

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

**EFEITO OSMÓTICO DA COLINA E DA GLICINA BETAÍNA NO RIM
DE RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado

Matheus Parmegiani Jahn

Porto Alegre, 2004

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

**EFEITO OSMÓTICO DA COLINA E DA GLICINA BETAÍNA NO RIM
DE RATOS DIABÉTICOS**

Matheus Parmegiani Jahn

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, 2004

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luiz Carlos Rios Kucharski, pela dedicação, ajuda, conhecimentos, pelo divertido cotidiano do laboratório e principalmente por acreditar em mim;

À professora Roselis Silveira Martins da Silva, por me acolher em seu laboratório e pela constante ajuda;

À professora Maria Flávia Marques Ribeiro, pela disponibilidade e pelos importantes conselhos e incentivos;

Ao colegas e amigos do laboratório, pelo agradável convívio;

À Gabriela, pela amizade, companhia e por todo o auxílio;

Aos colegas, professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e do Curso de Pós-Graduação;

Aos meus pais, Julio e Neusa, e ao meu irmão Gabriel, por estarem presentes sempre que eu precisei e serem sempre melhores do que eu esperava;

Aos meus parentes, amigos e amigas e todas as pessoas que, de um jeito ou de outro, participaram da minha vida durante esse trabalho;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e à CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro;

À UFRGS pela minha formação e possibilidade de realizar esse trabalho de pesquisa;

À DEUS por tudo.

OBRIGADO

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO.....	8
FISIOLOGIA RENAL	16
<i>Anatomia Macroscópica</i>	19
<i>Anatomia Microscópica</i>	20
<i>Formação de Urina</i>	22
<i>Mecanismos tubulares</i>	24
DIABETES MELLITUS	25
<i>Diabetes experimental</i>	27
<i>Nefropatia Diabética</i>	28
<i>Insuficiência Renal</i>	31
COLINA COMO SUPLEMENTO	33
OBEJTIVOS ESPECÍFICOS.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
ANIMAIS	37
DESENHO EXPERIMENTAL	37
<i>Experimento I:</i>	38
<i>Experimento II:</i>	38
INDUÇÃO DO DIABETES	38
SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA	39
DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA E DA UREMIA.....	39
VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL: RATO DIABÉTICO	40
<i>Tabelas das glicemias</i>	41
<i>Tabelas das Uremias</i>	42
<i>Tabela de Pesos</i>	43
AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ÚRINA.....	44
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
<i>Avaliação da captação de colina</i>	46
a) Captação de colina em função do tempo de incubação:	47
b) Captação de colina na presença de colina não radioativa (colina fria) :	47
c) Captação de colina pelo rim de ratos diabéticos:.....	47
d) Captação de colina pelo rim de ratos diabéticos com suplementação:	47
<i>Avaliação da formação de glicina betaína à partir da colina radioativa</i>	48
e) Formação de glicina betaína na presença de competidores:	48
f) Formação de glicina betaína em ratos diabéticos:.....	48
g) Formação de glicina betaína em ratos diabéticos com suplementação:	49
TRATAMENTO ESTATÍSTICO	50
ARTIGO CIENTÍFICO.....	51
ABSTRACT	53
INTRODUÇÃO.....	55
<i>Diabetes Mellitus</i>	56
<i>Suplementação Dietética</i>	57
MATERIAIS E MÉTODOS.....	59

<i>Animais</i>	59
<i>Desenho experimental</i>	59
<i>Indução do Diabetes</i>	59
<i>Suplementação Dietética (Experimento II)</i>	59
<i>Determinação da Glicemia e da Uremia</i>	60
<i>Procedimento Experimental</i>	61
Avaliação da captação de colina.....	62
Avaliação da formação de glicina betaina à partir da colina radioativa.....	62
<i>Tratamento Estatístico</i>	63
RESULTADOS	64
DISCUSSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

Células do córtex e da medula renal estão constantemente expostas à variações da concentração de solutos extracelulares e podem responder à essas variações com o acúmulo de osmólitos orgânicos, como a glicina betaína, cujo precursor é a colina. Uma das características do diabetes é um distúrbio osmótico renal, levando posteriormente a uma nefropatia diabética, que finalmente pode resultar num quadro de insuficiência renal. O objetivo desse trabalho foi estudar o metabolismo da colina e da glicina betaína no rim de ratos diabéticos. Rins de ratos diabéticos foram excisados e fatiados. Nas fatias foram separadas a região cortical e a medular, e então incubadas em solução fisiológica com 0,2 μCi de [metil- ^{14}C] cloreto de colina. Foram quantificadas então a captação de colina e a formação de glicina betaína. Os maiores valores de captação foram obtidos aos 30 minutos de incubação. Tanto o córtex como a medula apresentaram diminuição na captação de colina e na formação de glicina betaína na presença de colina não marcada no meio de incubação, possivelmente por um processo de competição pelos transportadores de colina nos túbulos renais. Os rins de ratos diabéticos apresentaram maiores valores de captação de colina, possivelmente para contrabalançar a alta osmolaridade do líquido tubular decorrente da alta concentração de glicose. Os ratos que receberam tratamento com colina na alimentação apresentaram valores de captação semelhantes aos isentos. O suplemento de colina na dieta produziu um aumento na formação de glicina betaína no córtex. Possivelmente a colina dietética fornecida em baixas concentrações e cronicamente pode estar funcionando como um ativador do

sistema enzimático de formação de glicina betaína presente no córtex renal. Por outro lado a hipertrofia renal não foi influenciada pelo tratamento.

Entretanto, estudos com a avaliação da atividade enzimática nestes tecidos ajudarão a esclarecer este mecanismo osmorregulador.

INTRODUÇÃO

A capacidade de sobreviver em diferentes meios osmóticos foi adquirida nos grupos de animais pela aquisição de um meio interno estável, que age para proteger os tecidos internos contra oscilações do meio externo. Assim, a capacidade de manter um meio interno adequado face ao estresse osmótico (algo que tende a perturbar a homeostase iônica e osmótica) desempenhou um papel muito importante na evolução animal (Randall *et al.*, 2000).

Fatores abióticos estressantes como seca, salinidade e extremos de temperatura tem sido limitantes para a sobrevivência das espécies. Organismos que vivem em habitats onde esses fatores predominam, desenvolveram várias adaptações para sobreviver nestes ambientes. Eles acumulam solutos orgânicos como álcoois, aminoácidos, compostos quaternários de amônia ou terciários de sulfato, em resposta ao estresse osmótico. O acúmulo desses solutos em resposta ao estresse osmótico é uma adaptação metabólica encontrada em invertebrados e vertebrados tolerantes ao estresse, sugerindo uma evolução convergente para esse traço (Rathinasabapathi, 2000).

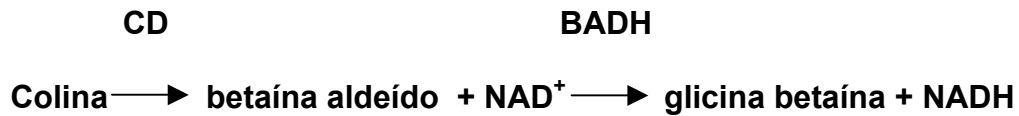
No ambiente os organismos estão expostos à variações de concentração de solutos no meio enquanto que a concentração interna de nutrientes precisa ser mantida relativamente constante. Um súbito aumento de osmolaridade no meio resulta num fluxo de água da célula para o meio, causando uma perda na pressão osmótica, mudanças na concentração intracelular de solutos e mudanças no volume celular. Essas condições hiperosmóticas são prejudiciais para qualquer tipo de célula viva. Estresse osmótico também envolve

condições hiposmóticas, onde pode ocorrer lise da célula (Van der Heide & Poolman, 2000). A regulação do volume celular em resposta ao estresse osmótico é mediada pela regulação de moléculas de pequeno peso molecular. Esta característica regulatória tem sido estudada em uma ampla variedade de espécies. Em geral estes compostos são chamados de compatíveis porque ao inverso dos íons inorgânicos eles não perturbam as macromoléculas. Além disso alguns osmólitos, especialmente as metilaminas, são chamadas de contrarreguladores porque podem estabilizar macromoléculas contra uma variedade de perturbações fisiológicas (Miller *et al.*, 2000).

A colina consiste em uma amina quaternária que se encontra amplamente distribuída em alimentos (Shills *et al.*, 1999) e é essencial para a função normal de todas as células. A colina assegura a integridade estrutural e as funções sinalizadoras das membranas celulares; constitui a principal fonte de grupamento metila na dieta; afeta diretamente a neurotransmissão colinérgica; e é necessária para o transporte/ metabolismo lipídico. A maior parte da colina no organismo é encontrada em fosfolipídios como a fosfatidilcolina e a esfingomiélin. A fosfatidilcolina consiste no fosfolipídio predominante na maioria das membranas de mamíferos. Apesar de representarem uma menor proporção da reserva total de colina, importantes metabólitos da mesma incluem o fator de ativação de plaquetas, a acetilcolina, plasmógenos de colina, lisofosfatidilcolina, fosfocolina, glicerofosfocolina e a betaína.

A glicina-betaína (betaína) é uma trimetilamina produzida pela oxidação da colina em dois passos, onde a primeira reação é catalisada pela

enzima colina desidrogenase (CD) e a segunda é catalisada pela betaína aldeído desidrogenase (BADH):



A atividade da colina desidrogenase é maior no fígado e nos rins de ratos e outros mamíferos, e em humanos, esta atividade é maior nos rins do que no fígado (Moeckel & Lien, 1997).

A betaína é utilizada como osmólito não perturbante por plantas, bactérias, invertebrados e vertebrados para compensar o estresse hipertônico (Petty & Lucero, 1999). A colina é captada por proteínas transportadoras dependente de sódio. Okuda *et al.* (2000) demonstraram que a seqüência de aminoácidos do transportador de colina em neurônios colinérgicos de rato tem uma significativa homologia com os membros da família do transportador de glicose dependente de sódio (26%).

Osmólitos orgânicos são substâncias que se acumulam em células de muitas espécies em resposta ao estresse hipertônico e realizam um importante papel na homeostase do volume celular. O papel dessas trimetilaminas como osmólitos aparenta ser altamente conservado, já que a sua função tem sido demonstrada em diversos grupos animais (Moeckel & Lien, 1997).

As bactérias, por exemplo, enfrentam o estresse hiperosmótico acumulando solutos compatíveis, pela captação e/ou síntese da glicina betaína (Van der Heide & Poolman, 2000).

Ao expor *Bacillus subtilis* a um meio hipersalino inicia-se uma resposta fisiológica para restabelecer o balanço hídrico, manter a turgescência e proteger os componentes da célula contra os efeitos da alta concentração de sal. A defesa mais efetiva contra este estresse é o acúmulo de grandes quantidades de osmoprotetores, sendo o mais importante deles a glicina betaína. Ela é sintetizada por plantas e disponibilizada para o *B. subtilis* pela degradação dos tecidos e/ou excreção das raízes das plantas. Nessa mesma bactéria foram identificados dois genes cujos produtos servem para converter colina em glicina betaína (Boch *et al.*, 1996).

As bactérias *Actinopolyspora halophila* e *Ectothiorhodorspira halochloris* são capazes de viver em ambientes com alto estresse osmótico, e são também eficientes produtores de betaína. A concentração interna de betaína em *A. halophila* pode representar até 33% de seu peso seco e *E. halochloris* pode mostrar um acúmulo de até 2,5M de concentração de betaína intracelular (Nyyssola *et al.*, 2000).

Muitos organismos podem crescer em meios contendo altas concentrações de sal e uréia. Por exemplo, bactérias crescem no trato urinário de mamíferos, na presença de sal e uréia. A betaína, presente na urina, tem sido apontada como sendo importante na manutenção do crescimento destes organismos (Randall *et al.*, 1996).

No molusco marinho *Mytilus californianus* o transportador de betaína presente nas brânquias é dependente de sódio e a atividade de transporte diminui com a diminuição da osmolaridade. Na lula *Lolliguncula brevis* foi verificado que a ativação do transporte de betaína em condições hipertônicas pode afetar a

regulação de volume e a excitabilidade de neurônios motores (Petty & Lucero, 1999).

A ostra *Crassostrea virginica* apresenta síntese de betaína à partir de colina exógena. Foi verificado que mitocôndrias de ostras adaptadas a alta salinidade captam colina e sintetizam betaína mais rápido que em baixas salinidades (Pierce *et al.*, 1995).

A taxa de síntese de glicina betaína é governada pela taxa de captação de colina por mitocôndrias de *Limulus polyphemus*. Em resposta à concentração iônica em alta salinidade, a captação de colina pela mitocôndria aumenta e o aumento dos níveis de colina estimulam a via metabólica resultando em um aumento na produção de glicina betaína. (Pierce *et al.*, 1995).

Em trabalho realizado com caranguejos *Chasmagnathus granulata*, Jahn (2001) verificou que, o animal quando exposto à um ambiente hiperosmótico, aumenta a captação de colina e a formação de glicina betaína no tecido hepatopancreático.

O estresse hiperosmótico de alguma forma ativa certos genes denominados osmogênes que promovem a eventual síntese de transportadores de colina na membrana (bactérias) assim como a betaína aldeído desidrogenase (bactérias e plantas) que é a enzima terminal da rota sintética (Pierce *et al.*, 1995).

Além destas funções osmóticas, esses solutos compatíveis podem também agir intracelularmente, protegendo enzimas e organelas contra o potencial efeito inibitório das mudanças no potencial iônico e disponibilidade de água. Além de todas essas funções relacionadas a mudanças nas pressões osmóticas do meio, esses solutos compatíveis podem realizar uma série de outras funções nas

células: reservas intracelulares de carbono e nitrogênio; termotolerância, tanto para o calor como para o frio e até para o congelamento; tolerância à dessecação. Também apresentam significância ecológica quando estão livres no meio ambiente, liberados pelas células, quando da sua morte ou lise, ou no caso de um choque hiposmótico onde serão fortemente expulsos das células, podendo servir como fonte de osmoprotetores, carbono, nitrogênio, energia e metano (através do metabolismo dos solutos metilados) para outros membros da comunidade (Welsh, 1999).

A betaína como osmólito tem sido investigada a mais de 30 anos, entretanto este composto tem sido ignorado em estudos na regulação do volume celular em favor dos aminoácidos livres (Gilles, 1982; 1983; Gilles & Pequeux, 1985; Gilles, 1997). Embora os aminoácidos livres sejam extremamente importantes osmólitos em organismos marinhos, as metilaminas em geral e particularmente a betaína estão freqüentemente em maiores quantidades que os aminoácidos em muitos animais eurihalinos (Pierce *et al.*, 1995).

A glicina betaína é utilizada por vários organismos para facilitar o crescimento sob condições de estresse celular, podendo também estabilizar macromoléculas contra sódio, uréia, desnaturação por calor e congelamento. Em mamíferos ela é acumulada intracelularmente na medula do rim, onde faz o balanço hiperosmótico do meio e evita a desnaturação pela uréia (Randall *et al.*, 1996).

A manutenção da concentração de solutos intracelulares e do volume celular é um pré-requisito para o funcionamento da célula. Em mamíferos, o rim é o componente chave desse sistema de defesa contra mudanças na concentração

de solutos intra e extracelulares, através da formação de urina com concentrações muito variadas. Isto só é possível devido ao sistema de contracorrente presente na medula renal, que faz com que a medula renal apresente variações muito grandes de NaCl e uréia. Essas altas concentrações fazem com que as células renais enfrentem diversos problemas, como manter os gradientes elétricos transmembranas e enfrentar as extraordinariamente altas concentrações de uréia na medula (pode chegar a 2000 mM em alguns animais). Essa uréia pode penetrar na célula e prejudicar a estrutura e função de proteína e de ácidos nucleicos. Esses desafios são enfrentados com o auxílio do acúmulo de osmólitos orgânicos, que não interferem no potencial elétrico das células e conseguem contrabalançar esses efeitos deletérios da uréia (Beck *et al.*, 1998).

