

**C. HIPÓLITO-REIS**

ASSISTENTE DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO  
BOLSEIRO DO INSTITUTO DE ALTA CULTURA

# **CETOSE E CETOGENESE**

**estudo experimental  
ensaio de interpretação**

TRABALHO DO LABORATÓRIO DE QUÍMICA FISIOLÓGICA

PORTO

1 9 7 0

PUBLICAÇÃO SUBSIDIADA PELO INSTITUTO DE ALTA CULTURA

# **CETOSE E CETOGENESE**

**estudo experimental  
ensaio de interpretação**

**CÂNDIDO ALVES HIPÓLITO REIS**

ASSISTENTE DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO  
BOLSEIRO DO INSTITUTO DE ALTA CULTURA

# **CETOSE E CETOGENESE**

**estudo experimental  
ensaio de interpretação**

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU  
DE DOUTOR APRESENTADA À FACULDADE  
DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

TRABALHO DO LABORATÓRIO DE QUÍMICA FISIOLÓGICA  
SUBSIDIADO EM PARTE PELO III PLANO DE FOMENTO, 1968, 1969 e 1970

**PORTO**

**1 9 7 0**



---

Tipografia BLOCO GRÁFICO, Limitada  
Rua da Restauração, 387 — P O R T O

CORPO DOCENTE  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

---

DIRECTOR

Professor Doutor JOSÉ RUIZ DE ALMEIDA GARRETT

SECRETÁRIO

Professor Doutor MANUEL SOBRINHO RODRIGUES SIMÕES

PROFESSORES CATEDRÁTICOS

Doutor JOSÉ AFONSO DIAS GUIMARÃIS . . . . .	Fisiologia
Doutor ANTÓNIO DE SOUSA PEREIRA . . . . .	Patologia Cirúrgica
Doutor LUÍS JOSÉ DE PINA GUIMARÃES . . . . .	História da Medicina
Doutor ÁLVARO ANTÓNIO PINHEIRO RODRIGUES . . . . .	Clínica Cirúrgica
Doutor ERNESTO BORGES TELXEIRA DE MORAIS . . . . .	Patologia Geral
Doutor ANTÓNIO MARTINS GONÇALVES DE AZEVEDO . . . . .	Clínica Obstétrica
Doutor ANTÓNIO JOSÉ DE OLIVEIRA FERRAZ JÚNIOR . . . . .	Clínica Médica
Doutor FRANCISCO ALBERTO DA COSTA PEREIRA VIANA . . . . .	Patologia Médica
Doutor MANUEL DA SILVA PINTO . . . . .	Histologia e Embriologia
Doutor CARLOS RIBEIRO DA SILVA LOPES . . . . .	Medicina Legal e Toxicologia Forense
Doutor JOAQUIM JOSÉ MONTEIRO BASTOS . . . . .	Propedêutica Cirúrgica
Doutor EDUARDO ESTEVES PINTO . . . . .	Pneumotisiologia
Doutor JÚLIO MACHADO DE SOUSA VAZ . . . . .	Bacteriologia e Parasitologia
Doutor ABEL JOSÉ SAMPAIO DA COSTA TAVARES . . . . .	Anatomia Topográfica
Doutor JOSÉ RUIZ DE ALMEIDA GARRETT . . . . .	Farmacologia
Doutor MANUEL SOBRINHO RODRIGUES SIMÕES . . . . .	Química Fisiológica
Doutor JOSÉ FERNANDO DE BARROS CASTRO CORREIA . . . . .	Anatomia Descritiva
Doutor EMÍDIO JOSÉ RIBEIRO . . . . .	Propedêutica Médica
Vaga . . . . .	Higiene e Medicina Social
Vaga . . . . .	Clínica Pediátrica e Puericultura
Vaga . . . . .	Anatomia Patológica
Vaga . . . . .	Medicina Operatória

PROFESSORES JUBILADOS

Doutor JORGE DE AZEVEDO MAIA  
Doutor CARLOS FARIA MOREIRA RAMALHÃO  
Doutor MANUEL CERQUEIRA GOMES  
Doutor FRANCISCO MANUEL DA FONSECA E CASTRO  
Doutor AMÂNDIO JOAQUIM TAVARES

Artigo 48.º, § 3.º — A Faculdade não responde  
pelas doutrinas expendidas na dissertação.

*(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto,  
29 de Janeiro de 1931. — Decreto n.º 19 337).*

AO CORPO CATEDRÁTICO  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA  
DO  
PORTO

AO EXCELENTÍSSIMO SENHOR

PROF. MANUEL SOBRINHO RODRIGUES SIMÕES

À MEMÓRIA DO

PROF. ELÍSIO MILHEIRO

AOS EXCELENTÍSSIMOS SENHORES PROFESSORES

AFONSO GUIMARÃIS

E

JOSÉ DE ALMEIDA GARRETT

*À memória  
de minha Mãe  
e de minha filha Maria da Paz*

*A meu Pai*

*A minha mulher*

*A meus filhos*



## PREFÁCIO

Motiva a tradição que as palavras de um exórdio se aponham e antepõem. E por nós não deixaremos de o fazer, de tal modo lhe compreendemos também a significação.

Permite o prólogo apresentar o trabalho, falar da sua radicação e evolver, testemunhando-se, também assim, as ajudas recebidas, e ainda pedir a compreensão e a benevolência de quem lê o escrito, apresentando-se-lhe as razões que determinaram limites no alcance e na profundidade.

Ora, destas, assim por três ordens repartidas, só as intercalares nos parecem legítimas razões e permissões — e por elas sentimos grata a oportunidade deste encontro pessoal com a tradição que desejamos, afinal, ampliar; as outras não nos parecem legítimas — e não sentimos nem a tentação de as usar nem, outro tanto, o desejo de rever o problema da sua legitimidade.

Sendo, como no rosto se diz, dissertação de doutoramento, este trabalho, que apresentamos ao douto Conselho da Faculdade que nos formou e em que temos a subida honra de ser Assistente, constituirá matéria de julgamento no acto a que, com perfeita consciência e liberdade plena, nos desejamos submeter.

Não seria por isso justificado que nós mesmos adiantássemos um julgamento. A nossa atitude é em si mesma um acto de fé e de esperança que, bem o sabemos, vale por si.

Só para os que não julgam ou não são capazes de descobrir por si mesmos, não estiveram nunca ou não estarão jamais em circunstâncias destas poderia ter sentido dizer que se trata de uma dissertação que pretende fidelidade ao estilo próprio da dissertação; no entanto, se os excluirmos, quando nos perguntássemos sobre para quem falávamos, quando assim sem enfeites nem postigos arranjos falássemos, afinal nada teríamos a dizer também.

Apresentação de outro modo, quando acabámos de escrever o sumário temático que deixamos como epílogo, deslocada nos parece, porque ele bastará para quem a desejar, e nunca seria necessária para quem julgar — que terá de conhecer.

Falar da sua radicação e evolver, isso sim: grata é a oportunidade, e não passará silente, porque então permite o exórdio explicitar o pensamento profundo e as motivações sondadas do trabalho a que moldura se tem de dar. É neste sentido que a escritura, quando o trabalho terminou, pode na verdade ser prefácio e que, também afinal, não há dissertação sem prefação.

Pretendemos, nesta perspectiva, explicitar, até onde nos sejam conhecidas, as relações de sustentação (alma mater — alimentadora), sem as quais não seria possível nem o ser nem o estar.

Sabemos, como Zubiri sabia, que Es un profundo error pensar que la ciencia nace por el mero hecho de que su objeto exista y de que el hombre posea una facultad para conocerlo. El hombre de Altamira y Descartes no se distinguen tan sólo en que éste filosofa y aquél no, sino en que el hombre de Altamira no podía filosofar <sup>11</sup>.

Reconhecemo-nos na nossa circunstância e sem amargura nos confessamos, mesmo tendo em frente o caminho do futuro... — Porquê falar de amargura? — Porque nos é necessário hoje fazê-lo para nos entendermos e distinguirmos o que é estado primário e superação.

Sabemos, no próprio ser, que o pessimismo é uma avaliação da vida, feita longe da experiência e do positivismo da dor. É muitas vezes uma fácil atitude literária e muitas outras uma simples anemia de carácter; é sempre a resolução dum problema na ignorância das relações, que o definem <sup>7</sup>.

Sabemos também que hoje mesmo se nos depara a realidade de mais recuado estádio, na própria recusa formal (como ponto de ser e estar que pretende não ser de partida, mas que é) de resolver o problema, perante a dificuldade efectiva dos tempos prodigiosos e difíceis em que somos.

A possibilidade de ser muito pode levar, na impossibilidade de possuir (que não de ser), ao desejo de não ser... Mas ser homem é sempre fazer-se homem <sup>6</sup>, irremediavelmente.

Zubiri formula o asserto aduzido e integrado para concluir que La ciencia nació solamente en una vida intelectual. No cuando el hombre estuvo, como por un azar, en posesión de verdades, sino justamente al revés, cuando se encontró poseído por la verdad. En este «pathos» de la verdad se gestó la ciencia <sup>11</sup>. E é também uma sua ideia, como de todos os pensadores, que a dificuldade do filosofar provém da própria natureza disso, de ser encontro pessoal e total — íntimo.

É assim que trabalho de grupo pode ser também como por un azar.

18 Só rende em grupo quem é capaz de dar, por ser livre — quem tem o sentido

da afirmação pessoal. E hoje fala-se muito do trabalho de colaboração, e bem...

Pois no mundo em que somos, a nossa palavra será de optimismo — não porque o mundo seja óptimo, mas porque o desejamos fazer bom, amoroso, penetrado de consciência e entendimento ?.

O filósofo Álvaro Ribeiro tem razão quando diz que quem não acredita sem ver, não acredita nem acreditará ?.

Este é, assim, e seja qual for o futuro pessoal e circunstancial, um compromisso de raiz, na melhor interpretação do sentido dinâmico da tradição e da humildade.

E é do mesmo modo também que falaremos do Mestre, pois o espírito faz a sua promoção pelo recurso ao espírito.

O Mestre exerce a sua acção mais profunda, essencialmente, pela formulação actual das suas opções fundamentais — não necessariamente, portanto, na exegética formal, mas, verdadeiramente, na própria afirmação pessoal do seu ser.

Da vida intelectual, a natureza é movimento, e poderá parecer que a referência que acabamos de fazer é afinal coisificação, mas outra não é a possibilidade de escaparmos aos sofismas — quer sejam os de Zenão ou quaisquer outros.

No discípulo revive assim a mesma vida — silenciosamente...

Esta a homenagem que agradecidamente aqui exaramos ao Prof. Manuel Sobrinho Simões.

A dívida de gratidão que temos para com a memória do Prof. Elísio Milheiro, desde que frequentámos o nosso curso e então — e só então — começámos a sentir, no curso universitário, a conformidade do ser, desejar e dever, ficou maior quando, por sua permissão e com o carinho que na sua aceitação sentimos, iniciámos sob a orientação do Prof. Manuel Sobrinho Simões os nossos primeiros passos no estudo aprofundado da Química Fisiológica e, mais, na investigação dos seus problemas.

Esta lembrança sentida e saudosa é ainda uma avaliação concreta.

A solicitação para outra presença e outros trabalhos interrompeu os nossos incipientes passos. O recomeço, se é sempre difícil, aqui mais o foi, porque houvera tempo para elaboração mental e contacto com realidades extraordinárias que permitiram sentir amplas dimensões da capacidade de ser; mas na mesma linha, não foi difícil encontrar a própria humildade.

Trabalho de colaboração é um caminho; afirmação pessoal, essa a tese a necessitava. Sempre e em todos os casos a presença crítica do Mestre,

que põe à prova, mas que silenciosamente se sente estar preocupada — e ser orientação.

Assim se tem feito a nossa própria formação científica de que a tese haveria de surgir como epifenómeno. Alguns trabalhos foram entretanto publicados. O trabalho da tese, afirmação pessoal, haveria de ficar inédito — não só no que aos resultados obtidos se refere mas também no que toca à própria concepção. E ficou — e aqui está agora para no conjunto se apresentar como desejou ser.

Não será difícil reconhecer-se a influência do Mestre, e por nós com alegria o fazemos, no próprio campo de trabalho que começou a ser explorado no Laboratório de Química Fisiológica aquando da preparação da sua tese e que encontramos em enriquecida linha de trabalho tópicamente realizada do Porto para Oxford com regresso.

Possibilidade de alegria pela conformidade plena com a situação em que perpassam forças que interiorizam e permitem, pelo conhecimento que delas assim temos, prometer o caminho seguinte — essa a devemos ao Prof. Manuel Sobrinho Simões.

Pois essas forças, que perpassam na circunstância, são várias ou apresentam-se múltipla e diferentemente — e advêm também da problemática essencial da própria atitude científica encarada crónica e tópicamente. Simples o itinerário — evidentemente — e na própria simplicidade a grandeza do abismo e o mistério da individuação que outros já claramente viram e nós descobrimos e sentimos também.

— Claude Bernard o diz: é a ideia que é o princípio de todo o raciocínio e de toda a invenção, é nela que mergulha toda a espécie de iniciativa <sup>3</sup>.

— Mas nós sabemos que o nosso ser excede as nossas ideias <sup>9</sup>; que o ser humano não cabe dentro de fórmulas nem de regras. Só os defuntos cabem num esquite, que é a lei das quatro tábuas <sup>10</sup>.

— Por outro lado, se o conhecimento científico da realidade ultrapassa os interesses da existência <sup>6</sup>, como diz Jaspers, uma praxis baptizada leva-nos a desejar exaurir o que é conquistado.

Filosofia, ciência, técnica — aí estão num mundo complexo.

20 Aqui recordamos Zubiri, já citado, e reconhecemos que Claude Bernard claramente intuiu o problema quando, dados os primeiros passos da Biologia

nascente, advertiu de forma categórica e sem possibilidade de deixar dúvidas: se admito a especialização para o que é prático na ciência, repudio-a de forma absoluta para tudo o que é teórico. Realmente, considero que fazer especialização das generalidades é um princípio antifilosófico, ainda que haja sido proclamado por uma moderna escola filosófica que se orgulha de ter os seus fundamentos na ciência <sup>3</sup>.

Não há dúvida de que, desde o princípio da instituição do método experimental, a possibilidade de regresso se encontra assegurada e necessitada.

Assim compreendemos também a límpida precedência da aventura filosófica ao método científico, para nós Portugueses muito especialmente, e de tal modo que, precedente, e por isso, permanece e paira, remanescente ou reacendida, sempre outra vez e mais profundamente até que, continuando, e continuando mesmo assim, se descubra, na paz, o mundo como fenomenalidade evanescente entre Deus e a existência <sup>6</sup>.

Dissipar, impedir, esclarecer o solipsismo que é uma atitude em que erradamente nos podemos colocar por ímpeto que parece ser ou é fatalidade, tal o movimento do ser consciência entre o mundo e a sua interpretação.

É neste movimento que aparece a função universitária — que é de instituição distinta de escola secundária de alto grau —, profundamente, por motivação do próprio pensamento.

Também é simples e clara a confluência.

— Si el filósofo se encontrase solo ante los objetos, la filosofía sería siempre una filosofía primitiva <sup>4</sup>— e não se encontra e não é.

— E a praxis baptizada de que falámos? Acresce que em todas as sociedades, o regime pedagógico é mais importante do que o regime político, e que nas nações modernas a orientação do magistério determina, anos depois, a acção no ministério <sup>2</sup>.

— E para esse movimento não são necessárias condições?

Rof Carballo <sup>5</sup> claramente o analisou ao considerar que a religação do homem que se ocupa das ciências, para que possa ter a liberdade de desenvolver o seu pensamento, há-de fazer-se à Universidade, a qual, para que se torne realidade viva, deve saber renascer todos os dias para um espírito novo.

A mesma necessidade nos leva a pensar que assim como Álvaro Ribeiro <sup>2</sup> distingue, face ao verbo, o sujeito e o agente, e diz que há sempre Deus há sempre Pátria, há sempre Rei, também nós podemos dizer que há sempre Universidade. O ponto é saber onde está.

*Para quem, como nós, também lê pela cartilha de D. Santiago — Se ha dicho que la Ciencia no tiene patria, y esto es exacto; mas, como contestaba Pasteur en ocasión solemne, «los sabios sí que la tienen»<sup>3</sup> — necessário se torna, no entanto, reconhecer que é consolador poder afirmar que esta consciência profunda de ser individuado e português se conforma em encontrar o que se pode desejar encontrar: a possibilidade de ser, embora em dificuldade e com todos os riscos.*

*A existência move-se sobre o abismo. Há quem se debruce e reconheça que os perigos que se correm são terríveis. Porém é necessário reconhecer com Ortega que o filosofar é um intento de sobreviver que é consubstancial à vida e que é necessário quando se filosofa habituarse a detener la mirada sobre el vivir mismo, sin dejarse arrastrar por él en su movimiento hacia lo ultravital<sup>4</sup>.*

*Falar de radicação e evolver é também, como se disse, explicitar o pensamento profundo e as motivações sondadas. Elas aqui ficam, a prefaciá-lo este que é documento da nossa vivência de alguns anos de Assistente em que nos fomos preparando e em que desejaríamos continuar a preparar-nos sempre...*

*Falar de radicação e evolver há-de ser também falar das ajudas recebidas.*

*Com uma bolsa concedida pelo Plano Intercalar de Fomento, estagiámos, durante um mês, em Madrid, em 1967. Essa foi uma oportunidade excepcional pelos horizontes que nos abriu e pelas perspectivas que nos concedeu.*

*Não esqueceremos, até, que são dessa proveniência os ratos que utilizámos na maior parte das nossas experiências e que muitas das espécies bibliográficas fundamentais foi então que as pudemos estudar.*

*Estagiámos no Instituto Gregorio Marañón do Centro de Investigaciones Biológicas do Consejo Superior de Investigaciones Científicas de que é director o Prof. José Luis Rodríguez-Candela e trabalhamos em estreita relação com o Doutor Clemente López-Quijada a quem agradecemos tudo quanto nos deram e possibilitaram.*

*A frequência do Instituto de Enzimologia do Doutor Alberto Sols permitiu-nos também ampliar a nossa visão, e muito gratos nos confessamos pelo acolhimento que sempre nos foi dispensado.*

*Há dez anos, quando prefaciámos a nossa dissertação de licenciatura, prometemos ao Senhor Doutor Daniel Serrão, como paga de uma dívida*

que, bem o sabíamos e sabemos, não nos seria, nem será, possível pagar, a fidelidade constante ao mesmo entusiasmo pela Ciência e pela Escola que com ele aprendemos a amar. Hoje, ao reconhecermos aqui a nossa ampliada dívida de gratidão, os termos com que nos referimos ao Prof. Daniel Serrão são, renovada e ampliadamente, os mesmos.

É-nos grato registrar a amizade sempre patente e a ajuda recebida do Prof. José Pinto de Barros a quem agradecemos tudo quanto nos tem dado e a disponibilidade com que nos tem atendido desde o nosso ingresso no Laboratório de Química Fisiológica.

Ao Dr. José Luís Medina Vieira agradecemos o entusiasmo que constantemente manifestou pelo nosso trabalho e a ajuda que sempre nos procurou dar, desde a sua entrada para o Laboratório de Química Fisiológica.

