. Os dados obtidos indicaram que a maioria dos genes diferentemente expressos nos rins e no fígado estão envolvidos no metabolismo de drogas ou na regulação osmótica, acarretando importantes diferenças nas habilidades que machos e fêmeas têm de responder às drogas ou adquirir hipertensão. É importante ressaltar que uma significativa quantidade de genes foram expressos diferentemente nos rins de machos e fêmeas, incluindo genes da citocromo p450 que são preferencialmente expressos em rins de machos. Isto aponta essenciais diferenças nos rins de ambos os sexos no que diz respeito ao metabolismo e à regulação osmótica, funções fundamentais deste órgão.

Os rins possuem um papel central na manutenção da homeostase eletrolítica e na regulação do volume do fluido extracelular. A regulação do transporte de íons sódio (Na^+) e água através do lúmen do néfron distal é um mecanismo crítico pelo qual a homeostase é mantida. Anormalidades nos canais de Na^+ presentes no túbulo contorcido distal e no ducto coletor podem levar à disfunção na regulação do volume extracelular. A atividade destes canais pode ser modulada por inúmeros hormônios incluindo aldosterona, vasopressina, insulina e catecolaminas. Recentemente, foi demonstrado que estrógeno e progesterona também podem modular o mRNA e a expressão funcional dos canais de Na^+ . Assim, foi sugerido que o funcionamento renal dos canais de Na^+ é diferente entre homens e mulheres. A partir destes dados, Gambling e cols. (2004) demonstraram em ratos que os níveis de mRNA dos canais de Na^+ são mais altos em fêmeas do que em machos, levando a uma série de conseqüências devido ao aumento na retenção de água e sódio, tais como edema periférico e ganho de peso, principalmente na fase lútea do ciclo e durante a prenhez.

Observando a disparidade entre machos e fêmeas na susceptibilidade para o dano isquêmico renal e sua importância central na fisiologia da bomba Na^+/K^+ -ATPase, Fekete e cols. (2003) realizaram experimentos de injúria renal em ratos e observaram alterações ligadas ao sexo. Os resultados mostraram que os danos estruturais no tecido renal após isquemia-reperfusão são menos severos em fêmeas do que em machos. Além disso, os resultados sugerem consideráveis influências do sexo na expressão pós-isquêmica do mRNA da subunidade α_1 da bomba Na^+/K^+ -ATPase. Assim, a possibilidade de prejuízos na translocação das proteínas da subunidade α_1

da bomba ocorre em machos, e não em fêmeas. Isto pode ser atribuído ao fato de que a proporção entre estrógenos e andrógenos (e não a testosterona ou o estrógeno por si só) possui um papel importante na diferença de susceptibilidade ao dano pós-isquêmico em machos e fêmeas. Desse modo, foi demonstrado que a bomba Na^+/K^+ -ATPase é mais estável em fêmeas e isto as protege dos efeitos prejudiciais da injúria renal pós-isquêmica. Em rins de fêmeas o mRNA para a expressão de proteínas da subunidade α_1 e a atividade da bomba são mais altos do que em machos, após a injúria. Estas diferenças sexuais específicas na bomba Na^+/K^+ -ATPase podem ser características adicionais importantes na modulação da fisiologia renal entre ambos os sexos.

Diferenças na pressão arterial associadas ao sexo foram observadas em animais e em humanos. Assim, os homens possuem níveis de pressão arterial mais altos do que mulheres, até 60-70 anos, quando a pressão em ambos os sexos se iguala. Por esta razão, homens apresentam maiores riscos de desenvolver complicações renais e cardiovasculares. Os mecanismos responsáveis por estas diferenças sexuais na pressão ainda não são totalmente entendidos, porém, muitas hipóteses têm sugerido o papel dos hormônios sexuais femininos e masculinos (Perchère-Bertisch e Burnier, 2004).

Os rins são os órgãos que possuem o maior papel na regulação da pressão arterial. Estudos feitos por Reckelhoff (1998), têm demonstrado que a natriurese por pressão em ratos espontaneamente hipertensos está relacionada com os hormônios sexuais. Além disso, o sistema renina-angiotensina, um sistema hormonal chave na regulação da pressão arterial, também possui diferenças relacionadas ao sexo em vários componentes da cascata. Em animais, significativas diferenças foram observadas entre machos

e fêmeas em relação ao sistema renina-angiotensina. A administração de testosterona em fêmeas ovariectomizadas aumenta a atividade da renina no plasma e diminui em machos após a castração. Este dado sugere que a testosterona estimula o sistema renina-angiotensina e isto evidencia que a resposta à estimulação deste sistema reflete diferenças entre homens e mulheres (Perchère-Bertisch e Burnier, 2004).

O rim é o órgão-alvo de muitos hormônios com importantes efeitos fisiológicos e patológicos na função sistêmica e renal. Em relação aos hormônios sexuais, a testosterona tem efeito estimulatório em muitas funções celulares (p.e. secreção), considerando que hormônios sexuais femininos não possuem efeitos claros sobre a função renal. A ação da testosterona resulta numa maior capacidade de transporte de glicose em homens do que em mulheres (Reyes e cols., 1998). Além disso, a testosterona aumenta o transporte transepitelial de cloreto e nos níveis de AMPc em linhagens de células derivadas de néfron distal de cães (Schandu e cols., 1997). Muitas diferenças entre espécies também são relatadas. Cães machos possuem maior secreção de creatinina do que as fêmeas. Contudo, em ratos machos, a secreção de creatinina ocorre provavelmente através do caminho direto dos ânions orgânicos, o que não ocorre nas fêmeas (Harvey e Malvin, 1965). Experimentos feitos por Reyes e cols. (1998) demonstraram que em fêmeas de ratos a testosterona aumentou a capacidade secretora para níveis similares aos constatados para os machos, sugerindo assim que este hormônio é responsável pela diferença sexual observada na função renal destes animais. É importante salientar que este aumento da capacidade secretora das fêmeas não foi relacionado ao aumento na massa corporal, pois os ratos tratados com

testosterona apresentavam uma média de peso inferior aos constatados em fêmeas-controle.

Estudos realizados por Noonan e Banks (2000) em camundongos com diabetes tipo II induzida pela dieta, revelaram diferenças ligadas ao sexo em relação à concentração plasmática de glicose e insulina, bem como na excreção de eletrólitos pelos rins, incluindo proteínas totais. Além disso, foi constatada interação entre dieta e sexo, que levou a diferenças significativas no peso (em gramas) dos rins. Fêmeas apresentaram valores de peso médio dos rins inferiores aos rins de machos em animais controle e em dieta. Dados de Hammond e Janes (1998) também evidenciaram diferenças entre camundongos machos e fêmeas alimentados com dieta rica em proteínas. Os valores de massa renal e função renal refletiram diferenças entre os sexos.

Em vista de todas as evidências relatadas de que os rins possuem um importante papel sobre o metabolismo, especialmente sobre a via gliconeogênica e que podem sintetizar glicose dentro de diferentes condições, investigamos a participação dos rins na gliconeogênese durante o jejum prolongado sob diversos aspectos. A influência da sazonalidade nesta via foi um dos objetivos deste trabalho, já que não foram encontrados estudos na literatura. Do mesmo modo, as diferenças ligadas ao sexo no metabolismo dos carboidratos também foram investigadas, além da observação da atividade da via gliconeogênica no rim a partir de dois substratos, lactato e glicerol. Assim, esse estudo contribuiu com alguns aspectos ainda não relatados sobre a gliconeogênese renal e sua importância na manutenção da homeostase da glicose.

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a capacidade gliconeogênica nos rins de ratos submetidos ao jejum. Para isto, teve-se como objetivos específicos:

- avaliar, *in vitro*, a formação de glicose pela via gliconeogênica a partir de dois precursores (lactato e glicerol) no córtex e na medula renal de ratos controles e submetidos ao jejum experimental;
- estimar a formação de glicose pela via gliconeogênica no córtex e na medula renal de ratos controles e submetidos a diferentes tempos de jejum em duas estações do ano, no inverno e no verão (variação sazonal);
- determinar a formação de glicose pela via gliconeogênica no córtex e na medula renal de ratos machos e fêmeas, controles e submetidos a 120 horas de jejum experimental;
- avaliar, *in vitro*, os níveis glicêmicos dos animais controles e submetidos a diferentes tempos de jejum.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Os modelos experimentais utilizados neste trabalho foram ratos Wistar, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Todos os procedimentos experimentais que os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS (Goldim e Raimundo, 1997).

Foram utilizados animais machos e fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade. Os animais foram separados em grupos de 2 ou 4 e distribuídos em caixas plásticas com cobertura de maravalha, alimentados com ração padrão para ratos (Moinhos Purina, Porto Alegre-RS) e água *ad libitum*.

O ambiente em que os animais permaneciam era mantido com temperatura controlada entre 22 e 24° C e com ciclos claro/escuro de 12 horas durante todo o período experimental.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Grupos

Os animais denominados controle permaneceram nas condições normais de manutenção (temperatura e fotoperíodo controlados, água e comida *ad libitum*).

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a diferentes tempos de jejum: 48, 72 e 120 horas, no qual permaneciam com temperatura e fotoperíodo controlados, água à vontade, porém a ração era retirada e nenhuma outra forma de alimentação era oferecida.

Além disso, animais machos e fêmeas eram separados e, posteriormente, também eram submetidos ao jejum.

Os experimentos foram realizados ao longo do ano e divididos basicamente em dois grandes grupos, de acordo com a temperatura e o fotoperíodo, em grupo de inverno (experimentos realizados de maio a agosto) e grupo de verão (experimentos realizados de outubro a março).

Todos os animais foram mortos por deslocamento cervical e o índice de mortalidade foi nulo ao longo de todos os períodos experimentais realizados.

Jejum

O protocolo utilizado para a realização do jejum nos animais dos grupos experimentais foi o seguinte: a comida era retirada pela manhã e a partir daí contava-se 48, 72 e 120 horas sem alimentação. Primeiramente era retirada a comida do grupo que passaria o maior tempo de jejum, ou seja, o grupo de 120 horas. Após, retirava-se a comida do grupo de 72 horas e assim por diante até que todos os grupos terminassem ao mesmo tempo o período de jejum determinado.

Assim, atingido o tempo de jejum experimental para todos os grupos, os animais eram mortos pela manhã, e em seguida procediam-se os experimentos. O peso em gramas dos ratos controles, bem como dos ratos em

jejum era determinado antes e após os tempos de jejum especificados (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Variação no peso (em gramas) das fêmeas antes e após os períodos de jejum.

GRUPOS	Peso antes do protocolo experimental (n=12)	Peso após o protocolo experimental (n=12)	Porcentagem de variação
Controle	157,3 ± 7,3	176,5 ± 15,8	+12,2%
Jejum 48 horas	160 ± 11,3	159 ± 12,7	-0,62%
Jejum 72 horas	161 ± 9,9	151,5 ± 7,8	-5,9%
Jejum 120 horas	154,5 ± 0,7	130,1 ± 15,5	-15,8%

Valores expressos em média ± DPM.

Tabela 2. Variação no peso (em gramas) dos machos antes e após os períodos de jejum.