A glicina betaína demonstrou forte efeito osmoprotetor, permitindo o crescimento de cultura de células de ovário de hamsters incubadas em um meio com alta osmolaridade, onde normalmente estes tecidos não seriam capazes de se desenvolver (Kim *et al.*, 2000).

Em mamíferos os íons inorgânicos são os maiores efetores osmóticos (osmólitos) intra e extracelular. Entretanto de forma anormal os íons podem aumentar seus níveis e perturbar a estrutura e função das macromoléculas. Durante o estresse algumas células de mamíferos regulam seu volume com osmólitos orgânicos. Estes osmólitos podem ser divididos em três categorias os polióis como o sorbitol, aminoácidos livres como glutamato e taurina, e metilaminas como creatina e betaína. (Miller *et al.*, 2000).

Sob fortes pressões osmóticas, a medula do rim, coração, cristalino e cérebro de mamíferos, utilizam osmólitos orgânicos para regular o volume celular.

Normalmente em mamíferos, somente os sistemas excretor e reprodutivo apresentam altas pressões osmóticas não patológicas, e estes apresentam altas concentrações de osmólitos orgânicos (Miller *et al.*, 2000).

Células do córtex e da medula renal são constantemente expostas à variações nas concentrações de solutos extracelulares, e respondem a essas variações com o acúmulo de osmólitos orgânicos, como a glicina-betaína. A colina é livremente filtrada no glomérulo, já que ela não é ligada a nenhuma proteína plasmática. Somente 3% da colina filtrada é excretada na urina, sugerindo uma reabsorção de colina, em nível fisiológico, de 10 μM . A maioria da colina reabsorvida é transformada em betaína pelo rim (Moeckel & Lein, 1997).

A síntese de betaína tem sido demonstrada no córtex renal, medula externa e medula interna, e a síntese é maior no córtex e vai diminuindo em direção à papila. Em contraste, o acúmulo de betaína é mínimo nos túbulos corticais e aumenta em direção à papila (Moeckel & Lein, 1997).

Experimento realizado por Moeckel & Lein (1997) demonstrou que após uma injeção de [^{14}C] colina na artéria renal de ratos foi verificada a síntese de [^{14}C] betaína no rim. A síntese aumentada no córtex posteriormente forneceu essa nova betaína formada para a medula renal, onde foi acumulada em resposta a estímulos de antidiurese. Essa nova betaína pode estar deixando as células corticais tanto pelos vasos sanguíneos para depois ser captada pelas células medulares via um transportador de betaína dependente de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$, ou entra no lúmen tubular para posteriormente ser reabsorvida na alça de Henle pelo mesmo transportador.

Fisiologia Renal

A capacidade que o rim de mamífero tem de conservar água, liberar os resíduos nitrogenados e outros, e manter uma pequena variação iônica e ácido-básica, é essencial para a manutenção da vida animal. Somente com estes mecanismos dos rins é que os mamíferos puderam invadir ambientes tão diversos e inóspitos (Pough *et al.*, 1993).

Na regulação osmótica, um fator importante na regulação do meio interno é a retenção de quantidades apropriadas de água. Outro requerimento importante para a sobrevivência da célula é a presença, em concentrações apropriadas, de vários solutos (p. ex., sais e moléculas de nutrientes) nos compartimentos intra e extracelular (Randall *et al.*, 2000).

O balanço iônico do líquido extracelular é principalmente regulado pelos rins. Para melhor apreciar a importância destas regulações renais, basta fazer uma listagem parcial das substâncias inorgânicas simples mais importantes que constituem o meio interno e quais são reguladas pelo rim: água, sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio, sulfato, fosfato e íon hidrogênio (Vander *et al.*, 1981).

O transporte de vários solutos através do epitélio renal pode ser feito por mecanismos passivos a favor de um gradiente eletroquímico ou por processos ativos específicos localizados na membrana da célula tubular. Os vários sistemas de transporte são interdependentes e um importante mecanismo como a reabsorção ativa de sódio, que utiliza uma grande fração do suprimento energético total do rim, exerce uma significativa influência no gradiente eletroquímico através

do epitélio tubular renal, que passa a afetar o transporte passivo de água e demais solutos, promovendo a energia necessária para a reabsorção de várias substâncias, como glicose e aminoácidos (Malnic & Marcondes, 1986).

O rim é o principal órgão de osmorregulação e excreção de nitrogênio na maioria dos vertebrados terrestres, especialmente em mamíferos, que não possuem outro recurso para a excreção de sais ou nitrogênio. Os rins utilizam a multiplicação do mecanismo de contracorrente para produzir urina hiperosmótica, que é mais concentrada do que o plasma (Randall *et al.*, 2000).

Segundo Randall *et al.* (2000), vários mecanismos são empregados para controlar os problemas osmóticos e regular as diferenças entre: os compartimentos intra e extracelular; e o compartimento extracelular e o meio externo. Tais mecanismos são coletivamente chamados de mecanismos osmorregulatórios que se referem à regulação da pressão osmótica e da concentração iônica no compartimento extracelular do organismo animal.

A capacidade osmorreguladora depende, em grande extensão, das propriedades do epitélio de transporte, localizado nos órgãos osmorreguladores tais como o rim de mamíferos. A célula altamente especializada que compõe esses epitélios difere de todos os outros tipos de células por ser anatômica e funcionalmente polarizada. É a partir dessas células epiteliais que depende a composição do líquido extracelular (LEC), através de seu trabalho osmorregulador.

A capacidade do epitélio de transporte é amplamente aumentada em órgãos osmorreguladores em face de organização anatômica destes órgãos, como é claramente evidenciado nos rins de mamíferos. Neles, além do transporte

transepitelial, o epitélio é organizado em túbulos arranjados de modo a aumentar a eficiência de transporte do epitélio tubular. Esta combinação de função celular e organização do tecido produziu um órgão excretor e osmorregulador eficiente (Randall *et al.*, 2000).

Os rins desempenham suas funções mais importantes filtrando o plasma e removendo substâncias do filtrado em graus diferentes, dependendo das necessidades do corpo. Por fim, os rins depuram o filtrado (e, portanto, o corpo) de substâncias indesejáveis, excretando-as na urina; ao mesmo tempo, fazem com que substâncias necessárias sejam devolvidas ao sangue. Outra função é a de controlar o volume e a composição dos líquidos corporais. Para a água e virtualmente todos os eletrólitos do corpo, o equilíbrio entre ingestão (decorrente de ingestão ou de produção metabólica) e eliminação (decorrente de excreção ou de consumo metabólico) é mantido em grande parte pelos rins. Esta função reguladora dos rins mantém estável o ambiente de que as células necessitam para executar suas diversas atividades. (Guyton & Hall, 1997).

Dentre as principais funções do rim pode-se citar:

a) Funções Homeostáticas:

- Regulação do volume plasmático e do equilíbrio hidrolítico (importante determinante da pressão sangüínea);
- Regulação da osmolalidade sangüínea;
- Manutenção do equilíbrio eletrolítico (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , PO_4^{2-});
- Regulação do equilíbrio ácido-básico (regulação do pH sangüíneo);
- Excreção de metabólitos (ex. uréia, ácido úrico, creatinina).

b) Funções Bioquímicas:

- Produção de hormônios:
 - Eritropoietina (estimula a produção de eritrócitos pela medula óssea);
 - Renina (enzima que catalisa a produção de Angiotensina);
 - 1,25-diidroxicolecalciferol (forma biologicamente ativa da vitamina D);
- Produção de substâncias bioativas (ex. prostaglandinas, adenosina, endotelina, óxido nítrico (NO), bradicinina, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento tipo insulina);
- Síntese de glicose (gliconeogênese), angiotensinogênio e amônia;
- Metabolismo de algumas substâncias (ex. insulina).

Anatomia Macroscópica

A face medial de cada rim apresenta uma endentação pela qual passam a artéria e as veias renais, nervos e a pelve renal. Na superfície de corte de um rim dividido em duas partes iguais, duas regiões são evidentes: uma região externa, chamada córtex, e uma região interna, chamada medula. O córtex e a medula são compostos por néfrons, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. No rim, a medula é dividida em massas cônicas: as pirâmides renais. A base de cada pirâmide origina-se na borda corticomedular, e o ápice termina na papila, que fica dentro do espaço pélvico. A pelve renal representa a região dilatada superior do ureter, que carrega urina do espaço pélvico para a bexiga urinária. A pelve se

divide em sacos abertos nas extremidades: os cálices maiores, que se estendem para fora da extremidade dilatada da pelve. Cada cálice maior divide-se em cálices menores, que coletam a urina de cada papila. As paredes dos cálices, pelve e ureteres contêm músculo liso, que se contrai para impelir a urina na direção da bexiga, onde fica armazenada até sua eliminação (Berne & Levy, 1996).

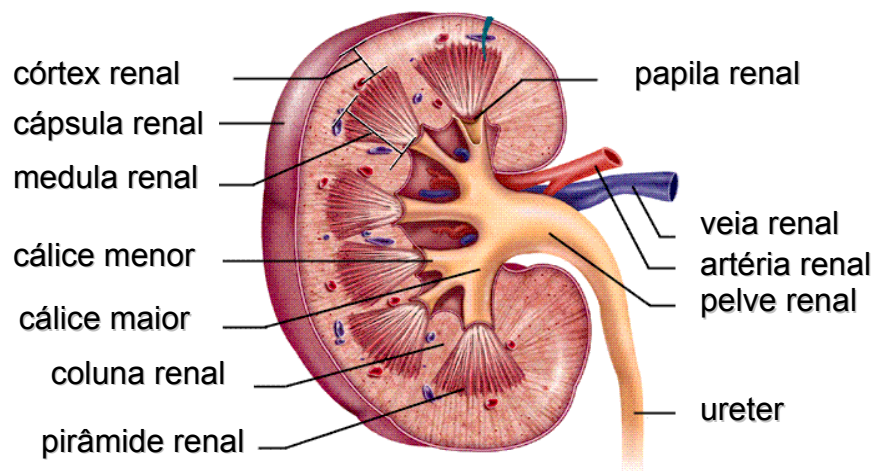


Figura 1. Estrutura do rim humano aberto para mostrar as estruturas internas.

Anatomia Microscópica

A unidade funcional do rim de mamíferos é o néfron, um tubo epitelial que é fechado em sua extremidade inicial mas aberto em sua extremidade distal. Cada rim contém numerosos néfrons, que se esvaziam em ductos coletores. Estes ductos combinam-se para formar ductos papilares, que por fim se esvaziam na pelve renal. Na extremidade fechada, o néfron é expandido para formar a cápsula de Bowman. A cápsula de Bowman tem forma de cálice, possuindo parede dupla entre as quais fica o espaço de Bowman, ocupado pelo filtrado glomerular. A luz

da cápsula é contínua com a luz estreita que se estende através do túbulo renal. Um tufo de capilares dentro da cápsula de Bowman forma o glomérulo renal (também chamado de corpúsculo renal). Essa estrutura é responsável pelo primeiro passo na formação da urina .

A parede do túbulo renal é uma camada grossa de células; esse epitélio separa a luz, do líquido intersticial. Em algumas porções do néfron, essas células epiteliais são morfológicamente especializadas em transporte, apresentando um denso tufo de microvilosidades em sua superfície luminal ou apical e profundas invaginações de sua membrana basal. As células epiteliais são mantidas juntas por junções fechadas relativamente permeáveis, que permitem difusão paracelular limitada entre a luz e o espaço intersticial em torno do túbulo renal.

O néfron pode ser dividido em três regiões principais: o néfron proximal, a alça de Henle e o néfron distal. O néfron proximal consiste na cápsula de Bowman e no túbulo proximal. A alça de Henle compreende um ramo descendente e um ramo ascendente. Este último desemboca em um túbulo distal, que se junta a um túbulo ou ducto coletor que serve a vários néfrons.

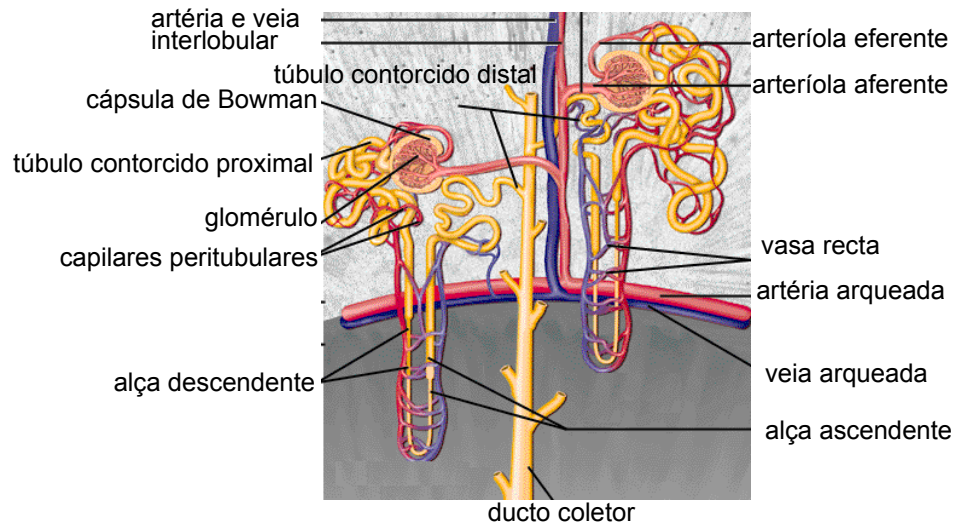


Figura 2: estrutura microscópica interna do rim humano.

Formação de Urina

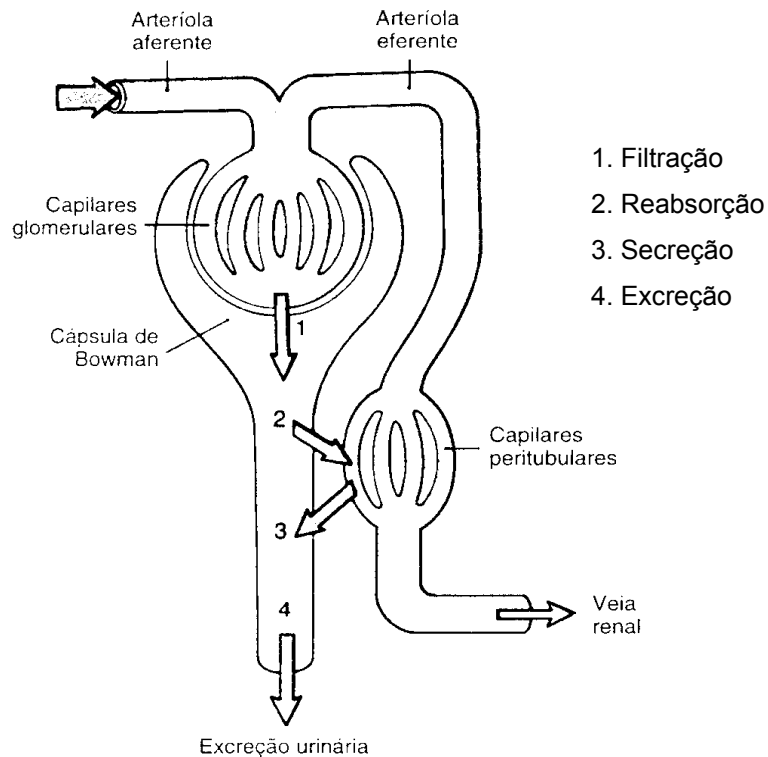
Segundo Randall *et al.* (2000), três processos principais contribuem para a composição final da urina:

- *Filtração glomerular* do plasma para formar um ultrafiltrado na luz da cápsula de Bowman.