No Laboratório de Farmacologia sempre encontrámos quer pelo apurado sentido do trabalho científico quer pelas altíssimas qualidades humanas, um ambiente universitário exemplar onde nos recolhemos quando necessitámos. Aí temos aprendido também a cultivar a amizade e a estimar as pessoas.

Ao Senhor Prof. José de Almeida Garrett agradecemos o entusiasmo que sempre nos comunicou e o interesse que sempre manifestou pelo nosso trabalho — razões que tantas vezes foram motivos para acreditarmos mais no nosso trabalho e no caminho em que nos empenhamos — e agradecemos todas as facilidades concedidas no Laboratório de Farmacologia sempre que delas necessitámos, e muitas foram, designadamente em material e em bibliografia.

Ao Senhor Prof. Walter Osswald agradecemos a atenção que nos tem concedido e a confiança com que, distinguindo-nos, nos tem animado. Muito lhe devemos, especialmente porque, tendo-nos sempre atendido e ouvido, muitas vezes nos permitiu que assim melhor nos encontrássemos.

Ao Doutor Serafim Guimarães, o reconhecimento do seu fraterno interesse pelos nossos problemas, e o testemunho da nossa fraterna amizade.

Na realização deste nosso trabalho concederam-nos ajudas valiosíssimas o Doutor Joaquim Maia e o Doutor Valdemar Cardoso.

Ao Doutor Joaquim Maia agradecemos a dedicação e o interesse que nos dispensou pessoalmente e que dispensou ao nosso trabalho e a ajuda que nos proporcionou. Esta ajuda muito enriqueceu o nosso estudo, pois permitiu que conseguíssemos o apuramento de informação que desejávamos

fazer. Por isso estamos-lhe muito gratos; no entanto, o que mais lhe agradecemos é o ter-nos permitido que descobrísemos a sua amizade e o seu agudo sentido universitário que nos são gratos acima de tudo.

Ao Doutor Valdemar Cardoso, ao amigo de sempre, o reconhecimento da sua valiosa ajuda, e um testemunho de fraterna amizade.

Agradecemos à Senhora Prof.<sup>a</sup> Doutora D. Maria Helena da Rocha Pereira a gentileza de ter revisto as provas do texto de Platão, que de há muito guardávamos para abrir este nosso trabalho, e muito particularmente a valiosa tradução que agora apresentamos do mesmo texto.

A todos os amigos que profundamente se preocuparam com o problema concreto da realização deste trabalho e que o sentiram como se seu fosse, aqui expressamos a nossa imarcescível gratidão.

A possibilidade de completarmos este trabalho no tempo em que o realizámos ficámos a devê-la ao nosso querido amigo Eng.<sup>o</sup> António Leite de Castro que sempre manifestou por estas investigações o maior interesse e que, com prejuízo das suas próprias actividades, permitiu que dispuséssemos de uma máquina de calcular que reduziu ao mínimo o muito tempo dedicado aos cálculos; por tudo, ao Eng.<sup>o</sup> Leite de Castro e a sua Esposa, o testemunho da nossa amizade e da nossa gratidão.

Referências de gratidão e de amizade devemo-las igualmente ao Eng.<sup>o</sup> Alberto Pinto Resende e a sua Esposa, pela ajuda e amparo que sempre nos deram, como as devemos ao Eng.<sup>o</sup> António Silva Martins e Esposa, ao Dr. Francisco Ayres Ribeiro Costa e Esposa, ao Dr. Joaquim José Rodrigues Gonçalves e Esposa, ao Eng.<sup>o</sup> Nicolau Sotto Mayor Negrão e Esposa, ao Padre Raimundo Castro Meireles e ao Padre Bernardo Domingues.

Ao Avelino Domingos Reis Gonçalves da Silva, que se encarregou de ultimar a documentação iconográfica, o testemunho do nosso reconhecimento.

Aos que como técnicos ou auxiliares trabalham no Laboratório de Química Fisiológica devemos agradecer os bons serviços com que fomos ajudados. Muito grato nos é registar a dedicação da preparadora Senhora D. Celeste de Oliveira Cardoso Peixoto. Reconhecidamente registámos também a diligência e o zelo do Senhor José António Mendes, do Senhor Joaquim de



Sousa Couto, da Senhora D. Maria Fernanda Queiroz Ribeiro e da Senhora D. Maria da Conceição Antunes.

*Desejamos agradecer às firmas e Laboratórios que nos ofereceram algumas das substâncias utilizadas na experimentação. À Sociedade Farmacêutica Abecassis, S. A. R. L. e à sua representada American Cyanamid Company agradecemos a oferta do diacetato de triamcinolona (Aristocort) com que trabalhamos. Aos Laboratórios Químico-Biológicos Delta e aos seus representados Laboratoires Aron agradecemos o cloreto de metformina (Glucophage) utilizado. A J. A. Baptista d'Almeida, Lda. e à sua representada Novo Industri A/S e à Hoechst Portuguesa, S. A. R. L. e à sua representada Farwerke Hoechst A. G. agradecemos a oferta da insulina cristalina que empregámos nas nossas experiências.*

*Algumas das espécies bibliográficas que não nos seria possível obter de outra maneira foram-nos oferecidas por firmas e laboratórios de produtos químico-farmacêuticos; aos Laboratórios Atral, ao Laboratório Carlo Erba, a Produtos Ciba, Lda., ao Instituto Luso-Fármaco, S. A. R. L., a Lepetit, a Henri Reynaud, Lda. (F. Hoffmann-La Roche & Cie, S. A.) a Produtos Sandoz e ao Laboratório Sanitas agradecemos, por isso, a preciosa ajuda.*

*À Exma. Direcção do Centro de Biologia da Fundação Calouste Gulbenkian desejamos manifestar o nosso agradecimento pela inestimável ajuda que tem constituído para nós o fornecimento regular de animais de experiência ao Laboratório de Química Fisiológica, sempre em óptimas condições, e que nos permitiu um ritmo de trabalho que de outro modo não seria possível.*

*À Exma. Direcção do Instituto de Alta Cultura agradecemos a bolsa de estudo que nos tem concedido e que tem sido para nós valioso auxílio; por isso aqui exaramos o testemunho da nossa gratidão.*

*Este trabalho também não teria sido possível sem os subsídios atribuídos pelo III Plano de Fomento do Ministério da Educação Nacional ao Laboratório de Química Fisiológica. Às entidades oficiais responsáveis a expressão do nosso melhor reconhecimento.*

- 
- 1 — ÁLVARO RIBEIRO — *Apologia e Filosofia*, colecção *Filosofia e Ensaios*, Guimarães & C.<sup>a</sup> Editores, Lisboa, 1953.
  - 2 — ———— *A Arte de Filosofar*, Portugália Editora, Lisboa, 1955.
  - 3 — CLAUDE BERNARD — *Introdução à Medicina Experimental*, tradução portuguesa de Maria José Marinho, colecção *Filosofia e Ensaios*, Guimarães Editores, Lisboa, 1959.
  - 4 — JOSÉ ORTEGA Y GASSET — *El Tema de Nuestro Tiempo*, 16.<sup>a</sup> edición en castellano, colección «El Arquero», Ediciones de la Revista de Occidente, Madrid, 1966.
  - 5 — JUAN ROF CARBALLO — *Cerebro Interno y Sociedad*, colección «O. Crece. O. Muere», Ateneo, Madrid, 1952.
  - 6 — KARL JASPERS — *Iniciação Filosófica*, tradução portuguesa de Manuela Pinto dos Santos, Colecção *Filosofia e Ensaios*, Guimarães Editores, Lisboa, 1961.
  - 7 — LEONARDO COIMBRA — *A Alegria, a Dor e a Graça*, obras completas de Leonardo Coimbra, Volume I, Livraria Tavares Martins, Porto, 1956.
  - 8 — SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL — *Los Tónicos de la Voluntad*, octava edición, colección Austral, Espasa-Calpe, S. A., Madrid, 1963.
  - 9 — TEIXEIRA DE PASCOAIS — *S. Jerónimo e a Trovoada*, Livraria Lello & Irmão, Editores, Porto, 1936.
  - 10 — ———— *S. Paulo*, Edições Ática, Lisboa, 1959.
  - 11 — XAVIER ZUBIRI — *Naturaleza, Historia, Dios*, quinta edición, Editora Nacional, Madrid, 1963.

## CETOSE E CETOGENÉSE

Καὶ τὰ μὲν γε ἄλλα οὐκ ἂν πάνυ ὑπὲρ τοῦ λόγου δισχυρισαίμην· ὅτι δ'οἴομενοι δεῖν ζητεῖν ἅ μὴ τις οἶδεν, βελτίους ἂν εἶμεν καὶ ἀνδρικώτεροι καὶ ἤττον ἄργοι ἢ εἰ οἰοίμεθα ἅ μὴ ἐπιστάμεθα μηδὲ δυνατόν εἶναι εὐρεῖν μηδὲ δεῖν ζητεῖν, περὶ τούτου πάνυ ἂν διαμαχοίμην, εἰ οἶός τε εἶην, καὶ λόγῳ καὶ ἔργῳ.

Em relação a outros pontos, não seria eu quem faria grande força na argumentação; mas, quanto à doutrina de que, se pensarmos que devemos investigar o que ignoramos, seremos melhores, mais viris e menos ociosos do que se supusermos que não é possível descobrir, nem se deve investigar, aquilo que não sabemos — por ela, eu lutaria, até onde fosse possível, em palavras e em actos.

PLATÃO, *Ménon* 382, 384

## I

### REVISÃO CRÍTICA DE CONCEITOS

- A. **Introdução**
- B. **Enzimologia e metabolismo dos corpos cetônicos**
- C. **Produção e utilização dos corpos cetônicos na dinâmica da cetose — Funções dos corpos cetônicos**
- D. **Cetogênese e sua regulação**
  - 1. Teoria da inibição da lipogênese
  - 2. Teoria da inibição do ciclo de Krebs
  - 3. Teoria da superprodução de acetil-CoA
  - 4. Teoria da pleora de ácidos gordos não esterificados
  - 5. Condicionamento hormonal da cetose
  - 6. Relações da cetogênese com a gliconeogênese
- E. **Conclusão**

## II

### CONTRIBUIÇÃO EXPERIMENTAL

- A. **Introdução**
- B. **Condições experimentais gerais. Métodos analíticos. Proveniência das substâncias utilizadas na experimentação e nos reagentes. Estudo estatístico.**
- C. **Estudos *in vivo***

Esquemas experimentais e apresentação de resultados

  - 1. Cetose do jejum
  - 2. Cetose em ratos com alimentação intermitente
  - 3. Estudos com esteróides gliconeogênicos e com *metformina*
  - 4. Estudo de efeitos da actividade muscular
  - 5. Estudo de efeitos da ministração de uma dieta gorda e de *triamcinolona*
  - 6. Estudo de efeitos da temperatura ambiente
  - 7. Relação do azoto ureico para o azoto total da urina na intoxicação pela *floridzina*
  - 8. Estudo de efeitos da ministração de cloreto de amónio e cloreto de amónio e ornitina
- D. **Estudos *in vitro***

Condições experimentais

  - 1. Estudos com a incubação de fatias de fígado
  - 2. Estudos com a perfusão de fígado isolado

Apresentação de resultados

  - 1. Estudos com a incubação de fatias de fígado
  - 2. Estudos com a perfusão de fígado isolado

## III

### ENSAIO DE INTERPRETAÇÃO

•

BIBLIOGRAFIA  
SUMÁRIO  
SUMMARY  
ÍNDICE

## ABREVIATURAS E SINAIS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CoA	Coenzima A combinada
CoASH ou HSCoA	Coenzima A livre
FAD	Dinucleotídeo da flavina e da adenina
GTP	Trifosfato de guanosina
HMG-CoA	Beta-hidroximetilglutaril-coenzima A
ITP	Trifosfato de inosina
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo da nicotinamida e da adenina
NADH	Dinucleotídeo da nicotinamida e da adenina reduzido
NADP <sup>+</sup>	Monofosfato do dinucleotídeo da nicotinamida e da adenina
NADPH	Monofosfato do dinucleotídeo da nicotinamida e da adenina reduzido
Pi	Fosfato inorgânico
PP	Pirofosfato inorgânico
~	Ligação em composto rico em energia
UTP	Trifosfato de uridina
°C	Grau(s) centígrado(s)
g	Gramas
g	Aceleração normal
h	Hora(s)
kg	Quilograma(s)
l	Litro(s)
mg	Miligramas
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mμEq	Milimicro-equivalente(s)
s	Segundo(s)
U	Unidade(s)
μl	Micro litro(s)
μmoles	Micromole(s)
F	Razão de variância
g. l. ou G. L.	Graus de liberdade
Σ □	Somatório de quadrados
□	Quadrado médio
Inf. al	Infinitesimal
P	Probabilidade
S. E. M.	Desvio padrão da média
et al.	E outros
e col.	E colaboradores

# I

## REVISÃO CRÍTICA DE CONCEITOS

*Anyone who studies human ketosis with some intensity becomes impressed, and sometimes exasperated, with the unsatisfactory chemical methods he has to use; with the quantitative variability of the effects of any given ketogenic regimen among different subjects and within the same subject from time to time, and with the difficulty of fitting his results into a unified set of postulates.*

R. E. JOHNSON, R. PASSMORE & F. SARGENT <sup>223</sup>

- A. Introdução
- B. Enzimologia e metabolismo dos corpos cetônicos
- C. Produção e utilização dos corpos cetônicos na dinâmica da cetose  
— Funções dos corpos cetônicos
- D. Cetogênese e sua regulação
  - 1. Teoria da inibição da lipogênese
  - 2. Teoria da inibição do ciclo de Krebs
  - 3. Teoria da superprodução de acetil-CoA
  - 4. Teoria da pletoira de ácidos gordos não esterificados
  - 5. Condicionamento hormonal da cetose
  - 6. Relações da cetogênese com a gliconeogênese
- E. Conclusão

## A. INTRODUÇÃO

Os chamados corpos cetônicos, isto é, a acetona, o acetacetato (ou beta-oxobutirato) e o beta-hidroxibutirato, foram reconhecidos em produtos do organismo humano há cerca de um século. A acetona foi identificada pela primeira vez em 1857 por PETERS <sup>381</sup>, o ácido beta-oxobutírico, em 1865, por GERHARDT <sup>158</sup> e, em 1884, KULZ <sup>281</sup> identificou o ácido beta-hidroxibutírico.

Qualquer deles foi reconhecido pela primeira vez na urina de diabéticos.

A designação genérica que damos ao grupo constituído por estas três substâncias não é, com certeza, satisfatória, pois uma delas, o beta-hidroxibutirato, como já tem sido salientado, não possui a função cetona ou oxo <sup>334</sup>; por outro lado, segundo JOHNSON, PASSMORE & SARGENT <sup>223</sup>, com elas deveriam ser estudados, pelo menos, o isopropanol e o 1,2-propanediol. A designação, no entanto, é geralmente aceite; pela nossa parte deixamo-la desde já definida como fica.

O conceito de *acidose diabética* surgiu também antes deste século, com HALLERVORDEN <sup>184</sup>, em 1879, e NAUNYN <sup>352</sup>, em 1900, e de tal modo que, como refere MILHEIRO <sup>342</sup>, a própria acidose em geral só pôde deixar de ser atribuída à produção de corpos cetônicos já depois de serem reconhecidos os casos de flagrante ausência da esperada correlação.

Assim, o conhecimento destes compostos fica ligado, desde início, à Patologia. E este é, desde então, um dos motivos do interesse da Medicina e da Bioquímica por estas substâncias.

A observação do *Quadro I* permitirá verificar que a *cetose* tem sido reconhecida em muitas outras situações não só patológicas mas também fisiológicas ou «semifisiológicas», como diria KREBS <sup>249</sup>.

Este termo *cetose* com certeza que também não é satisfatório, mas é geralmente utilizado e, como dizem JOHNSON, PASSMORE & SARGENT <sup>223</sup>, ele é útil do ponto de vista clínico.

Designaremos por cetose, sem o preconceito da origem etiológica que reconhecemos em ENGEL & AMATRUDA <sup>114</sup>, e semelhantemente na maioria dos autores, apenas o estado em que os corpos cetónicos se acumulam no organismo e podem aparecer na urina.

No âmbito da Medicina Veterinária este problema tem também um altíssimo interesse, na patologia dos Ruminantes, com implicações económicas de relevo, não só por andar ligado a uma causa de morte, mas também por afectar os animais durante a gravidez e a lactação, e com gravidade tanto maior quanto maior o número de fetos <sup>408</sup> e quanto mais abundante e de melhor qualidade for a produção de leite <sup>15, 457</sup>.

No domínio da Química Fisiológica a problemática radica em zonas centrais não só da Fisiologia em geral mas também da Bioquímica, tal como esta é entendida hoje.

Quanto a nós, temos desde as primeiras leituras e reflexões a convicção, cada vez mais bem fundamentada, de que no seu caminho de problema não resolvido, apesar de perseguido desde o início da Bioquímica e hoje amplamente debatido, podem vir a esclarecer-se problemas de uma amplitude muito maior do que os que lhe têm sido atribuídos, dado que estão implícitos nesta situação conceitos básicos da Química Fisiológica e da Fisiopatologia.

A consideração dos mecanismos fisiopatológicos das situações apontadas no *Quadro I* levou a que estas substâncias, depois de terem sido consideradas como normalmente intermediárias do metabolismo dos ácidos gordos, em trânsito do fígado para a periferia <sup>310</sup>, fossem tidas como constituintes anormais do organismo.

No dizer acertado de WINEGRAD <sup>581</sup>, *Much confusion has resulted from the concept that ketogenesis is essentially an aberration of metabolism which is of quantitative significance only in prolonged starvation or in human or experimental diabetes.*

Os corpos cetónicos são hoje unânimemente considerados como substâncias normalmente existentes no sangue, com um papel na homeostasia calórica <sup>136, 256</sup> da ordem do desempenhado pela glicose e pelos ácidos gordos não esterificados, papel encadeado mesmo num corpo de doutrina por RANDLE *et al.* <sup>401, 402</sup>.

A destriça que recentemente tem sido feita entre uma cetose normal e uma cetose patológica <sup>256, 565</sup> carece de bases seguras e impõe uma definição de patológico que tem compromissos sérios.