GRUPOS	Peso antes do protocolo experimental (n=8)	Peso após o protocolo experimental (n=12)	Porcentagem de variação
Controle	181 ± 9,5	233,6 ± 15,7	+29%
Jejum 120 horas	196 ± 17,3	147,8 ± 36,6	-24,6%

Valores expressos em média ± DPM.

Procedimentos Experimentais

Decorrido os tempos de jejum dos grupos experimentais, todos os animais, incluindo os animais controle, eram mortos e em seguida, procedia-se a coleta de sangue diretamente do coração para a dosagem da glicose. Os rins eram excisados e colocados em placas de Petri devidamente identificadas e com solução fisiológica gelada (Ringer Bicarbonato em mmol/L: NaCl 118,3; KCl 4,7; CaCl₂ + 2H₂O 2,5; MgSO₄ + 7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; pH 7,4).

Dos rins retirava-se a gordura perirrenal juntamente com a cápsula renal. Então, estes órgãos eram cortados longitudinalmente, com auxílio de um *slicer* manual, em finas fatias de aproximadamente 800 a 1000 µm de espessura. De cada rim eram obtidas de 2 a 3 fatias. Estas fatias eram separadas em córtex e medula, originando assim, duas amostras de tecido renal em cada uma das fatias. É importante salientar que, o número amostral apresentado nos resultados dos experimentos feitos com jejum é relativo ao número de amostras de tecido, ou seja, de córtex e medula, e não corresponde ao número de animais utilizados.

ESTUDO *IN VITRO*

Os tecidos, separados em córtex e medula, eram secados em papel filtro e dispostos em tubos de 5 mL contendo 1000 µL de solução fisiológica (descrita anteriormente) acrescida de 0,2 µCi de precursor gliconeogênico marcado (L-[U-¹⁴C]-Ácido Lático, Atividade Específica: 157 mCi/mmol, Amersham Life Science ou [U-¹⁴C]-Glicerol, Atividade Específica: 142 mCi/mmol, Amersham Life Science) juntamente com precursor gliconeogênico não marcado (ver adiante). Os tubos eram pesados antes e após a colocação da amostra para que fosse determinado o peso do tecido. A seguir era feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:CO₂, na proporção 95:5% v/v). Estudos prévios demonstraram que 5% de CO₂ no meio de incubação não altera significativamente a atividade gliconeogênica. Os tubos eram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante a 37° C.

Primeiramente foi realizada uma curva de tempo de incubação cuja finalidade foi detectar o melhor tempo de incubação para que fossem realizados os outros experimentos (Figura 5). Foram utilizadas fêmeas Wistar controle e foram testados os tempos de 30, 60 e 120 minutos de incubação para se avaliar o comportamento da conversão do precursor marcado em glicose. Nesta curva, não foram detectadas diferenças significativas entre os tempos e também entre as duas amostras de tecido analisadas (córtex e medula). Porém, verificou-se que no tempo de 60 minutos os valores obtidos da formação de ^{14}C Glicose a partir de ^{14}C Ácido Lático pela via gliconeogênica eram mais adequados. Por este motivo, foi estabelecido o tempo de 60 minutos para a incubação das amostras em todos os experimentos que se seguiram.

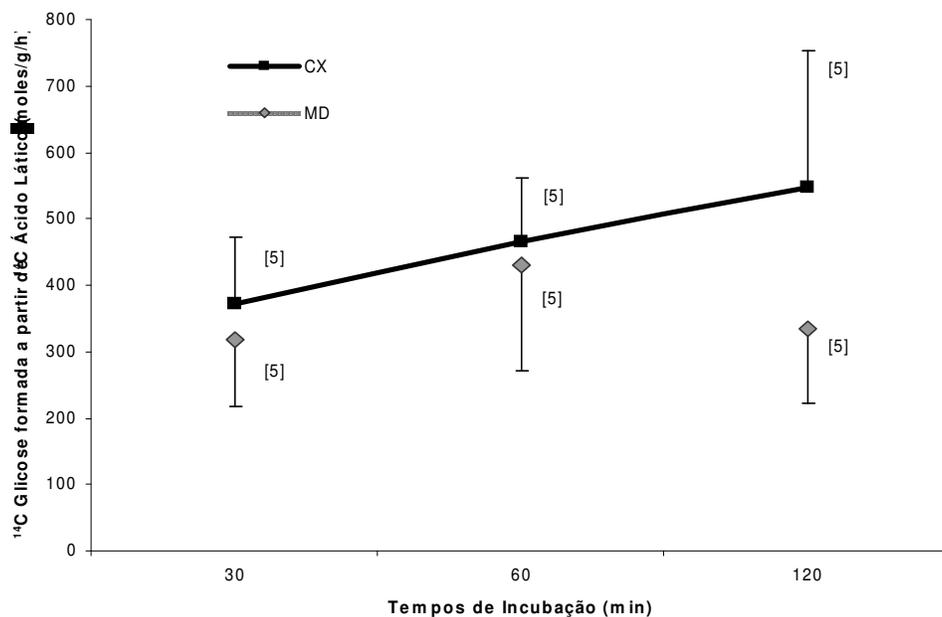


Figura 5. Formação de ^{14}C Glicose a partir de ^{14}C Ácido Lático no tecido renal de ratos controle em diferentes tempos de incubação. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**), respectivamente. Dados representados como média \pm DPM. Número amostral indicado entre colchetes.

Também com fêmeas controle foi avaliada a capacidade gliconeogênica no córtex e na medula, em presença de concentrações crescentes de precursor gliconeogênico não marcado (Figura 6). Foram adicionadas ao meio de incubação as concentrações de 2,5; 5; 10; 20 e 40 mM de ácido láctico não marcado e foram detectadas diferenças significativas da concentração de 10 mM em relação às outras, exceto em relação à concentração de 20 mM. Assim, considerou-se que a concentração de 10 mM era a mais adequada, e adotou-se esta concentração para a realização dos demais experimentos.

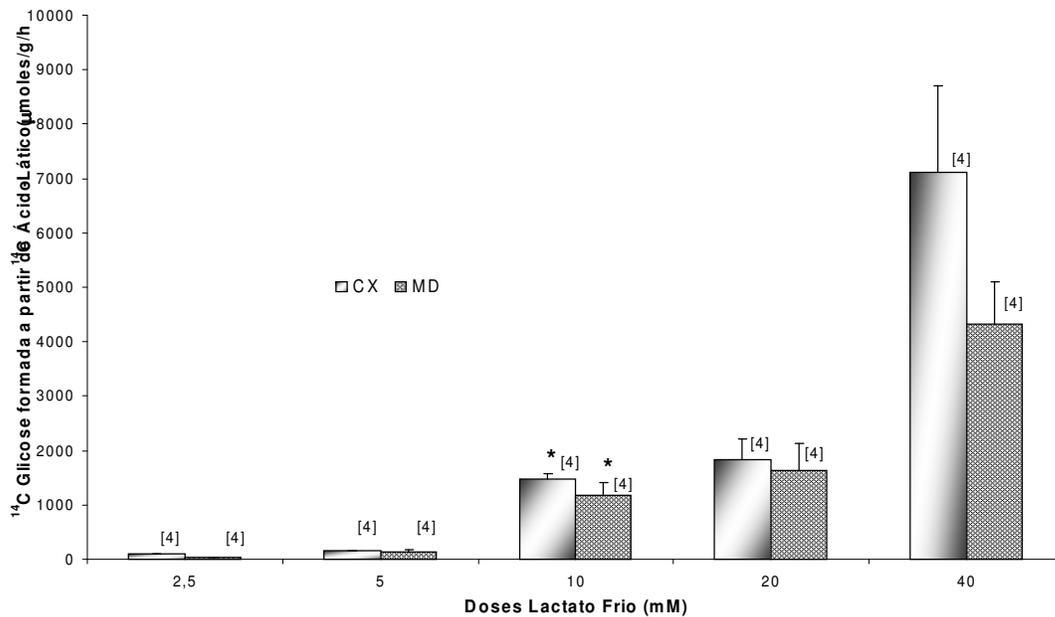


Figura 6. Formação de ^{14}C Glicose a partir de ^{14}C Ácido Láctico no tecido renal de ratos controle em diferentes concentrações de ácido láctico frio. Córtex renal (CX) e medula renal (MD), respectivamente. Dados representados como média \pm DPM. Número amostral indicado entre colchetes. *: diferença em relação às concentrações de 2,5; 5 e 40 mM ($p < 0,001$).

Ao final de cada período de incubação, os tubos eram retirados do banho e imersos imediatamente em recipiente com gelo para interromper as atividades metabólicas.

Do meio de incubação, 300 μL eram transferidos para tubos de 1,5 mL para a desproteinização com 75 μL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturado + 75 μL de ZnSO_4 a 2% (Sommogy, 1945). Após era realizada a centrifugação dos tubos a 3000 rpm (Centrífuga Eppendorf) durante 10 minutos e o sobrenadante era retirado e utilizado para a determinação da ^{14}C -Glicose formada pela via gliconeogênica.

DETERMINAÇÃO DA GLICONEOGÊNESE RENAL

A determinação da ^{14}C -Glicose foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada (placas de alumínio com sílica gel 60 MERCK), conforme método descrito por Baker e cols. (1965). Utilizou-se como solução carreadora 200 mL da mistura de solvente constituída de n-butanol: álcool etílico 95%: ácido acético 5,4% na proporção de 500:316:184 (v/v/v). A atmosfera da cuba era previamente saturada. Ao solvente era permitido correr 6 cm na placa a partir do ponto de origem, onde eram aplicadas as amostras. Foram aplicados 10 μL da amostra juntamente com 10 μL de solução padrão de glicose não marcada na concentração de 1,5 mg/mL (150 mM/g) e, como controle, foram utilizados 20 μL da solução padrão de glicose. A glicose foi revelada nas placas de cromatografia (Figura 7) com uma solução de álcool etílico 95%: anisaldeído: ácido sulfúrico concentrado, na proporção de 18:1:1 (v/v/v). As bandas arredondadas com aproximadamente 2 cm eram recortadas e colocadas diretamente em 3 mL de líquido de cintilação [Tolueno-Triton X-100 (2:1), PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)]. Durante 24 horas as amostras eram deixadas imersas no líquido de cintilação e sob refrigeração (4-7^o C). A

radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallacc) com 95% de eficiência, calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram expressos em μmoles de ^{14}C -precursor convertido em ^{14}C -Glicose $\cdot \text{g}^{-1}$ de tecido $\cdot \text{h}^{-1}$ de incubação.

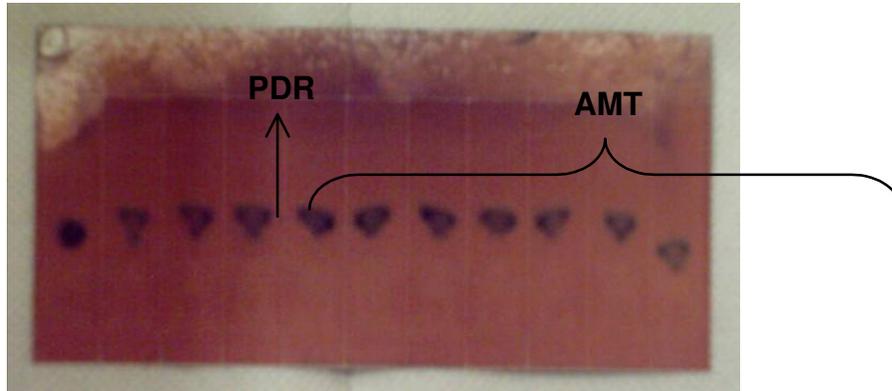


Figura 7. Placa de cromatografia com as bandas de glicose reveladas: PDR: padrão e AMT: amostras

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

As amostras de sangue que eram coletadas dos animais no momento do sacrifício eram acondicionadas em tubos de 1,5 mL previamente heparinizados (Liquemine[®]), para evitar a coagulação. A seguir realizava-se a separação do plasma e dos elementos figurados mediante centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos. O plasma era então congelado para posterior análise da glicemia.