- *Reabsorção tubular* de aproximadamente 99% da água e da maioria de sais do ultrafiltrado remanescentes e concentração dos produtos de excreção tais como uréia.

- *Secreção tubular* de várias substâncias principalmente por transporte ativo.

Mecanismos Básicos de Excreção Renal



$$\text{Excreção} = \text{Filtração} - \text{Reabsorção} + \text{Secreção}$$

Figura 3. Mecanismos básicos de excreção renal.

A excreção de diferentes substâncias na urina representa a soma algébrica destes três processos renais: (1) a filtração glomerular, (2) reabsorção de substâncias do túbulo renal para o sangue e (3) secreção de substâncias do sangue para os túbulos renais (Figura 3). Em termos matemáticos,

$$\text{Excreção urinária} = \text{filtração} - \text{reabsorção} + \text{secreção}$$

A formação de urina começa com filtração, dos capilares glomerulares para a cápsula de Bowman, de grande quantidade de um líquido virtualmente isento de proteínas. A maioria das substâncias existentes no plasma com exceção das proteínas é filtrada livremente, de modo que suas concentrações no filtrado glomerular colhido na cápsula de Bowman são quase as mesmas do plasma. À medida que o filtrado deixa a cápsula de Bowman e avança pelos túbulos, ele é modificado pela reabsorção, de volta para o sangue, de água e solutos específicos ou pela secreção de outras substâncias dos capilares peritubulares para os túbulos.

Mecanismos tubulares

O filtrado glomerular é modificado por mecanismos tubulares que dependem de processos de transporte ativo ou passivo das substâncias filtradas. Os processos de transporte ativos podem ser primários ou secundários.

O transporte ativo primário é realizado por bombas, denominação que se dá aos sistemas enzimáticos que geram energia a partir do ATP, para transportar um elemento contra um gradiente eletroquímico. Esse é o caso do Na^+ , K^+ , H^+ e Ca^{2+} , para os quais existem a Na^+ , K^+ - ATPase (bomba de Na^+ e K^+), a H^+ - ATPase (bomba de H^+), a H^+ , K^+ - ATPase (bomba de H^+ , K^+) e a Ca^{2+} - ATPase (bomba de Ca^{2+}).

No transporte ativo secundário, o gradiente eletroquímico produzido pelo transporte ativo primário fornece energia para a passagem do elemento, mas a esse se liga outra substância por meio de um co-transportador, como no caso da passagem de Na^+ , da luz tubular para o interior da célula (interior negativo e de

baixa concentração), acoplado à glicose no mesmo sentido. Outros exemplos são o co-transportador $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$, na membrana luminal do ramo ascendente da alça de Henle, e o co-transportador $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$, na membrana luminal do túbulo contorcido distal. Em outras situações o elemento acoplado tem sentido contrário: fluxo de Na^+ para o interior da célula a partir da luz tubular e de H^+ ou de NH_4^+ em direção oposta.

No transporte passivo, os elementos se movem a favor de um gradiente eletroquímico (difusão simples), em algumas ocasiões com intervenção de transportadores da membrana celular que facilitam sua passagem (difusão facilitada). Alguns íons, como o K^+ , possuem canais específicos que favorecem a saída do interior da célula, seguindo seu gradiente de concentração.

A água se move por diferenças de pressão osmótica criadas por mecanismos de transporte ativo através de canais aquosos (aquaporinas) que facilitam sua passagem (Houssay & Cingolani, 2004).

Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) se caracteriza por um grupo de distúrbios metabólicos identificados por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou de ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes é associada com danos à longo prazo, disfunções e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos.

Diversos processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes. Desde destruição autoimune das células β do

pâncreas com conseqüente deficiência de insulina, até anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina. A base das anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras no diabetes é a ação ineficiente da insulina nos seus tecidos alvo. Ação deficiente da insulina é resultado de uma secreção inadequada ou diminuição da resposta do tecido à insulina em um ou mais pontos da complexa rota de ação deste hormônio.

Sintomas de severa hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, algumas vezes polifagia e visão borrada. Disfunção de crescimento e suscetibilidade à certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica.

Complicações à longo prazo do diabetes incluem retinopatia com perda potencial da visão; nefropatia levando à falência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés e amputações; e neuropatia autonômica causando sintomas gastrointestinais, geniturinários e cardiovasculares e disfunção sexual. Pacientes com diabetes ainda apresentam incidência aumentada de arteriosclerose cardiovascular e doença cerebrovascular. Hipertensão e anormalidades no metabolismo de lipoproteínas também são geralmente associados com o diabetes.

A grande maioria dos casos de diabetes podem ser classificados em duas categorias: No diabetes do tipo I, a causa é a absoluta deficiência na secreção de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas, resultado da destruição autoimune dessas células. Também é conhecida como diabetes dependente de insulina e diabetes juvenil. No diabetes tipo II, a causa é uma

combinação de uma resistência à ação da insulina e uma resposta secretória de insulina compensatória inadequada. Esse aumento da resistência periférica à insulina se dá devido a defeitos na cascata de sinalização ou no próprio receptor de insulina. As causas para o estabelecimento desse tipo de diabetes, também conhecido como não-dependente de insulina ou diabetes do adulto, ainda não foram completamente esclarecidas, mas acredita-se que a obesidade, idade, deposição inadequada de gordura corporal e falta de exercício físico podem causar resistência à ação da insulina nos seus tecidos alvo levando a esse quadro de diabetes (American Diabetes Association, 2004).

Diabetes experimental

O modelo experimental de DM contribui para o entendimento das causas, consequências e tratamento desta doença. Para o seu desenvolvimento são utilizadas toxinas químicas (aloxano, estreptozotocina, queladores de zinco), animais transgênicos (ratos geneticamente modificados, por exemplo), entre outros. A estreptozotocina é o agente empregado na indução do diabetes experimental devido a sua seletividade pelas células β das ilhotas pancreáticas. A estreptozotocina é uma nitrosuréia derivada de um fungo – *Streptomyces griseus* – que produz severa insuficiência de insulina em ratos, simulando então o diabetes tipo I (Pickup & Willians, 1998).

A estrutura química da STZ consiste de uma nitrosuréia interposta entre um grupo metil e uma glicosamina. Embora seu mecanismo de ação não esteja bem esclarecido, esta droga está relacionada à inibição da síntese de DNA,

à interferência com reações químicas envolvendo o NAD e NADH e à inibição de algumas enzimas envolvidas com gliconeogênese. No organismo distribui-se pelo fígado, rins e pâncreas. É excretada predominantemente pelos rins (60-72% em 24h), na respiração (5%) e pelas fezes (1%) (BC Cancer Agency, 1994).

Nefropatia Diabética

Uma das maiores complicações do DM é uma progressiva nefropatia que se desenvolvem em aproximadamente 35% dos pacientes à partir de 10 – 20 anos após o início da doença e leva, na maioria dos casos, à falência renal terminal (Bardoux *et al.*, 1999).

A nefropatia diabética (ND) representa atualmente a principal causa de insuficiência renal terminal (IRT) nos Estados Unidos, e sua frequência está em ascensão (Faria, 2001).

A alteração mais precoce é o espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares. Simultaneamente, verifica-se uma esclerose glomerular progressiva, caracterizada por expansão mesangial acelular. A expansão mesangial progressiva causa colapso dos capilares glomerulares e a área de filtração declina proporcionalmente.

A hiperglicemia crônica resulta na glicosilação não enzimática de diversas proteínas plasmáticas e teciduais. Este fenômeno origina produtos glicosilados que sofrem um rearranjo molecular levando a formação de produtos glicosilados avançados (AGE). Os AGE podem causar dano tecidual por sua reatividade com outras proteínas, modificando sua estrutura ou função, ou pela ativação de diversas linhagens de células, como células endoteliais, fibroblastos,

células mesangiais e macrófagos. Um exemplo é a albumina glicosilada que, em modelos animais, é capaz de induzir as lesões observadas na nefropatia diabética (espessamento da membrana basal glomerular e expansão mesangial).

Em decorrência da expansão do mesangio e do colapso progressivo dos capilares glomerulares, ocorre isquemia túbulo-intersticial, observando-se infiltrado inflamatório e posteriormente atrofia e fibrose. Esta lesão isquêmica favorece a ocorrência de necrose da papila renal.

Logo após o aparecimento do DM, praticamente todos os pacientes apresentam aumento no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular (TFG), ou seja, um estado de hiperfiltração glomerular. Os rins encontram-se aumentados de tamanho e os glomérulos e túbulos tornam-se hipertrofiados. A TFG excede em 20-40% o valor normal (dos não-diabéticos). Mesmo após a evolução para a falência renal, os rins do diabético permanecem proporcionalmente maiores que os rins terminais em outras patologias.

A hiperfiltração está associada ao espessamento da membrana basal glomerular.

Atribui-se ao hiperfluxo renal um papel fundamental no desencadeamento e progressão da nefropatia diabética. Os mecanismos iniciais, dependentes da hiperglicemia, parecem envolver a ativação renal do sistema das cicinas-prostaglandinas e os níveis elevados de glucagon e hormônio do crescimento. Quando a glomerulosclerose se estabelece, a progressão da doença provavelmente se deve à hiperfiltração compensatória, condição adaptativa onde os néfrons remanescentes tentam manter a TFG.

O aparecimento da proteinúria marca o início da nefropatia diabética propriamente dita. O paciente que apresenta proteinúria já apresenta lesão glomerular visível à microscopia ótica – neste caso a expansão da matriz mesangial.

Simultaneamente, a TFG inicia seu declínio como resultado da glomeruloesclerose, característica histológica desta fase (glomerulopatia). Observa-se então um aumento na incidência de hipertensão arterial e o surgimento de edema periférico. O aparecimento de edema generalizado e proteinúria determinam a síndrome nefrótica na nefropatia diabética.

Quando a taxa de filtração glomerular cai abaixo de um limiar, tem início a elevação dos nitrogênios não protéicos no plasma, marcando o início da insuficiência renal. Neste momento, a evolução para a síndrome urêmica e rins em estado terminal é a regra, mesmo com intervenções atualmente disponíveis que retardam o processo de deterioração renal (Engel *et al.*, 2004).

Em uma análise simples, o distúrbio metabólico por si, induzido por DM, é suficiente para o desenvolvimento das lesões glomerulares observadas na nefropatia diabética. Desse modo, as lesões renais podem ser observadas em modelos animais com DM induzido por drogas. Estas lesões podem ser prevenidas ou reduzidas em sua intensidade pela obtenção de valores glicêmicos próximos aos normais e dependem da duração e da intensidade do tratamento com a insulina (Faria, 2001).

Dois importantes estudos - um em pacientes com DM tipo I, o DCCT (Diabetes Control and Complications Trial, 1993) e outro em paciente com DM tipo II, o UKPDS (United Kingdom Prospective Study, 1998) – demonstraram que o

desenvolvimento da nefropatia diabética é definitivamente influenciado pelo controle glicêmico (Faria, 2001).

Insuficiência Renal

A insuficiência renal crônica resulta da perda irreversível de grande número de néfrons funcionantes. Com frequência, os sinais clínicos graves só aparecem quando o número de néfrons funcionais cai para pelo menos 70% abaixo do normal. Em geral, a insuficiência renal crônica, assim como a insuficiência renal aguda, pode ocorrer em consequência de distúrbios dos vasos sanguíneos, glomérulos, túbulos, interstício renal e trato urinário inferior. Apesar da grande variedade de doenças que podem levar ao desenvolvimento de insuficiência renal crônica, o resultado final é essencialmente o mesmo – diminuição no número de néfrons funcionais.

Em muitos casos, a ocorrência de uma agressão aos rins pode levar a uma deterioração progressiva da função renal e perda adicional de néfrons até um ponto em que o indivíduo deve ser submetido a tratamento com rim artificial ou transplante de rim funcional para sobreviver. Esta condição é conhecida como insuficiência renal terminal.

Desconhece-se a causa dessa lesão progressiva, mas algumas pesquisadores acreditam que possa estar relacionada à pressão aumentada ou estiramento dos glomérulos restantes, o que ocorre em consequência da vasodilatação adaptativa ou de aumento da pressão arterial. Acredita-se que o aumento crônico da pressão e estiramento de pequenas arteríolas e glomérulos provoque finalmente a esclerose destes vasos (substituição do tecido normal por

tecido conjuntivo). Essas lesões escleróticas podem eventualmente obliterar o glomérulo, com a conseqüente redução adicional da função renal, além de alterações adaptativas nos néfrons remanescentes e ciclo vicioso lentamente progressivo que acaba terminando em insuficiência renal terminal.

Os efeitos da insuficiência renal sobre os líquidos corporais incluem: edema generalizado decorrente da retenção de água e sal, acidose resultante da incapacidade de os rins eliminarem do corpo produtos ácidos normais, concentração elevada de nitrogênio não protéico – sobretudo a uréia – em decorrência da incapacidade de o organismo excretar os produtos finais das proteínas e altas concentrações de outras substâncias excretadas pelos rins, como sulfatos, fenóis, fosfatos, potássio e bases guanidínicas. Esta condição global é denominada uremia devido à elevada concentração de uréia nos líquidos corporais.

A uremia é o aumento de uréia e de outros nitrogênios não protéicos no sangue. Os nitrogênios não protéicos incluem a uréia, o ácido úrico, a creatinina e alguns compostos menos importantes. Em geral, trata-se de produtos finais do metabolismo protéico, que devem ser removidos do organismo para garantir o metabolismo normal contínuo das proteínas das células. As concentrações desses produtos podem aumentar até 10 vezes o normal durante uma a duas semanas de insuficiência renal completa. Na presença de insuficiência renal crônica, as concentrações aumentam aproximadamente em proporção ao grau de redução dos néfrons funcionais. Por essa razão, a determinação das concentrações de tais substâncias, sobretudo a uréia e a

creatinina, fornece um importante meio de avaliar o grau de insuficiência renal (Guyton & Hall, 1998).

Recentemente, o diabetes melitus e a hipertensão passaram a ser reconhecidos como as principais causas de insuficiência renal de estágio terminal (Guyton & Hall, 1998).

Colina como suplemento

A suplementação dietética de colina e de betaína tem sido usada em diversos experimentos visando os mais diferentes resultados.

Em modelos animais, uma suplementação de colina pré-natal tem melhorado a função do sistema nervoso central de diversas maneiras, alterando, por exemplo, no estágio pós-natal, a memória espacial e temporal e demonstrando efeito neuroprotetor, diminuindo a vulnerabilidade à neurotoxicidade no estágio adulto (Guo-Ross *et al.*, 2003).

Courrèges *et al.* (2003) testaram a influência de dietas suplementadas e deficientes em colina em diferentes parâmetros da resposta imune. Não só durante momentos críticos como gestação, lactação e desmame, mas também na vida adulta, no caso de uma dieta deficiente em colina, essa resposta se torna diminuída.

Uma combinação de uridina e colina na dieta, de ratos espontaneamente hipertensos, melhorou as deficiências cognitivas apresentadas por estes modelos animais, como atenção seletiva e aprendizado espacial (De Bruin *et al.*, 2003).

O papel da betaína na osmorregulação de tecido intestinal de galinhas foi estudado por Kettunen *et al.* (2001). A presença de betaína protegeu o epitélio duodenal contra a perda de água num ambiente hiperosmótico *in vitro*, assim como a betaína é utilizada pelo rim de mamífero. No caso de uma suplementação de betaína na ração, as galinhas demonstraram uma melhoria na capacidade de retenção de água num meio hiperosmótico, sendo que as células do tecido intestinal dos animais suplementados apresentaram uma maior quantidade de betaína do que os controles neste mesmo meio, comprovando que a suplementação de betaína ajudou a proteger as células contra os efeitos de um ambiente hiperosmótico.