Para KREBS <sup>256</sup>, *the moderate ketosis which occurs under a variety of circumstances is to be looked upon as a normal physiological process supplying the tissues with a readily utilisable fuel of respiration when glucose is short in supply* e, por outro lado, *In contrast in the light forms of ketosis, the severe ketosis of the diabetic or the acetonaemic lactating cow is obviously*



## QUADRO I

### SITUAÇÕES EM QUE SE PODE VERIFICAR O APARECIMENTO DE CETOSE

---

#### Nutricionais

- Jejum
- Dietas pobres em glicídeos (ricas em gorduras ou em proteínas)
- Ministração experimental de butirato

#### Ecológicas

- Frio
- Pressão atmosférica reduzida

#### Patológicas e toxicológicas

- Diabetes (*mellitus*, secundárias e experimentais, com variados mecanismos etiopatogénicos)
- Glicosúria renal
- Intoxicação pela floridzina
- Febre
- Hipertireoidismo
- Alcalose respiratória ou ministração de bicarbonato
- Tesaurismoses glicogéneas
- Hiperглиcinemia idiopática
- Intolerância a ácidos aminados
- Hiperemia gravídica
- Vômitos periódicos das crianças
- Intoxicação pelo fluoracetato e pelo fluorocitrato
- Intoxicação pelo malonato
- Intoxicação pelo mesoxalato
- Ministração de glicagina
- Ministração de insulina em doses grandes

#### Outras

- Após actividade muscular intensa
- Situações vitais de *stress*
- Gravidez
- Lactação
- Crescimento rápido
- Convalescença e cura de feridas
- Anestesia
- Trauma cirúrgico
- Irradiação pelos raios X
- Ministração de extractos de lobo anterior da hipófise
- Ministração de adrenalina

#### Com especial interesse em Medicina Veterinária

- Nos Ruminantes
  - Toxemia gravídica
  - Cetose da lactação

---

Referências bibliográficas pormenorizadas sobre as situações que apontamos podem ser procuradas nos artigos de ENGEL & AMATRUDA <sup>114</sup>, HAGEN & HAGEN <sup>182</sup>, HOUSSAY <sup>212</sup>, JOHNSON, PASSMORE & SARGENT <sup>223</sup>, KREBS <sup>249, 250, 257</sup>, KRONFELD <sup>274</sup>, NYHAN *et al.* <sup>363, 365</sup>, SCOTT & ENGEL <sup>442</sup>, TANAYAMA & UI <sup>507</sup> e WERK & KNOWLES <sup>556</sup>.

*a harmful pathological condition in which the quantities of ketone bodies formed grossly exceed possible needs.*

Mais adiante, no mesmo artigo, KREBS <sup>256</sup> diz em tom conclusivo: *As is to be expected on account of their different genesis, the physiological and pathological forms of ketosis differ in respect to many secondary features.*

Um certo carácter definitivo dado a proposições que não formulam senão hipóteses de trabalho tem inevitavelmente consigo o perigo de poder atrasar o esclarecimento dos problemas encobertos. Neste caso, o que é certo é que a separação entre os dois tipos de cetose não tem qualquer base conhecida e o pressuposto de etiologias diferentes pode efectivamente desviar a atenção dos investigadores para *caminhos* mais longos.

Quanto à definição de estado patológico, lembramos, por exemplo, que ROUS & FAVARGER <sup>425</sup> dividem o jejum em três graus, segundo a sua *gravidade* e consideram o 3.º grau, o jejum longo, um estado não fisiológico mas patológico. Neste caso haveríamos de admitir uma etiologia variável através do tempo, o que não nos parece tão fecundo como considerar que através do jejum haja uma modulação diferente do mesmo fenómeno.

Já quanto a considerar que a acidose inerente à cetose pode estar *compensada* ou *descompensada*, isso parece-nos necessário, tanto mais que a descompensação pode eventualmente introduzir factores de modificação.

Reconhecida como constante a existência dos corpos cetónicos, mesmo no organismo normal, embora neste caso em concentrações muito baixas, e postulado, neste contexto, um mecanismo de regulação que realmente se desconhece, as formulações mais vezes feitas na literatura, em face dos problemas da cetose, são:

- Quais as causas da acumulação dos corpos cetónicos?
- Quais as razões da variabilidade de concentração destas substâncias relativamente ao mesmo organismo e às mesmas situações?
- Qual o significado destas substâncias e da sua acumulação?

As vias de aproximação no sentido de resolver os problemas assim equacionados têm sido múltiplas.

É evidente que o conhecimento dos caminhos metabólicos da formação e da utilização destas substâncias poderia fornecer a resposta comum; necessário seria, no entanto, que fosse conhecido o mecanismo da regulação de cada um deles. E há-de ter-se sempre presente que tal conhecimento, para ser fecundo, não pode ficar limitado à sequência

metabólica que, num determinado contexto, mais nos interessa. Isto porque:

- o problema da cetose aparece, como vimos, integrado em situações metabólicas muito complexas em que a valorização dos diversos factores amplia a problemática;
- por outro lado, embora a estrutura proteica, designadamente das enzimas, e a compartimentação celular estabilizem as cadeias de reacções, uma sequência metabólica não deixa de ser também uma abstracção, que se realiza, explícita e propõe por necessidade de investigação, exposição e compreensão.

Eis categorias que BARTLEY, BIRT & BANKS <sup>19</sup> reconhecem numa sequência metabólica:

1. *The description of the enzymes and chemical changes that comprise the metabolic sequence.*
2. *The rate at which material can be transformed by the sequence.*
3. *The amounts of material that are utilized by the sequence in the living organism.*
4. *The nature of the control mechanisms which adjust the amounts of material utilized by the sequence.*

A última parece-nos pouco explícita, tanto mais que os autores acrescentam que *Apart from 1. the considerations are all of a quantitative nature.*

Nela devemos reconhecer explicitamente e em relação aos metabolitos intermediários e extremos (produtos e substratos), pelo menos:

- a inter-relação da sequência metabólica com outras e designadamente as chamadas *anaplerotic sequences* <sup>245</sup>;
- as acções de substâncias intermediárias ou finais da linha metabólica, de ordem qualitativa e quantificáveis: as interferências alostéricas e as regulatórias por *feedback* <sup>7, 8</sup>.

É sabido que, com os métodos de que dispomos actualmente em Bioquímica, nos encontramos numa fase que poderemos chamar *analítica*. O estudo de uma sequência metabólica faz-se parcelarmente, a maior parte das vezes com notórios artificios, recorrendo a preparações, as mais variadas e engenhosas, que permitam explicitar os fenómenos e potencialidades. Mesmo assim, uma das dificuldades maiores da bioquí-

mica de hoje reside ainda nessa análise. A propósito de capacidades enzimáticas, SCRUTTON & UTTER <sup>448</sup> lembram, em 1968, que as condições ópticas de ensaio são geralmente definidas num tecido de uma espécie e subsequentemente usadas para medir actividades enzimáticas noutros tecidos e espécies, o que torna a maior parte das vezes os resultados não comparáveis. Note-se que aqueles autores chamam condições *óptimas* às capacidades máximas nos sistemas de ensaio, quando nada garante a validade de tal qualificação relativamente à célula em funcionamento normal.

Sendo assim, o método que se nos afigura mais eficaz para abordar os problemas propostos é o de numa primeira fase abarcar o problema globalmente, explorando vários parâmetros, e procurar integrar entretanto e sucessivamente as possibilidades descobertas. Esse tem sido, aliás, o método que tem resultado em processos bioquímicos fundamentais como aqueles a que KREBS tem indissolúvelmente ligado o seu nome — o ciclo da ureia e o ciclo dos ácidos tricarbóxicos.

Relativamente ao problema da cetose e da cetogénese, a maioria dos investigadores não tem procedido assim; é possível que uma das causas desse facto advenha de se tratar de um problema que, repartido por tantas situações, suscita em primeiro lugar, o desejo da compartimentação. Relativamente à própria Bioquímica isso tem sido um motivo de progresso, pois o problema, explorado extensa e exhaustivamente, há mais de um século, está implicado em múltiplos outros que entretanto se têm aberto e esclarecido. O ciclo dos ácidos tricarbóxicos é, talvez, o exemplo mais brilhante. No entanto, postos e vistos claramente desde o início, os problemas fundamentais da cetose e da cetogénese continuam por resolver. Ao terminar uma revisão que em 1968 lhe dedica, WIELAND <sup>560</sup> pôde escrever *With the present lack of a direct experimental approach to regulation in integrated biological systems, no clear cut answer can be given to this question, and interpretation of results in this field remain rather subjective.*

Perante o panorama de que efectivamente se pode obter tal retrato, torna-se de uma dificuldade extrema integrar numa perspectiva fisiológica ou fisiopatológica os resultados obtidos pelos diversos autores, e é difícil resumir-los, mesmo em grandes linhas, sem pecar por omissão grave ou sem correr o risco da dispersão.

A natureza deste trabalho permite-nos, no entanto, uma orientação que não será preocupadamente didáctica. Preferimo-la exegética, e muitas vezes até não esconderemos mesmo um certo pendor polémico.

Poderíamos fazê-lo, indubitavelmente, de outro modo, mas nós sabemos que, como dizia ORTEGA <sup>372</sup>, *todo auténtico decir no sólo dice algo, sino que lo dice alguien a alguien* e — acrescentamos — em alguma ocasião.

## B. ENZIMOLOGIA E METABOLISMO DOS CORPOS CETÓNICOS

Um dos motivos do extraordinário interesse dos conhecimentos do metabolismo dos corpos cetónicos reside no facto de ter sido sob a pressão das incógnitas nascidas neste campo que a Bioquímica tomou a sua conformação actual e que os seus fundamentos básicos se estabeleceram.

A quem ler, por necessidade de iniciação, apenas o que hoje vem escrito nos manuais ou tratados de Bioquímica sobre o metabolismo dos corpos cetónicos e dos ácidos gordos, escapará a melhor parte das relações íntimas dos dois processos e a lição que este problema encerra para quem pense dedicar-se a compreender os múltiplos problemas que estão para diante e já hoje começam a surgir; e ficará completamente ignorado o alcance do asserto de STADIE <sup>488</sup> quando, em 1958, dizia que *A comparison of the present-day concepts with the older hypothesis clarifies the problem of ketogenesis.*

As palavras que se seguem pretendem situar o problema no seu autêntico campo de desenvolvimento, pois também só assim é possível compreender o seu interesse actual. Para quem não teve a oportunidade de assistir ao desenvolvimento dos conhecimentos e interessado está na perseguição das suas consequências fica a tarefa de reinventar o passado, num contexto em que só o dinamismo assim despertado pode garantir, na nova posição e com os novos dados, a fecundidade dos próprios passos.

Com a cetose diabética, que já vimos ter sido um ponto de partida, começou a ser estudada a cetose do jejum, e HIRSCHFELDT <sup>205</sup>, em 1895, foi o primeiro a responsabilizar um factor comum em ambas as situações: a deficiência da utilização glicídica, quer por deficiente capacidade de metabolização quer por autêntica privação.

Os trabalhos de MAGNUS-LEVY <sup>316, 317</sup>, em 1889 e 1901, e de GEELMUYDEN <sup>156, 157</sup>, em 1897 e 1904, demonstraram que, em ambas as situações, os precursores dos corpos cetónicos são, principalmente, os ácidos gordos quer da dieta quer das reservas lipídicas.

Os trabalhos geniais de KNOOP <sup>241</sup>, de 1904, em que pela primeira vez nos estudos metabólicos foram utilizadas substâncias químicas marcadas, permitiram a formulação da teoria da oxidação em *beta*, dos ácidos gordos.

Como consequência das experiências de KNOOP, os corpos cetónicos ganharam um interesse de primeira ordem e só muito recentemente deixou de ser possível defender tanto a tese, muitas vezes defendida e muitas vezes contraditada, de serem os corpos cetónicos um passo obrigatório da degradação dos ácidos gordos e um estado catabólico incompleto, como as teses subsidiárias relativas à posição do acetacetato e do beta-hidroxibutirato no processo. A acetona nunca foi considerada autenticamente nessa perspectiva, senão como produto lateral.

Tal avanço ficou a dever-se ao emprego de um outro tipo de marcação dos ácidos gordos: com isótopos radioactivos. Assim, WEINHOUSE *et al.* <sup>552, 553</sup>, em 1944, com a preparação de fatias de fígado *in vitro* e com o ácido caprílico marcado com o <sup>13</sup>C no carboxilo, puderam comprovar a teoria proposta anteriormente por TOENNIESSEN & BRINKMANN <sup>514</sup>, em 1938, MACKAY *et al.* <sup>311</sup>, em 1940, e WICK <sup>559</sup>, em 1941, segundo a qual a formação dos corpos cetónicos é um processo de síntese ou de ressíntese.

A evolução do problema de KNOOP a WEINHOUSE e deste a LYNEN & OCHOA <sup>309</sup>, marca um período exemplar do ponto de vista pedagógico, pela série de tentativas feitas no sentido de com as teorias abarcar os factos.

O adiantamento das teorias em relação aos factos, mesmo contra a aparência de alguns, está cheio de riscos, mas põe novas exigências que são condição de progresso. Com razão diz H. POINCARÉ <sup>386</sup> que «em algumas oportunidades, a verdade assusta-nos. Com efeito, sabemos que às vezes é enganosa; que é um fantasma que só se nos mostra um instante para fugir sem cessar; que é necessário persegui-la mais longe e sempre mais longe, sem poder alcançá-la nunca».

A oxidação em beta era uma inferência perfeitamente legítima e legitimada pelas referidas experiências de KNOOP e pelas de EMBDEN & MARX <sup>112</sup>, em 1908, sobre a oxidação hepática dos ácidos gordos. Mas duas ordens de factos a punham em causa:

1. a) DEUEL e col. <sup>88, 89</sup>, em 1935 e 1936, verificaram que, dando ácidos gordos a ratos, é possível obter na urina uma quantidade de acetona superior à prevista pela oxidação em beta até ácido acetacético e ulterior descarboxilação deste. Os ácidos gordos de cadeia longa são metabolizados de modo a darem finalmente na urina todos os fragmentos possíveis de quatro átomos de carbono.
- b) Os mesmos confirmaram o facto, encontrado por RINGER e outros, de os ácidos gordos de número ímpar de átomos de carbono não darem corpos cetónicos, quando oxidados.

- c) JOWETT & QUASTEL <sup>228</sup>, em 1935, estudaram a oxidação dos ácidos gordos por fatias de fígado e chegaram a conclusões sobreponíveis às que DEUEL tinha tirado do estudo com o animal inteiro.

No tocante ao problema da oxidação dos ácidos gordos de número ímpar de átomos de carbono, JOWETT & QUASTEL <sup>228</sup> concluem: *The greater increase in the respiration of liver brought about by the odd-numbered fatty acids suggests that these are more completely burned to carbon-dioxide and water than their even-numbered neighbours.*

2. O fragmento simples de dois átomos de carbono não aparecia quando era procurado.

As sérias dificuldades levantadas foram então resolvidas pelo adiantamento de uma teoria que já tinha sido proposta, em 1916, por HURTLEY <sup>220</sup> — a teoria da oxidação múltipla alternada — segundo a qual a oxidação pode dar-se simultâneamente no carbono beta e em cada carbono alternado da cadeia, com a conseqüente destruição completa da cadeia e formação de fragmentos de dois e quatro átomos de carbono. Foram as experiências de WEINHOUSE <sup>552, 553</sup> que vieram mostrar a inadequação desta teoria.

Quando se lê com atenção o artigo de JOWETT & QUASTEL <sup>228</sup> em referência, encontra-se o porquê da distorção ao reconhecer-se como postulado básico, logo na introdução do seu trabalho: *The production of ketone bodies is definitely established as a major process in the oxidation.*

A disputa nasce, afinal, do confronto de duas teorias erradas, quando na altura havia apenas uma válida mas incompleta.

As dificuldades haveriam de aumentar. Já em 1946, LEHNINGER <sup>290</sup>,

— com o ciclo de Krebs estabelecido;

— dispondo dos dados de WEINHOUSE *et al.* <sup>552, 553</sup>, já referidos;

— com as referências de HUNTER & LOEHR <sup>218</sup> e BUCHANAN *et al.* <sup>53</sup> de que a oxidação do acetacetato nos tecidos extra-hepáticos, através do ciclo de Krebs, envolve provavelmente o corte preliminar do acetacetato em dois fragmentos de dois átomos de carbono;

— mais ainda com a conclusão que KREBS <sup>248</sup> tinha tirado, sem provas definitivas, de que o piruvato é transformado por oxidação num composto de dois átomos de carbono antes da condensação com o oxalacetato;

— e ainda com a necessidade de admitir um precursor do acetato a partir dos ácidos gordos,

interpreta a formação de duas moléculas de acetato durante a oxidação do octanoato pela sua «suspensão de partículas hepáticas lavadas» <sup>289</sup> como *an independent and more conclusive confirmation of the «multiple» formation of ketone from fatty acids which has been observed in surviving slices and in intact animals* <sup>290</sup>.

O mesmo LEHNINGER, na tentativa feita para identificar um produto com dois átomos de carbono formado por oxidação do piruvato ou dos ácidos gordos, verifica que as seguintes substâncias, acetato, glicolato, glioxilato, oxalato, glicina, acetaldeído, acetamida, etanol, acetoína e diacetil, não parecem ser os intermediários e também não formam acetato nem citrato na sua preparação.

As dificuldades só puderam ser ultrapassadas pelo reconhecimento de que:

- os ácidos gordos só podem ser oxidados depois de terem sido «activados»;
- a activação dos ácidos gordos é um fenómeno endergónico;
- a procurada unidade de dois átomos de carbono é a acetil-CoA.

A formulação destas conclusões deve-se principalmente ao grupo de LYNEN, e neste aspecto a espécie bibliográfica fundamental é a assinada por LYNEN & OCHOA <sup>309</sup>, em 1953. Aí pode ser apreciada a múltipla e sucessiva bibliografia que em pouco tempo então se juntou, na qual é relatada a descoberta de factos fundamentais e o emprego de métodos novos.

Os nomes de WARBURG e de LIPMAN aparecem-nos nesta fase na sua autêntica grandeza.

Este é também, verdadeiramente, o início da Bioquímica.

O outro facto, inesperado, que na mesma data veio contribuir para que a perspectiva dos problemas do metabolismo dos corpos cetónicos se mudasse completamente e tomasse a feição que hoje tem, foi o referido, em 1953, por LEHNINGER & GREVILLE <sup>294</sup>: a substância intermediária que se forma na degradação dos ácidos gordos é a beta-hidroxibutiril-CoA [L(+)], enquanto que o corpo cetónico que aparece livre é o beta-hidroxibutirato [D(-)].

É por esta mesma época também que, pelas investigações desenvolvidas simultaneamente em vários laboratórios, ficam estabelecidas com segurança as actividades enzimáticas de oxidação dos ácidos gordos, pela obtenção de preparações solúveis e pelo assentamento da sua localização mitocôndrica <sup>103, 295</sup>.



O conhecimento das actividades enzimáticas tem para o nosso problema, como dissemos já, uma importância muito grande. O conjunto das suas acções pode ser apreciado na Fig. 1. Passaremos a referi-las para, depois disso, apontarmos os pontos controversos que o assunto contém.