Os níveis de glicose plasmática dos animais eram determinados pelo método de glicose-oxidase pela utilização do teste colorimétrico enzimático Glicose PAP Liquiform (Kit ENZICOLOR, LABTEST Diagnóstica). O

teste era realizado misturando um reagente de cor juntamente com 10 μ L de amostra de plasma e medido em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) com comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL e o número amostral corresponde ao número de animais os quais foram coletadas amostras de sangue.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos (\pm) o desvio padrão da média (DPM). Os dados experimentais obtidos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Para dados não pareados foi utilizado teste t de Student. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05 ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

ARTIGO CIENTÍFICO

O trabalho a seguir faz parte desta dissertação e está formatado para uma futura versão para o inglês, com adaptações, para publicação no periódico "*Metabolism*" (Anexo 1).

Influências Ligadas ao Sexo e a Sazonalidade sobre a Gliconeogênese Renal em Ratos Submetidos ao Jejum

Gabriela Cavagni; Matheus P. Jahn e Luiz Carlos Kucharski

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento de Fisiologia / Instituto de Ciências Básicas da saúde (ICBS) / UFRGS,

Título de página: **Efeito do jejum sobre a gliconeogênese renal em ratos.**

Gabriela Cavagni

R. Sarmiento Leite, 500 –

Porto Alegre – RS / Brasil

Fone: (51) 3316-3505

Fax: (51) 3316-3166

e-mail: gabrielacavagni@hotmail.com

ABSTRACT

The gluconeogenic pathway is a central one in the study of cell biosynthetic processes which, in animal tissues, lead to glucose formation from non-carbohydrate precursors. Several studies have showed that kidneys increase the contribution for glucose release in circulation during starvation. However, few works have focused on this important physiologic process in other conditions. The aim this work was thus to evaluate the seasonal and sexual influences on renal gluconeogenesis in animals submitted to prolonged fasting. The rats' kidneys were excised, sliced and separated in two parts, cortical and medullar. The samples were incubated in physiological solution with 0.2 μCi of ^{14}C -Lactic acid or ^{14}C -Glycerol. The ^{14}C -Glucose was calculated through chromatography and expressed in $\mu\text{moles/g}$ tissue/hour. In order to evaluate seasonal influence, the experiments were carried out in two periods of the year, winter and summer, and the gluconeogenic activity showed differences between the two seasons. In the winter, the gluconeogenic activity in the kidneys of control rats was significantly lower than in summer. Moreover, the animals submitted to 48 and 72 hours of starvation showed decreased renal gluconeogenesis as compared to the control group. After 120 hours of starvation, however, the gluconeogenic activity increased and was similar in the two seasons. Several aspects could be influencing these differences, such as basal metabolism and the hormonal and enzymatic variation on the pathway. In this study we also found that the renal gluconeogenic activity showed differences between male and female rats. The results indicated that glucose formation through labeled lactic acid is higher in females than in males. These

differences between male and female rats in renal gluconeogenesis are likely to be due to hormonal variation and the various factors interconnected with this variation. In conclusion, this study has contributed to elucidate questions not investigated as yet in the literature, such as the importance of seasonal and sexual variations on the renal gluconeogenic pathway in starving rats.

Keywords: glucose, renal gluconeogenesis, starvation, seasonal and sexual differences.

INTRODUÇÃO

A via gliconeogênica é uma via central no estudo dos processos biossintéticos celulares que, nos tecidos animais, leva à formação de glicose partindo de precursores não-glicídicos (Lehninger, 1995). A gliconeogênese permite a manutenção dos níveis de glicose no sangue, muito tempo depois de toda a glicose da dieta ter sido absorvida e completamente oxidada (Devlin, 2003). Segundo Moon (1988), a precisa contribuição desta via na manutenção da glicemia difere conforme a espécie e sua capacidade de adaptação bioquímica às mudanças nos níveis glicêmicos.

Somente dois órgãos no corpo humano - o fígado e o rim - possuem a capacidade de fazer com que a glicose seja liberada para a circulação como um resultado de gliconeogênese (Stumvoll e cols., 1999; Gerich e cols., 2001).

Estudos demonstraram que o lactato é o principal precursor gliconeogênico, seguido do glicerol e da glutamina. De acordo com estes dados, o lactato é responsável por aproximadamente 50% da gliconeogênese renal (Cano, 2002; Meyer e cols., 2002a, 2002b). Além do lactato, o glicerol também estimula a formação de glicose (Lietz e Bryla, 1995) e torna-se quantitativamente mais importante quando a lipólise é acelerada, tal como ocorre no diabetes e após um jejum prolongado (Stumvoll e cols., 1999; Corssmit e cols., 2001).

Até recentemente acreditava-se que o rim humano não era uma importante fonte de glicose exceto durante a acidose e o jejum prolongado (Cryer, 1994; Stumvoll e cols., 1997; Gerich, 2000; Gerich e cols., 2001; Meyer

e Gerich, 2002; Cano, 2002). Entretanto, a importância dos rins neste processo tem sido bem avaliada nas últimas décadas e propõe evidências de que o rim pode sintetizar glicose sob várias condições.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a gliconeogênese renal teria uma participação de 20-25% dos valores da glicose circulante durante o período pós-absortivo podendo o rim ser considerado um importante órgão gliconeogênico, tal qual o fígado (Stumvoll e cols., 1995, 1997, 1998, 1999; Cersosimo e cols., 1999; Meyer e cols., 1999, 2001, 2002a; Gerich, 2000; Gerich e cols., 2001; Conjard e cols., 2001; Cano, 2002; Buczkowska, 2004).

Com relação ao metabolismo da glicose, o rim pode ser considerado como dois órgãos distintos: a utilização da glicose ocorre principalmente na medula (glicólise), enquanto que a liberação (síntese/produção) ocorre principalmente no córtex (Stumvoll e cols., 1997; Gerich e cols., 2001; Cano, 2002). Esta divisão funcional é um resultado de diferenças na distribuição de várias enzimas ao longo do néfron (Stumvoll e cols., 1997; Gerich e cols., 2001). Alguns experimentos realizados em ratos demonstraram que somente as células do túbulo proximal são capazes de sintetizar glicose e que somente este segmento contém as enzimas chaves da gliconeogênese (Krebs, 1963b; Guder e Ross, 1984; Conjard e cols., 2001), porém a atividade enzimática ao longo do néfron ainda é controversa.

A literatura está repleta de estudos sobre as mudanças circadianas, tais como o ritmo circadiano da temperatura corporal e muitas outras variáveis, porém pouco se sabe sobre as variações sazonais. Estas alterações foram estudadas sobre a atividade enzimática em mamíferos, como as constatadas por Belló-Klein (2000), estudando o estresse oxidativo e por

Sarykovich e cols. (1996), estudando as enzimas glicolíticas. Além disso, a liberação de hormônios tais como o cortisol (Walker e cols., 1997), insulina e glucagon (Cuendet e cols., 1975) também teria influência sazonal. Assim, ocorre a necessidade de se considerar estas variações sazonais em outros processos fisiológicos, tais como a via gliconeogênica.

Semelhante às variações sazonais, as diferenças sexuais sobre a via gliconeogênica pouco são relatadas na literatura. Gambling e cols. (2004) demonstraram em ratos alterações sexuais nos níveis de mRNA dos canais de Na^+ nos rins. Rinn e cols. (2004) observaram que a expressão gênica nos rins de camundongos também sofre influências sexuais. Fekete e cols. (2003) mostraram que os danos estruturais no tecido renal após injúria são menos severos em fêmeas do que em machos. Além disso, Perchère-Bertisch e Burnier (2004), Reckelhoff (1998) e Reyes e cols. (1998) sugerem a influência dos hormônios sexuais sobre as alterações encontradas em seus estudos.

Baseado nestas evidências, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação dos rins na gliconeogênese durante o jejum prolongado com relação à sazonalidade e às influências ligadas ao sexo sobre esta via. A partir desse estudo, contribuimos com alguns aspectos ainda não relatados sobre a gliconeogênese renal e sua importância na manutenção da homeostase da glicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Todos os procedimentos experimentais a que os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS (Goldim e Raimundo, 1997).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais denominados controle permaneceram nas condições normais de manutenção (temperatura controlada entre 22 e 24^o C, ciclos claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*).

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a diferentes tempos de jejum: 48, 72 e 120 horas, no qual permaneciam com temperatura e fotoperíodo controlados, água à vontade, porém a ração era retirada e nenhuma outra forma de alimentação era oferecida.

Além disso, animais machos e fêmeas eram separados e, posteriormente, também eram submetidos ao jejum.

Os experimentos foram realizados ao longo do ano e divididos basicamente em dois grandes grupos, de acordo com a temperatura e o

fotoperíodo, em grupo de inverno (experimentos realizados de maio a agosto) e grupo de verão (experimentos realizados de outubro a março).

Todos os animais foram mortos por deslocamento cervical e o índice de mortalidade foi nulo ao longo de todos os períodos experimentais realizados.

Decorrido os tempos de jejum dos grupos experimentais, os rins de todos os animais, incluindo os animais controle, eram excisados e colocados em placas de Petri devidamente identificadas e com solução fisiológica gelada (Ringer Bicarbonato em mmol/l: NaCl 118,3; KCl 4,7; CaCl₂ + 2H₂O 2,5; MgSO₄ + 7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; pH 7,4). Então, estes órgãos eram cortados longitudinalmente, com auxílio de um *slicer* manual, em finas fatias de aproximadamente 800 a 1000 µm de espessura. De cada rim eram obtidas de 2 a 3 fatias. Estas fatias eram separadas em amostras de córtex e de medula. O número amostral apresentado nos resultados dos experimentos é relativo ao número de amostras de tecido.

ESTUDO *IN VITRO*

Os tecidos, separados em córtex e medula, eram secados em papel filtro e dispostos em tubos de 5 mL contendo 1000 µL de solução fisiológica acrescida de 0,2 µCi de precursor gliconeogênico marcado (L-[U-¹⁴C]-Ácido Láctico, Atividade Específica: 157 mCi/mmol, Amersham Life Science ou [U-¹⁴C]-Glicerol, Atividade Específica: 142 mCi/mmol, Amersham Life Science) juntamente com 10 mM (concentração determinada previamente) de precursor gliconeogênico não marcado e após determinado o peso do tecido. A

seguir era feita a substituição da fase gasosa por carbogênio ($O_2:CO_2$, na proporção 95:5% v/v). Os tubos eram fechados e incubados por 60 minutos (curva de tempo realizada previamente) em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante à 37° C.

Após a incubação, as amostras foram processadas segundo Somogy (1945) e o sobrenadante retirado para a determinação da ^{14}C -Glicose formada pela via gliconeogênica.