Ogborn *et al.* (2000) testaram a hipótese que uma suplementação de betaína poderia amenizar a doença renal em ratos Han:SPRD-cy, um modelo de doença renal policística e progressiva falência renal crônica, e mostraram que essa suplementação pode modificar o metabolismo hepático, mas não o dano renal causado pela doença.

Lohr *et al.* (1991) estudaram o efeito de uma dose de vanadato na água de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina no controle da glicemia, na hipertrofia renal e no acúmulo de polióis. Seus resultados proveram evidências de que o tratamento com vanadato reduziu a hipertrofia renal e o acúmulo de polióis, característicos da nefropatia diabética em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Mas esses resultados são associados às propriedades do vanadato de mimetizar os efeitos da insulina no controle glicêmico.

A partir das informações da literatura podemos estabelecer que o diabetes ao longo do tempo leva a uma disfunção renal. Basicamente a

hiperglicemia tem uma forte relação com esta disfunção, provocando um tipo de estresse osmótico renal.

Baseado na hipótese que o rim pode acumular osmólitos orgânicos durante alterações da pressão osmótica, o objetivo geral do trabalho foi avaliar a importância da colina e da glicina betaína no córtex e na medula renal de ratos controles e diabéticos.

OBEJTIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a captação de [metil - ^{14}C] cloreto de colina *in vitro* no córtex e na medula renal de ratos controles em diferentes tempos de incubação;

Avaliar a captação de [metil - ^{14}C] cloreto de colina *in vitro* no córtex e na medula renal de ratos incubados com diferentes doses de colina não marcada;

Avaliar a captação de [metil - ^{14}C] cloreto de colina *in vitro* no córtex e na medula renal de ratos controles e diabéticos;

Avaliar a formação de glicina betaína em ratos controles e diabéticos;

Avaliar o índice renal de ratos controles e diabéticos;

Avaliar a influência de uma suplementação dietética de colina em ratos controles e diabéticos sobre a captação de colina, formação de glicina betaína e índice renal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os animais utilizados nesse trabalho foram ratos Wistar, machos, pesando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram colocados em caixas plásticas (dois ou três ratos por caixa) e mantidos em ambiente com temperatura controlada (22° C - 24° C). A luminosidade foi controlada em ciclos de 12 horas com luz e 12 horas de escuridão (ciclo claro/escuro). Foram alimentados por ração (Moinhos Purina, Porto Alegre – RS), dieta com 12 % de proteínas e água *ad libitum*.

Todos os animais utilizados neste trabalho foram sacrificados por deslocamento cervical.

Desenho experimental

Para a determinação de alguns parâmetros ideais como tempo de incubação, idade, sexo e competição por transportadores foram utilizados ratos controles.

A mortalidade observada nos animais diabéticos foi de 10% e nos animais controles foi nula.

Experimentos *in vitro* foram realizados para determinar a função da colina e da glicina betaína nos ratos diabéticos, estes foram divididos da seguinte forma:

Experimento I:

- Controles (5 ratos) : injeção de tampão;
- Diabéticos (6 ratos) : injeção de STZ ;

Para a determinação da influência de uma suplementação dietética de colina na água sobre os processos de captação de colina e de formação de glicina betaína em ratos diabéticos, estes foram divididos da seguinte forma:

Experimento II:

- Controles Isentos (2 ratos) : injeção de tampão e água isenta;
- Controles Tratados (3 ratos) : injeção de tampão e água suplementada;
- Diabéticos Isentos (2 ratos) : injeção de STZ e água isenta;
- Diabéticos Tratados (6 ratos) : injeção de STZ e água suplementada;

Indução do Diabetes

O diabetes foi induzido por uma única injeção intra peritoneal (i.p.) de Streptozotocina (STZ – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) 70 mg/kg (Takeuchi *et al.*, 1994).

A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4,5) e injetada até 10 minutos após a diluição dessa substância. Os animais controle receberam o mesmo volume de tampão citrato de sódio na mesma via.

Suplementação Dietética

Os animais dos grupos experimentais controle tratado (CTR-TRT) e diabético tratado (DBT-TRT) receberam uma suplementação dietética de colina (25 mM de Cloreto de Colina) na água (Guo-Ross *et al.*, 2003), e os animais controle isento (CTR-ISN) e diabético isento (DBT-ISN) receberam água potável. A quantidade de água ingerida por animal (controle ou diabético) foi controlada através da análise do consumo com o auxílio de garrafas graduadas e levada em consideração no momento de se determinar a quantidade de colina na água para que todos animais ingerissem a mesma quantidade de colina.

Foi realizada então uma correção no momento do preparo da água suplementada para os animais diabéticos para que, apesar de eles estarem tomando mais água, estarão recebendo a mesma quantidade de colina.

Ingesta hídrica em animais controles: aproximadamente 45 mL / rato / dia (3,6g de colina/litro);

Ingesta hídrica em animais diabéticos: aproximadamente 135 mL / rato / dia (1,2g de colina/litro).

Determinação da Glicemia e da Uremia

O sangue foi retirado da veia caudal dos ratos e depositado em tubo de ensaio previamente heparinizado (Liquemine[®]), para evitar a coagulação. Após realizou-se a separação do plasma e dos elementos figurados através de centrifugação (Centrífuga Eppendorf) e 5000 rpm (rotações por minuto) por 10

minutos. Retirou-se o plasma que foi armazenado em freezer para posterior análise da glicemia e da uremia.

Amostras de sangue foram coletadas semanalmente para realização das dosagens.

A glicemia foi determinada através da utilização do teste colorimétrico enzimático Glicose PAP Liquiform (Kit ENZICOLOR, LABTEST Diagnóstica), no qual um reagente de cor foi misturado com 10 μ L de amostra do plasma e medido em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) com comprimento de onda de 505 nm.

A uremia foi determinada através da utilização do teste colorimétrico enzimático Uréia CE (Kit UREASE, LABTEST Diagnóstica) onde 5 μ L de amostra do plasma foi misturado primeiramente com a urease tamponada, deixada em banho-maria e posteriormente misturada com o oxidante de uso. As amostras foram medidas em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) com comprimento de onda de 600 nm.

Validação do modelo experimental: rato diabético

Os animais foram avaliados durante 60 dias com coletas semanais de sangue e urina.

A injeção de STZ ou tampão foi feita no dia 0 (zero) e no dia 4 (quatro) foi feita a primeira dosagem da glicemia. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram concentração de glicose plasmática maior de 250mg/dL (Packer *et al.*, 2000).

Tabelas das glicemias

A glicemia foi monitorada para certificação da existência e manutenção do diabetes.

Tabela 1: Níveis glicêmicos (mg/dL) de animais controles e diabéticos após diferentes tempos de tratamento - (Experimento I)

	TEMPO DE TRATAMENTO (dias)				
	0 (n=5 e 7)	11 (n=5 e 7)	25 (n=5 e 7)	39 (n=5 e 6)	53 (n=5 e 5)
CONTROLE	108,4±7,4	99,5±8,6	88,3±2,9	105,8±3,6	122,2±17,3
DIABÉTICOS	104,4±6,1	393,1±13,6*	408,6±12,3*	479,8±14,9*	512,2±45,4*

Valores expressos em média ± EPM;
* - diferença em relação ao controle(p<0,05).

Tabela 2: Níveis glicêmicos (mg/dL) de animais controles e diabéticos após diferentes tempos de tratamento - (Experimento II)

	TEMPO DE TRATAMENTO (dias)				
	0 (n=5 e 7)	11 (n=5 e 7)	25 (n=5 e 7)	39 (n=5 e 7)	53 (n=4 e 5)
CONTROLE	108,4±7,4	85,4±5,9	99,6±5,0	93,1±3,4	125,1±5,8
DIABÉTICOS	104,4±6,1	442,0±23,5*	555,2±25,6*	580,0±19,1*	619,8±28,6*

Valores expressos em média ± EPM;
* - diferença em relação ao controle(p<0,05).

Tabelas das Uremias

A uremia foi medida para monitorar o avanço da insuficiência renal, sendo que o aumento da uremia é aproximadamente proporcional à diminuição do número de néfrons funcionais (Guyton & Hall, 1998).

Tabela 3: Níveis urêmicos (mg/dL) de animais controles e diabéticos após diferentes tempos de tratamento - (Experimento I)

	TEMPO DE TRATAMENTO (dias)				
	0 (n=5 e 7)	11 (n=5 e 7)	25 (n=5 e 7)	39 (n=5 e 6)	53 (n=5 e 5)
CONTROLE	44,9±3,3	46,3±4,2	43,2±1,4	47,9±2,3	49,2±0,9
DIABÉTICOS	42,1±2,2	50,5±1,5	52,1±2,3*	55,9±3,5*	80,3±9,8* ^a

Valores expressos em média ± EPM;

* - diferença em relação ao controle (p<0,05);

^a - diferença com os outros dias dentro do mesmo grupo(p<0,05).

Tabela 4: Níveis urêmicos (mg/dL) de animais controles e diabéticos após diferentes tempos de tratamento - (Experimento II)

	TEMPO DE TRATAMENTO (dias)				
	0 (n=5 e 7)	11 (n=5 e 7)	25 (n=5 e 7)	39 (n=5 e 6)	53 (n=3 e 5)
CONTROLE	44,9±3,3	51,2±2,6	53,1±2,5	49,4±2,2	59,3±5,9
DIABÉTICOS	42,1±2,2	60,3±2,9* ^b	65,9±4,0* ^b	65,0±3,4* ^b	92,0±6,7* ^{b a}

Valores expressos em média ± EPM;

* - diferença em relação ao controle(p<0,05);

^b - diferença com o dia 0 dentro do mesmo grupo(p<0,05);

^a - diferença com os outros dias dentro do mesmo grupo(p<0,05).

Tabela de Pesos

O peso dos animais também foi monitorado, antes e depois do período experimental.

Tabela 5: Pesos (g) de animais controles e diabéticos - (Experimento I)

	PESOS (g)		
	Inicial (n= 4 e 5)	Final (n=4 e 5)	Varição (Pf-Pi)
CONTROLE	292,3±11,2	445,3±7,8	153
DIABÉTICOS	240,6±6	226,0±17,6	-14,6

Valores expressos em média ± EPM;

Tabela 6: Pesos (g) de animais controles e diabéticos - (Experimento II)

	PESOS (g)		
	Inicial (n=2,2,2 e 3)	Final (n=2,2,2 e 3)	Varição (Pf-Pi)
CONTROLES ISENTOS	222,0±18,0	323,0±36,0	101
CONTROLES TRATADOS	268,5±13,5	344,0±25,0	75,5
DIABÉTICO ISENTOS	353,5±11,5	317,0±11,0	-36,5
DIABÉTICOS TRATADOS	283,7±10,2	249,3±10,7	-34,3

Valores expressos em média ± EPM;

Foram observados alguns aspectos característicos de animais diabéticos, como pêlo amarelado (devido à poliúria) (Figura 4), alto consumo de água (polidipsia), alto consumo de alimento (polifagia), diminuição de peso (Tabelas 5 e 6 e Figura 4) e rins hipertróficos (Figura 5).



Figura 4: Aspecto visual de ratos: CTR: controle e DBT: diabético.

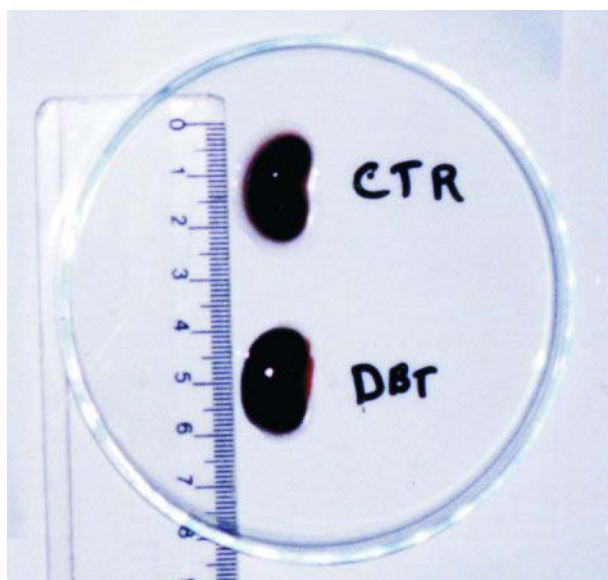


Figura 5: Aspecto visual do rim: CTR: controle e DBT: diabético.

Avaliação Qualitativa da Urina

Amostras de urina dos ratos de todos os grupos foram submetidas a avaliações qualitativas com o auxílio de tiras reagentes para uroanálise (Multistix

® - Bayer Diagnósticos). A presença de grandes quantidades de glicose na urina foi observada nos ratos dos grupos diabéticos.

Procedimento Experimental

Os animais foram pesados e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. Os rins foram excisados e colocados em placas de Petri umedecidas com solução fisiológica gelada (Ringer Bicarbonato em mmol/L: NaCl 118,3; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 25,0; pH 7,4). Após, os rins foram secados em papel filtro e pesados, para a determinação do índice renal. Os rins foram então cortados em fatias (Figura 6) com o auxílio de um *slicer*, e foi feita a separação do córtex renal (CX) da medula renal (MD). Para cada rim foram obtidas 3 fatias de aproximadamente 800-1000 μm de espessura. Esses tecidos foram secados em papel filtro e colocados em tubos de 5ml, previamente pesados, contendo 1000 μl de SF e 0,2 μCi de [metil - ^{14}C] cloreto de colina (55,0 mCi/mmol; Amersham Internacional). Os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O_2 :/ CO_2 , na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante por 30 minutos e à 37°C.

Ao final de cada tempo experimental, os tubos eram imersos imediatamente em recipiente com gelo para interromper os processos de metabólicos.

As amostras foram removidas do meio de incubação, lavadas duas vezes em solução fisiológica gelada, com o objetivo de retirar o excesso de radioatividade adsorvida ao tecido, secas em papel filtro e colocadas em frascos com tampa rosca contendo 1 ml de água bidestilada. Após, estes frascos foram congelados e fervidos alternadamente por três vezes, para romper as células e liberar conteúdo captado pelo tecido renal. Este conteúdo liberado foi considerado o meio interno, e o meio de incubação, o externo.

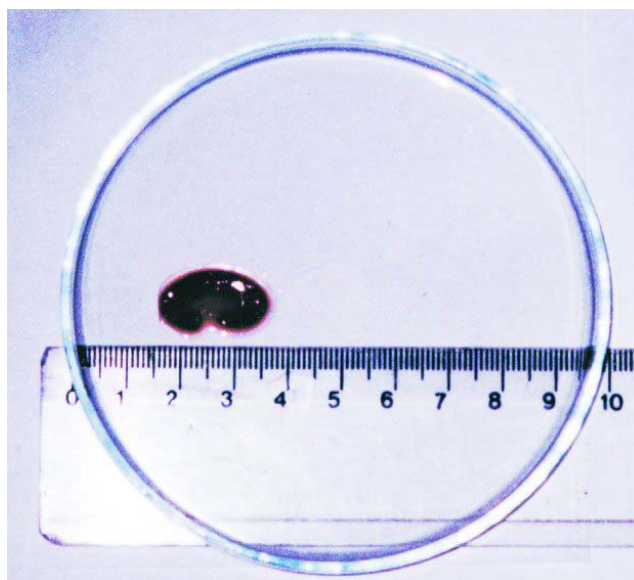


Figura 6: Amostra de uma fatia retirada de um rim.