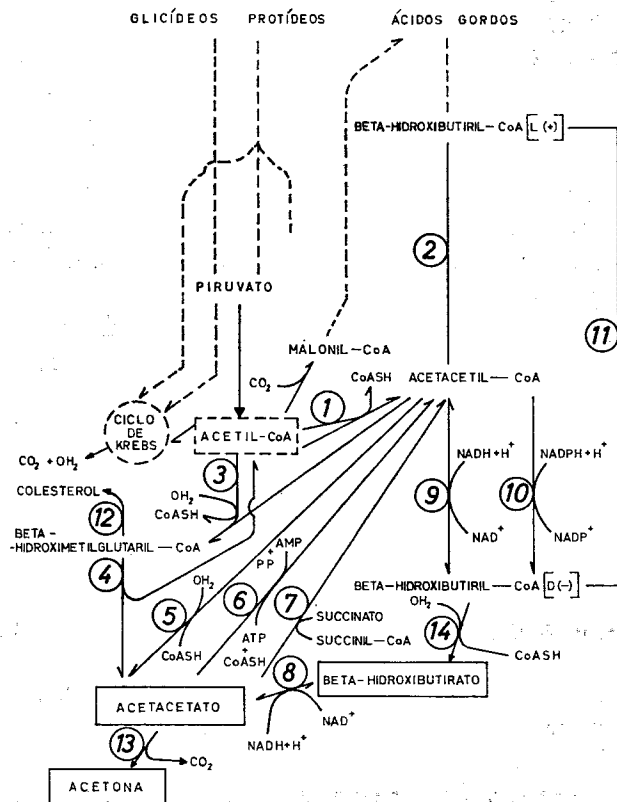
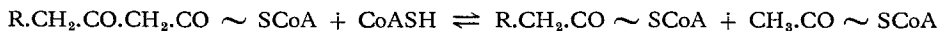


Fig. 1 — **Metabolismo dos corpos cetônicos.** Os números que neste esquema assinalam as actividades enzimáticas correspondem aos da apresentação feita no texto.

### 1. TIÓLASE [TIÓLASE DA ACETACETIL-CoA (EC 2.3.1.9.)]

A actividade beta oxo-tiolásica pode ser genèricamente formulada:



Diversas enzimas manifestam grande especificidade relativamente ao radical R<sup>179</sup>.

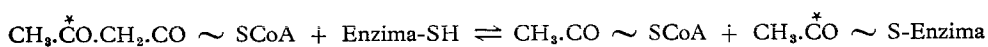
A cotação EC 2.3.1.9. aplica-se a uma enzima específica para a acetacetil-CoA, enquanto que a cotação EC 2.3.1.16. se aplica a uma enzima com especificidade para derivados alquílicos de cadeia longa.

Como salienta LYNEN <sup>305</sup>, o significado biológico da participação do enxofre consiste no facto de a clivagem tiolítica ser reversível, ao contrário da clivagem hidrolítica.

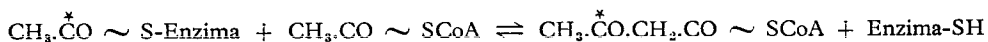
O mecanismo de acção desta enzima foi esclarecido por LYNEN <sup>304, 305, 309</sup>, de modo a explicar o aparecimento de acetacetato marcado assimetricamente, como havia sido já registado por DRYSDALE & LARDY <sup>103</sup> com o estudo da oxidação do butirato e caproato-1-<sup>14</sup>C por preparações enzimáticas solúveis, de mitocôndrias de fígado de Rato.

A maior reactividade aparente da unidade terminal de um ácido gordo relativamente à formação da extremidade carbonil do acetacetato, só por si, era compatível com a efectividade de uma oxidação preferencial em  $\omega$  que chegou a ser admitida.

Ora o que acontece é que o grupo terminal de dois átomos de carbono de um ácido gordo é o último a combinar-se com a tiólase:



O produto de condensação com a enzima poderá, então, seguir dois caminhos: ou transferir a unidade de dois átomos de carbono para o *pool* de acetil-CoA ou combinar-se novamente com uma das moléculas de acetil-CoA desse *pool* para formar acetacetil-CoA:



Ressalta dos factos a conclusão de que o aparecimento do acetacetato é um fenómeno de síntese e não apenas a expressão do bloqueio a um fenómeno catabólico.

A enzima é sensível aos reagentes dos grupos SH e a iões bivalentes, incluindo o  $\text{Mg}^{++}$ .

A constante de equilíbrio da reacção enzimática

$$K = \frac{[\text{acetacetil-CoA}] [\text{CoASH}]}{[\text{acetil-CoA}]^2}$$

é variável com o pH. Em meio alcalino a enolização da 3-oxo-acil-CoA, com um pK aparente de 8,5, segundo GREVILLE & TUBBS <sup>179</sup>, favorece a formação da ligação C-C.

Segundo estes autores, entre pH 6 e pH 9 a constante K aumenta de 1,48 para  $6,62 \times 10^{-5}$ .

Para além do mais, estes dados têm a importância de mostrar que o equilíbrio da reacção é muito desfavorável à formação de acetacetil-CoA.

Segundo GREVILLE & TUBBS <sup>179</sup>, cujo escrito neste aspecto é valiosíssimo, especialmente por deixar a descoberto as incógnitas do problema, é possível que o precursor do acetacetato seja não a acetacetil-CoA livre, mas a acetacetil-CoA ligada à tiólase, o que explicaria o insucesso da procura da acetacetil-CoA quer no tecido hepático quer nas mitocôndrias isoladas.

## 2. DESIDROGÉNASE DAS BETA-HIDROXIACIL-CoA [L( + )] (EC 1.1.1.35)

Esta é a enzima que catalisa a outra reacção pela qual se produz a acetacetil-CoA. Segundo WAKIL & BRESSLER <sup>541</sup>, trata-se de uma desidrogénase dependente do NAD, não específica relativamente ao comprimento do radical alquílico.

É uma enzima mitocôndrica que pode ser facilmente solubilizada extraíndo o pó acetónico das mitocôndrias com amortecedor de fosfatos <sup>540, 541, 543</sup>.

A constante de equilíbrio

$$K = \frac{[\text{acetacetil-CoA}] [\text{NADH}] [\text{H}^+]}{[\beta\text{-hidroxibutiril-CoA [L(+)]}] [\text{NAD}^+]}$$

seria, segundo WAKIL <sup>540</sup>,  $6,3 \times 10^{-11}$  e, segundo JAENICKE & LYNEN <sup>221</sup>,  $1,9 \times 10^{-10}$ , a 25 °C.

## 3. ENZIMA CONDENSANTE DA BETA-HIDROXIMETILGLUTARIL-CoA

[síntase da HMG-CoA (EC 4.1.3.5.)] e

## 4. ENZIMA CLIVANTE DA BETA-HIDROXIMETILGLUTARIL-CoA

[liase da HMG-CoA (EC 4.1.3.4)]

Trata-se de duas enzimas que catalisam reacções virtualmente irreversíveis, as quais constituiriam em conjunto o «shunt da HMG-CoA»:

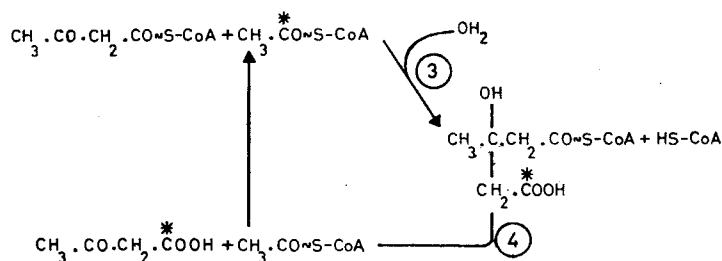


Fig. 2 — Ciclo da HMG-CoA. Os números que neste esquema assinalam as actividades enzimáticas correspondem aos da apresentação feita no texto.

Este mecanismo de produção do acetacetato foi proposto por LYNEN e col. em 1958<sup>307</sup> para explicar os achados experimentais, quando procuraram purificar a desacilase da acetacetil-CoA em extractos de fígado (ver para mais completa informação a referência<sup>179</sup>).

A enzima limitante do sistema parece ser a síntase, dado que a actividade da outra líase se mostra bastante mais alta que a do sistema<sup>179</sup>.

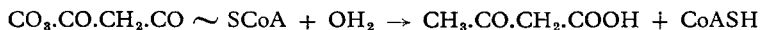
Quanto à localização, ambas estão presentes nas mitocôndrias<sup>55, 450</sup> e também exomitocôndricamente<sup>565, 566</sup>. A enzima condensante foi ainda encontrada nos microssomas, enquanto que a outra não<sup>55, 106</sup>. Estes dados têm interesse porque os microssomas são locais da formação de colesterol e a HMG-CoA é um ponto de passagem na síntese deste<sup>81, 106, 427</sup>.

Segundo os dados de LYNEN e col.<sup>307</sup>, o aumento da concentração da acetil-CoA acelera o desaparecimento da acetacetil-CoA e a síntese do acetacetato.

GREVILLE & TUBBS<sup>179</sup> apontam que a síntase hepática da HMG-CoA foi ainda só parcialmente purificada e que o seu comportamento cinético não tem sido referido. Para estes autores a actividade desta síntase seria função não só da concentração da acetacetil-CoA (que possivelmente anda ligada à tiólase, como vimos) e, portanto, da razão  $[\text{acetil-CoA}]^2/[\text{CoASH}]$ , mas também da concentração da acetil-CoA, pela sua capacidade de segundo substrato, e da concentração de CoASH como um produto provavelmente inibitório. Nestas condições, comentam, se os valores de  $K_m$  e  $K_i$  forem apropriados, a velocidade de síntese da HMG-CoA, e portanto de cetogénese, pode corresponder, de modo muito aproximado, às variações do estado de acetilação da CoASH. E concluem: *It may be noted that experimental errors will make correlation of ketogenesis rates with analyses of liver samples for CoA and acetyl-CoA very imprecise when the acetyl-CoA/CoA ratio is high, i. e. when ketogenesis is rapid.*

##### 5. DESACÍLASE DA ACETACETIL-CoA (EC 3.1.2. —)

Esta actividade enzimática



foi descrita por STERN & MILLER<sup>498</sup>, em 1959, em mitocôndrias de fígado de rato tratadas pelos ultra-sons, e por DRUMMOND & STERN<sup>102</sup>, em 1960, usando um sistema solúvel de fígado bovino, purificado por uma técnica diferente da utilizada pelo grupo de LYNEN, e seria a base de uma outra via de formação do acetacetato.

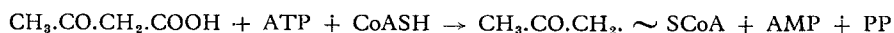
SEGAL & MENON <sup>449</sup> concluem também, em 1960, da incubação de mitocôndrias com acetacetil-CoA marcada, que o caminho da desacilação seria o principal, senão o único, da formação do acetacetato no fígado normal.

SAUER & ERFLE <sup>436</sup> demonstram, em 1966, que as preparações comerciais de coenzima A contêm quantidades suficientes de glutatião para que os resultados encontrados não possam ser valorizáveis.

Em 1968, BURCH & TRIANTAFILLOU <sup>56</sup> retomam o problema e pensam poder concluir não só da efectividade deste caminho, como também do seu significado fisiológico e fisiopatológico.

## 6. TIOCÍNASE DO ACETACETATO

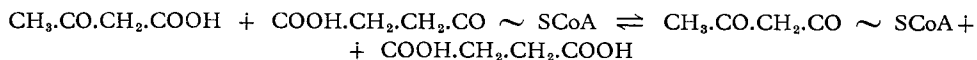
Esta actividade foi descrita por STERN *et al.* <sup>496</sup>, como responsável pela activação do acetacetato no rim, na levedura e, em pequenas proporções, nos extractos de fígado, e implicaria uma clivagem pirofósforica do ATP:



Segundo WAKIL & BRESSLER <sup>541</sup> e BRESSLER <sup>50</sup>, a existência desta actividade nunca foi adequadamente documentada. Recentemente, ROSSI, DRAHOTA, ALEXANDRE & SILIPRANDI <sup>422</sup> descrevem a presença de duas tiocínases do acetacetato, uma com especificidade para o ATP e outra para o GTP, nas mitocôndrias do tecido adiposo castanho.

## 7. TRANSFÉRASE ACETACETATO-SUCCINIL-CoA (EC 2.8.3.5.)

Trata-se de um sistema presente em todos os tecidos com excepção do fígado, e a reacção catalisada tem a seguinte equação:



A constante de equilíbrio da reacção é cerca de  $2,8 \times 10^{-3}$ , a pH 7 <sup>497</sup>, mas é maior para valores maiores de pH ou na presença de  $\text{Mg}^{++}$ .

A determinação da actividade enzimática no coração demonstra que ela é suficiente para justificar a utilização do acetacetato nas proporções em que aquele tecido a faz <sup>497</sup>.

De salientar a posição ímpar do fígado quanto à não existência desta actividade, o que justifica que, sendo um tecido produtor de acetacetato, não o utilize.

## 8. DESIDROGÉNASE DO BETA-HIDROXIBUTIRATO [D(-)] (EC 1.1.1.30)

Esta actividade foi descrita pela primeira vez por GREEN *et al.* <sup>175</sup>, em 1937, na forma insolúvel; posteriormente foi referida a sua preparação na forma solúvel e a sua dependência absoluta de lecitinas <sup>229</sup>, <sup>296</sup>.

Na segunda parte desta dissertação, a propósito dos métodos enzimáticos de doseamento dos corpos cetónicos, faremos referência a algumas das suas propriedades.

Interessa apontar que esta actividade desidrogenásica é exclusiva das mitocôndrias e nestas só da membrana interna <sup>119</sup>, <sup>120</sup>, <sup>568</sup>, e que só pode ser demonstrada depois da tumefacção ou da desintegração mitocôndricas <sup>296</sup>, <sup>541</sup>. Este facto, a sua localização e a relação desta enzima com os fenómenos da fosforilação oxidativa e do transporte de electrões, fazem prever para a enzima e para os corpos cetónicos um papel de relevante importância na economia celular <sup>334</sup>, <sup>541</sup>. O assunto foi já várias vezes abordado <sup>48</sup>, <sup>250</sup>, <sup>399</sup>, mas, no entanto, permanece obscuro e necessita de novas investigações.

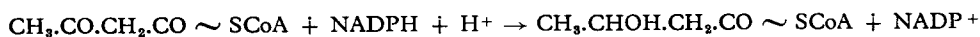
## 9. DESIDROGÉNASE DA BETA-HIDROXIBUTIRIL-CoA [D(-)]

Trata-se de uma actividade enzimática cuja existência foi postulada por WAKIL <sup>539</sup> para explicar o mecanismo da racemização da beta-hidroxi-butiril-CoA.

A separação das desidrogenases das formas [D(-)] e [L(+)] nunca foi até hoje realizada, não obstante terem sido obtidas preparações da desidrogenase da forma [L(+)], de que já falámos anteriormente, isentas desta actividade <sup>541</sup>.

## 10. REDÚTASE DA ACETACETIL-CoA (EC 1.1.1.36.)

Esta enzima catalisa a reacção



e a sua presença foi demonstrada por WAKIL & BRESSLER <sup>542</sup> e LYNEN <sup>306</sup> no fígado e na levedura.

De salientar, a natureza da coenzima. Segundo WAKIL & BRESSLER <sup>541</sup>, o NADH pode substituir o NADPH, embora apenas em 10 a 20 p. 100 da actividade.

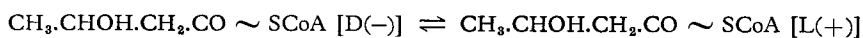
A enzima pode ser separada da desidrogenase dos compostos hidroxiaçil-CoA, assim como da racémase de que vamos falar.

WAKIL & BRESSLER <sup>541</sup> concluem que o papel fisiológico desta enzima não é conhecido, mas que tudo indica que ela não esteja implicada na sequência da síntese do ácido palmítico a partir da malonil-CoA e da acetil-CoA. Numa publicação <sup>542</sup>, WAKIL & BRESSLER admitem a possibilidade, que reafirmam noutra <sup>541</sup>, de a enzima desempenhar um papel importante na síntese dos corpos cetónicos, por um caminho muito diferente do que é habitualmente admitido.

### 11. RACÉMASE DA BETA-HIDROXIBUTIRIL-CoA (EC 5.1.2.3.)

Esta actividade foi descrita por STERN *et al.* <sup>495</sup> em extractos mitocondrónicos de fígado e de coração bovinos.

A reacção catalisada será:



A interconversão parece ser directa, por não ser influenciada pela concentração do  $\text{NAD}^+$  <sup>494</sup>, <sup>495</sup>.

Dado que a actividade desidrogenásica da beta-hidroxibutiril-CoA [D(+)] existe sempre nas preparações de racémase, WAKIL <sup>539</sup>, que demonstrou a transformação da beta-hidroxibutiril-CoA [D(-)] em beta-hidroxibutiril-CoA [L(+)], na presença de uma fracção proteica derivada de mitocôndrias hepáticas de Boi, propõe um mecanismo de racemização mais complexo, dependente do  $\text{NAD}^+$ , que pode ser representado do seguinte modo:

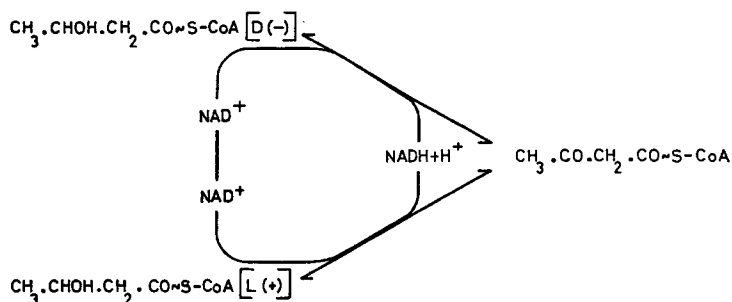


Fig. 3 — Mecanismo de racemização da beta-hidroxibutiril-CoA, proposto por WAKIL <sup>539</sup>

Este mecanismo pressupõe, no entanto, a desidrogenase da beta-hidroxibutiril-CoA [D(-)] de que já falámos e cuja existência não está demonstrada.

## 12. REDÚTASE DA HMG-CoA (EC 1.1.1.34)

Esta é uma actividade microssómica que pode influenciar também o metabolismo dos corpos cetónicos.

A reacção catalisada é a transformação da HMG-CoA em ácido mevalónico <sup>106</sup>. É uma enzima limitante da biossíntese do colesterol a partir do acetato <sup>185</sup>, a actividade tem alterações rítmicas no ciclo de 24 h <sup>185</sup>.

O aumento da concentração hepática de HMG-CoA, por diminuição de drenagem quando a síntese do colesterol diminui, por exemplo no jejum <sup>561</sup>, pode contribuir para o aumento da cetogénese. No entanto, a actividade parece não sofrer alteração, por exemplo, na diabetes aloxânica <sup>561</sup>.

## 13. DESCARBOXÍLASE DO ACETACETATO (EC 4.1.1.4.)

Esta enzima, cuja actividade consiste na catálise da descarboxilação do acetacetato, foi isolada a partir do *Clostridium acetobutylicum* por HAMILTON & WESTHEIMER <sup>505</sup>, em 1959, e ulteriormente purificada, cristalizada e estudada no que respeita ao mecanismo de acção e propriedades moleculares <sup>505</sup>.

Contudo, esta actividade nunca foi descrita nem no sangue nem nos outros tecidos do organismo <sup>560</sup>. Dada a velocidade da descarboxilação espontânea, esta transformação parece ter nos casos que nos ocupam um mecanismo puramente químico <sup>300, 421, 488</sup>; os valores da produção de acetona encontrados por LINDSAY & BROWN <sup>300</sup> na Cabra, quer em condições normais quer de cetose, são os previsíveis tendo em conta que a descarboxilação do ácido acetacético é de cerca de 5 p. 100, por hora, a 40 °C.