A determinação da ^{14}C -Glicose foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada (Baker e cols., 1965). A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallacc) e os resultados foram expressos em μ moles de ^{14}C -precursor convertido em ^{14}C -Glicose . g^{-1} de tecido . h^{-1} de incubação.

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

Os níveis de glicose plasmática dos animais eram determinados pelo método de glicose-oxidase pela utilização do teste colorimétrico enzimático Glicose PAP Liquiform (Kit ENZICOLOR, LABTEST Diagnóstica). Os resultados foram expressos em mg/dL e o número amostral corresponde ao número de animais os quais foram coletadas amostras de sangue.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos (\pm) o desvio padrão da média (DPM). Os dados experimentais obtidos foram

analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação Student-Newman-Keuls (SNK). Para dados não pareados foi utilizado teste t de Student. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05 ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1: Efeito do Jejum e da Variação Sazonal sobre a Gliconeogênese Renal a partir de ¹⁴C-Ácido Lático

Neste experimento, realizado com fêmeas de ratos Wistar, dois parâmetros foram analisados: o efeito do jejum e da variação sazonal sobre a via gliconeogênica renal. Para isto, foram utilizados animais controles e animais submetidos ao protocolo de jejum citado anteriormente. Estes quatro grupos de animais (controle, 48, 72 e 120 horas de jejum) foram analisados em duas estações do ano, no inverno (Figura 1) e no verão (Figura 2). Verificou-se que no inverno e no verão ocorrem diferenças entre os quatro grupos de animais. No inverno, são significativas as mudanças ocorridas no córtex às 120 horas de jejum comparado ao grupo controle e na medula entre os grupos controle, 48 e 72 horas de jejum. Durante o verão não foram observadas diferenças entre os grupos de jejum em relação ao grupo controle. Porém, quando comparados estes resultados com os resultados obtidos no inverno esta mudança mostrou-se significativa no córtex e na medula nos grupos controle e 48 horas de jejum e na medula somente durante as 72 horas de jejum, sendo os resultados de verão maiores do que os de inverno. É importante salientar que neste experimento também foram detectadas diferenças entre os tecidos (córtex e medula) nos tempos de 72 e 120 horas de jejum durante o inverno e no grupo controle e 120 horas de jejum durante o verão.

EXPERIMENTO 2: Efeito do Jejum sobre a Gliconeogênese Renal em Machos e Fêmeas

Este experimento demonstra a comparação da atividade gliconeogênica entre ratos Wistar machos (Figura 3) e fêmeas (Figura 4) separados em dois grupos: animais controle e submetidos a 120 horas de jejum. Tanto nos machos quanto nas fêmeas foram observadas diferenças significativas entre os tecidos (córtex e medula) nos dois grupos, controle e 120 horas de jejum. Não houve diferença na formação de glicose no córtex e na medula entre o grupo controle e o grupo jejum nos machos e nas fêmeas. Quando comparados machos e fêmeas entre si, observou-se que os valores de formação de ^{14}C -Glicose nas fêmeas eram muito superiores àqueles encontrados nos machos. Essa diferença mostrou-se significativa no córtex e na medula do grupo controle e do grupo de 120 horas de jejum.

EXPERIMENTO 3: Avaliação da Capacidade Gliconeogênica a partir de ^{14}C -Glicerol

Neste experimento foram utilizadas fêmeas Wistar controle e submetidas a 120 horas de jejum (Figura 5). Os parâmetros utilizados no experimento, tais como tempo de incubação e concentração de substrato não marcado, foram os mesmos utilizados nos experimentos feitos com ácido láctico. Os resultados obtidos demonstraram diferença significativa na medula entre o grupo controle e o grupo de jejum. Os dois tecidos, córtex e medula apresentaram diferenças entre si tanto no grupo controle quanto no grupo de

120 horas de jejum. Foram comparadas também as atividades gliconeogênicas a partir dos dois precursores, lactato e glicerol. Assim, encontrou-se diferença entre as amostras de medula no grupo controle e 120 horas de jejum do experimento feito a partir do glicerol comparado ao experimento feito com lactato. As amostras de córtex não apresentaram diferenças significativas entre os dois experimentos. Entretanto, é importante salientar que os valores encontrados na formação de ^{14}C -Glicose a partir de ^{14}C -Glicerol referem-se à atividade gliconeogênica renal durante o verão e foram comparados aos dados da formação de glicose a partir de ^{14}C -Ácido Lático na mesma estação do ano.

Em todos os experimentos realizados, o córtex renal apresentou valores de formação de ^{14}C -Glicose superiores aos valores obtidos na medula renal.

EXPERIMENTO 4: Avaliação da Glicemia

Para avaliar a glicemia foram coletadas amostras de sangue de animais controle e também de animais submetidos a 48, 72 e 120 horas de jejum. Como pode ser visto na Figura 6, observou-se diferença significativa nos valores de glicemia somente nos animais do grupo submetido a 120 horas de jejum, demonstrando, então, a importância da via gliconeogênica durante este período.

RESULTADOS

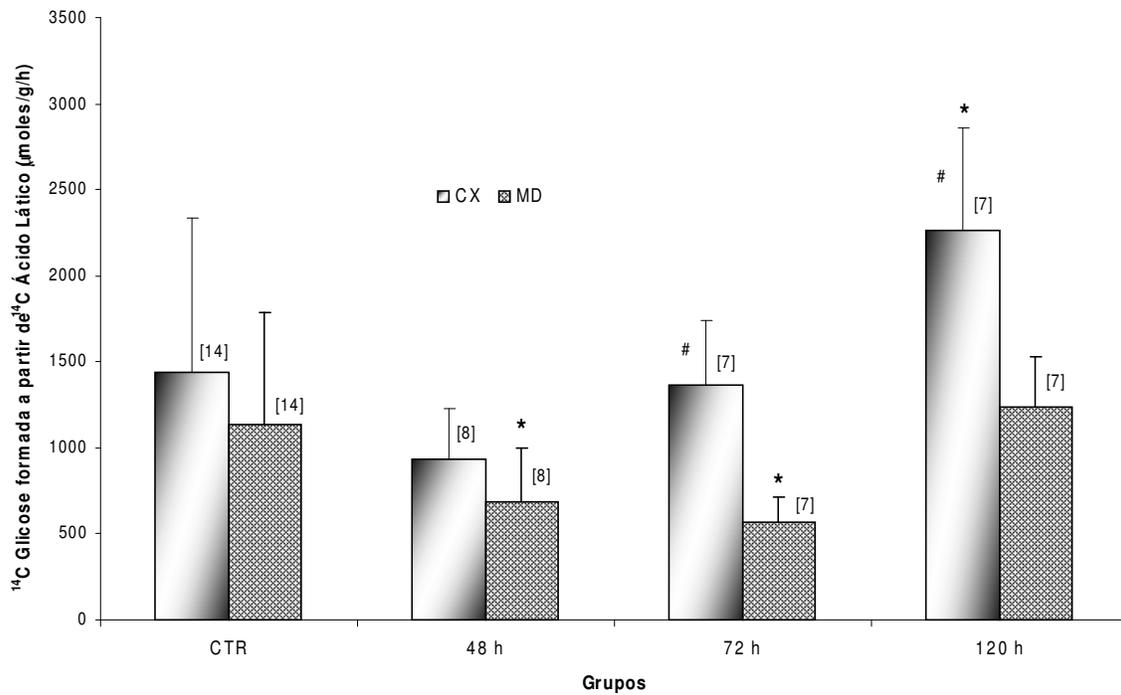


Figura 1. Síntese de ^{14}C Glucose a partir de ^{14}C Ácido Lático no tecido renal de ratos controle e submetidos a diferentes tempos de jejum durante o inverno. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**); **CTR**: controle. Dados representados como média \pm DPM. Número amostral indicado entre colchetes. *: diferença em relação ao controle; #: diferença entre os dois tecidos (córtex e medula) ($p < 0,05$).

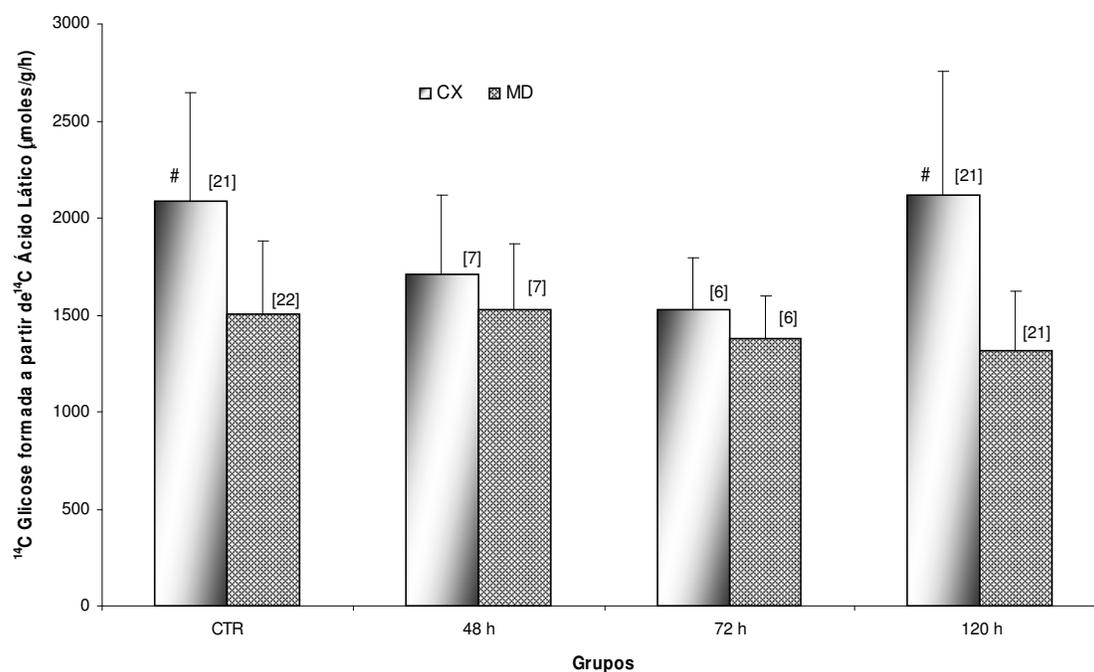


Figura 2. Síntese de [^{14}C]Glicose a partir de [^{14}C]Ácido Lático no tecido renal de ratos controle e submetidos a diferentes tempos de jejum durante o verão. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**), **CTR**: controle. Dados representados como média \pm DPM. Número amostral indicado entre colchetes. #: diferença entre os dois tecidos (córtex e medula) ($p < 0,05$).