Avaliação da captação de colina

Para cada amostra, foram utilizados 100 μ L do meio interno e do meio externo, e colocados em 2,5 ml de líquido de cintilação [tolueno– triton X-100 (2:1), PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] para medida de radioatividade. Esta medida foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac) com 97% de eficiência. Os resultados da captação de colina foram expressos pela da

radioatividade contida no meio interno ([metil - ^{14}C] cloreto de colina captada pelo tecido) e no meio externo (meio de incubação) (T/M: dpm/ml meio interno dividido por dpm/ml de meio externo), conforme descrito por Machado *et al.* (1991).

Os seguintes parâmetros de captação foram estudados:

a) Captação de colina em função do tempo de incubação:

As amostras do tecido renal (córtex e medula) de ratos controles foram incubadas em solução fisiológica, conforme descrito acima, e a colina radioativa durante tempos de 30, 45 e 60 minutos.

b) Captação de colina na presença de colina não radioativa (colina fria) :

Neste experimento foram utilizadas amostras de CX e MD de rim de animais controle incubados com SF mais [metil - ^{14}C] cloreto de colina, nas quais foram acrescentadas doses de colina não radioativa na concentração de 0mM (controle), 1mM, 5mM e 10mM.

c) Captação de colina pelo rim de ratos diabéticos:

Foi realizado o procedimento de captação de colina em CX e MD renal de ratos controles e diabéticos, onde amostras do tecido renal foram incubadas em solução fisiológica mais [metil - ^{14}C] cloreto de colina.

d) Captação de colina pelo rim de ratos diabéticos com suplementação:

Experimento de captação de colina pelo tecido renal (CX e MD) foi realizado em ratos de quatro diferentes grupos: controle isento, controle tratado, diabético isento e diabético tratado.

Avaliação da formação de glicina betaína à partir da colina radioativa

No CX e na MD renal foram realizados experimentos de formação de glicina betaína à partir da colina radioativa captada pelos tecidos. Para determinar a síntese de glicina betaína foi realizada a cromatografia de camada fina. Utilizou-se 20 µL do meio interno, aplicado em placas de cromatografia (Silica gel G-60; Darmstadt, Germany). A solução carreadora foi preparada com metanol e amônia 0,88M (75:25), e posteriormente a formação de betaína foi avaliada por autorradiografia em filme radiográfico (Hyperfilm® MP – Amersham Pharmacia Biotech, England) (Boch *et al.*, 1994). As autorradiografias foram analisadas por meio de densitômetro (VDS, Pharmacia), para quantificar a formação de betaína que foi expressa em unidades arbitrárias de pixels.

Foram realizados os seguintes experimentos de formação de glicina betaína à partir da colina radioativa captada pelo tecido renal.

e) Formação de glicina betaína na presença de competidores:

Neste experimento foi realizado a avaliação da formação de glicina betaína em amostras de CX e MD renal de animais controle e com a dose de 10mM de colina fria.

f) Formação de glicina betaína em ratos diabéticos:

Foi realizado a avaliação da formação de glicina betaína à partir da captação de colina em CX e MD renal de ratos controles e diabéticos.

g) Formação de glicina betaína em ratos diabéticos com suplementação:

Experimento de formação de glicina betaína pelo tecido renal (CX e MD) foi realizado em ratos de quatro diferentes grupos: controle isento, controle tratado, diabético isento e diabético tratado.

Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média (EPM). Para os dados experimentais obtidos foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados. Para as curvas de tempo ou de tratamentos foi feita a análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito Osmótico da Colina e da Glicina Betaína no Rim de Ratos Diabéticos

Matheus Parmegiani Jahn; Gabriela Cavagni e Luiz Carlos Kucharski

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

Titulo de página: Osmoproteção no rim de ratos diabéticos.

Matheus Parmegiani Jahn

R. Sarmiento Leite, 500 –

Porto Alegre-RS / Brasil

Fone: (51) 3316-3505

Fax: (51) 3316-3166

e-mail: matheus@pdh.com.br

Palavras Chave: colina, glicina betaína, osmorregulação, diabetes, rim

ABSTRACT

Cells from renal cortex and medulla are constantly exposed to variations of extracellular solutes and can respond to these variations with the accumulation of organic osmolytes, like the glycine betaine, whose precursor is the choline. One characteristic of the diabetes disease is a renal osmotic disturbance, leading to a diabetic nephropathy, which can result in renal insufficiency. The purpose of this work was to study the metabolism of the choline and glycine betaine in the kidneys of diabetic rats. Kidneys of diabetic rats were excised and sliced. In the slices were separated the cortical and medullar regions, and than incubated in physiological solution with 0,2 μ Ci of [methyl- 14 C] choline chloride. Than the choline uptake and the glycine betaine formation were measured. The higher values of choline uptake were obtained after 30 minutes of incubation. The cortex and the medulla showed reduction of the choline uptake and of the glycine betaine formation in the presence of non labeled choline in the incubation media, probably because of a competition process by the choline transporters at the renal tubules. Kidneys from diabetic rats showed higher values of choline uptake, probably to compensate the high osmolarity of the tubular liquid, due to high glucose concentration. The rats which receive a treatment with choline in their diet showed choline uptake values similar to the diet free ones. The supplement of choline in the diet resulted in a rising on the glycine betaine formation at the cortex. The choline supplied chronically and in small concentrations can probably be working

as an activator of the enzymatic system of glycine betaine formation, at the renal cortex. Nevertheless the hypertrophy was not influenced by the treatment.

However, studies of the enzymatic activity in these tissues will help to enlighten this osmoregulator mechanism.

INTRODUÇÃO

Fatores abióticos estressantes como seca, salinidade e extremos de temperatura tem sido limitantes para a sobrevivência das espécies. Organismos que vivem em habitats onde esses fatores predominam, desenvolveram várias adaptações para sobreviver nestes ambientes. Eles acumulam solutos orgânicos como álcoois, aminoácidos, compostos quaternários de amônia ou terciários de sulfato, em resposta ao estresse osmótico. O acúmulo desses solutos em resposta ao estresse osmótico é uma adaptação metabólica encontrada em invertebrados e vertebrados tolerantes ao estresse, sugerindo uma evolução convergente para esse traço (Rathinasabapathi, 2000). Em geral estes compostos são chamados de compatíveis porque ao inverso dos íons inorgânicos eles não perturbam as macromoléculas. Além disso alguns osmólitos, especialmente as metilaminas, são chamados de contrareguladores porque podem estabilizar macromoléculas contra uma variedade de perturbações fisiológicas (Miller *et al.*, 2000).

A glicina-betaína (betaína) é uma trimetilamina produzida pela oxidação da colina em dois passos, onde a primeira reação é catalisada pela enzima colina desidrogenase (CD) e a segunda pela betaína aldeído desidrogenase (BADH):



A betaína é utilizada como osmólito não perturbante por plantas, bactérias, invertebrados e vertebrados para compensar o estresse hipertônico (Petty & Lucero, 1999).

A glicina betaína é utilizada por vários organismos para facilitar o crescimento sob condições de estresse celular, podendo também estabilizar macromoléculas contra sódio, uréia, desnaturação por calor e congelamento. Em mamíferos ela é acumulada intracelularmente na medula do rim, onde faz o balanço hiperosmótico do meio e evita a desnaturação pela uréia (Randall *et al.*, 1996).

Células do córtex e da medula renal são constantemente expostas à variações nas concentrações de solutos extracelulares, e respondem a essas variações com o acúmulo de osmólitos orgânicos, como a glicina-betaína. A colina é livremente filtrada no glomérulo, já que ela não está ligada a nenhuma proteína plasmática. Somente 3% da colina filtrada é excretada na urina, sugerindo uma reabsorção de colina, em nível fisiológico, de 10 μM . A maioria da colina reabsorvida é transformada em betaína pelo rim (Moeckel & Lein, 1997).

A síntese de betaína tem sido demonstrada no córtex renal, medula externa e medula interna, e a síntese é maior no córtex e vai diminuindo em direção à papila. Em contraste, o acúmulo de betaína é mínimo nos túbulos corticais e aumenta em direção à papila (Moeckel & Lein, 1997).

Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) se caracteriza por um grupo de distúrbios metabólicos identificados por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou de ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes é

associada com danos à longo prazo, disfunções e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos.

Uma das maiores complicações do DM é uma progressiva nefropatia que se desenvolve em aproximadamente 35% dos pacientes à partir de 10 – 20 anos após o início da doença e leva, na maioria dos casos, à falência renal terminal (Bardoux *et al.*, 1999).

A nefropatia diabética (ND) representa atualmente, junto com a hipertensão, as duas principais causas de insuficiência renal terminal (IRT) nos Estados Unidos e sua frequência está em ascensão (Faria, 2001; Guyton & Hall, 1998).

Em uma análise simples, o distúrbio metabólico por si, induzido por DM, é suficiente para o desenvolvimento das lesões glomerulares observadas na nefropatia diabética. Desse modo, as lesões renais podem ser observadas em modelos animais com DM induzido por drogas (Faria, 2001).

Suplementação Dietética

A suplementação dietética de colina e de betaína tem sido usada em diversos experimentos, para avaliar seu papel no sistema nervoso de ratos (Guo-Ross *et al.*, 2003; Courrèges *et al.*, 2003; De Bruin *et al.*, 2003), osmorregulação em aves (Kettunen *et al.*, 2001) e amenizar uma doença renal policística em ratos (Ogborn *et al.*, 2000). Também já foi estudado o efeito do vanadato na alimentação para diminuir a hipertrofia renal no diabetes (Lohr *et al.*, 1991).

A partir das informações da literatura podemos estabelecer que o diabetes leva, ao longo do tempo, a uma disfunção renal. Basicamente a

hiperglicemia tem uma forte relação com esta disfunção, provocando um tipo de estresse osmótico renal.

Baseado na hipótese que o rim pode acumular osmólitos orgânicos durante alterações da pressão osmótica, o objetivo do trabalho foi avaliar a importância da colina e da glicina betaína no córtex e na medula renal de ratos controles e diabéticos, através da avaliação do índice renal, da captação de colina e da formação de glicina betaína no rim de ratos diabéticos com e sem suplementação dietética de colina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os animais utilizados nesse trabalho foram ratos Wistar, machos, pesando entre 250 e 300 gramas. Todos os animais utilizados neste trabalho foram sacrificados por deslocamento cervical.

Desenho experimental

Para a determinação de alguns parâmetros ideais como tempo de incubação, idade, sexo e competição por transportadores foram utilizados ratos controles.

Experimentos *in vitro* foram realizados para determinar a função da colina e da glicina betaína nos ratos diabéticos, sendo que o primeiro experimento contou com ratos controle e diabéticos e no segundo experimento foi oferecida uma suplementação de colina na dieta de ratos controles e diabéticos.

Indução do Diabetes

O diabetes foi induzido por uma única injeção intra peritoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), dose de 70 mg/kg (Takeuchi *et al.*, 1994).

Suplementação Dietética (Experimento II)

Os animais dos grupos experimentais controle tratado (CTR-TRT) e diabético tratado (DBT-TRT) receberam uma suplementação dietética de colina

(25 mM de Cloreto de Colina) na água (Guo-Ross *et al.*, 2003), e os animais controle isento (CTR-ISN) e diabético isento (DBT-ISN) receberam água potável. A quantidade de água ingerida por animal (controle ou diabético) foi controlada através da análise do consumo com o auxílio de garrafas graduadas e levada em consideração no momento de se determinar a quantidade de colina na água para que todos animais ingerissem a mesma quantidade de colina.

Determinação da Glicemia e da Uremia

Amostras de sangue foram coletadas semanalmente durante 60 dias para realização das dosagens de níveis glicêmicos e níveis urêmicos.

A injeção de STZ ou tampão foi feita no dia 0 (zero) e no dia 4 (quatro) foi feita a primeira dosagem. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram concentração de glicose plasmática maior de 250mg/dL (Packer *et al.*, 2000).

A uremia foi medida para monitorar o avanço da insuficiência renal, sendo que o aumento da uremia é aproximadamente proporcional à diminuição do número de néfrons funcionais (Guyton & Hall, 1998).

Foram observados alguns aspectos característicos de animais diabéticos, como presença de glicose na urina (glicosúria), pêlo amarelado (devido à poliúria), alto consumo de água (polidipsia), alto consumo de alimento (polifagia), diminuição de peso corporal e rins hipertróficos.

Procedimento Experimental

Os animais foram pesados e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. Os rins foram excisados e colocados em placas de Petri umedecidas com solução fisiológica gelada (Ringer Bicarbonato, pH 7,4). Após, os rins foram secados em papel filtro e pesados, para a determinação do índice renal. Os rins foram então cortados em fatias com o auxílio de um *slicer*, e foi feita a separação do córtex renal (CX) da medula renal (MD). Para cada rim foram obtidas três fatias de aproximadamente 800-1000 μ m de espessura. Esses tecidos foram secados em papel filtro e colocados em tubos de 5ml, previamente pesados, contendo 1000 μ l de SF e 0,2 μ Ci de [metil - 14 C] cloreto de colina (55,0 mCi/mmol; Amersham Internacional). Os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:/CO₂, na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante por 30 minutos e à 37°C.

Ao final de cada tempo experimental, os tubos eram imersos imediatamente em recipiente com gelo para interromper os processos metabólicos.

As amostras foram removidas do meio de incubação, lavadas duas vezes em solução fisiológica gelada, com o objetivo de retirar o excesso de radioatividade adsorvida ao tecido, secadas em papel filtro e colocadas em frascos com tampa rosca contendo 1 ml de água bidestilada. Após, estes frascos foram congelados e fervidos alternadamente por três vezes, para romper as células e

liberar conteúdo captado pelo tecido renal. Este conteúdo liberado foi considerado o meio interno, e o meio de incubação, o externo.

Avaliação da captação de colina

Para cada amostra, foram utilizados 100 μ L do meio interno e do meio externo, e colocados em 2,5 ml de líquido de cintilação [tolueno– triton X-100 (2:1), PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] para medida de radioatividade. Esta medida foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac) com 97% de eficiência. Os resultados da captação de colina foram expressos pela da radioatividade contida no meio interno ([metil - 14 C] cloreto de colina captada pelo tecido) e no meio externo (meio de incubação) (T/M: dpm/ml meio interno dividido por dpm/ml de meio externo), conforme descrito por Machado *et al.* (1991).

Avaliação da formação de glicina betaína à partir da colina radioativa

No CX e na MD renal foram realizados experimentos de formação de glicina betaína à partir da colina radioativa captada pelos tecidos. Para determinar a síntese de glicina betaína foi realizada a cromatografia de camada fina. Utilizou-se 20 μ L do meio interno, aplicado em placas de cromatografia (Silica gel G-60; Darmstadt, Germany). A solução carreadora foi preparada com metanol e amônia 0,88M (75:25), e posteriormente a formação de betaína foi avaliada por autorradiografia em filme radiográfico (Hyperfilm[®] MP Amersham Pharmacia Biotech, England) (Boch *et al.*, 1994). As autorradiografias foram analisadas por

meio de densitômetro (VDS, Pharmacia), para quantificar a formação de betaína que foi expressa em unidades arbitrárias de pixels.

À partir dos protocolos acima citados, os seguintes parâmetros de captação colina e formação de glicina betaína pelo CX e MD renal de ratos foram estudados:

Captação de colina em função do tempo de incubação; captação de colina e formação de glicina betaína na presença de doses de colina não radioativa (colina fria); captação de colina e formação de glicina betaína em ratos controles e diabéticos, com e sem suplementação de colina na dieta.

Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média (EPM). Para os dados experimentais obtidos foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados. Para as curvas de tempo ou de tratamentos foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

RESULTADOS

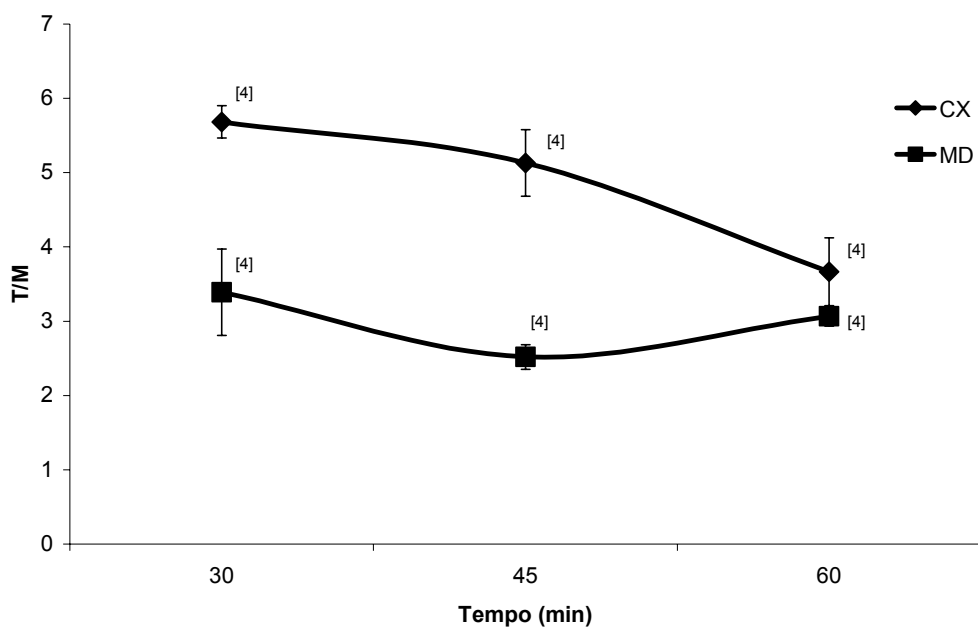


Figura 1. Captação de [^{14}C]colina pelo tecido renal de ratos controles em diferentes tempos de incubação. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**), respectivamente; **T/M**: a captação está expressa pela relação tecido/meio. Os dados estão representados como média \pm EPM. O número amostral está indicado entre colchetes.

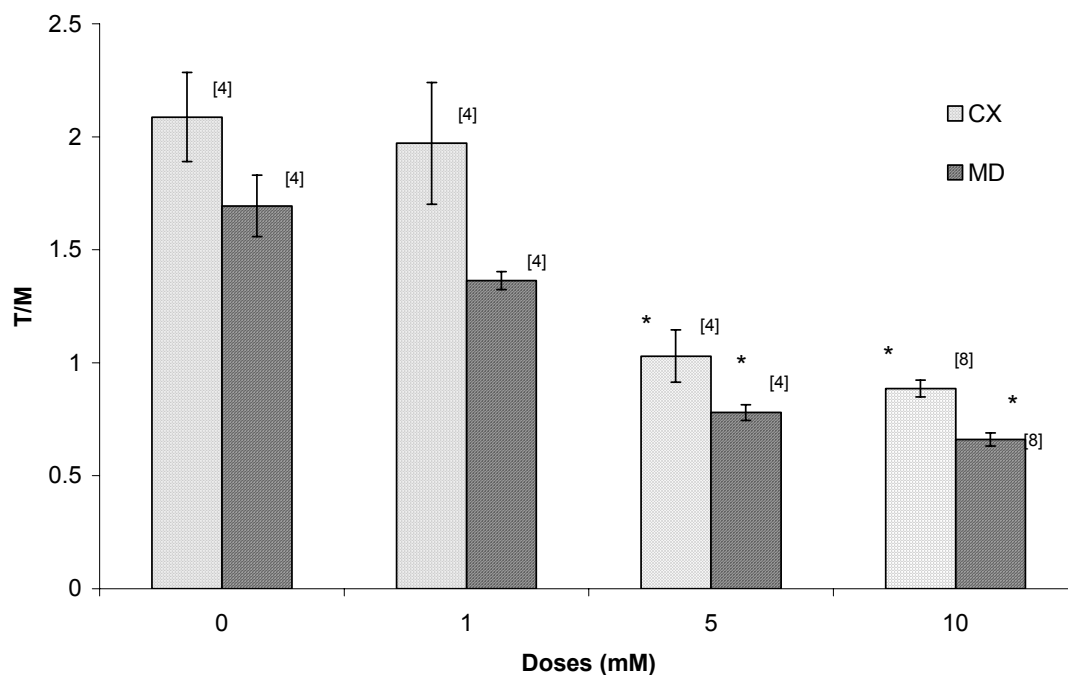


Figura 2. Captação de [^{14}C]colina pelo tecido renal de ratos controles na presença de diferentes doses de colina fria. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**), respectivamente; **T/M**: a captação está expressa pela relação tecido/meio. *: diferença em relação ao controle ($p < 0,05$); Os dados estão representados como média \pm EPM; O número amostral está indicado entre colchetes.

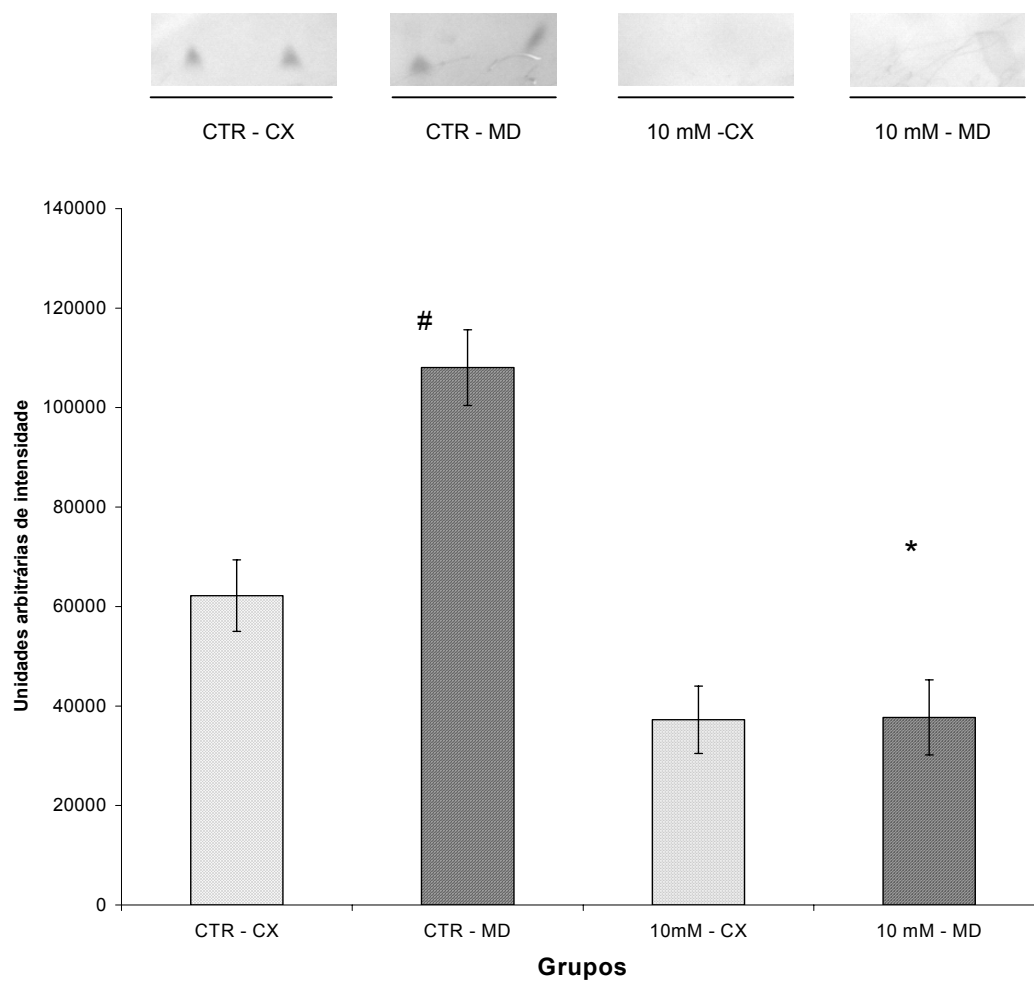


Figura 3. Formação de glicina betaína à partir de [^{14}C]colina pelo tecido renal de ratos controles na presença da dose de 10mM de colina fria. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**); **CTR**: controle; *: diferença em relação ao controle ($p < 0,05$); #: diferença em relação ao córtex no mesmo grupo ($p < 0,05$); Os dados estão representados como média \pm EPM;

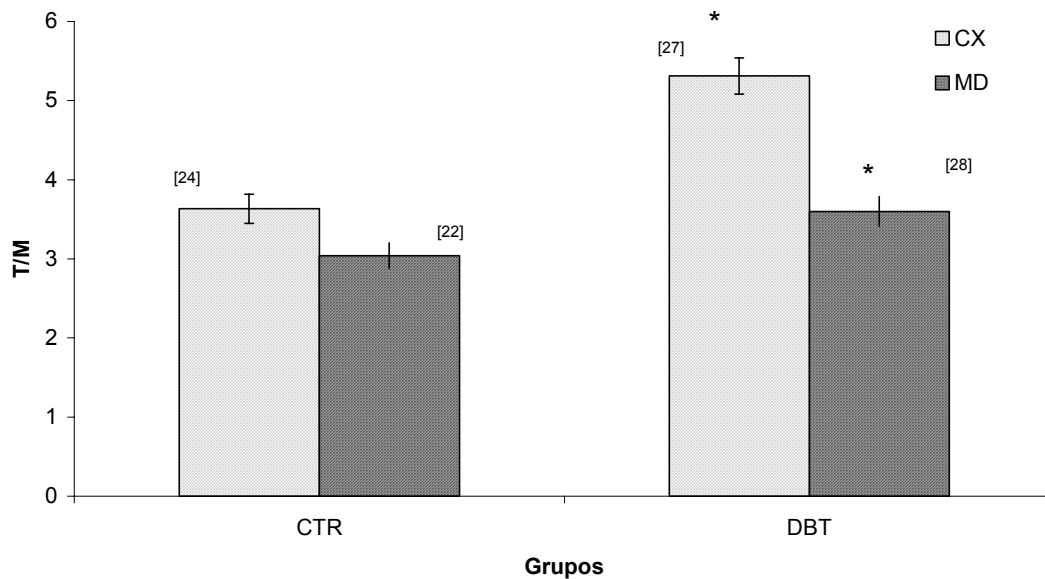


Figura 4. Captação de [^{14}C]colina pelo tecido renal de ratos controles e diabéticos. Córtex renal (CX) e medula renal (MD); T/M: a captação está expressa pela relação tecido/meio; CTR: controle; DBT: diabético; *: diferença em relação ao controle ($p < 0,05$); Os dados estão representados como média \pm EPM. O número amostral está indicado entre colchetes.

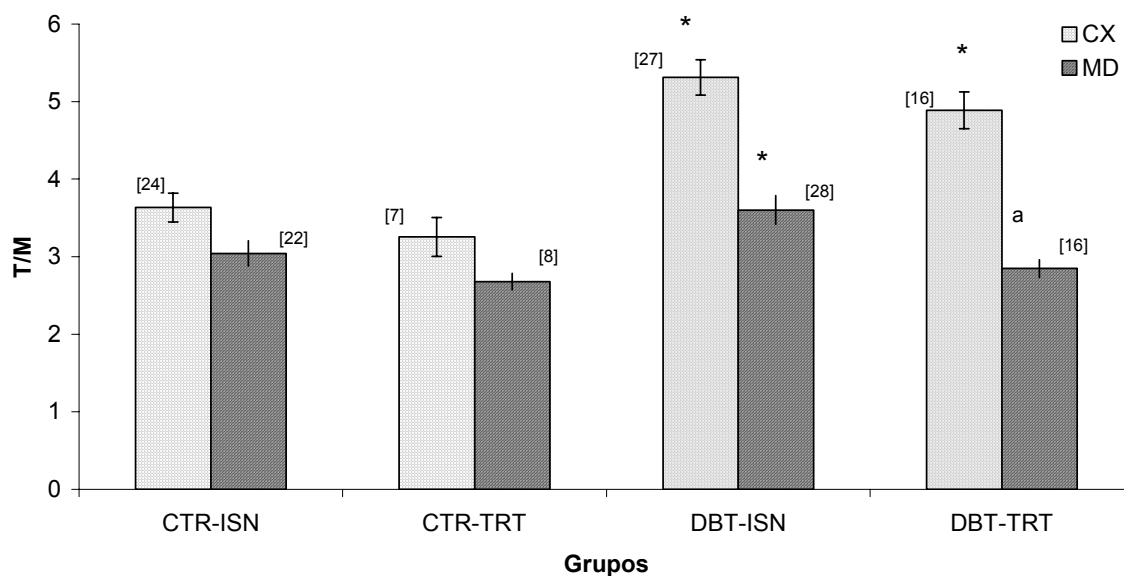


Figura 5. Captação de [^{14}C]colina pelo tecido renal de ratos controles isentos (**CTR-ISN**), controle tratados (**CTR-TRT**), diabéticos isentos (**DBT-ISN**) e diabéticos tratados (**DBT-TRT**). Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**); **T/M**: a captação está expressa pela relação tecido/meio; *: diferença em relação ao controle ($p < 0,05$); ^a: diferença em relação ao DBT-ISN; Os dados estão representados como média \pm EPM. O número amostral está indicado entre colchetes.