MATSCHINSKY & WIELAND <sup>321</sup>, em 1961, verificaram, no entanto, que a velocidade desta reacção é quase duplicada quando o acetacetato é posto em contacto com eritrócitos desintegrados por saponina e que a catálise não sofre alterações quando se faz o aquecimento da preparação à fervura durante 5 minutos. A natureza e significado biológico deste factor estável são desconhecidos <sup>560</sup>.

## 14. DESACÍLASE DA BETA-HIDROXIBUTIRIL-CoA [D(-)]

Trata-se de uma enzima postulada por WAKIL & BRESSLER <sup>541, 542</sup> e cuja existência também é admitida, teóricamente, por WIELAND <sup>560</sup>, num conjunto de reacções em que à redútase da acetacetyl-CoA, para os



primeiros autores, ou à racémase da beta-hidroxibutiril-CoA descrita por STERN, DEL CAMPILLO & LEHNINGER <sup>495</sup>, para WIELAND <sup>560</sup>, seria atribuível um papel fisiopatológico na síntese dos corpos cetónicos.

É de acentuar o carácter hipotético desta actividade e também que a reacção em sentido inverso não está descrita. É certo que BRESSLER <sup>50</sup> afirma que o ácido beta-hidroxibutírico [D(-)] pode ser reactivado no fígado, ao contrário do que acontece com o acetacetato. Contudo, esta afirmação carece de fundamento. O que se pode concluir pela leitura atenta tanto do trabalho de LEHNINGER & GREVILLE <sup>294</sup>, de 1953, como do de McCANN <sup>328</sup>, de 1957, é que a oxidação do isómero [D(-)] do beta-hidroxibutirato se faz num primeiro passo quer nas mitocôndrias de fígado quer nas dos outros tecidos pela sua transformação em acetacetato, ao contrário da do isómero [L(+)] que requer um sistema de activação semelhante ao dos ácidos gordos. Todos os trabalhos em que seja utilizada a forma racémica não são, por isso, de considerar quanto a este problema. Tudo leva a crer, na verdade, como WIELAND <sup>560</sup> também diz, que o beta-hidroxibutirato [D(-)] só possa ser utilizado após a sua transformação em acetacetato.

#### PONTOS CONTROVERSOS

Depois da apresentação sumária que fizemos das diversas enzimas que interessará ter presentes em qualquer tentativa de compreensão bioquímica do metabolismo dos corpos cetónicos, apresentaremos, também sumariamente, os pontos controversos deste campo.

1. Em nosso entender há um primeiro ponto, doutrinário, que terá de ser considerado e cuja fundamental importância seria suficiente para impedir o tom definitivo com que vemos a maioria dos autores abordar os problemas e defender os seus pontos de vista. Esse ponto diz respeito à compreensão dos fenómenos enzimáticos a nível molecular. REED & COX <sup>406</sup> são claros nesta doutrina:

*The chief trend of classical enzymology has been toward breaking down metabolic processes into sequences of reactions, each reaction catalyzed by a single enzyme. A major preoccupation of enzymologists has been the separation and purification of the enzymes involved at each stage of each pathway. To be described as pure, an enzyme must generally be shown to possess the highest possible catalytic activity in one reaction and no detectable activity in any other. Judged by this criterion, a multienzyme complex is an impure enzyme.*

Ora, como mais adiante concluem, *The present lack of positive evidence for the general occurrence of multienzyme complexes does not necessarily mean that such entities are rare.* Os exemplos apontados no mesmo estudo — os complexos da síntese do triptofano, de desidrogenação dos ácidos oxo em alfa e da síntese dos ácidos gordos — são esclarecedores.

Só por isto, não é possível tirar conclusões definitivas a partir dos trabalhos que têm sido feitos no campo da enzimologia dos corpos cetônicos cuja complexidade está patente na Fig. 1.

2. A noção da complexidade do problema situa-nos perante a possibilidade de um raciocínio de ampla visão teleológica. Nesta perspectiva são de colocar os seguintes dados:

- a) as sequências metabólicas consideradas têm mais de um ponto de regulação; haja em vista que a HMG-CoA é, como vimos, uma saída para dois caminhos;
- b) quer a desacetilase quer o sistema da HMG-CoA existem dentro e fora das mitocôndrias <sup>566</sup>.

Estes dados sugerem que a síntese do acetacetato possa ser uma síntese facilitada, o que faz pensar ou na *necessidade* da sua formação ou na possibilidade de sob essa forma ser desviada qualquer substância *inibitória* do processamento de outros fenómenos.

BURCH & TRIANTAFILLOU <sup>56</sup> levantam a hipótese de a desacetilase da acetacetil-CoA poder ser considerada num mecanismo de regulação, no jejum, pelo desvio que faz da acetil-CoA impedida nessa condição de se incorporar nas sínteses dos ácidos gordos e do colesterol, cujas velocidades se encontram diminuídas, enquanto que a actividade desacetilásica se encontra aumentada. WILLIAMSON, BATES & KREBS <sup>566</sup> pensam da mesma maneira.

Embora a hipótese possa ser fecunda, ela terá de ser integrada numa visão panorâmica mais geral e mais documentada da situação.

3. Da base em que colocámos anteriormente os dados, surge um corolário muito importante: todo o estudo da regulação da cetogénese deverá ser feito com preparações que mantenham as mitocôndrias no seu ambiente.

Todos os estudos feitos com mitocôndrias isoladas são impugnáveis pela base quando pretendem tirar conclusões relativamente à regulação do fenómeno.

4. O problema que mais aceso anda na literatura diz respeito ao caminho fundamental da síntese do acetacetato. Qual a actividade enzimática mais importante: a desacilásica ou a do conjunto do *shunt* da HMG-CoA?

Os argumentos a favor dos pontos de vista de SEGAL e col. <sup>449, 450</sup> são compendiados por WAKIL & BRESSLER <sup>541</sup>:

a) *A actividade desacilásica da acetacetil-CoA está presente nas mitocôndrias em quantidade suficiente para explicar quase todo o acetacetato formado.*

O valor deste argumento desapareceu perante o que dissemos em 3.

b) *Quando se faz a inibição completa pela iodacetamida das duas enzimas do shunt, a produção de acetacetato não sofre alterações.*

Quanto a nós isto só prova que o caminho nessas condições é operante, mas não demonstra a sua efectividade na regulação.

c) *O processo usado por LYNEN <sup>307</sup> para, a partir do fígado de Boi, purificar a outra liase que é estável ao calor, tem um passo de aquecimento que causa não só a perda da enzima condensante (que LYNEN adiciona ao sistema a partir da preparação de levedura) mas também da desacilase.*

Quanto a nós, daqui só se pode concluir que, nestas condições, LYNEN estuda apenas um sistema e não os dois e, dentro desse, explora apenas uma reacção; relativamente ao problema da regulação, ambos os grupos estão em posições semelhantes.

Subsequentemente, WAKIL & BRESSLER <sup>541</sup> comentam os estudos de SEGAL & MENON <sup>449, 450</sup> feitos com ratos normais e com ratos diabéticos pela aloxana, para concluir que os resultados *showed that the bulk of the acetoacetate forming activity of the liver resides in the mitochondria and that the major if not the sole pathway of acetoacetate formation in normal and diabetic livers is through a direct deacylation of acetoacetyl CoA.* O dispositivo experimental de SEGAL & MENON é elegante: consiste em juntar às preparações de mitocôndrias hepáticas acetil-CoA marcada. O raciocínio é também elegante: se o acetacetato se formar pela via do *shunt*, terá a mesma actividade específica da acetil-CoA que se juntou e a restante acetacetil-CoA permanecerá sem marcação, excepto na pequena escala de actividade da tiólase; se, pelo contrário, o acetacetato se formar por desacilação directa, terá apenas essa pequena actividade.

Os resultados levam os autores à conclusão da efectividade da desacilase, tanto mais que a omissão da acetil-CoA também não diminui a quantidade de acetacetato formado.

A nosso ver, tudo isto só prova que, nestas condições, o *shunt* não é utilizado, mas a conclusão não se pode transferir para o problema da regulação.

Relativamente a este complexo assunto, faremos apenas referência a dois problemas de técnica, que nos voltam a lembrar a doutrina de REED & COX <sup>406</sup>, já apresentada. SAUER & ERFLE <sup>436</sup>, em 1966, invalidaram os estudos anteriores aos seus com o dado de que as preparações comerciais de coenzima A contêm glutatião; BURCH & TRIANTAFILLOU <sup>56</sup>, em 1968, invalidam os dados de SAUER & ERFLE, no respeitante ao confronto das duas possibilidades de regulação, pelo facto de estes utilizarem uma solução de sulfato de amónio na extracção das enzimas do *shunt* e o sulfato de amónio remover a desacilase.

Relativamente à quantificação das actividades enzimáticas em situações de cetose, o quadro de conclusões é o seguinte:

- a) SEGAL & MENON <sup>449, 450</sup> encontram duplicados, em relação às testemunhas, os valores da desacilase das mitocôndrias de fígado na diabetes aloxânica.
- b) WIELAND e col. <sup>561</sup> verificam que nos ratos em jejum há um aumento de 8 vezes na actividade da enzima clivante da HMG-CoA e que a HMG-CoA também aumenta.
- c) WILLIAMSON, BATES & KREBS <sup>566</sup> referem que a actividade da síntase aumenta 70 p. 100 e 140 p. 100, respectivamente, nos fígados de ratos diabéticos pela aloxana e de ratos alimentados com dieta gorda, enquanto que a enzima clivante, cuja maior parte parece ser exomitocôndrica, não mostra aumento de actividade no jejum ou na diabetes aloxânica, mas tem um aumento de 40 p. 100 nos ratos alimentados com dieta gorda. Verificam também que o jejum e a diabetes aloxânica não alteram a actividade desacilásica.

Estes autores concluem finalmente que as variações das concentrações das enzimas da síntese do acetacetato não desempenham qualquer papel principal na regulação da cetogénese no jejum e na diabetes aloxânica. Parece-nos, no entanto, por tudo quanto dissemos, que o problema não fica de maneira nenhuma encerrado.

E não deixaremos de lembrar também, neste contexto, que WAKIL & BRESSLER <sup>541</sup> admitem a possibilidade de a síntese do acetacetato se fazer por outro caminho, com intervenção da redútase da acetacetil-CoA, enzima dependente do NADPH, enquanto que WIELAND <sup>560</sup> aponta a

possibilidade de tal papel ser desempenhado pela racémase da beta-hidroxi-butiril-CoA.

Por tudo quanto foi referido, podemos bem concluir de como, no campo da cetogénese, as incógnitas e o interesse dos problemas começam logo quando se considera a primeira categoria expandida por BARTLEY, BIRT & BANKS <sup>19</sup> no que respeita aos caminhos metabólicos, isto é, a descrição das enzimas.

### METABOLISMO DA ACETONA

Através deste nosso trabalho falamos quase sempre de corpos cetónicos (de cetogénese, etc.) quando queremos significar (e temos em mente), apenas, acetacetato e beta-hidroxi-butirato. A sinédoque é geralmente aceite e encontra-se consagrada pelo uso, mas não é, rigorosamente, correcta.

Pela nossa parte fazemo-lo conscientemente, pois desejamos colocar este trabalho na perspectiva em que a literatura actual coloca o problema. Considerando, no entanto, que estamos também num ponto de partida, não deixamos de ter em conta a possibilidade de revalorização futura de pontos hoje obscuros.

A acetona tem sido dada relativamente pouca atenção quer pelas dificuldades que se encontram no seu estudo quer também pelo convencimento de que se trata de um produto de excreção.

As dificuldades são realmente grandes e advêm:

- da baixa concentração em que a acetona existe no sangue, pois mesmo em animais em cetose não passa muitas vezes de 1 mg/100 ml <sup>300</sup>;
- de não ser possível isolar a acetona do sangue sem descarboxilar acetacetato <sup>300</sup>.

Por isso, o estudo do metabolismo da acetona tem sido feito através do doseamento desta substância no ar expirado <sup>141, 142, 300, 503</sup> ou por processos que empregam a acetona marcada com carbono radioactivo (para referências ver <sup>300</sup> e <sup>348</sup>).

O convencimento de que se trata de um produto de excreção é resultante:

- de a reacção de descarboxilação do acetacetato, nos casos que nos interessam, poder ser explicada, como vimos, por mecanismo puramente químico;
- de não existir limiar de excreção para a acetona <sup>141, 557</sup>.

O facto, porém, de ser um produto de excreção não significa que seja uma substância inerte, embora os aspectos quantitativos das experiências realizadas neste campo necessitem de crítica muito atenta. Assim:

- POLONOVSKI e col. <sup>387, 388, 389, 390</sup> referem, em 1951, a utilização da acetona *in vitro*, por preparações de glândulas supra-renais de Boi, e a transformação desta substância em produtos ácidos como o ácido cítrico e derivados. Nestes estudos encontram-se referências aos trabalhos mais antigos da literatura sobre a utilização da acetona.
- MOURKIDES, HOBBS & KOEPPE <sup>348</sup>, em 1959, abordam também o problema, estudando em ratos machos, normais, intactos em jejum, e em ratos machos diabéticos pela aloxana, o tipo de marcação do glutamato, aspartato, alanina e glicogénio, após a injeção intraperitoneal de acetona-2-<sup>14</sup>C. Este esquema experimental, então com a sua novidade convidativa, visava, fundamentalmente, averiguar por qual dos dois caminhos apontados na literatura se fazia a metabolização da acetona. Com efeito, por um lado, estudos com isótopos, em ratos intactos, indicavam que a acetona poderia ser transformada em acetato <sup>394, 586</sup>, formato <sup>431</sup> e intermediários glicolíticos de 3 átomos de carbono <sup>426, 432</sup>; por outro lado, experiências *in vitro* sugeriam a carboxilação da acetona, com a sua transformação em acetacetato <sup>385</sup>.

Os resultados obtidos por MOURKIDES, HOBBS & KOEPPE <sup>348</sup> indicam:

- 1.º) que a acetona pode ser metabolizada pelos dois caminhos e que o do acetato pode predominar ligeiramente;
  - 2.º) que o jejum e a diabetes aloxânica não alteram o metabolismo da acetona, o que, do ponto de vista fisiopatológico é, como se compreende, um dado de grande importância.
- Estudos mais recentes, de LINDSAY & BROWN <sup>300</sup>, na Cabra, *in vivo*, referem a transformação da acetona em glicose, lactato e ácidos gordos voláteis, além do aparecimento do seu carbono como anidrido carbónico.

Segundo estes autores, a transformação da acetona em glicose deve fazer-se via propanediol, dado que se encontra uma percentagem maior da marcação da acetona no lactato do que na glicose.

Deve, no entanto, salientar-se que, mesmo neste tipo de animais, a contribuição da acetona para as necessidades de glicose são insignificantes. LINDSAY & BROWN calculam que na própria cabra em cetose (com peso compreendido entre 30 e 40 kg) a produção de glicose a partir de acetona não ultrapassa 1,5 g por dia.

### C. PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DOS CORPOS CETÓNICOS NA DINÂMICA DA CETOSE — FUNÇÕES DOS CORPOS CETÓNICOS

Nos Ruminantes os corpos cetônicos podem ser sintetizados não só no fígado mas também na glândula mamária em lactação <sup>377</sup> e na parede do *rímen* <sup>508, 551</sup>. Estes animais apresentam particularidades metabólicas especiais que os distinguem como animais de muito interesse no estudo de certos problemas metabólicos <sup>476</sup>. Para além disso, os problemas que neste aspecto espontaneamente apresentam têm, como dissemos, um alto interesse económico.

Em todos os outros mamíferos estudados, incluindo o Homem, os corpos cetônicos são de produção exclusivamente hepática.

Numa primeira aproximação poderemos, assim, considerar que, se os corpos cetônicos constituem combustíveis habituais dos tecidos periféricos, o aumento ou diminuição da sua concentração sanguínea poderão resultar, respectivamente, do aumento da produção ou do decréscimo da utilização e do decréscimo da produção ou do aumento do consumo. O outro aspecto a considerar neste contexto será o da eliminação renal dos corpos cetônicos em geral e pulmonar da acetona em particular; não há, no entanto, razões suficientes para o considerar quando se trata do problema geral da cetose <sup>41, 231, 581</sup>; com excepção da acetona, pelas duas vias, trata-se de substâncias que têm um limiar de excreção <sup>76, 77, 320, 441, 535, 557</sup> — e também não há diferenças na *depuração* renal dos corpos cetônicos, pelo menos entre os ratos diabéticos e os normais <sup>444</sup>.

SOMOGYI & WEICHELBAUM <sup>484</sup>, em 1942, consideraram já completamente em corpo de doutrina todas estas possibilidades.

Perante tal formulação, o problema que surge é o da natureza do mecanismo da regulação.

O problema é posto desta maneira por todos quantos se têm interrogado perante um fenómeno que, apesar de tanto ser estudado, designadamente por KREBS em múltiplas das suas publicações, WIELAND <sup>560</sup>, WINEGRAD <sup>581</sup>, LANGDON <sup>282</sup>, SÖLING <sup>482</sup>, etc., continua encoberto nos seus aspectos fundamentais.

É de notar, desde já, que todas as teorias anteriores a 1953, pelas razões que já vimos, só por coincidência se apresentam coerentes, dado que ou partiam do princípio de que os ácidos gordos se metabolizavam obrigatoriamente em dois tempos<sup>310</sup> (hepático, até corpos cetónicos, e periférico, destes até anidrido carbónico e água) ou desconheciam que o beta-hidroxibutirato não é um produto intermediário do catabolismo dos ácidos gordos.

Já de posse dos conhecimentos fundamentais que se devem a LYNEN & OCHOA<sup>309</sup> e LEHNINGER & GREVILLE<sup>294</sup>, manteve-se ainda, durante muito tempo, nitidamente patente o interesse pela disjuntiva produção-utilização, cujos termos permaneciam duvidosos<sup>50, 444</sup>. E o problema não está encerrado.

Assinalemos a este propósito que, quanto a nós, múltiplos trabalhos em que é estudado o consumo de corpos cetónicos não marcados, ministrados a animais ou adicionados a preparações *in vitro*, não são de considerar verdadeiramente na perspectiva do estudo da regulação, pois exploram apenas um dos termos daquela disjuntiva. Pelo contrário, aqueles em que se ministram substâncias marcadas<sup>14, 20, 324</sup> afiguram-se-nos com valiosas possibilidades.

Em 1968 o grupo de KREBS<sup>20</sup> voltou ao problema com um estudo de grande importância não por si, dado que é muito incompleto e tem aspectos muito discutíveis, mas pelas perspectivas que abre. Nesse trabalho os autores confirmam, com os resultados obtidos nas condições que estudaram, a inferência de NELSON *et al.*<sup>354</sup> de que a utilização é em larga escala proporcional à cetonemia, e com isso pretendem dar por terminado, em tom dogmático, o interesse das teorias opostas, mantidas por investigadores anteriores, de ser a cetose devida à superprodução ou à subutilização dos corpos cetónicos.

Quanto a nós, o encerramento do debate só pode e deve fazer-se quando as conclusões dos estudos experimentais contiverem o esclarecimento da regulação da produção e da regulação do consumo, problemas que de modo nenhum estão resolvidos, especialmente no que diz respeito ao último, por se considerar neste contexto apenas um dos aspectos da fisiologia e fisiopatologia dos corpos cetónicos, isto é, o serem fornecedores de energia<sup>551, 557</sup>.