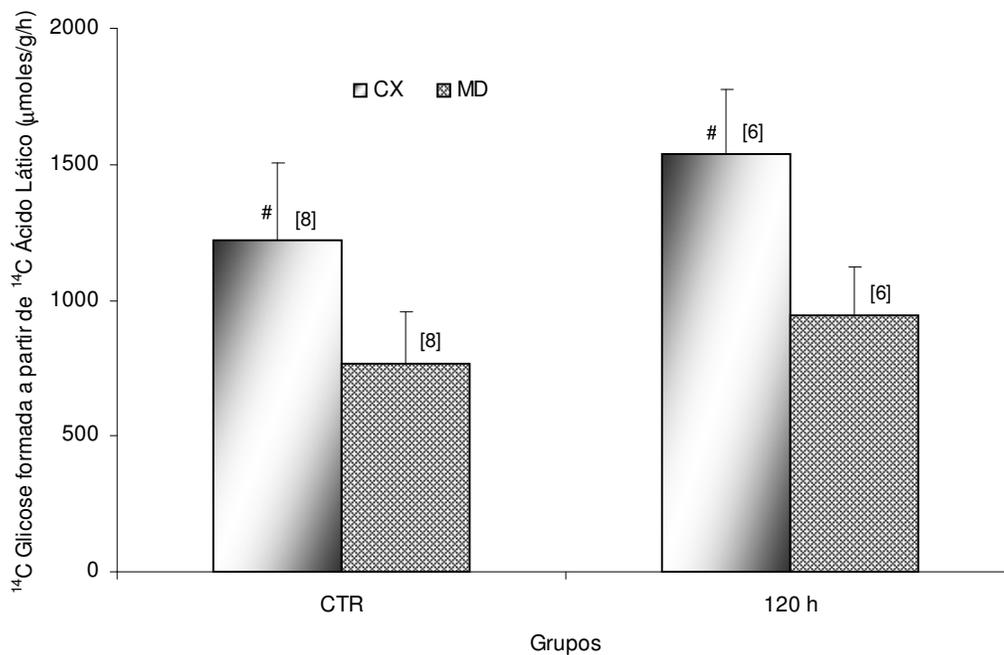


Figura 3. Síntese de [^{14}C]Glicose a partir de [^{14}C]Ácido Lático no tecido renal de ratos machos controle e submetidos a 120 horas de jejum. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**), **CTR**: controle. Dados representados como média \pm DPM. Número amostral indicado entre colchetes. #: diferença entre os dois tecidos (córtex e medula) ($p < 0,05$).

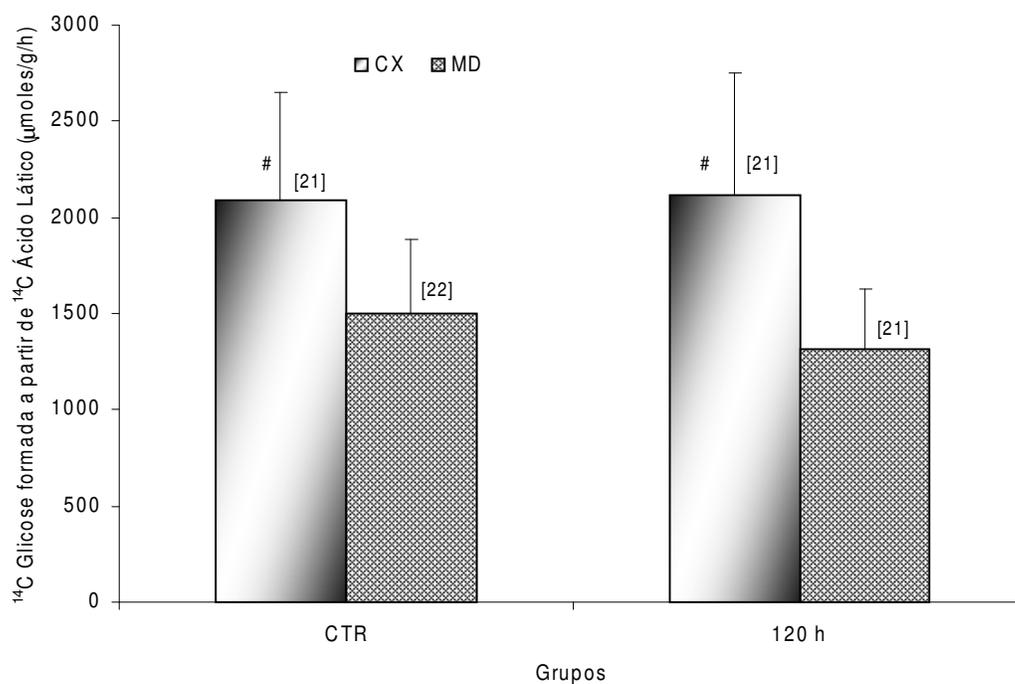


Figura 4. Síntese de [¹⁴C]Glicose a partir de [¹⁴C]Ácido Lático no tecido renal de fêmeas controle e submetidas a 120 horas de jejum. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**), **CTR**: controle. Dados representados como média ± DPM. Número amostral indicado entre colchetes. #: diferença entre os dois tecidos (córtex e medula) (p<0,05).

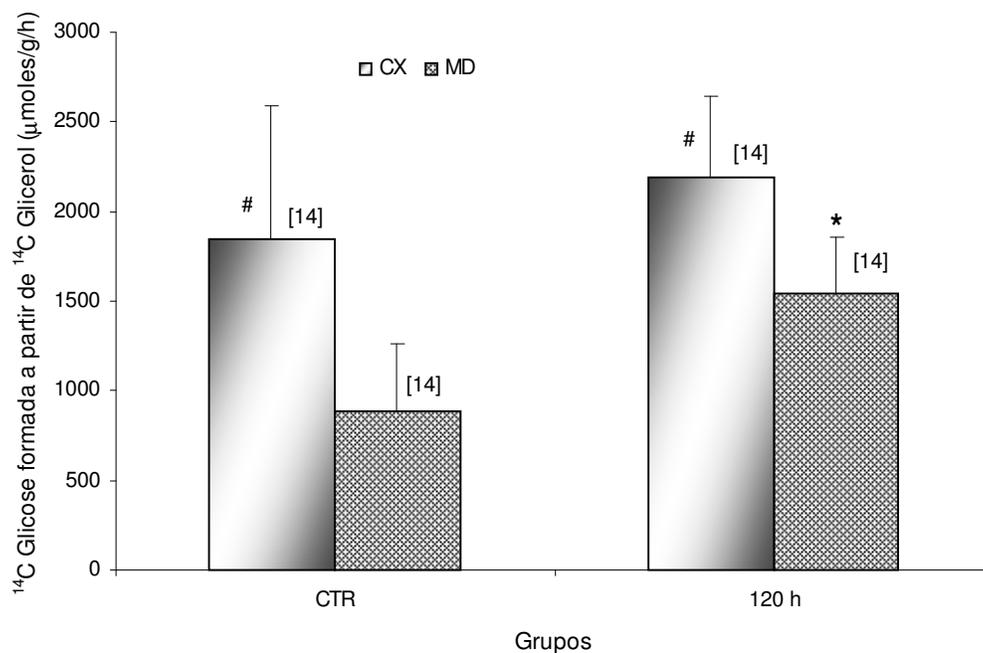


Figura 5. Síntese de [^{14}C]Glicose a partir de [^{14}C]Glicerol no tecido renal de ratos controle e submetidos a 120 horas de jejum. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**), **CTR**: controle. Dados representados como média \pm DPM. Número amostral indicado entre colchetes. *: diferença em relação ao controle; #: diferença entre os dois tecidos (córtex e medula) ($p < 0,05$).

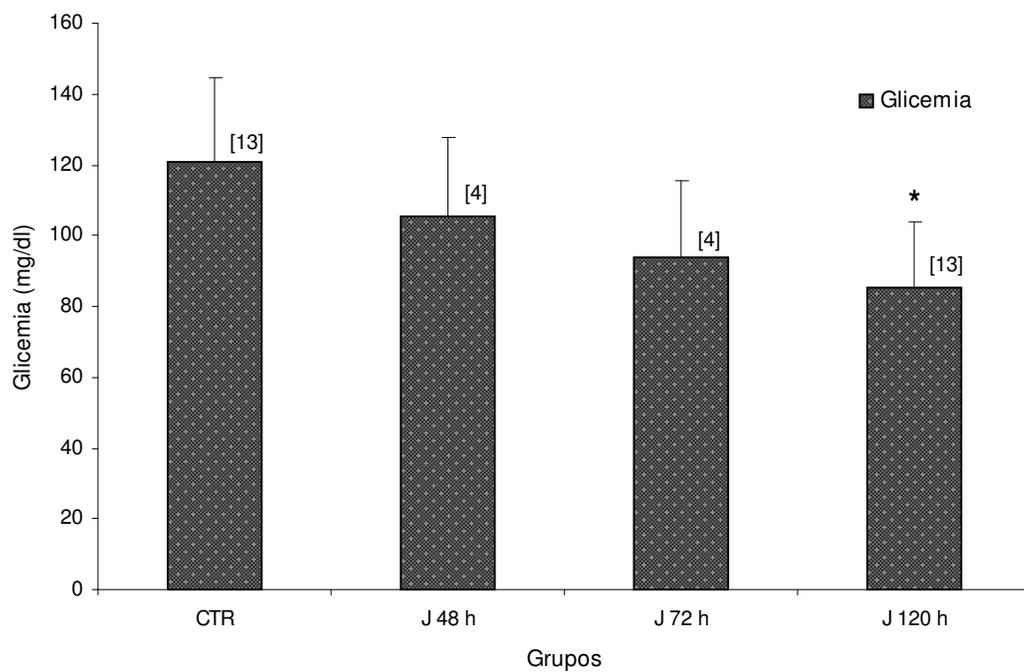


Figura 6. Valores de glicemia de ratos controle e submetidos a diferentes tempos de jejum expressos em mg/dL. Dados representados como média \pm DPM. Número de animais indicado entre colchetes. *: diferença em relação ao controle ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Até alguns anos atrás acreditava-se que o fígado era a única fonte de glicose do organismo, exceto em condições de acidose ou jejum prolongado, entretanto, este conceito foi revisto. Muitos estudos realizados durante as décadas passadas têm proposto o rim como um importante órgão gliconeogênico (Bergman e Drury, 1938; Teng, 1954; Landau, 1960; Krebs, 1963a, 1963b, 1963c; Aber, 1966). Neste trabalho, também pudemos constatar a capacidade deste órgão em captar substratos gliconeogênicos e transformá-los em glicose livre (Figura 1 a 5). Diversos autores propuseram a importância dos rins comparada à importância hepática para a gliconeogênese, já que praticamente toda a glicose liberada pelos rins decorre de atividade gliconeogênica (Stumvoll e cols., 1997, 1998, 1999; Gerich, 2000; Gerich e cols., 2001; Meyer e cols., 2002a, 2002b; Gustavson e cols., 2004). Estes estudos basearam-se na observação da maquinaria enzimática presente nos rins e também no aporte sanguíneo para este órgão, que se reflete na disponibilidade de substratos para a via (Meyer e cols., 1998; Cano, 2002). A partir disso, nossos resultados evidenciam que os rins não são apenas capazes de ativar a via gliconeogênica como também possuem grande importância na manutenção da homeostasia da glicose no organismo (Figura 6). Este estudo demonstrou também que os rins contribuem para a síntese de glicose pela via gliconeogênica em animais alimentados, além da importante participação do órgão para a liberação de glicose durante estados fisiológicos como o jejum prolongado (Figuras 1 a 5).

Em todos os resultados descritos neste trabalho foi observada maior participação do córtex renal na produção de glicose, demonstrada através da maior quantidade de glicose formada a partir do substrato oferecido. Estes resultados estão de acordo com trabalhos feitos por Stumvoll e cols. (1997) e Gerich e cols. (2001), que relatam a maior capacidade gliconeogênica no córtex, especialmente pela presença das enzimas chaves da gliconeogênese, ressaltando o córtex como uma região de atividade predominantemente gliconeogênica.