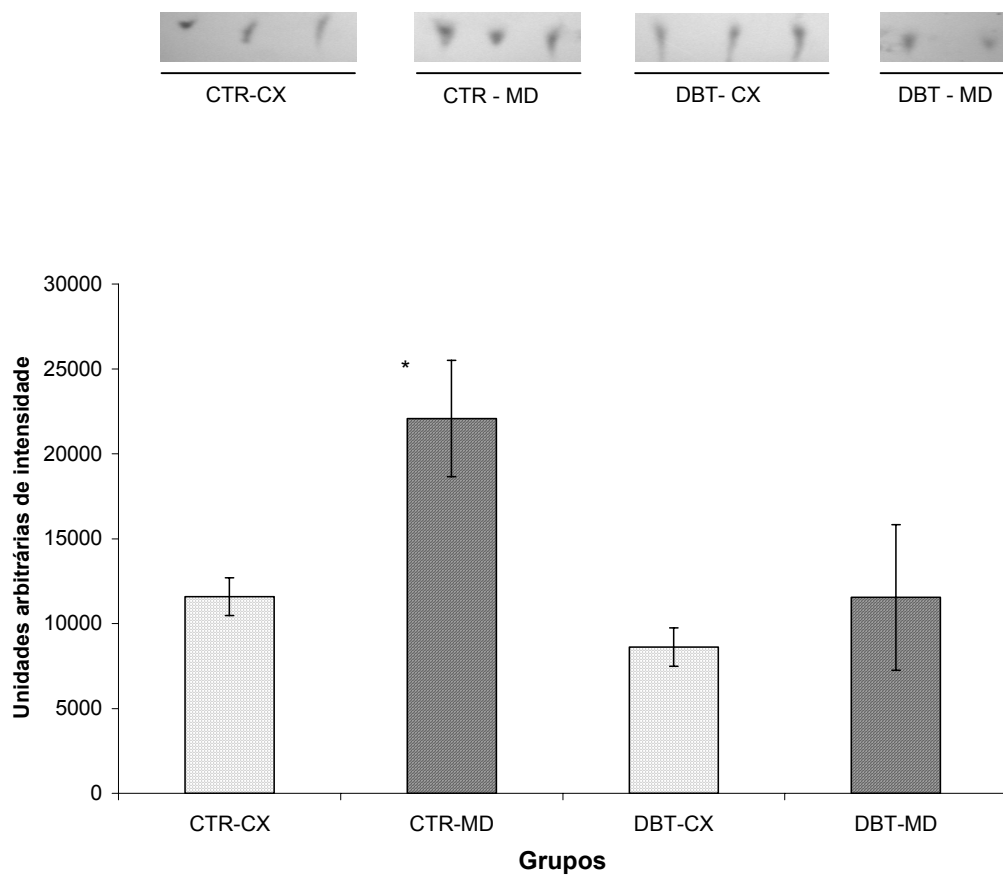


Figura 6. Formação de glicina betaína à partir de $[^{14}\text{C}]$ colina pelo tecido renal de ratos controles e diabéticos. Córtex renal (**CX**) e medula renal (**MD**); **CTR**: controle; **DBT**: diabético; *: diferença em relação ao córtex no mesmo grupo ($p < 0,05$); Os dados estão representados como média \pm EPM;

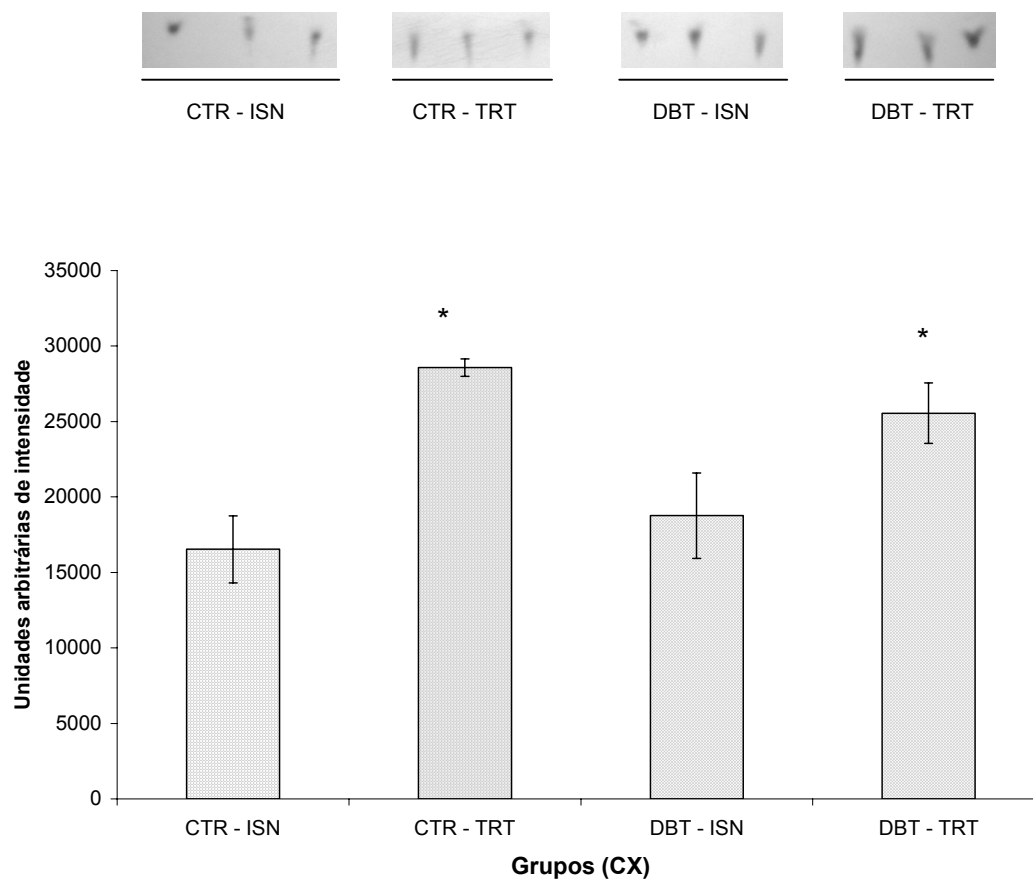


Figura 7. Formação de glicina betaína à partir de [^{14}C]colina pelo tecido renal de ratos controles isentos (**CTR-ISON**), controles tratados (**CTR-TRT**), diabéticos isentos (**DBT-ISON**) e diabéticos tratados (**DBT-TRT**); **CX**: córtex renal; *: diferença em relação ao isento no mesmo grupo ($p < 0,05$); Os dados estão representados como média \pm EPM;

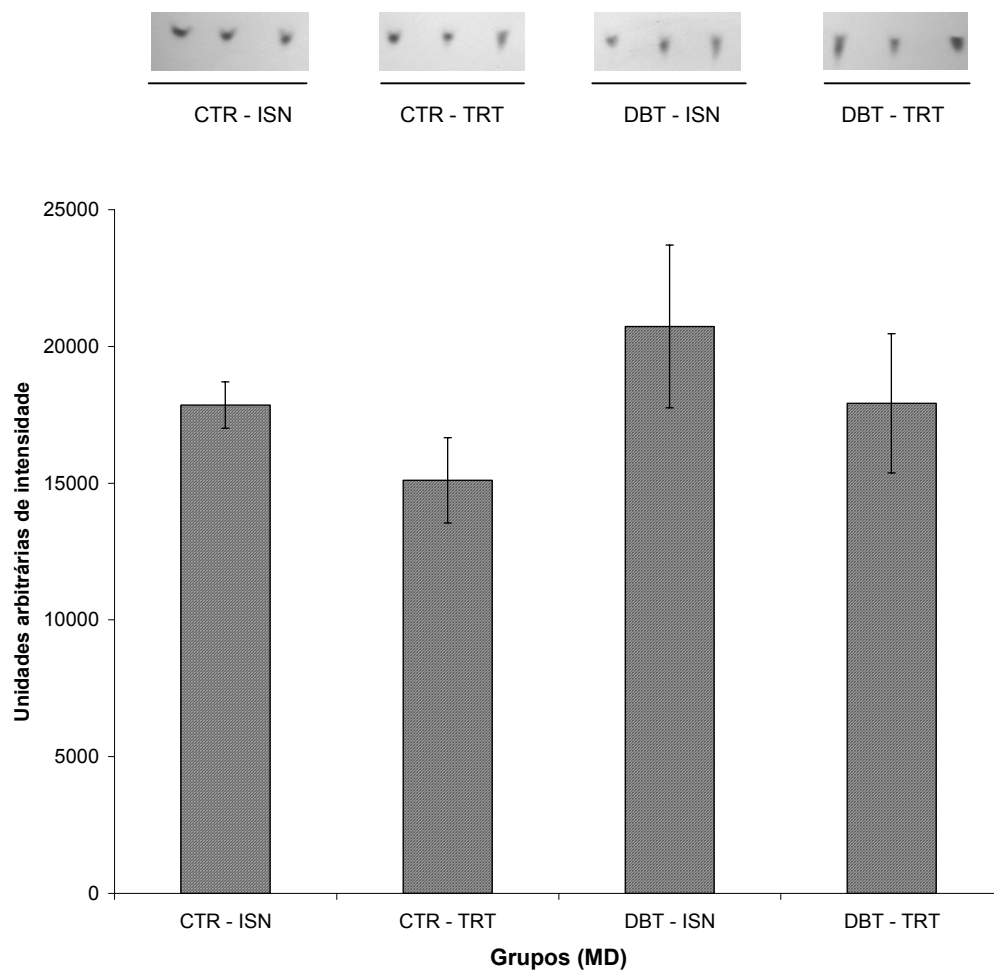


Figura 8. Formação de glicina betaína à partir de [^{14}C]colina pelo tecido renal de ratos controles isentos (**CTR-ISN**), controles tratados (**CTR-TRT**), diabéticos isentos (**DBT-ISN**) e diabéticos tratados (**DBT-TRT**); **MD**: medula renal; Os dados estão representados como média \pm EPM;

Tabela 1: Valores do Índice Renal (%) de animais controles e diabéticos - (Experimento I)

	PESOS (g)		
	Rato (n=2 e 3)	Rim (n=4 e 6)	IR (%)
CONTROLES	434,0±12,0	1,32±0,04	0,31
DIABÉTICOS	242,7±23,2	1,21±0,07	0,50*

Valores expressos em média ± EPM;

IR - Índice Renal = (Peso do rim / Peso do rato) x 100

* - diferença em relação ao controle.

Tabela 2: Valores do Índice Renal (%) de animais controles isentos, controles tratados, diabéticos isentos e diabéticos tratados - (Experimento II)

	PESOS (g)		
	Rato (n=1,2,2,4)	Rim (n=2,4,4 e 8)	IR (%)
CONTROLES ISENTOS	359,0±0,0	1,09±0,01	0,30
CONTROLES TRATADOS	344,0±25,0	1,05±0,10	0,31
DIABÉTICOS ISENTOS	317,0±8,0	1,48±0,04	0,47*
DIABÉTICOS TRATADOS	249,3±10,7	1,29±0,03	0,52*

Valores expressos em média ± EPM;

IR - Índice Renal = (Peso do rim / Peso do rato) x 100

* - diferença em relação ao controle;

RESULTADOS

Em todos os experimentos, o córtex renal apresentou valores de captação maiores que a medula renal.

Na figura 1 está demonstrada a captação de colina em diferentes tempos de incubação. O tempo escolhido para os outros experimentos foi baseado nos resultados desta curva, onde a maior captação observada foi aos 30 minutos, diminuindo nos outros tempos.

A presença de doses de colina fria no meio de incubação está representada na figura 2. Nas doses de 5 mM e 10 mM, tanto no córtex como na medula, os valores de captação foram significativamente mais baixos que os valores do grupo controle.

É importante salientar que as representações gráficas da formação de glicina betaína se referem à experimentos realizados numa mesma placa de cromatografia, não sendo válido a comparação entre valores de duas representações.

A formação de glicina betaína à partir da colina radiotiva na presença da dose de 10 mM de colina fria está demonstrada na figura 3. No grupo controle a formação de glicina betaína na medula foi maior que no córtex. A presença de colina fria diminuiu significativamente a formação de glicina betaína na medula renal.

A figura 4 mostra a captação de colina no córtex e na medula renal de ratos controles e diabéticos. O grupo diabético apresentou valores de captação

significativamente maiores que o grupo controle, tanto para o córtex renal quanto para a medula renal.

Na figura 5 está demonstrada a captação de colina pelo tecido renal de ratos controles isentos (CTR-ISN), controle tratados (CTR-TRT), diabéticos isentos (DBT-ISN) e diabéticos tratados (DBT-TRT). Os valores de captação no grupo diabético isento foram maiores que os valores controles. No grupo diabético tratado, somente o córtex apresentou valores maiores que o controle tratado. A medula do grupo diabético tratado apresentou uma diminuição nos valores de captação quando comparados aos valores da medula do grupo diabético isento.

A figura 6 mostra a formação de glicina betaína à partir da colina marcada em ratos controles e diabéticos. A medula renal do grupo controle apresentou maior formação que o córtex renal no mesmo grupo. O grupo dos diabéticos não apresentou diferenças em relação ao controle.

A formação de glicina betaína à partir de colina marcada no córtex renal, nos grupos controle isento (CTR-ISN), controle tratado (CTR-TRT), diabético isento (DBT-ISN) e diabético tratado (DBT-TRT) está demonstrada na figura 7. O grupo CTR-TRT apresentou valores de betaína maiores que o grupo CTR-ISN, e esse padrão se repetiu no grupo diabético, onde o grupo DBT-TRT apresentou valores de betaína maiores que o DBT-ISN.

A figura 8 está mostrando a formação de glicina betaína pela medula renal nos grupos controle isento (CTR-ISN), controle tratado (CTR-TRT), diabético isento (DBT-ISN) e diabético tratado (DBT-TRT); Na medula renal não foram observadas diferenças na formação de glicina betaína com a presença da colina na alimentação.

A tabela 1 mostra as variações no índice renal de ratos controles e diabéticos do Experimento I, onde é levado em conta o peso final dos ratos e o peso de cada rim do animal. Os índices renais dos ratos diabéticos foram significativamente maiores quando comparados com os ratos controles. Na tabela 2 estão representados os índices renais dos ratos do Experimento II, onde ocorreu a suplementação dietética de colina. O mesmo padrão do experimento I foi observado, onde os grupos diabéticos apresentaram índices maiores que os grupos controles.

DISCUSSÃO

A investigação do metabolismo e da importância dos osmólitos orgânicos tem sido alvo de estudos em diversos organismos como bactérias (Boch *et al.*, 1996; Heide & Poolman, 2000; Nyysola *et al.*, 2000), invertebrados (Pierce *et al.*, 1995, Petty & Lucero, 1999) e vertebrados, como aves (Kettunen *et al.*, 2001) e mamíferos (Sizeland *et al.*, 1993; Grunewald & Eckstein, 1995; Moeckel & Lein, 1997; Moeckel *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2000; Pummer *et al.*; 2000; Handler & Kwon, 2001; Grunewald *et al.*, 2001). Estes trabalhos mostram o envolvimento desses compostos na osmorregulação, proteção contra os efeitos deletérios da uréia, manutenção das concentrações intracelulares e do volume celular, entre outras funções.

Os primeiros resultados obtidos por este trabalho serviram como padronizações para os experimentos seguintes. A curva de tempo de incubação para a captação de colina (Figura 1) mostrou que o tempo de 30 minutos apresentou a maior captação, o qual foi utilizado como tempo de incubação para os outros experimentos.

Em todos os experimentos com os ratos controles e com os ratos diabéticos a captação de colina sempre foi maior no córtex renal do que na medula renal, demonstrando que o córtex é o principal sítio de captação deste composto. Estes resultados estão de acordo com Grunewald & Eckstein (1995) e Pummer *et al.* (2000). Moeckel & Lien (1997) observaram que as enzimas CD e BADH fazem a conversão da colina em betaína principalmente no córtex.

A curva de competição (Figura 2) mostrou que a presença de colina não marcada no meio de incubação, nas doses de 5 mM e 10 mM, inibiu o transporte de colina para dentro do tecido renal, tanto no córtex renal como na medula renal, evidenciando que existe um sistema de transporte específico para esta substância neste tecido e que este sistema é saturável, já que a colina não marcada estaria competindo pelos transportadores de colina e deixando menos transportadores disponíveis para a captação. Resultado semelhante foi obtido por Kiene (1998) em bactérias, onde observou um efeito competitivo da colina não marcada no meio de incubação, produzindo uma redução de 85% na captação em relação ao controle. Okuda *et al.* (2000) demonstraram uma significativa homologia entre o transportador de colina em neurônios de ratos com os membros da família do transportador de glicose dependente de sódio. Em caranguejos já foi demonstrado que a presença de glicose no meio de incubação inibiu a captação de glicose marcada em brânquias (Eichler, 2001). E para a colina também já foi observada essa competição em brânquias de caranguejos por Jahn (2001).

A formação de glicina betaína à partir da colina radioativa foi significativamente diminuída nos grupos que receberam a dose de 10 mM de colina fria na medula (Figura 3). A competição exercida pela colina fria ocasionou uma menor captação da colina marcada e conseqüentemente reduzindo significativamente a formação de glicina betaína. Nota-se que no grupo controle, a formação de glicina betaína na medula renal foi maior que no córtex renal, o que explica a propriedade da medula de acumular esse composto em resposta às altas concentrações do interstício medular (Sizeland *et al.*, 1993; Beck *et al.*, 1998; Handler & Kwo, 2001).