Na verdade, os corpos cetónicos têm, também, outras propriedades e desempenham, talvez, outras funções. Para além da indução de variações glicémicas<sup>13, 313, 314, 334</sup> e de alterações da acidemia gorda<sup>13, 91, 313</sup>, sabe-se que:

— são substratos em caminhos metabólicos de síntese<sup>75, 187, 482</sup>;

— estimulam a gliconeogénese<sup>267, 270</sup>;



- modificam a utilização da glicose, quantitativamente <sup>371, 482, 577</sup>, e, na presença da insulina, modificam o próprio tipo de utilização pelo tecido adiposo <sup>186</sup>;
- têm propriedades antilipolíticas <sup>13, 38, 39, 40, 194, 453</sup>;
- actuam sobre o pâncreas <sup>351</sup> e estimulam a secreção de insulina <sup>314, 315, 396</sup>;
- desempenham, possivelmente, papel de relevo, nos fenómenos de oxidação biológica <sup>50, 93, 251, 263, 264, 280, 399, 541</sup>.

Na formulação geral dos problemas da cetose é necessário apontar estes aspectos.

Só razões de ordem pragmática, dado que de uma maneira geral tais acções ou funções tenderão a diminuir a cetonemia, é que, no estado actual do problema e com as possibilidades que temos presentemente, nos fazem dar predominante papel à cetogénese.

Os dados muito recentes de SÖLING e col. <sup>479, 482</sup> e de BALASSE & HAVEL <sup>14</sup> permitem-nos manter e reforçar o ponto de vista que acabamos de expender. Quando se considera que não só o tecido muscular <sup>21, 44, 71, 153, 154, 355, 356, 577</sup> mas também o tecido adiposo <sup>128, 186, 265, 482</sup> pode utilizar os corpos cetónicos e que, ao contrário do que acontece com o músculo, a utilização dos corpos cetónicos pelo tecido adiposo é estimulada pela glicose <sup>187, 478, 482</sup> — bem como pelo citrato, oxalacetato e piruvato <sup>155, 482</sup> — e que, na presença de glicose, a insulina tem também um efeito estimulante <sup>482</sup>, temos razões para concluir, como SÖLING, ZAHLTEN, REIMOLD & WILLMS <sup>482</sup>, que *the question arises again whether diabetic ketosis might result not only from an overproduction of ketone bodies but also from a diminished utilization of ketone bodies by adipose tissue.*

## D. CETOGÉNESE E SUA REGULAÇÃO

Equacionando o problema em termos amplos, como convém na primeira aproximação deste problema, LANGDON <sup>282</sup>, em 1960, resume os pontos de vista da época em duas hipóteses que admite poderem estar combinadas.

1. Poderá a cetose ser devida a uma velocidade tão grande da produção de acetil-CoA que os outros caminhos da sua utilização fiquem saturados? Esta é a hipótese que postula a *superprodução* de unidades de acetil-CoA.

2. Resultará a cetose, mesmo com uma cifra constante de produção de acetil-CoA, de uma diminuída utilização por outras vias? Nesta hipótese é postulada uma *subutilização* por outras vias.

Os caminhos que podem competir para a utilização da acetil-CoA são o do ciclo de Krebs e o da lipogénese, que figuram no esquema junto:

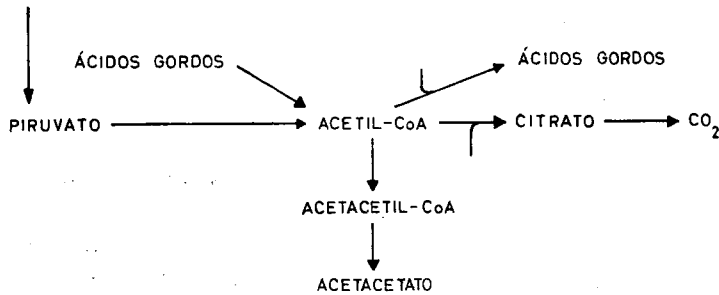


Fig. 4 — Vias de produção e utilização da acetil-CoA.

Passaremos resumidamente em revista as diversas teorias da cetogénese.

### 1. INIBIÇÃO DA LIPOGÉNESE

É sabido que a lipogénese e a síntese do colesterol podem estar diminuídas em condições de cetose tais como o jejum e a diabetes.

DOLE <sup>98</sup> salienta a evidência clínica deste factor, nos diabéticos graves não tratados.

A descoberta de que uma diminuição de NADPH, utilizado na síntese dos ácidos gordos, pode acompanhar estas situações, deu maior verosimilhança à hipótese <sup>470, 488</sup>.

Em 1959, SIPERSTEIN <sup>469</sup> atribuiu-lhe também a responsabilidade fundamental no desenvolvimento da cetose. Depois de compendiar os argumentos disponíveis, pôde concluir que *although a defect in the oxidation of acetyl CoA in the Krebs cycle provides the best theoretical explanation for the appearance of ketosis during glucose deprivation, an influence of glucose on this aspect of acetyl CoA metabolism has by no means been proved*, e mais adiante completa:

*It seems reasonable to conclude, therefore, that ketosis is, in a sense, the passive consequence of an accumulation of acetyl CoA and the inability of this acetyl CoA to be metabolized beyond the level of crotonyl CoA on the pathway of lipogenesis.*

MAYES <sup>322</sup>, no entanto, também em 1959, fundamentado na consideração dos aspectos quantitativos do problema e em sugestões colhidas

das suas experiências, embora inconcludentes, põe em dúvida que *in vivo* a diminuição da lipogénese possa ser a causa da cetose.

Os argumentos juntos por LANGDON <sup>282</sup>, em 1960, permitem admitir igualmente que, do ponto de vista quantitativo, o processo não pode ter a importância que SIPERSTEIN <sup>469</sup> lhe atribuiu.

ASHMORE <sup>6</sup>, em 1961, apresenta-nos ainda argumentos mais relevantes, dado que contrariam a teoria de SIPERSTEIN no próprio mecanismo postulado. Segundo aquele autor, o aumento dos corpos cetónicos no sangue e no fígado, em animais diabéticos a que é retirada a insulina, pode preceder, cerca de uma hora, a diminuição da síntese dos ácidos gordos. Por outro lado, a concentração de NADPH pode não ser *rate limiting* da síntese dos ácidos gordos no fígado diabético; o mesmo se passa num sistema hepático purificado, pelo que a diminuição na lipogénese parece ter como causa, nestas condições, um mecanismo propriamente de natureza enzimática <sup>6</sup>.

BORTZ & LYNEN <sup>47</sup> referiram ulteriormente, em 1963, que os derivados acil-CoA de longa cadeia inibem competitivamente a carboxilase da acetil-CoA.

No entanto, em 1967, FOSTER <sup>135</sup>, para além de mostrar que a cetose do jejum não é acompanhada de aumento da concentração da acetil-CoA no fígado, mostra em experiência simétrica da referida por ASHMORE <sup>6</sup> em 1961, que, após a realimentação ou ministração de glicose em ratos em jejum, a cetonemia e a síntese hepática do acetacetato diminuem antes que se verifique qualquer alteração na lipogénese hepática.

Aliás, um trabalho do laboratório de WIELAND <sup>504</sup>, em 1963, indica que a inibição da lipogénese acompanha, nas condições de cetose estudadas (infusão de quilomicra), a inibição do ciclo de Krebs, pelo que o fenómeno não tem uma simplicidade que permita por si apoiar a teoria de SIPERSTEIN.

Como veremos, os efeitos das substâncias implicadas têm sido, de resto, interpretados como fenómenos inespecíficos cujo significado fisiológico e fisiopatológico deve ser olhado com reservas <sup>374, 506</sup>.

## 2. INIBIÇÃO DO CICLO DE KREBS

Nesta perspectiva, o papel do oxalacetato salientou-se pelas experiências de LEHNINGER, em 1946 <sup>290</sup>. Com uma suspensão de partículas hepáticas, este investigador demonstrou que, na presença de ATP, Mg<sup>++</sup> e malonato, os ácidos gordos e o piruvato são completamente transformados em acetacetato, e que a adição de oxalacetato ao sistema diminui a quantidade de acetacetato formado e aumenta a do citrato

acumulado. Verificou também que o fumarato diminui a quantidade de acetato formado e que as quantidades de citrato, alfa-oxoglutarato, e succinato que se acumulam justificam esse *deficit*.

Note-se que, mesmo antes do estabelecimento do ciclo de Krebs, já ao oxalacetato havia sido atribuído um papel de fundamental importância na cetogénese e na cetose. Propuseram-no, pela primeira vez, em 1937, KORANYI & SZENT-GYÖRGYI <sup>243</sup> motivados pela conjectura da participação do oxalacetato como transportador de hidrogénio nos sistemas respiratórios e com a base experimental (não confirmada por outros) da reversão da cetose diabética pela ministração de succinato.

Desde aí tem sido postulada muitas vezes uma diminuição da concentração hepática de oxalacetato para explicar o aumento da cetogénese <sup>251, 254, 256, 275</sup>.

Os factos experimentais têm sido contudo de difícil interpretação. Apenas num tipo de cetose há reversão pelos intermediários do ciclo de Krebs: no que resulta da ministração do butirato <sup>22, 126</sup>; nos outros tipos de cetose a reversão não se verifica <sup>23, 94, 104, 126, 288, 312</sup>. Por outro lado, *in vitro*, os diversos intermediários produzem efeitos diferentes quando a cetogénese é estudada com fatias de fígado obtidas em diferentes situações metabólicas e incubadas em diferentes condições <sup>24</sup>. Acresça-se que os doseamentos feitos por KALNITSKY & TAPLEY <sup>230</sup> e SHAW & TAPLEY <sup>458</sup> vieram demonstrar que, na cetose, a concentração hepática do oxalacetato nem sempre está diminuída.

Quanto a nós, estas duas ordens de factos merecem ser ponderadas mais profundamente do que o têm sido.

Relativamente à primeira, o que se deve pôr é o problema da utilização do oxalacetato ou dos outros intermediários do ciclo de Krebs ministrados ou adicionados aos sistemas. O ciclo de Krebs é uma das seqüências metabólicas, e destas já atrás dissemos o suficiente. Aqui se situa também a crítica à segunda ordem de factos: por um lado, a distribuição do oxalacetato não é uniforme no fígado (os estudos da compartimentação e da permeabilidade das membranas têm permitido afirmá-lo); por outro, e isso é ainda mais vezes esquecido nos raciocínios, o oxalacetato não pertence *exclusivamente* ao ciclo de Krebs.

Parece-nos que neste campo se tem passado algo de semelhante ao que se passou com as intermitentes concordâncias da teoria da oxidação em beta, antes de 1953.

Fazer como LANGDON <sup>282</sup> faz, isto é, terminar com *It seems clear, therefore, that although this hypothesis is an attractive one at first glance, it is probably incorrect* e tomar, logo a seguir, por certa, uma outra teoria tão questionável como esta, não nos parece legítimo. Além do mais, tal atitude deixa aberto o campo para que os pontos de vista continuem

a ser defendidos sem que se verifiquem progressos apreciáveis, como realmente tem acontecido até agora <sup>329, 360</sup>.

O asserto de ENGEL & AMATRUDA <sup>114</sup> que passamos a referir, sem outro comentário, parece-nos que deve ser meditado:

*Decreased activity of the Krebs cycle, if it exists in diabetes or other conditions of ketosis, is probably of secondary importance, although it might be argued that Krebs cycle activity even when «normal» is deficient, since it should be increased to dispose of the large amount of substrate.*

Mais adiante, a propósito das relações da gliconeogénese com a cetogénese, voltaremos a este problema, para uma análise mais pormenorizada.

### 3. TEORIA DA SUPERPRODUÇÃO DE ACETIL-CoA

Segundo LANGDON <sup>282</sup>, a teoria da superprodução de acetil-CoA ganha verosimilhança pela insuficiência da hipótese contraposta. E na interpretação deste autor é dada importância fundamental ao facto referido na literatura (para referência, ver <sup>282</sup>) de existir uma desconjunção parcial da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias de fígado de gato com diabetes provocada pela ablação do pâncreas, desconjunção que é revertida pelo tratamento insulínico.

Ora o mesmo já não se verifica, por exemplo, no rato, em condições experimentais semelhantes, e a hipótese de haver uma desconjunção da fosforilação oxidativa no fígado diabético, defendida por LANGDON na base das observações de PRESSMAN & LARDY <sup>392</sup>, não é senão uma hipótese. Estes autores propõem que os aniões dos ácidos gordos tenham um efeito estimulante específico sobre uma actividade mitocôndrica fosfatásica «latente», do ATP. Há, no entanto, fortes razões para crer que os fenómenos observados *in vitro* com concentrações altas de ácidos gordos, tal como com os seus derivados de conjugação com a coenzima A, possam ser apenas fenómenos inespecíficos, sem significado biológico, devidos às propriedades tensioactivas destas substâncias, como TAKETA & POGELL <sup>506</sup> e PANDE & MEAD <sup>374</sup> concluem em trabalhos muito valiosos onde o problema também é revisto.

A inibição não competitiva da síntese do citrato pela palmitil-CoA, descrita por WIELAND & WEISS <sup>563</sup>, pode também não ser senão um problema de alteração estrutural, *in vitro* <sup>506</sup>.

Para o próprio LANGDON <sup>282</sup>, de resto, o mecanismo proposto é *admittedly speculative*. Dois dos argumentos com que procura fundamentá-lo melhor são, afinal, de valor apenas aparente. Para LANGDON:

— os fígados perfundidos que tenham maiores quantidades de triglicerídeos produzem mais corpos cetónicos;

— a cetose é quase invariavelmente precedida pelo desenvolvimento de esteatose.

Ora, relativamente ao primeiro argumento, as condições experimentais impedem a transposição de conclusões; quanto ao segundo, parece que o que se passa na generalidade das situações <sup>130, 404</sup> é exactamente o contrário do referido por LANGDON.

No contexto desta teoria interessará saber se a concentração de acetil-CoA está aumentada ou não, dado que, se não estiver, o problema pode deixar também de se reduzir ao do dinamismo de acção de massas. Relativamente a este ponto, os dados são, no entanto, desencontrados. WIELAND & WEISS <sup>562</sup> encontram aumento da concentração hepática da acetil-CoA na cetose da diabetes aloxânica e da alimentação com dieta gorda, em ratos. FOSTER <sup>135</sup>, na mesma espécie e no jejum, não a encontra. Os achados de MAYOR, VELOSO & WILLIAMSON <sup>327</sup> juntam-se aos de FOSTER. Em 1969, WILLIAMSON, VELOSO, ELLINGTON & KREBS <sup>570</sup> voltam a afirmar ampliadamente os factos citados.

No entanto parece-nos ainda necessária uma reinterpretação. Por um lado, devemos entrar em linha de conta com o problema da Km da tiólase, de que já falámos (ver atrás); por outro lado, o doseamento em bloco da acetil-CoA quer do fígado quer mesmo das mitocôndrias pode afinal não nos dar qualquer informação acerca da sua diversa disponibilidade. FRITZ <sup>147</sup> reconhece que é conveniente admitir a existência de dois *pools* de acetil-CoA na mesma mitocôndria, um relacionado com o catabolismo dos ácidos gordos e com a síntese do acetacetato, outro relacionado com a oxidação do piruvato e com o ciclo de Krebs. Segundo FRITZ <sup>147</sup>, ficaria assim explicado:

- que a carnitina aumente a transformação dos ácidos gordos mais em acetacetato do que em anidrido carbónico <sup>144, 145</sup>;
- que na ausência do malonato a cetogénese a partir do piruvato seja mais difícil de demonstrar do que a partir dos ácidos gordos, como SOSKIN & LEVINE <sup>487</sup> referem em 1952;
- que, como BREMER <sup>49</sup> mostrou em 1966, a cetogénese a partir do piruvato seja facilmente diminuída pela adição de succinato, enquanto que a cetogénese a partir de derivados acílicos de longa cadeia conjugados com a carnitina não seja facilmente suprimida por intermediários do ciclo de Krebs.

64 Quanto a nós, o problema da cetogénese excede a problemática abordada por FRITZ nesta formulação e haverá de ser enquadrada em

mais ampla visão, como faremos neste nosso trabalho. De alguns aspectos relacionados com os intermediários do ciclo de Krebs, na perspectiva da cetogénese, já falámos, e de outros falaremos ao abordar a relação da cetogénese com a gliconeogénese; além disso, não nos parece necessário reconhecer uma tal compartimentação, que é, como o próprio FRITZ <sup>147</sup> reconhece, apenas uma conjectura *highly speculative*.

#### 4. TEORIA DA PLETORA DE ÁCIDOS GORDOS NÃO ESTERIFICADOS

A separação desta teoria da anterior justifica-se tanto pela diversidade dos mecanismos que têm sido propostos, num caso e noutro, para explicar o efeito final, embora a primeira esteja postulada também nesta, como pela diversidade de ordem dos argumentos aduzidos em cada caso.

Como vimos, os ácidos gordos são tidos, desde o século passado, como precursores dos corpos cetónicos. O conhecimento de que os ácidos gordos não esterificados existem no plasma como tais e não são artefactos de laboratório é, no entanto, relativamente recente <sup>97, 170, 287</sup>.

As escolas que, pela aplicação de métodos novos muito sensíveis, descobriram a realidade da existência da acidemia gorda, trabalharam o problema muito rapidamente.

GORDON, CHERKES & GATES <sup>171</sup>, em 1957, confirmam os dados dinâmicos de DOLE <sup>97</sup>, de 1956, relativamente à acção da glicose e da insulina sobre a acidemia gorda, e ampliam-nos com a semelhança de efeitos da alanina e do ácido glutâmico, *per os*. É no mesmo trabalho que estes autores postulam para os ácidos gordos não esterificados um papel de transporte.

Também no mesmo ano, BIERMANN, DOLE & ROBERTS <sup>37</sup> confirmam o trabalho de LAURELL <sup>287</sup> relativamente à acidemia gorda na cetose diabética e mostram uma anormalidade persistente mesmo no diabético equilibrado.

Parecem-nos muito importantes as reflexões destes autores nessa altura: *It seems probable that the abnormality of NEFA metabolism in diabetes is an impaired ability to limit the output of fatty acids from tissue stores, resulting from an impaired utilization of glucose by the adipose cells. In ketosis, the defect has become extreme, and the body is flooded with a surplus of fatty acids exceeding its capacity for oxidation or synthesis of esters. Treatment with insulin checks the output of fatty acids and removes the primary cause of acidosis, but does not immediately cure ketosis, since the accumulation of ketone bodies in blood and tissues is more slowly removed.*

*It must be emphasized that this interpretation of ketosis is no more than a working hypothesis...*

O texto está cheio de interesse: para além do mecanismo da lipólise, aflora o próprio problema da utilização dos corpos cetónicos. Há a salientar, ainda, o carácter provisório da interpretação. Apesar de tudo, e talvez pela força sugestiva dos dados sobre a vida média dos ácidos gordos plasmáticos (\*) e da noção de que a sua captação pelos tecidos é proporcional à concentração plasmática <sup>4, 129, 332</sup>, a cetose passa a ser atribuída causalmente, por muitíssimos autores, ao aumento da acidemia gorda.