Entretanto, foi verificado que a medula renal também é capaz de produzir glicose. Este resultado diverge de achados anteriores (Schmidt e Guder, 1976; Burch e cols., 1978; Stumvoll e cols., 1997; Gerich e cols., 2001), que revelam que a medula, sendo pobremente vascularizada e não possuindo enzimas gliconeogênicas nem glicose 6-fosfatase, não seria responsável pela liberação de glicose, mas sim um local exclusivamente de utilização pela via glicolítica. Contudo, ainda existem muitas controvérsias da verdadeira participação da medula na manutenção da glicose sistêmica, sobretudo na distribuição das enzimas tanto glicolíticas quanto gliconeogênicas ao longo do néfron. A atividade da PEPCK, enzima chave da gliconeogênese estaria relacionada ao túbulo proximal, enquanto que a glicose 6-fosfatase, enzima responsável pela liberação de glicose livre, relacionada ao néfron distal (Schmidt e Guder, 1976; Burch e cols., 1978; Guder e Ross, 1984).

Neste trabalho, a quantificação de glicose produzida por meio de atividade gliconeogênica na medula, poderia estar relacionada ao maior número de néfrons justamedulares nos rins desta espécie animal (Swenson e Reece, 1996). A presença deste tipo de néfron poderia indicar uma produção

de glicose na medula, já que o túbulo proximal é apontado como o maior sítio de produção de glicose (Krebs e cols., 1963b; Guder e Ross, 1984; Conjard e cols., 2001) e se encontra no limite entre a zona cortical e medular. Outra questão que deve ser considerada é o fato de que a atividade gliconeogênica avaliada neste trabalho foi verificada em fatias de tecido renal, separadas em córtex e medula. Assim, cada zona é uma mistura de diferentes tipos de células, podendo as células que contém maior atividade gliconeogênica estarem presentes em amostras de córtex e de medula.

Além disso, a técnica de fluorescência para avaliação da atividade enzimática utilizada por outros autores (Schmidt e Guder, 1976; Burch e cols., 1978; Guder e Ross, 1984) pode não ter sido suficientemente sensível a ponto de detectar a atividade das enzimas que fazem parte da via gliconeogênica em outros pontos do néfron além do túbulo proximal. Atualmente, a metodologia utilizada para avaliação da atividade enzimática é feita por meio de técnicas radioativas e/ou técnicas de biologia molecular, sendo estas mais sensíveis do que os métodos fluorescentes (Sartori e cols., 2000; Xavier e cols., 2002; Festuccia e cols., 2003; Schein e cols., 2005).

Porém, independente dos fatores citados, observamos a existência de uma produção de glicose na medula renal. Entretanto, é necessário ressaltar que a contribuição deste tecido para a manutenção da glicose sistêmica ocorre em menor grau do que a contribuição atribuída ao córtex para desempenhar esta função. Desse modo, sugere-se que a medula renal produza glicose pela via gliconeogênica, porém utilize parte desta glicose para a sua própria manutenção em diversos processos de transportes celulares que necessitam de energia.

Entre os precursores da via gliconeogênica no rim de humanos, o lactato é considerado por muitos autores o substrato preferencial, seguido pelo glicerol e pela glutamina (Corssmit e cols., 2001; Cano, 2002; Meyer e cols., 2002a; Bellomo, 2002). Assim, a formação de glicose observada em nossos experimentos (Figuras 1 a 4) teve como substratos o lactato marcado (^{14}C -Ácido Lático) e o glicerol marcado (^{14}C -Glicerol) (Figura 5).

A síntese de ^{14}C -Glicose no tecido renal a partir do lactato oferecido no meio de incubação foi observada, além da maior captação deste substrato e formação de glicose pelo córtex. De acordo com Bellomo (2002), durante condições de acidose, jejum ou na simples ausência de glicose, a medula renal gera lactato por meio da glicólise. O córtex simultaneamente capta o lactato liberado pela medula e utiliza-o para a oxidação e gliconeogênese. Assim, sugere-se a presença de um sistema recíproco entre córtex/medula e glicose/lactato. Estudos realizados por Cersosimo e cols. (1998, 2000b, 2000c) também relatam a importância do lactato na gliconeogênese renal. Aproximadamente 40% da produção renal de glicose no estado pós-absortivo e 60% da produção renal de glicose durante a hipoglicemia decorre da captação renal de lactato. Além disso, o lactato se torna o principal precursor dentro de uma grande variedade de condições fisiológicas, tais como acidose, hipoglicemia e durante o jejum prolongado e ainda contribui significativamente para a manutenção da glicemia a partir de outros substratos (Bellomo, 2002; Meyer e cols., 2002b). Sendo assim, nossos dados, de acordo com a literatura, demonstraram que o lactato é o principal precursor gliconeogênico nos rins de ratos, particularmente sob condições de

jejum prolongado (Figuras 1 a 4), contribuindo para a homeostasia da glicose durante este período.

A capacidade de síntese de glicose nos rins por meio da atividade gliconeogênica a partir do lactato foi bem demonstrada nos experimentos 1 e 2, porém ocorreu a necessidade de verificar como esta via se comportaria na presença de glicerol marcado (^{14}C -Glicerol) como precursor (Experimento 3). Foi proposto que o glicerol torna-se quantitativamente mais importante quando a lipólise é acelerada, tal como ocorre no diabetes e após um jejum prolongado (Stumvoll e cols., 1999; Corssmit e cols., 2001). Assim, foi verificada a existência de formação de glicose pela via gliconeogênica renal a partir deste substrato e também sua participação sob condições de jejum prolongado (Figura 5). O glicerol, tal como o lactato, também se mostrou um precursor importante para a via gliconeogênica. Os resultados não demonstraram diferenças em relação à formação de glicose no córtex renal quando foi oferecido lactato ou glicerol como substrato. Entretanto, a formação de glicose na medula foi significativamente diferente entre os dois precursores. Os valores mostraram que a formação de glicose na medula renal de ratos controles quando o glicerol foi utilizado como precursor foi menor do que os valores constatados na medula quando o lactato foi utilizado. Já durante o jejum, esta relação se inverte. A formação de glicose na medula a partir de glicerol foi maior do que a formação de glicose a partir de lactato. Este dado coloca em evidência a importância do glicerol durante o jejum prolongado e ainda propõe um aumento na contribuição da medula para a síntese de glicose durante o jejum a partir deste substrato.

Desse modo, os resultados apresentados demonstram a atividade gliconeogênica renal a partir de dois substratos preferenciais, lactato e glicerol, e também evidenciam a importância dos rins na manutenção da glicemia, especialmente durante o jejum prolongado (Figuras 1 a 5).

Existem inúmeros trabalhos na literatura relatando a variação circadiana sobre o metabolismo, porém, pouco se sabe sobre as variações sazonais. Assim, a via gliconeogênica nos rins foi investigada ao longo das estações do ano e constatou-se a influência do inverno e do verão sobre esta via. Está relatado que as mudanças circadianas dependem em grande parte do ciclo claro/escuro, enquanto alterações sazonais dependem em maior grau das condições ambientais, tais como temperatura, umidade e pressão atmosférica. Assim, os mecanismos básicos das mudanças durante um dia e ao longo do ano podem diferir significativamente. No presente estudo, tanto o ciclo claro/escuro quanto a temperatura foram controlados, visto que os animais utilizados permaneciam sob estas condições no biotério e, portanto, as alterações observadas não podem ser atribuídas diretamente a estes fatores.

Neste trabalho, foram detectadas mudanças no perfil gliconeogênico nos rins de animais submetidos ao jejum ao longo do ano. A atividade gliconeogênica demonstrada durante o inverno difere daquela demonstrada durante o verão. No inverno, a atividade gliconeogênica nos rins de ratos controles é significativamente menor do que no verão. Além disso, os animais submetidos a 48 e 72 horas de jejum apresentaram um decréscimo na atividade gliconeogênica quando comparados ao grupo controle. Já durante um período maior de jejum, às 120 horas, a atividade gliconeogênica aumenta e é semelhante entre as duas estações. Isto pode ser explicado pelo fato dos

animais possuem um mecanismo de regulação do metabolismo basal, que, faz decrescer a atividade metabólica durante o jejum (Fuglei e Oritsland; 1999), inclusive a via gliconeogênica, com o objetivo de poupar energia. Este fato se torna mais acentuado durante o inverno (Figura 1), pois os estoques energéticos se encontram deficitários, o que não ocorre no verão (Figura 2). Cuendet e cols. (1975) demonstraram que, durante o inverno, os camundongos magros mobilizavam gordura que era insuficiente para permitir sobrevivência ao longo de três dias de jejum. Em contraste, no verão, o mesmo animal sobreviveu durante sete dias e demonstrou evidências de grande mobilização lipídica, cetose e capacidade de conservar proteína. Estes dados foram atribuídos às mudanças ocorridas no metabolismo hormonal particularmente em diferentes estações do ano. Colaborando com estas evidências, nossos dados indicam uma maior capacidade gliconeogênica durante o verão, onde a formação de glicose demonstrou-se aumentada em comparação aos resultados de inverno.

A variação hormonal relatada em alguns estudos (Cuendet e cols., 1975; Amat e Torres, 1993; Walker e cols., 1997) também pode ser considerada como um aspecto que pode influenciar a atividade gliconeogênica. Sabe-se que nesta via estão envolvidos muitos hormônios contrarreguladores e se estes podem variar em relação as diferentes estações do ano, a via gliconeogênica conseqüentemente sofrerá mudanças em ritmo circannual.

Um outro fator que deve ser levado em consideração é o fato de que as enzimas gliconeogênicas podem possuir atividade diferenciada ao longo do ano. Starykovich e cols. (1996), observaram em ratos que as enzimas glicolíticas exibem alterações ao longo do ano. Belló-Klein e cols. (2000)

também demonstraram a existência de alterações na atividade das enzimas antioxidantes em coração e fígado de ratos de laboratório (condições ambientais controladas) ao longo das estações. Assim, claramente está demonstrado que as estações do ano influenciam a atividade enzimática em mamíferos. Entretanto, devemos lembrar que os animais utilizados neste estudo também permaneciam sob ciclo claro/escuro e temperatura controlada, não sendo estes fatores responsáveis pelas alterações encontradas neste trabalho. Assim, sugere-se que os ritmos biológicos sejam regulados por relógios biológicos internos. Desse modo, algumas mudanças na atividade enzimática e conseqüentemente na via gliconeogênica podem ser atribuídas a algum tipo de memória genômica responsável pela adaptação a diferentes estações do ano nesses animais.

Portanto, as diferenças na gliconeogênese renal observadas no inverno e no verão podem ser atribuídas a diversos fatores e sugerem a necessidade de considerar as variações sazonais como tendo um importante papel nesta via metabólica.