A importância destes osmólitos na osmorregulação no tecido fica evidenciada por estes resultados. Também foi avaliado o papel destas substâncias, precisamente da colina e da glicina betaína durante o diabetes melitus, isto é, como está a captação de colina e a formação de glicina betaína no córtex e na medula renal de ratos normais e diabéticos, e se estas substâncias podem estar sendo utilizados para auxiliar na regulação osmótica renal.

Sabe-se que tecido renal sofre diversos prejuízos durante o DM, e que essa doença é conhecida como nefropatia diabética, que em muitos casos leva à insuficiência renal.

Na Figura 4 está evidenciado um aumento na captação de colina nos ratos diabéticos, tanto no córtex como na medula, demonstrando que o tecido renal destes animais está captando mais colina, possivelmente para balancear o significativo aumento da osmolaridade da urina e assim evitar a perda excessiva de água (diurese osmótica).

A formação de glicina betaína na medula do grupo controle está aumentada em relação ao córtex no mesmo grupo (Figura 6), reforçando o que já foi observado na Figura 3. A formação de glicina betaína não foi influenciada pelo diabetes, sendo que o grupo diabético não apresentou diferenças na formação quando comparado com o grupo controle.

A captação de colina nos ratos tratados foi semelhante à captação nos sem tratamento (isentos) (Figura 5), sendo que os controles apresentaram valores aproximados tanto no córtex como na medula renal. O córtex renal dos diabéticos, tratados ou não, apresentou valores de captação significativamente maiores que os controles, como já havia sido observado (Figura 4), e a

suplementação não influenciou esse comportamento. Já na medula renal, os diabéticos isentos apresentaram valores maiores que os controles, como o observado anteriormente, mas os diabéticos tratados apresentaram valores iguais aos controles, e menores que os diabéticos isentos. Sendo assim, o tratamento com colina influenciou somente o processo de captação de colina na medula renal dos ratos diabéticos, fazendo com que essa captação ficasse diminuída. Provavelmente a suplementação com colina produziu um sistema de competição como o observado no experimento *in vitro* (Figura 2) onde houve a incubação com diferentes doses de colina fria. Entretanto a competição *in vitro* (Figura 2) foi observada tanto no córtex como na medula renal e houve uma redução de aproximadamente 60%, ao passo que com o tratamento (Figura 5) se observou competição somente na medula, com uma redução de aproximadamente 21%. Provavelmente isto está relacionado com a dose de colina não radioativa oferecida, sendo que no experimento *in vitro* essa dose foi maior que no experimento do tratamento.

A Figura 7 mostra que existe influência da suplementação de colina na formação de glicina betaína no córtex renal. Tanto nos controles como nos diabéticos, a suplementação de colina fez com que houvesse um aumento na formação de glicina betaína. Isto pode estar acontecendo de maneira semelhante ao observado por Perrino & Pierce (2000) que avaliaram a cinética enzimática da colina desidrogenase (CD) e betaína aldeído desidrogenase (BADH), onde utilizaram diferentes doses de colina não marcada para estimular a síntese de glicina betaína em ostras. Outros protocolos também utilizam esta metodologia para avaliar a gliconeogênese (Oliveira & Da Silva, 1997), síntese de glicogênio

(Kucharski *et al.*, 2002) e síntese de proteína (Schein, 1999). Como o substrato (colina) foi oferecido cronicamente por 30 dias, o sistema enzimático foi ativado, e quando a colina radioativa foi adicionada ao meio de incubação, acabou por aumentar a sua oxidação à betaína.

Não foi observada nenhuma modificação na formação de glicina betaína na medula renal nos ratos controles ou diabéticos tratados (Figura 8), evidenciando o que já foi observado, que o mecanismo enzimático está localizado no córtex renal (Grunewald & Eckstein, 1995), então a suplementação de colina não tem efeito na formação de glicina betaína na medula renal.

Nota-se que, se o tecido estivesse íntegro, com o córtex e a medula se comunicando, possivelmente essa betaína formada pelo córtex seria acumulada na medula, que é onde esse osmólito será utilizado para contrabalançar a alta osmolaridade do meio (Sizeland *et al.*, 1993; Beck *et al.*, 1998; Handler & Kwo, 2001).

Outro fato observado nos experimentos foi o índice renal, o que demonstra a hipertrofia renal apresentada nos ratos diabéticos. Na Tabela 1, do primeiro grupo experimental, o índice renal dos ratos diabéticos (0,50% do peso corporal) foi significativamente maior que o dos ratos controles (0,31% do peso corporal), evidenciando essa hipertrofia renal causada pela nefropatia diabética (Lohr, 1991; Bardoux *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 2004). A Tabela 2 mostra que o tratamento com colina não influenciou o índice renal nos ratos controles, pois tanto os isentos como os tratados apresentaram os mesmos valores. Na comparação entre os controle e os diabéticos, seguiu-se o padrão da Tabela 1 onde os grupos diabéticos apresentaram valores maiores que os controles, mostrando que o

tratamento com colina não influenciou o aparecimento da hipertrofia renal na nefropatia diabética.

Em resumo, este trabalho demonstrou que, em resposta ao diabetes melitus, o tecido renal capta mais colina provavelmente para tentar amenizar a diurese osmótica. O tratamento com colina não marcada na alimentação fez com que ativasse o mecanismo de conversão de colina em glicina betaína no córtex, mas esse mecanismo não foi modificado pela doença. E esse tratamento também não influenciou o processo de hipertrofia renal apresentado pelos animais diabéticos.

Pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a colina e a glicina betaína atuam sobre a disfunção osmótica causada pelo diabetes. Estudos posteriores, como a avaliação da atividade enzimática nestes tecidos, estudos com túbulos renais isolados ou ainda com diferentes doses de tratamento devem ser realizados para serem obtidas maiores informações sobre os mecanismos osmóticos envolvidos no diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 27(SUP 1):S5-S10.
- BARDOUX, P.; MARTIN, H.; AHLOULAY, M.; SCHMITT, F.; BOUBY, N.; TRINH-TRAN-TAN, M.M. & BANKIR, L., 1999, Vasopressin contributes to hiperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: Study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:10397-10402.
- BC CANCER AGENCY, 1994, Cancer Drug Material. Canadá. Artigo por home page. www.bccancer.bc.ca
- BECK, F.; KENTISCHER, A.B. & MULLER, E., 1998, Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Eur. J. Physiol.* 436:814-827.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N., 1996, Fisiologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- BOCH, J.; KEMPF B.; SCHMID, R. & BREMER, E., 1996, Synthesis of the Osmoprotectant Glycine Betaine in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *gbsAB* Genes. *J. Bacteriol.* 178:5121-5129.
- COURRÈGES, M.C.; BENENCIA, F.; UCEDA, A. & MONSERRAT, A.J., 2003, Effect of dietary choline deficiency on immunocompetence in Wistar rats. *Nutrition Research* 23: 519-526.
- DE BRUIN, N.M.W.J.; KILIAAN, A.J.; DE WILDE, M.C. & Broersen, L.M., 2003, Combined uridine and choline administration improves cognitive deficits in

spontaneously hypertensive rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 80:63-79

EICHLER, P., 2001, **Transporte de glicose e aminoácidos nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851)**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ENGEL, C.L.; MARINHO, M.L.; DURANT, A.; ENGEL, H.; LIMA, M.R., 2004, Nefrologia – Envolvimento Renal nas Doenças Sistêmicas. *Medcurso 2004*, Vol 3.

FARIA, J.B.L de, 2001, Atualização em fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética. *J. Bras. Nefrol.* 23(2):121-129.

GILLES, R. & PEQUEUX, A., 1985, Ion transport in crustacean gills: Physiological and ultrastructural approaches. In: GUILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. *Transport Process, Ions and Osmoregulation*. Berlin: Springer-Verlag. Current Comparative Approaches. P. 136-158.

GILLES, R., 1982, Osmoregulatory process in mollusc and crustacean from media with fluctuating salinity regime. *Bol. Fisiol. Animal USP*, 6: 1-36.

GILLES, R., 1983, Review: Volume maintenance and regulation in animal cells: Some features and trends. *Molec. Physiol.*, 4: 3-16.

GILLES, R., 1997, “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A: 279-290.

- GRUNEWALD, R.W. & EKCSTEIN, A., 1995, Osmotic regulation of the betaine metabolism in immortalized renal cells. *Kidney International* 48: 1714-1720.
- GRUNEWALD, R.W.; OPPERMAN, M.; SCHETTLER, V.; FIEDLER, G.M.; JEHLE, P.M. & SCHUETTERT, J.B., 2001, Polarized function of thick ascending limbs of Henle cells in osmoregulation. *Kidney International* 60: 2290-2298.
- GUO-ROSS, S.X.; JONES, K.H.; SHETTY, A.K.; WILSON, W.A. & SWARTZWELDER, H.S., 2003, Prenatal dietary choline availability alters postnatal neurotoxic vulnerability in the adult rats. *Neuroscience Letters* 314: 161-163.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E., 1997. Tratado de fisiologia médica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E., 1998, Fisiologia Humana e Mecanismo das Doenças. 6^a Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- HANDLER, J.S. & KWON, H.M., 2001, Cell and molecular biology of organic osmolyte accumulation in hypertonic renal cells. *Nephron* 87: 106-110.
- HOUSSAY, A.B. & CINGOLANI, H.E., 2004, Fisiologia Humana de Houssay. 7^a Edição, Porto Alegre: Editora Artmed p.452-481, cap. 23
- JAHN, M.P., 2001, **Efeito osmoprotetor da colina nas brânquias e hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) submetido ao estresse osmótico.** Porto Alegre: UFRGS. (Bacharelado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- KETTUNEN, H.; PEURANEN, S. & TIIHONEN, K., 2001, Betaine aids in the osmoregulation of duodenal epithelium of broiler chicks, and affects the movement of water across the small intestinal epithelium in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 129 A: 595-603.
- KIENE, R.P., 1998, Uptake os Choline and Its Conversion to Glycine Betaine by Bacteria in Estuarine Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3): 1045-1051.
- KIM, T.K.; RYU, J.S.; CHUNG, J.Y.; KIM, M.S. & LEE, G.M., 2000, Osmoprotective Effect of Glycine Betaine on Thrombopoietin Production in Hyperosmotic Chinese Hamster Ovary Cell Culture: Clonal Variations. *Biotechnol. Progr.* 16:(5)775-781.
- KUCHARSKI, L.C.R.; SCHEIN, V.; CAPP, E. & DA SILVA, R.S.M., 2002, *In vitro* insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chamagnathus granulata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125:256-263.
- LOHR, J.W.; BENNETT, M.I.; POCHAL, M.A.; MCREYNOLDS, J.; ACARA, M. & WILLSKY, G.R., 1991, Effect of vanadate on renal hypertrophy ans sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetes in rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Parhmacology* 72 (2): 191-202.
- MACHADO, V.L.A.; WASSERMANN, G.F. & MARQUES, M., 1991, *In vitro* effect of insulin on the uptake of glucose and α -Aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorbigni*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 82: 8-13.
- MALNIC, G.; MARCONDES, M., 1986, Fisiologia renal. 3.ed. São Paulo: EPU.

- MILLER, T.J.; HANSON, R.D. & YANCEY, P.H., 2000, Developmental changes in organism osmolytes in prenatal and postnatal rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 125 A:45-56.
- MOECKEL, G.W. & LIEN, Y.H., 1997, Distribution of de novo synthesized betaine in rat kidney: role of renal synthesis on medullary betaine accumulation. *Am. J. Physiol.* 272 (*Renal Physiol.* 41): F94-F99.
- MOECKEL, G.W.; LAI, L.; GUDER, W.G.; KWON, H.M. & LIEN, Y.H., 1997, Kinetics and osmoregulation of Na⁺ - and Cl⁻ -dependent betaine transporter in rat renal medulla. *Am. J. Physiol.* 272 (*Renal Physiol.* 41): F100-F106.
- NYSSOLA, A.; KEROVUO, J.; KAUKINEN, P.; VON WEYMARN, N. & REINIKAINEN, T., 2000, Extreme Halophiles Synthesize Betaine from Glycine by Methylation. *J. Biol. Chem.* 275:22196-22201.
- OGBORN, M.R.; NITSCHMANN, E.; BANKOVIC-CALIC, N.; BUIST, R. & PEELING, J., 2000, Dietary betaine modifies hepatic metabolism but not renal injury in rat polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: G1162-G1168.
- OKUDA, T. & HAGA, T., 2000, Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Letters.* 484:92-97.
- OKUDA, T.; HAGA, T.; KANAI, Y.; ENDOU, H.; ISHIHARA, T. & KATSURA, I., 2000, Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature Neuroscience* 3:120-125.
- OLIVEIRA, G.T. & DA SILVA, R.S.M., 1997, Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118 A (4): 1429-1435.

- PACKER, L.; ROSEN, P.; TRITSCHLER, H.J.; KING, G.L. & AZZI, A., 2000, Antioxidants in diabetes management. Ed. Marcel Dekker, New York.
- PERRINO, L.A. & PIERCE, S.K., 2000, Choline Dehydrogenase Kinetics Contribute to Glycine Betaine Regulation Differences in Chesapeake Bay and Atlantic Oysters. *J. Exp. Zool.* 286:250-261.
- PETTY, C.N. & LUCERO, M.T., 1999, Characterization of Na⁺-Dependent Betaine Transporter with Cl⁻ Channel Properties in Squid Motor Neurons. *J. Neurophysiol.* 81:1567-1574.
- PICKUP, J. & WILLIAMS, G., 1998, Textbook of Diabetes. 2 ed. Blackwell Science. 164p.
- PIERCE, S.K.; ROWLAND-FAUX, L.M. & CROMBIE B.N., 1995, The Mechanism of Glycine Betaine Regulation in Response to Hyperosmotic Stress in Oyster Mitochondria: A Comparative Study of Atlantic and Chesapeake Bay Oysters. *J. Exp. Zool.* 271:161-170.
- POUGH, F. H.; HEISER, J.B. & Mc FARLAND, W. N., 1993, A vida dos vertebrados. 1 ed. São Paulo: Atheneu.
- PUMMER, S.; DANTZLER, W.H.; LIEN, Y.H.; MOECKEL, G.W.; VOLKER, K. & SILBERNEGL, S., 2000, Reabsorption of betaine in Henle's loops of rat kidney in vivo. *Am. J. Physiol.* 278 (*Renal Physiol.*): F434-F439.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W. & FRENCH, K., 2000, ECKERT Fisiologia animal – mecanismos e adaptações. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- RANDALL, R.; LEVER, M.; PEDDIE, B.A. & CHAMBERS S.T., 1996, Natural and synthetic betaines counter the effects of high NaCl and urea concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1291:189-194.

- RATHINASABAPATHI, B., 2000, Metabolic Engineering for Stress Tolerance: Installing Osmoprotectant Synthesis Pathways. *Annals of Botany*. 86: 709-716.
- SCHEIN, V., 1999, **Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1852)**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SHILLS, M.E.; OLSON, J.; SHILKE, M.; ROSS, A.C., 1999, Modern Nutrition in Health and disease. 9^a Ed, Baltimore.
- SIZELAND, P.C.B.; CHAMBERS, S.T.; LEVER, C.; BASON, L.M. & ROBSON, R.A., 1993, Organic osmolytes in human and other mammalian kidneys. *Kidney International* 43: 448-453.
- TAKEUCHI, K.; UESHIMA, M.A.K.; OHICHI, B.S.T. & OKABE, S., 1994, Introduction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. *Digestive Diseases and Sciences* 39 (3).
- VAN DER HEIDE, T. & POOLMAN, B., 2000, Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *PNAS*. 97:7102-7106.
- VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S., 1981, Fisiologia humana: os mecanismos da função de órgãos e sistemas. 3.ed. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil.

WELSH, D.T., 1999, Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cell to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:263-290.