Aparecem-nos nesta altura completamente conformadas duas noções que não podem ser admitidas sem espírito crítico: a velocidade de libertação dos ácidos gordos a partir do tecido adiposo é a determinante da regulação da acidemia; secundariamente é também a determinante da utilização. BALASSE <sup>12</sup> formula-o muito claramente em 1966: a utilização tecidual dos ácidos gordos é regulada pela sua concentração sanguínea — exceptuando o caso do esforço muscular, não há qualquer outra condição metabólica em que tenha sido possível demonstrar uma modificação da *velocidade de consumo* dos ácidos gordos pelo organismo; conseqüentemente, todas as outras variações da acidemia gorda resultam de modificações da libertação de ácidos gordos pelo tecido adiposo <sup>12</sup>.

FRITZ <sup>146</sup>, que faz em 1961 uma revisão copiosa destes problemas, conclui: *The accelerated rate of ketogenesis in insulin-deficient animals is most probably a reflection of increased acetyl CoA formation resulting from enhanced fatty acid oxidation following increased fatty acid uptake by the liver during hyperlipacidemia*, e, já na discussão do problema específico da cetogénese:

*The viewpoint will be developed that ketosis is the result primarily of increased ketogenesis, which is a reflection of enhanced rates of hepatic fatty acid oxidation following augmented mobilization of FFA to the liver.*

O ponto de vista é retomado por ENGEL & AMATRUDA <sup>114</sup>, ONTKO & JACKSON <sup>369</sup>, ONTKO & ZILVERSMIT <sup>370</sup> e START & NEWSHOLM <sup>491</sup>.

Entretanto, a falta de correlação entre as duas grandezas tem sido também iterativamente afirmada por WERK & KNOWLES <sup>556</sup>, por KAYE *et al.* <sup>231</sup>, ADLER *et al.* <sup>1</sup>, BLACKARD & OMORI <sup>41</sup>, FOSTER <sup>135</sup>, MAYOR, VELOSO & WILLIAMSON <sup>327</sup> e WILLMS *et al.* <sup>580</sup>.

As experiências *in vitro* também não têm clarificado neste campo os problemas, mas têm tido a grande vantagem e a virtude de mostrar a sua complexidade.

---

(\*) HAVEL & FREDRIKSON <sup>191</sup> calculam-na em 2 min, FORD *et al.* <sup>134</sup> em 2,4 min; BOGDONOFF <sup>45</sup> e ARMSTRONG *et al.* <sup>4</sup> referem valores da mesma ordem para o Homem e para o Cão, respectivamente.



SCOW & CHERNICK <sup>444</sup> assim com SÖLING e col. <sup>480, 481</sup> não encontraram diferenças na cetogénese entre os fígados de ratos normais e de ratos diabéticos quando os perfundiram com meio contendo ácidos gordos. Nestas experiências os autores também observaram que a insulina não tem efeito sobre a cetogénese: *in vitro* a cetogénese dependeria apenas do fornecimento de ácidos gordos.

HEIMBERG, DUNKERLEY & BROWN <sup>193</sup>, porém, verificaram que a formação de corpos cetónicos pelo fígado isolado de rato, perfundido, não é proporcional à concentração de ácidos gordos não esterificados, mas parece ser constante dentro de uma margem larga de concentração.

KREBS, WALLACE, HEMS & FREEDLAND <sup>271</sup>, em 1969, obtêm dados concordantes com a possibilidade de o aumento da cetogénese do jejum poder ser explicado em parte pela mais alta concentração de ácidos gordos plasmáticos e presumivelmente dos tecidos. No entanto, desde que a adição de ácidos gordos ao meio de perfusão do fígado de animais alimentados não aumenta a velocidade de cetogénese para valores da ordem dos que se obtêm com o fígado de ratos em jejum, *outros factores* que não a concentração dos ácidos gordos devem determinar a velocidade da cetogénese. Segundo os autores, uma dessas causas pode ser a disponibilidade de substratos não lipídicos, e a proposição é justificada, tanto mais que o doseamento das actividades enzimáticas relacionadas com a cetogénese no fígado indica que, nesta condição, não há aumentos que possam explicar os efeitos.

Um outro trabalho da escola de KREBS tem também, neste contexto, uma importância muito grande: WILLIAMSON, VELOSO, ELLINGTON & KREBS <sup>570</sup>, em 1969, concluem que a cetogénese hepática é rapidamente diminuída nos ratos em jejum pela injeção intramuscular de glicose, de glicerol ou de di-hidroxiacetona, sem que se verifique concomitantemente qualquer alteração significativa nas concentrações dos ácidos gordos não esterificados plasmáticos ou nas concentrações hepáticas de acetil-CoA, de produtos de conjugação da coenzima A com acilos de cadeia longa, de coenzima A livre ou de ATP. Os autores concluem, também, que as alterações da concentração hepática do alfa-glicerofosfato não se correlacionam com os efeitos anticetogénicos e, finalmente, que o aumento da disponibilidade de precursores do oxalacetato pode ser o principal factor do efeito anticetogénico verificado.

Em face da revisão que acabámos de fazer, encontramos razões bastantes para afirmar que o problema da regulação da cetogénese necessita de novas investigações e para reafirmar que, relativamente ao problema da participação do oxalacetato nessa regulação, parece estar a acontecer algo de semelhante ao que aconteceu com a teoria da oxidação em beta.

## 5. CONDICIONAMENTO HORMONAL DA CETOSE

O primeiro motivo de interesse pelo estudo da cetose foi, como vimos, o facto de esta se ter revelado inicialmente em relação com a diabetes. É natural, por isso, que o conhecimento e o estudo de uma e outra tenham andado e andem ligados, e que a primeira tendência haja sido para reconhecer no desencadeamento da cetose a mesma causa dos outros fenómenos da diabetes. Dado o conhecimento da multiplicidade de situações em que a cetose aparece, a tentativa de lhes descobrir um mesmo nexo tem, sem dúvida, todo o mérito de uma justificada hipótese de trabalho.

Contudo, no desenvolvimento deste problema, nós assistimos a uma constante tomada do postulado como corolário.

Isto é tão patente em MACKEY <sup>310</sup>, quando diz *Today there is no question that ketosis is due to carbohydrate lack* (1943) como, vinte anos mais tarde, em ENGEL & AMATRUDA <sup>114</sup> quando afirmam que *the metabolic key to ketosis is utilisable carbohydrate and the endocrine key to carbohydrate utilizability is insulin*.

Tal movimento não criticado pode ser talvez a causa das dificuldades que se encontram nas tentativas de integração dos resultados experimentais obtidos neste campo.

BANTING & BEST <sup>16, 17</sup> foram os primeiros a estabelecer e referir, em 1922, a supressão da cetonúria como um efeito insulínico, do mesmo modo que o concomitante armazenamento do glicogénio hepático, o aumento do cociente respiratório, o abaixamento glicémico e a correcção da esteatose diabética.

Em 1930, HOUSSAY & BIASOTTI descobriram que a hipofisectomia no Cão <sup>215</sup> e a extirpação da *pars distalis* hipofisária no Sapo <sup>214</sup> são seguidas por notável atenuação da diabetes pancreática e *floridzínica* <sup>216</sup>.

Entre outros aspectos dessa atenuação conta-se, como originalmente verificou RIETTI <sup>415, 416</sup>, do grupo de HOUSSAY, o desaparecimento da hiperce-tonemia ou a sua redução para níveis quase normais.

Assim, muito pouco tempo depois da demonstração da responsabilidade da insulina na diabetes, fica demonstrado também que a cetose da diabetes causada pela ablação do pâncreas ou pela intoxicação por *floridzina* é devida à acção simultânea de dois factores: 1) a falta de insulina; 2) a efectividade da hipófise.

Pouco depois, LONG & LUKENS <sup>302</sup>, em 1936, confirmaram no Rato as observações de HOUSSAY e col. e demonstraram além disso que a adrenalectomia atenua a diabetes pancreática.

O estudo das influências hormonais da hipófise e da supra-renal tem sido exaustivamente feito no Rato por Scow e col., a partir de 1957 <sup>443, 444</sup>.

A soma de dados de que hoje dispomos é muitíssimo grande, mas a exacta valorização dos diversos factores hormonais torna-se muito difícil, dada a diversidade verificada quanto às espécies utilizadas e às restantes condições experimentais.

Grande parte dos conhecimentos assentes quanto aos efeitos das hormonas foram obtidos em animais por privação experimental de glândulas. Não só por isso mesmo, mas também pelo aparecimento de efeitos insuspeitados que tal método acarreta e pela necessidade de procurar em bases moleculares os efeitos das hormonas, parece-nos que se torna hoje necessária uma reinvestigação geral no campo da endocrinologia.

Os dispositivos experimentais que compreendem privações de glândulas endócrinas apresentam, a nosso ver, alguns problemas de base que interessa ter em conta e que passamos a referir.

- 1.º — Possibilidade de desenvolvimento de sensibilizações especiais ou de modificação da sensibilidade normal.

É sabido de há muito que a desnervação de um músculo pode aumentar em cerca de mil vezes a sua sensibilidade à adrenalina ou à acetilcolina (ver McLENNAN <sup>333</sup>). Este fenómeno pode ser transposto para o campo em estudo, como veremos.

- 2.º — Anulação de efeitos mediados.

Como exemplo flagrante daremos o da impossibilidade de obter no chamado «cão de Houssay» a acção da hormona somatotrófica endógena sobre a secreção de insulina, descrita por CAMPBELL & RASTOGI <sup>62</sup>, e todos os efeitos com interesse fisiológico que daí derivam. Com este tipo de preparações podemos ficar a conhecer melhor os efeitos das hormonas *per se* — o que é contestável —, mas ficaremos seguramente sem possibilidade de conhecer a acção no conjunto, quando afinal o aparelho endócrino é um aparelho de ajuste múltiplo e não de efeitos simples.

- 3.º — Possibilidade de se tomar a parte pelo todo na interpretação dos resultados obtidos pela ablação de uma glândula, quando se atribuem os efeitos às hormonas já conhecidas ou suspeitadas.

As pancreatectomias, por exemplo, fazem com que seja impedida não só a produção de *insulina* mas também, pelo menos, de *glicagina*

pancreática e esta última substância, cujo papel fisiológico constitui por si um problema, deve ser devidamente valorizada, tanto mais que o efeito cetogénico da sua ministração está bem documentado <sup>576</sup>.

Não deixaremos aliás de referir que alguns estudos feitos sobre a glicagina <sup>433</sup> nos fornecem fundamentos seguros para afirmar que o papel fisiológico de uma substância endógena ou de uma hormona em particular não pode ser sempre inferido a partir dos efeitos consequentes à sua ministração.

4.º — Possibilidade de tomar, ainda, a parte pelo todo, quando se interpretam, agora, os efeitos das hormonas.

É de considerar sempre a possibilidade de uma hormona possuir acções múltiplas, mesmo para além das conhecidas. O que se passa com a insulina é exemplar, e disso nos ocuparemos ainda neste trabalho. Quanto à ACTH, por exemplo, parece estar demonstrada, para além dos efeitos sobre a supra-renal e dos que se efectivam por intermédio das secreções desta, entre outras, uma acção cetogénica própria <sup>117</sup>.

A formulação e importância do primeiro dos pontos que acabamos de apresentar foi-nos sugerida, entre outros, pelos factos relatados por SCOW *et al.* <sup>446</sup>, URGOITI, HOUSSAY & RIETTI <sup>521</sup>, GOODMAN & KNOBIL <sup>167</sup>, <sup>168</sup> e STEINER *et al.* <sup>493</sup>.

A — SCOW *et al.* <sup>446</sup> referem que os ratos com pancreatectomia de 95 p. 100, mantidos com insulina e alimentados por sonda gástrica, não desenvolvem cetose nem alterações lipémicas e que a glicemia desce quando estes tratamentos são suspensos, se a pancreatectomia foi realizada há uma semana. Se os ratos forem mantidos durante 80 dias com aquele tratamento e então este for suspenso, desenvolve-se uma cetose grave e nenhum sobrevive para além de 42 h.

As experiências destes autores são feitas no fim do primeiro período (entre 7 e 12 dias após a intervenção), quando a cetose de jejum ainda se não manifesta. Em tais condições um *stress* operativo (a simulação da adrenalectomia, por exemplo) determina o aparecimento da cetose, que não se desenvolve se a adrenalectomia ou a hipofisectomia se realizam. Nestes animais, hipofisectomizados e pancreatectomizados, a hormona somatotrófica não tem praticamente qualquer efeito sobre a cetonemia, e a cortisona tem uma acção cetogénica gravíssima (4 mg de cortisona matam 100 p. 100 dos animais em menos de 22 h); e a ACTH produz também um efeito cetogénico considerável.

A adrenalectomia em animais pancreatectomizados possibilita também a acção cetogénica da cortisona.

Note-se, no entanto, que a cortisona e a ACTH não têm quaisquer efeitos sobre a cetonemia ou sobre a lipemia em ratos hipofisectomizados com pâncreas intacto, nem em ratos normais. Este facto, quanto a nós, deve estar subjacente em todas as interpretações.

A hormona tireoestimulante aumenta a cetonemia nos ratos hipofisectomizados e pancreatectomizados dentro de 3 h após cada injeção. A concentração máxima obtida é, no entanto, relativamente baixa.

A prolactina, mesmo em doses muito grandes, não tem efeito sobre a glicemia nem sobre a cetonemia e também não afecta a lipemia em ratos hipofisectomizados e adrenalectomizados.

Os autores crêem que os glicocorticóides actuam fundamentalmente sobre a mobilização lipídica, embora admitam também um efeito de aumento de velocidade da cetogénese.

Fica patente que as ilações de ordem fisiopatológica que Scow *et al.*<sup>446</sup> pretendem tirar das suas experiências, e que são muitas vezes cotadas pelos próprios e por outros, devem conter necessariamente as reservas relativas às condições experimentais.

B — URGOITI, HOUSSAY & RIETTI<sup>521</sup> e HOUSSAY<sup>212</sup> referem que nos cães pancreatectomizados e hipofisectomizados mantidos sem insulina, a ministração de hormona somatotrófica aumenta a cetonemia quando injectada no segundo dia depois da hipofisectomia, atingindo um nível comparável com o verificado em cães pancreatectomizados mantidos sem insulina. Depois, a acção da hormona somatotrófica diminui progressivamente até ao vigésimo dia, para se tornar mínima ou mesmo ausente.

Os autores atribuem o facto ou à progressiva diminuição das hormonas supra-renais ou à progressiva diminuição de algumas funções dos tecidos, dependentes das supra-renais, causada pela diminuição da secreção do córtex supra-renal, que diminui para cerca de 10 p. 100 do valor normal algumas horas depois da hipofisectomia.

Quando os glicocorticóides e a somatotrofina são ministrados simultaneamente, a hipercetonemia desloca-se para um nível alto.

De especial relevância, para o problema que nos ocupa, parecem ser os resultados obtidos por estes autores no tocante à correlação da cetose com a lipemia e com a acidemia gorda. Na verdade, embora a hiperlipemia se desenvolva a maior parte das vezes antes da hipercetonemia, há excepções:

1. Nos cães pancreatectomizados e hipofisectomizados a acção hipercetonémica da somatotrofina diminui com o tempo, embora a hiperlipemia esteja presente.

2. Nestes cães a ministração de cortisol não tem qualquer efeito cetonémico, embora haja hiperlipemia.

Tais resultados, como os autores fazem notar, são, na verdade, concordantes com os obtidos em macacos por GILLMAN e col. <sup>159, 160, 161</sup>. Estes, além disso, obtiveram resultados simétricos em macacos pancreatetectomizados e hipofisectomizados, com a injeção de extractos de hipófise humana, isto é, cetonomia grave sem variações lipémicas.

O estudo dos ácidos gordos referido por HOUSSAY <sup>212</sup> mostra-nos dissociações que merecem ser valorizadas:

1. Os ácidos gordos plasmáticos não esterificados diminuem com a hipofisectomia e aumentam com a pancreatetectomia. A insulina corrige a cetose dos cães pancreatetectomizados, mas, não obstante, os ácidos gordos plasmáticos continuam a ter uma concentração alta.
2. Em cães pancreatetectomizados, a hipofisectomia impede o aumento dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados e da cetonomia.
3. A somatotrofina, durante os primeiros vinte dias depois da hipofisectomia, faz aumentar nestes cães os ácidos gordos plasmáticos não esterificados e a cetonomia; mas depois a hiperketonemia desaparece, embora a concentração dos ácidos gordos se mantenha moderadamente aumentada.
4. Nestes animais a ministração de cortisol aumenta os ácidos gordos plasmáticos não esterificados, mas praticamente não aumenta a cetonomia.
5. A combinação da somatotrofina e do cortisol aumenta nitidamente a concentração dos ácidos gordos e dos corpos cetónicos do sangue.

C — Nas observações do grupo de KNOBIL <sup>167, 168</sup> consta que a mobilização dos ácidos gordos em resposta ao jejum é reduzida, em ratos, quatro meses após a hipofisectomia, tal como acontece em macacos.

D — Parecem-nos também de muito interesse as conclusões de STEINER *et al.* <sup>493</sup> relativas à cetose da diabetes experimental (quer cirúrgica quer química) em ratos que começam a ser tratados pela insulina logo após a indução da diabetes. Nestas condições o desenvolvimento ulterior da cetose por privação da insulina é condicionado pela dose de insulina habitualmente ministrada.

Os resultados dos grupos de HOUSSAY, de SCOW e de GILLMAN são apresentados num quadro que em parte tomamos de HOUSSAY <sup>212</sup>.

O aproveitamento destes resultados e de múltiplos outros referidos na literatura é, como se disse já, muito difícil, e as conclusões a tirar devem ser sempre referidas às condições precisas em que foram obtidos.

Neste campo a reinvestigação dos problemas é também uma necessidade motivada pela natureza dos métodos de doseamento empregados na maioria dos trabalhos e pela limitada informação que nos é dada, em particular, acerca do acetacetato e do beta-hidroxibutirato.

Para além das já referidas, outras hormonas têm sido consideradas pelos seus efeitos cetogénicos, designadamente a tiroxina, a adrenalina e ainda uma substância a que CHALMERS, PAWAN & KEKWICK <sup>66</sup> chamam *fat mobilizing substance* que seria, segundo os mesmos autores, um polipeptídeo de origem hipofisária.

Todos estes efeitos parecem, no entanto, de muito secundária importância e, sobretudo, indirectos relativamente ao próprio fenómeno da cetogénese. A acção cetogénica da adrenalina segundo HAGEN & HAGEN <sup>182</sup> é provavelmente devida à estimulação da oxidação dos ácidos gordos no fígado e ao aumento da mobilização dos ácidos gordos do tecido adiposo.

Relativamente à noradrenalina não há, segundo os mesmos autores, qualquer referência de um efeito cetogénico.

A ministração de tiroxina ou de extractos de glândulas tireóideas aumenta a gravidade de todos os tipos de diabetes experimental e de diabetes humana e intensifica nitidamente a cetonemia <sup>213</sup>. Contudo, como referem SINGH & SRIVASTANA <sup>468</sup>, se não existir concomitantemente diabetes, nunca se verifica cetose grave no hipertireoidismo, a não ser que outros factores se sobreponham, como pode acontecer com os vómitos.