Além das variações relacionadas à sazonalidade encontradas na via gliconeogênica, também constatou-se alterações ligadas ao sexo. Muitos estudos relatam diferenças entre machos e fêmeas sobre o metabolismo, especialmente no que diz respeito à fisiologia renal (Reckelhoff, 1998; Reyes e cols., 1998; Noonan e Banks, 2000; Fekete e cols., 2003; Rinn e cols., 2004; Gambling e cols., 2004). Neste trabalho, verificou-se que a formação de glicose pela via gliconeogênica nos rins apresentou diferenças entre ratos machos e fêmeas. Em primeiro lugar, observou-se diferença significativa entre os dois tecidos, córtex e medula, nos grupos controles e nas 120 horas de jejum, tanto

para os machos quanto para as fêmeas. Em segundo lugar, não foram constatadas diferenças entre o grupo de jejum em relação ao grupo controle em machos e fêmeas. Porém, os resultados demonstram que a formação de glicose através de captação de lactato marcado nas fêmeas é significativamente maior do que nos machos (Figuras 3 e 4).

Cabe ressaltar ainda que os valores encontrados nas fêmeas do grupo controle são superiores àqueles encontrados em machos após 120 horas de jejum e esta diferença está expressa no tecido cortical e também no tecido medular. Isto pode provavelmente ser devido a fatores hormonais ligados ao sexo e relacionados à atividade gliconeogênica nos rins. Sabe-se que a testosterona possui efeito em muitas das atividades celulares nos rins, entretanto, os hormônios femininos ainda não possuem um efeito claro (Reyes e cols., 1998). A testosterona também possui um efeito estimulatório do sistema renina-angiotensina, e isto pode refletir diferenças entre homens e mulheres no que diz respeito à regulação da pressão arterial (Perchère-Bertisch e Burnier, 2004).

Além do mais, não só o estrógeno ou a testosterona possuem um efeito por si, mas também a relação estrógeno/testosterona pode ser responsável por alterações fisiológicas entre os sexos. A partir disso, Fekete e cols. (2003) demonstraram em experimentos de injúria renal que a bomba Na^+/K^+ -ATPase é mais estável em fêmeas e o mRNA para a expressão de proteínas da subunidade α_1 e a atividade da bomba são mais altos do que em machos. Estas diferenças sexuais específicas na bomba Na^+/K^+ -ATPase podem ser características adicionais importantes na modulação da fisiologia renal entre ambos os sexos. Gambling e cols. (2004) sugeriu que o

funcionamento renal dos canais de Na^+ é diferente entre homens e mulheres e demonstrou em ratos que os níveis de mRNA dos canais de Na^+ são mais altos em fêmeas do que em machos, levando a uma série de conseqüências.

Desse modo, sugerimos uma maior capacidade gliconeogênica nas fêmeas e também uma maior adaptação delas ao jejum, pois os resultados não mostram diferenças na formação de glicose mesmo após um período de jejum prolongado, sendo semelhantes aos valores controles (Figura 4). Em contraste, os machos apresentam uma capacidade gliconeogênica menor do que as fêmeas, além de um aumento não significativo na formação de glicose através da via durante o período de jejum ao qual foram submetidos (Figura 3). Assim, acredita-se que os machos possam aumentar significativamente a formação de glicose a partir da gliconeogênese se fossem submetidos a um período de jejum maior do que o realizado, o que não ocorreria nas fêmeas. Supõe-se, a partir deste fato, que os machos possuem uma capacidade de adaptação menor ao estresse provocado pelo jejum, porém outros estudos que investiguem melhor esta capacidade devem ser realizados.

Portanto, neste trabalho, está estabelecido que existem diferenças entre ratos machos e fêmeas no perfil gliconeogênico nos rins e que estas diferenças podem estar relacionadas em grande parte à variação hormonal e ao conjunto de fatores interligados a esta variação.

Também é importante mencionar que este estudo teve como objetivo verificar a existência ou não de diferenças entre machos e fêmeas, por isso, a fase do ciclo em que as fêmeas se encontravam durante os procedimentos experimentais não foi determinada.

Em conclusão, podemos afirmar que os rins possuem um papel chave na regulação da homeostasia da glicose no organismo, através da formação e liberação de glicose para a circulação. Podemos destacar a grande participação do córtex renal e em menor grau a participação medular na produção de glicose. A via gliconeogênica também demonstrou-se ativada em presença de dois precursores distintos, lactato e glicerol, especialmente nas condições de jejum prolongado. Este trabalho também contribuiu para o esclarecimento de algumas questões até então não investigadas, como a variação sazonal e as alterações sexuais na via gliconeogênica nos rins de ratos submetidos ao jejum. A partir dos resultados expostos, surgem perspectivas para novos trabalhos nas quais se incluem a avaliação da expressão e da atividade enzimática no córtex e na medula renal durante o jejum, uma questão ainda conflitante na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aber G, Morris L, Housley E: Gluconeogenesis by the human kidney. *Nature* 212: 1589-1590, 1966

Amat J, Torres A: Cirannual rhythm in the effects of stress on the humoral immune response of the rat. *Neurosci Lett* 160 (2): 190-192, 1993

Baker N, Huebotter RJ, Schotz MC: Analysis of glucose-¹⁴C in tissues using thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry* 10: 227-235, 1965

Belló-Klein A, Morgan-Martins MI, Barp J, et al: Circaannual changes in antioxidants and oxidative stress in the heart and liver in rats. *Comp Biochem and Physiol* 126: 203-208, 2000

Bellomo R: Bench-to bedside review: Lactate and the kidney. *Critical Care* 6 (4): 322-326, 2002

Bergman H, Drury DR: The relationship of kidney function to the glucose utilization of the extra abdominal tissues. *Am J Physiol* 124: 279-284, 1938

Buczowska EO: The role of the human kidney for glucose homeostasis. *Wiad Lek* 57 (3-4): 158-160, 2004

Burch HB, Narins RG, Chu C, et al: Distribution along the rat nephron of three enzymes of gluconeogenesis in acidosis and starvation. *Am J Physiol* 235(3): F246-F253, 1978

Burelle Y, Fillipi C, Péronnet F, et al: Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E35-E42, 2000

Cano, N: Bench-to-beside review: Glucose production from the kidney. *Critical Care* 6: 317-321, 2002

Castellini MA, Rea LD: The biochemistry of natural fasting at its limits. *Experientia* 48: 575-582, 1992

Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J: Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276 (39): E78-E84, 1999

Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J: Regulation of splanchnic and renal substrate supply by insulin in humans. *Metabolism* 49: 676-683, 2000a

Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J: Renal substrate metabolism and gluconeogenesis during hypoglycemia in humans. *Diabetes* 49: 1186-1193, 2000b

Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J: Simultaneous hepatic and renal vein catheterization to evaluate postabsorptive glucose production by the human liver and kidney. *Diabetes* 49 (1): 1230-1241, 2000c

Cersosimo E, Judd RI, Miles JM: Insulin regulation of renal glucose metabolism in conscious dogs. *J Clin Invest* 93: 2584-2589, 1994

Cersosimo E, Molina PE, Abumrad NN: Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 46: 643-646, 1997

Cersosimo E, Molina PE, Abumrad NN: Renal lactate metabolism and gluconeogenesis during insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 47: 1101-1106, 1998

Conjard A, Brun V, Martin M, et al: Effect of starvation on glutamine ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. *Biochem J* 368: 301-308, 2002

Conjard A, Martin M, Guitton J, et al: Gluconeogenesis from glutamine and lactate in the isolated human renal proximal tubule: longitudinal heterogeneity and lack of response to adrenaline. *Biochem J* 360: 371-377, 2001

Corssmit EPM, Rornijn JA, Sauerwein HP: Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism* 50 (7): 742-755, 2001

Cryer PE: Hypoglycemia – The limiting factor in the management of IDDM. *Diabetes* 43 (11): 1378-1389, 1994

Cuendet GS, Loten EG, Cameron DP, et al: Hormone-substrate responses to total fasting in lean and obese mice. *Am J Physiol* 228 (1): 276-283, 1975

Devlin TM: Manual de bioquímica com correlações clínicas. São Paulo, Edgard Blucher, 2003

Drouin R, Lavoie C, Bourque J, et al: Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274 (34): E23-E28, 1998

Fekete A, Vannay A, Vér A, et al: Sex differences in the alterations of Na⁺,K⁺-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Physiol* 555 (2): 471-480, 2003

Festuccia WTL, Kawashita NH, Garofalo MAR, et al: Control of glyceroneogenic activity in rat brown adipose tissue. *Am J Physiol* 285 (1): R177-R182, 2003

Fuglei E, Oritsland NA: Body composition, resting and running metabolic rate, and net cost of running in rats during starvation. *Acta Physiol Scand* 165: 203-210, 1999

Gambling L, Dunford S, Wilson CA, et al: Estrogen and progesterone regulate α , β and γ ENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney International* 65: 1774-1781, 2004

Garcia-Salguero L, Lupianez JA: Metabolic adaptation of the renal carbohydrate metabolism. I. Effects of starvation on the gluconeogenic and glycolytic fluxes in the proximal and distal renal tubules. *Mol Cell Biochem* 83 (2): 167-178, 1988

Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, et al: Renal Gluconeogenesis - Its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 24 (2): 382-391, 2001

Gerich JE: Measurements of renal glucose release. *Diabetes* 50 (4): 905-910, 2001

Gerich JE: Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2: 345-350, 2000

Goldim JR, Raimundo MM: Pesquisa em saúde e direito dos animais. Porto Alegre, RS, HCPA, 1997

Guder WG, Ross BD: Enzyme distribution along the nephron. *Kidney International* 26: 101-111, 1984

Gustavson SM, Chu CA, Nishizawa M, et al: Effects of hyperglycemia, glucagon, and epinephrine on renal glucose release in the conscious dogs. *Metabolism* 53: 933-941, 2004

Hammond KA, Janes DN: The effects of increased protein intake on kidney size and function. *The Journal of Experimental Biology* 201: 2081-2090, 1998

Harvey AM, Malvin RL: Comparison of creatinine and insulin clearances in male and female rats. *Am J Physiol* 209: 849-852, 1965

Herling AW, Burger HJ, Schubert G, et al: Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. *European Journal of Pharmacology* 386: 75-82, 1999

Joseph SE, Heaton N, Potter D, et al: Renal glucose production compensates for the liver during the anhepatic phase of liver transplantation. *Diabetes* 49 (3): 450-456, 2000

Kida K, Nakajo S, Kamiya F, et al: Renal net glucose release in vivo and its contribution for blood glucose in rats. *J Clin Invest* 62: 721-726, 1978

Kouda K, Nakamura H, Kohno H, et al: Dietary restriction: effects of short-term fasting on protein uptake and cell death/proliferation in the rat liver. *Mechanisms of Ageing and Development* 125: 375-380, 2004

Krebs H, Hems R, Gascoyne T: Renal gluconeogenesis. IV. Gluconeogenesis from substrate combinations. *Acta Biol Méd Germ* 11: 607-615, 1963a

Krebs H, Yoshida T: Renal gluconeogenesis. II. The gluconeogenic capacity of the kidney cortex of various species. *Biochem J* 89: 398-400, 1963b

Krebs H: Renal gluconeogenesis. *Adv Enzyme Reg* 1: 385-400, 1963c

Kurowava K, Massry SG: Evidence for stimulation of renal gluconeogenesis by catecholamines. *J Clin Invest* 52: 961-964, 1973

Landau B: Gluconeogenesis and pyruvate metabolism in rat kidney in vitro. *Endocrinology* 67: 744-751, 1960

Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, et al: Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Inv* 98 (2): 378-385, 1996

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: *Princípios de Bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 1995

Lietz T, Bryla J: Glycerol and lactate induce reciprocal changes in glucose formation and glutamine production in isolated rabbit kidney-cortex tubules incubated with aspartate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 321 (2): 501-509, 1995

Meyer C, Dostou J, Nadkarni V, et al: Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic renal and hepatic substrate metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 275 (44): F915-F921, 1998

Meyer C, Dostou JM, Gerich JE: Role of the human kidney in glucose counterregulation. *Diabetes* 48: 943-948, 1999

Meyer C, Dostou JM, Welle SL, et al: Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E419-E427, 2002a

Meyer C, Gerich JE: Role of the kidney in hyperglycemia in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2 (3): 237-41, 2002

Meyer C, Stumvoll M, Dostou J, et al: Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E428-E434, 2002b

Meyer C, Stumvoll M, Welle S, et al: Human kidney substrate utilization and gluconeogenesis. *Diabetologia* 40 (1): 87-94, 1997

Meyer C, Stumvoll M, Welle S, et al: Relative importance of liver, kidney, and substrates in epinephrine-induced increase gluconeogenesis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E819-E826, 2003

Meyer C, Woerle HJ, Dostou JM, et al: Abnormal renal, hepatic, and muscle glucose metabolism following glucose ingestion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E1049-E1056, 2004a

Meyer C, Woerle HJ, Gerich J: Paradoxical changes of muscle glutamine release during hyperinsulinemia euglycemia and hypoglycemia in humans: further evidence for the glucose-glutamine cycle. *Metabolism* 53 (9): 1208-1214, 2004b

Moon TW: Adaptation, constraint and function of gluconeogenesis pathway. *Can Journal Zool* 66: 1059-1068, 1988

Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, et al: Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 153-163, 2003a

Newsholme P, Procopio J, Lima MM, et al: Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 21 (1): 1-9, 2003b

Noonan WT, Banks RO: Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes mellitus. *P S E B M* 225: 221-230, 2000

Nurjhan N, Bucci A, Perriello G, et al: Glutamine: a major gluconeogenic precursor and vehicle for interorgan carbon transport in man. *J Clin Invest* 95: 272-277, 1995

Owen OE, Felig P, Morgan AP, et al: Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *The Journal of Clinical Investigation* 48: 574-583, 1969

Perchè-Bertschi A, Burnier M: Female sex hormones, salt and blood pressure regulation. *A J H* 17: 994-1001, 2004

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP: Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31: 435-439, 1998

Reyes JL, Meléndez E, Alegría A, et al: Influence of sex differences on the renal secretion of organic anions. *Endocrinology* 139 (4): 1581-1587, 1998

Rinn JL, Rozowsky JS, Laurenzi IJ, et al: Major molecular differences between mammalian sexes are involved in drug metabolism and renal function. *Developmental Cell* 6: 791-800, 2004

Sacca L, Vigorito C, Cicala M, et al: Role of gluconeogenesis in epinephrine-stimulated hepatic glucose production in humans. *Am J Physiol* 245: E294-E302, 1983

Sandhu S, Silbiger SR, Lei J, et al: Effects of sex hormones on fluid and solute transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney International* 51: 1535-1539, 1997

Sartori DRS, Garofalo MAR, Roselino JES, et al: Gluconeogenesis and P-enolpyruvate carboxikinase in liver and kidney of long-term fasted quails. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 170 (5-6): 373-377, 2000

Schein V, Chittó ALF, Etges R, et al: Effects of hypo or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxikinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 316: 203-212, 2005

Schmidt U, Guder WG: Sites of enzyme activity along the nephron. *Kidney International* 9: 233-242, 1976

She P, Shiota M, Shelton KD, et al: Phosphoenolpyruvate carboxykinase in necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 20 (17): 6508-6517, 2000

Sommogy M: Determination of blood sugar. *Journal Biol Chem* 160: 69-73, 1945

Starykovich LS, Vernikovs'ka IAI, Vynovs'ka TV, et al: Effect of x-irradiation on the structural and functional characteristics of rat erythrocytes and activity of individual enzymes of glycolysis. *Ukr Biokhim Zh* 68 (6): 80-85, 1996

Stumvoll M, Chintalapudi U, Perriello G, et al: Uptake and release of glucose by the human kidney – Postabsorptive rates and responses to epinephrine. *J Clin Invest* 96 (5): 2528-2533, 1995

Stumvoll M, Meyer C, Mitrakou A, et al: Renal glucose production and utilization: New aspects in humans. *Diabetologia* 40 (7): 749-757, 1997

Stumvoll M, Meyer C, Perriello G, et al: Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am J Physiol* 274: E817-E826, 1998

Stumvoll M, Perriello G, Meyer C, et al: Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International* 55: 778-792, 1999

Sumida KD, Garrett JH, McJilton WT, et al: Effect of endurance training and fasting on renal gluconeogenic enzymes in the rat. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14 (3): 323-32, 2004

Swenson MJ, Reece WO: *Dukes – Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996

Teng C: Studies on carbohydrate metabolism in rat kidney slices. II. Effects of alloxan diabetes and insulin administration on glucose uptake and formation. *Arch Biochem Biophys* 415-423, 1954

Trimmer JK, Casazza GA, Horning MA, et al: Autoregulation of glucose production in men with a glycerol load during rest and exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E657-E668, 2001

Vercoutère B, Durozard D, Baverel G, et al: Complexity of glutamine metabolism in kidney tubules from fed and fasted rats. *Biochem J* 1; 378 (Pt 2): 485-495, 2004

Vittorelli A, Gauthier C, Michoudet C, et al: Metabolic viability and pharmacotoxicological reactivity of cryopreserved human precision-cut renal cortical slices. *Toxicology in Vitro* 18: 285-292, 2004

Walker BR, Best R, Noon JP, et al: Seasonal variation in glucocorticoid activity in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4015-4019, 1997

Woerle HJ, Meyer C, Dostou JM, et al: Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab* 284: E716-E725, 2003a

Woerle HJ, Meyer C, Popa EM, et al: Renal compensation for impaired hepatic glucose release during hypoglycemia in type 2 diabetes – Further evidence for hepatorenal reciprocity. *Diabetes* 52: 1386-1392, 2003b

Xavier AR, Roselino JED, Resano NMZ, et al: Glyconeogenic pathway in isolated skeletal muscles of rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80 (2): 162-167, 2002

ANEXO 1

Normas para o envio de artigos científicos para o periódico “*Metabolism*”:

Guide for Authors

Notes to Contributors

Original communications

Manuscripts for publication, letters, and all other editorial communications should be addressed to the Editor-in-Chief, James B. Field, MD, Eight Windmill Point Lane, Hampton, VA 23664-2129; telephone/fax: 757-850-2826. Articles are accepted for publication on the condition that they are contributed solely to *Metabolism*. Contributors should bear in mind the nature of the Journal, ie, articles should have a definite metabolic application, with case reports submitted only if they include controlled observations of an exceptionally revealing nature. Papers should be as brief as possible and consistent with the subject. Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if it is accepted for publication, copyright in the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to the Publisher.

Preliminary reports

Contributors are encouraged to submit articles in a special short form known as a "Preliminary Report," with the understanding that if such an article is accepted it will be printed in the next available issue, regardless of the backlog of regular articles. It can serve as a preliminary report on work just completed, or may be a final report or an observation that does not require a lengthy write-up. To qualify for the priority given a Preliminary Report, the article must not exceed 1,000 words including the bibliography, but exclusive of any illustrative material. A simple table or small figure is allowed, but the author should cut the 1,000-word allowance by an amount sufficient to allow for the space taken up by the table or illustration. Despite the limitation on length, data to support the conclusions stated should be included to the extent necessary.

Manuscripts

Manuscripts must be submitted on a disk, preferably in Microsoft Word. Three double-spaced hard copy versions of the final manuscript, free of handwritten alterations, must accompany the disk. All components of the manuscript must appear within a single electronic file: references, figure legends, and tables must appear at the end of the manuscript. Please refrain from using end notes as references or automatic list numbering because these features are lost in conversion: simply type the reference number in parentheses in the text and type the reference list. Formatting, such as Greek letters, italics, super- and subscripts, may be used: the coding scheme for such elements must be consistent throughout.

The title page of the manuscript should include (1) the name of the institution where the work was done ("From the Fels Research Institute . . ."); (2) acknowledgments for research support the authors wish to publish; and (3) one complete mailing address for one author for the mailing of proofs and for reprint requests.

Previously published material

Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions.

Illustrations and tables

All tables and figures must be cited in order in the text using arabic numerals. Illustrations should carry their numbers and the author' s name on the back; where necessary, indicate "top" on the back. Figure legends should be compiled in a separate list at the end of the paper. To ensure clear reproduction, diagrams, charts, and other line drawings should be submitted as glossy, black-and-white photo prints; for half-tone work, good photographic prints should be supplied. Photocopies are not acceptable for reproduction in the Journal, but legible copies may be sent with the duplicate manuscripts. Tables and illustrations should be of a size easily handled, and for all illustrations the effect of reduction in size to fit the Journal page should be considered. The contributor must bear the full cost of printing color plates.

Electronic illustration submission

Figures may be submitted in electronic format. Images should be provided in EPS or TIF format on Zip disk, CD, floppy, Jaz, or 3.5 MO. Graphics software such as Photoshop and Illustrator, not presentation software such as PowerPoint, CorelDraw, or Harvard Graphics, should be used to create the art. Color images must be CMYK, at least 300 DPI, with a digital color proof, not a color laser print or color photocopy (this proof will be used at press for color reproduction). Gray scale images should be at least 300 DPI and accompanied by a proof. Combinations of gray scale and line art should be at least 1200 DPI and accompanied by a proof. Line art (black and white or color) should be at least 1200 DPI and accompanied by a proof. Please include hardware and software information, in addition to the file names. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, consult Elsevier' s Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>

References should be compiled numerically according to the order of citation in the text and typed double-spaced in the following style, **giving inclusive pages**:

Journal article:

1. Chick WL, Lauris V, Soeldner JS, et al: Monolayer culture of a human pancreatic beta-cell adenoma. *Metabolism* 22:1217-1224, 1973
2. Katz A, Bogardus C: Insulin-mediated increase in glucose 1,6-bisphosphate is attenuated in skeletal muscle of insulin-resistant man. *Metabolism* (in press)

Complete book:

3. Wesson LG: *Physiology of the Human Kidney*. Philadelphia, PA, Grune & Stratton, 1969

Chapter in book:

4. Young VR: The role of skeletal and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism, in Munro HN (ed): *Mammalian Protein Metabolism*, vol 4. San Diego, CA, Academic, 1970, pp 585-674

Proofreading

Contributors are provided with galley proofs and are asked to proofread them for typesetting errors, returning them within 48 hours. Important changes in data are

allowed within reason without cost, but excessive alterations and additions must be charged to the contributor.

Reprints of articles will be furnished to contributors when ordered in advance of publication. An order form is sent with proofs via Email upon registration of an article with the publisher. Individual reprints of an article can usually be obtained by contacting its author (see footnote on first page of article).

Other inquiries. Visit Elsevier' s Author Gateway(<http://authors.elsevier.com>) for the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an articles' s status has changed. The Author Gateway also provides detail artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions, and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.