Tomada em conjunto a totalidade destes resultados, que são aqueles que nos parecem mais significativos numa literatura de extraordinária vastidão, parece-nos poder-se concluir que, *in vivo*, a insulina tem uma actividade anticetogénica e que a cetose subsequente à pancreatectomia necessita das secreções da hipófise e da supra-renal.

A valorização dos efeitos das hormonas hipofisárias e da supra-renal em animais privados de glândulas é, no entanto, difícil de fazer, porque são possíveis interferências que provisoriamente podemos atribuir a uma modificação de *sensibilidades* e que resultam em aumento ou diminuição nos parâmetros estudados.

A reinvestigação parece-nos necessária designadamente no que respeita aos glicocorticóides, substâncias que apresentam para nós o grande interesse de terem efeitos sobre os fenómenos de gliconeogénese

cujo mecanismo anda, como se sabe desde há alguns anos, ligado ao da cetogénese, em interpretações da cetose que analisaremos adiante.

Os glicocorticóides são cetogénicos em ratos pancreatectomizados e hipofisectomizados, mas, para as mesmas condições, isso não se verifica nem no Cão nem no Macaco (ver *Quadro II*) nem em animais normais nem em animais hipofisectomizados.

Os dados da clínica não nos permitem também afirmar que os glicocorticóides sejam cetogénicos, como Scow *et al.* <sup>444, 446</sup> pretendem, pois os casos que tomam por exemplo são os de dois doentes diabéticos com doença de Addison concomitante, quando a ministração de insulina e a alimentação lhes foram suspensas, e o caso de uma doente em que a ACTH foi dada em condições de jejum e de suspensão do tratamento insulínico.

É sabido também que na síndrome de Cushing, mesmo com diabetes patente, não se verifica cetacidose e que, neste caso, a sensibilidade à insulina pode permanecer normal, embora a captação periférica de glicose possa estar diminuída, normal ou aumentada <sup>123</sup>.

Relativamente às hormonas pancreáticas, os efeitos necessitam de ser investigados, tanto como todos aqueles cujo mecanismo se desconhece.

A acção cetogénica da glicagina tem ainda o interesse que resulta do facto de esta substância, para além de participar normalmente no mecanismo da insulinogénese <sup>443</sup>, ter também efeitos glicogénicos e ureogénicos <sup>150, 572</sup>.

Digamos finalmente que, quanto à insulina, é muito grande o interesse dos seus efeitos anticetogénicos. Como conclui WINEGRAD <sup>581</sup>, em extenso estudo especialmente dedicado ao assunto, nós não sabemos qual é o mecanismo desta acção. As dificuldades neste campo são múltiplas, dada a complexidade dos efeitos desta hormona sobre o metabolismo de todos os princípios imediatos e designadamente sobre a lipólise, a gliconeogénese, a glicólise, a síntese proteica, incluindo a das enzimas, e ainda sobre os aspectos estruturais e funcionais das membranas.

Toda esta revisão faz salientar a necessidade de conhecermos melhor o mecanismo da cetogénese.

A nossa concepção de hormonas não pode ficar pela ideia vaga de que se trata de substâncias reguladoras dos processos fisiológicos. Só o conhecimento das acções destas substâncias ao nível molecular <sup>349</sup> pode trazer respostas às incógnitas de hoje. As perspectivas abertas por BESSMAN <sup>35</sup>, ao considerar a intervenção da insulina na organização de sequências moleculares funcionais abrangidas no conceito de *coacervate*, pela concepção hoje corrente dos efeitos alostéricos, e ainda pela possibilidade de interferências sobre as velocidades de síntese e degra-



QUADRO II

Respostas metabólicas à somatotrofina (STH), ao extracto de lobo anterior de hipófise humana (HAL) e aos corticóides gliconeogénicos (C), no Cão, no Rato e no Macaco, segundo HOUSSAY 312.

(+ aumento; ++ aumento intenso; = ausência de resposta; ± aumento ligeiro; v variável)

Condições experimentais	Lipemia			Cetonomia		
	Cão	Rato	Macaco	Cão	Rato	Macaco
<b>Pancreatectomia</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Pancreatectomia + Hipofisectomia</b>	=	=	= ou ±	=	=	=
« + STH	+ (1)	=	=	+ (1)	=	=
« + HAL	=	=	=	=	=	+
« + C	+	+	+	=	++	=
« + STH + C	+	+	+	+	+	+
<b>Pancreatectomia + Adrenalectomia</b>	=	=	=	=	=	=
« + STH	=	=	=	=	=	=
« + HAL	=	=	=	=	=	v
« + C	+	+	+	+	+	=
« + STH + C	+	+	+	+	+	=
« + HAL + C	+	+	+	+	+	+
<b>Pancreatectomia + Hipofisectomia + Adrenalectomia</b>	=	=	=	=	=	+
« + STH	=	=	=	=	=	+
« + C	=	=	=	+	+	+
« + STH + C	=	=	=	+	+	+
« + HAL + C	+	+	+	+	+	+

(1) Quando a STH é injectada do 2.º ao 20.º dia depois da hipofisectomia.

As tabelas e gráficos apresentados por HOUSSAY representam médias de valores máximos observados em cada grupo de cães durante o período de 5 dias depois do começo de cada grupo de experiências. Nesta forma, a apresentação dos resultados torna impossível uma apreciação aprofundada e minuciosa dos problemas.

dação das moléculas complexas, para não falar de outras hipóteses, colocam os problemas num nível de exigências que será necessário atingir de futuro.

Com toda a razão afirma KREBS: «*Metabolic disorder*», «*hormonal imbalance*» and even «*nutritional disorder*» do not necessarily denote different types of abnormalities. They are terms which emphasize different aspects of the same complex situation <sup>254</sup>.

O problema da regulação hormonal tem ainda, neste capítulo, aspectos actuais mais complexos.

De há muito se sabe já que tanto em pessoas obesas como em animais de experiência, em determinadas condições, pode haver uma certa resistência ao desenvolvimento de cetose, por exemplo durante o jejum. Está também registado que as fêmeas desenvolvem um grau de cetose maior do que os machos e, embora tal facto seja habitualmente atribuído à diferença na quantidade de gorduras armazenadas, não há clara demonstração de que seja essa a causa da diversidade de comportamento (para referências, ver <sup>114</sup>).

Em literatura mais recente, o problema volta a pôr-se e com novos aspectos. É-nos sugerido, por exemplo, que nos doentes diabéticos obesos as alterações da velocidade de lipólise e do desenvolvimento de cetose estejam correlacionadas com o factor «obesidade» e não com a deficiência de insulina <sup>580</sup> que nos diabéticos que necessitam de insulina seria o factor responsável pelas alterações verificadas nos mesmos parâmetros.

Ao concluirmos a revisão deste aspecto por que tem sido encarado o problema da cetogénese e da cetose, não deixaremos de apontar que foi postulado, há muito tempo, um centro hipotalâmico de regulação da cetonemia <sup>310</sup>, possibilidade que não tem sido lembrada, a não ser rara e episódicamente <sup>250, 581</sup>.

## 6. RELAÇÕES DA GLICONEOGÉNESE COM A CETOGÉNESE

Em 1946 PETERS & VAN SLYKE <sup>380</sup> concluem que *When the evidence is all summed up it seems to indicate that ketogenesis increases when protein assumes the functions of carbohydrate, including the formation of hepatic glycogen.*

Esta conclusão, em si mesma, parece-nos hoje de uma magnífica fecundidade. VAN ITALLIE & BERGEN <sup>529</sup> reconhecem também que ela é apoiada pelas observações de GAMBLE *et al.* <sup>148</sup> em pessoas sujeitas a experiências de sobrevivência durante a Segunda Guerra Mundial e pelas observações em animais adrenalectomizados e hipofisectomizados, cuja

resistência à cetose se acompanha da dificuldade de gliconeogénese a partir das proteínas <sup>353, 366</sup>.

Não obstante a interpretação que lhe é dada pelos autores que ulteriormente a consideram <sup>59, 256</sup>, incluindo VAN ITALLIE & BERGEN já citados <sup>529</sup>, a afirmação de PETERS & VAN SLYKE tem em conta a existência de um fenómeno concomitante que é tomado por causal: a deficiência da utilização glicídica.

Parece-nos que as motivações desta interpretação, que leva a confinar o interesse do facto referido nos limites do quadro mental em que surge, são o peso de uma originária tradição interpretativa da cetose, de que já falámos atrás, confirmada pela alusão ao glicogénio hepático, e um prejuízo de ordem teleológica, a propósito da gliconeogénese, de que falaremos adiante.

No dizer de KREBS, *The understanding of the position* (da anormal produção de corpos cetónicos) *made great progress when it was realized that the severer forms of ketosis are always accompanied by increased rates of gluconeogenesis* <sup>254</sup>.

O problema devia, na verdade, ser formulado como KREBS o faz então:

*The concomitance of increased ketone body production and increased gluconeogenesis poses the question whether these parallel increases are accidental or whether there are obligatory links between gluconeogenesis and ketogenesis which make it unavoidable that the increase in one causes an increase in the other.*

No entanto, KREBS conclui imediatamente, sem uma consideração ou uma ampla análise teórica do problema, que o laço comum entre os dois fenómenos é o oxalacetato, metabolito relevante para os dois fenómenos, o da gliconeogénese e o da cetogénese.

Deve dizer-se, porém, que a primeira relação de natureza entre os dois fenómenos tinha sido já proposta em 1960, por RENOLD & CAHILL <sup>410</sup>, segundo uma proposição que no dizer de VAN ITALLIE & BERGEN <sup>529</sup> constitui *a recent and more sophisticated version of the gluconeogenesis theory.*

Para RENOLD & CAHILL <sup>510, 511</sup>, na diabetes, a hiperglicemia compensará, de início, a diminuição da utilização da glicose, por aumento da concentração.

O agravamento da doença levará, depois, a que, em dada altura, seja ultrapassado o limiar renal. Então, as necessidades gliconeogénicas, muitíssimo grandes, não serão compensáveis. Como este fenómeno ocorre concomitantemente com o do catabolismo dos ácidos gordos e das proteínas, os ácidos gordos fornecerão o hidrogénio necessário para as reduções do piruvato até glicose e as proteínas fornecerão o esqueleto carbonado, isto é, o próprio piruvato (directa ou indirecta-

mente). Dada a irreversibilidade da oxidação do piruvato, os ácidos gordos não podem participar neste último fornecimento.

Uma vez que a ureia é o principal produto final do metabolismo azotado e, na concepção dos autores, o acetacetato é o principal *produto intermediário* do catabolismo hepático dos ácidos gordos, seguir-se-á que a síntese de uma molécula de glicose a partir de duas de piruvato deve ser acompanhada pela acumulação de, pelo menos, uma molécula de acetacetato e de uma molécula de ureia. A perda de 100 a 200 gramas de glicose na urina corresponderá ao catabolismo de uma quantidade proporcional de ácidos gordos e acompanhar-se-á também da formação de quantidades proporcionais de corpos cetónicos. A cetose e a acidose surgirão quando a capacidade de utilização dos corpos cetónicos pelo organismo for ultrapassada.

No passo seguinte, quando os autores procuram argumentos para substanciar a teoria, aduzem factos que, a nosso ver, mostram a sua inadequação.

Quais os mecanismos por que o fígado obtém os ácidos gordos e os ácidos aminados para o processo?

Voltamos, então, às teorias antecedentes: na deficiência absoluta ou relativa de glicose há deficiência insulínica; o tecido gordo responderá a esta deficiência com aumento da libertação de ácidos gordos; os músculos, com aumento do catabolismo proteídico; o fígado utilizará os ácidos gordos e os ácidos aminados na medida da sua concentração plasmática.

Segundo os mesmos autores, os glicocorticóides aceleram o efluxo dos ácidos aminados a partir dos músculos, e talvez facilitem a sua tomada pelo fígado; e, por outro lado, os glicocorticóides, a ACTH e a hormona somatotrófica aceleram a lipólise.

Os autores procuram ainda generalizar a sua teoria de modo a compreender a cetose num sentido unitário. A *cetose* provocada pela *floridzina* e pela *glicosúria renal*, e a *cetose bovina da lactação* teriam todas como causa fundamental a perda de glicose, como acontece também com a *cetose dos doentes febris*.

Esta teoria tem para nós o mérito muito grande de justapor e valorizar dois fenómenos que nos aparecem e parecem materialmente relacionados, mas merece-nos as seguintes críticas:

— Não toma em conta que os glicocorticóides possam ser antice-  
togénicos: toma-os, exactamente, por cetogénicos.

— Estipula que o desencadeamento do processo correlativo é obri-  
gatoriamente hormonal, o que não nos parece de admitir.

- Não considera, na universalidade que pretende, que a concomitância quer de ambas as mobilizações quer de ambas as metabolizações seja, de certo modo, aleatória.
- Estabelece que corpos cetônicos são apenas subprodutos metabólicos, o que não parece que se deva admitir, pelo conhecimento que temos das suas funções.

Há ainda a considerar a natureza dos produtos de metabolização dos ácidos aminados, ponto que nos parece dever ser tomado em conta por qualquer teoria que pretenda correlacionar os dois fenómenos. Quanto a este aspecto, KREBS <sup>255</sup> discutiu, a propósito da cetose bovina, a possibilidade de a gliconeogénese tornar realmente inevitável a cetogénese, tendo concluído pela negativa. Argumenta que *Gluconeogenesis from proteins would remove glucogenic amino acids but would leave behind the ketogenic ones and their degradation would cause an accumulation of ketone bodies. However the quantities of ketone bodies formed in this way are far too small to account for bovine ketosis. One hundred grammes of the usual proteins can yield about 50-60 g glucose and at most 12-16 g acetoacetate. This quantity of acetoacetate is too small, in relation to the turnover of ketone bodies, to alter significantly the balance between utilization and accumulation* <sup>255</sup>.

O laço entre os dois fenómenos existiria ao nível do oxalacetato, solicitado para a formação de fosfo-enolpiruvato no caminho da gliconeogénese e para a formação de citrato com incorporação concomitante da acetil-CoA (Fig. 5) no caminho do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

*Ketone body formation is the only major alternative pathway of acetyl coenzyme A metabolism if the tricarboxylic acid cycle is blocked by the absence of oxaloacetate* <sup>255</sup>; uma diminuição da velocidade da reacção 2 (ver Fig. 5), que participa no mecanismo de fornecimento de energia, não deixará ao fígado outra alternativa para obtenção de energia que não seja a partir de reacções estranhas ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Essas serão as da oxidação dos ácidos gordos que conduzem à formação de acetil-CoA e, subsidiariamente, a conversão de certos resíduos de ácidos aminados quer em oxalacetato quer, também, em acetil-CoA.

A utilização destes caminhos conduz à acumulação de corpos cetónicos.

KREBS formula, então, o axioma de que a produção de corpos cetónicos no fígado é um tipo de respiração, isto é, parte de um processo de oxidação com produção de energia utilizável <sup>254, 255, 256</sup>. Característica especial deste tipo de respiração será o seu baixo quociente respiratório, e STADIE et al. <sup>489</sup> observaram, na verdade, que o quociente respiratório

do fígado de gato em condições de cetose diabética pode ser da ordem de 0,2-0,4.

Aqui encontramos, finalmente, toda a problemática já abordada anteriormente a propósito do papel do oxalacetato, e a necessidade de concluir como GREVILLE <sup>178</sup>: se é certo que com mitocôndrias isoladas os problemas se equacionam e resolvem com certa clareza, já quanto às situações *in vivo* tudo se torna muito menos claro.

O próprio KREBS <sup>255</sup> aponta que a hipótese requer provas ulteriores para poder ser finalmente aceite.

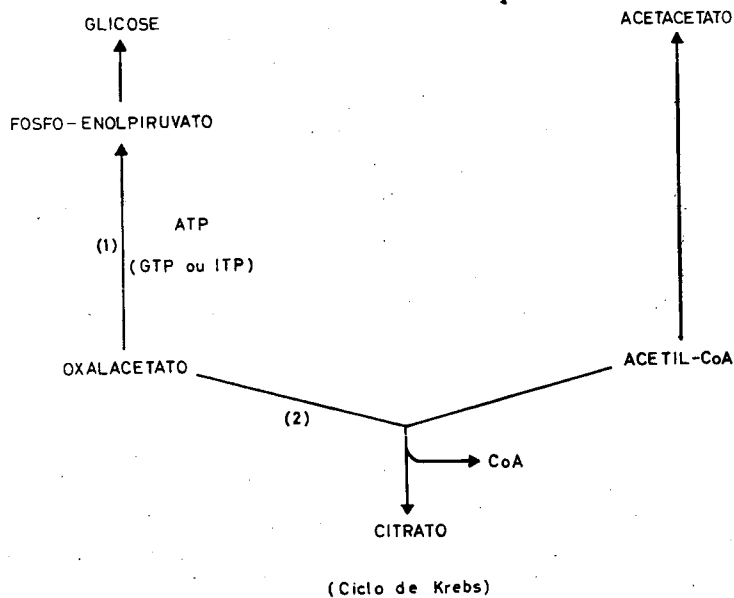


Fig. 5 — Gliconeogênese, cetogênese e ciclo de Krebs. Utilização do oxalacetato e da acetil-CoA.

A interdependência dos caminhos metabólicos representados na Fig. 5 está reduzida a uma forma extremamente simplificada. O conhecimento da compartimentação da célula poderia alterar todos os raciocínios feitos. Pode na verdade parecer que, sendo a gliconeogênese um fenómeno exomitocôndrico e a cetogênese um fenómeno endomitocôndrico, as suas interferências estejam dificultadas ou minimizadas.

No entanto, uma das razões da possível importância das interferências é exactamente a estabilização que as membranas das mitocôndrias podem conceder ou permitir ao resultado dessas interferências.

Os principais fenômenos a considerar neste contexto são os seguintes:

- 1.º — A síntese de uma molécula de glicose a partir de lactato ou de piruvato necessita de seis moléculas de ATP; se a síntese da glicose se fizer a partir do ácido glutâmico, da prolina, da arginina ou da histidina, serão necessárias quatro moléculas de ATP. Estas moléculas de ATP são produzidas na mitocôndria.
- 2.º — Quando a gliconeogênese se faz a partir dos ácidos aminos, alguns destes são transformados em malato. Estão neste caso o ácido glutâmico, a prolina, a arginina e a histidina. As reacções inerentes a essas transformações passam-se na mitocôndria e integram-se numa parte do ciclo de Krebs, a compreendida entre o alfa-oxoglutarato e o malato. O malato terá de transitar da mitocôndria para o espaço exomitocôndrico.
- 3.º — O piruvato entra no caminho da gliconeogênese por uma reacção de carboxilação catalisada pela carboxilase do piruvato descrita por UTTER & KEECK <sup>523</sup>, cuja localização é predominantemente mitocôndrica <sup>138, 198, 222, 223, 224, 285, 583</sup>.

A outra reacção de carboxilação seria a catalisada pela enzima málica, como foi proposto por WAGLE & ASHMORE <sup>537</sup> com base em estudos com fígados de ratos diabéticos; verificou-se, porém, depois, que provavelmente esta não é a via habitual, dado que o ensaio da sua actividade sugere que ela não é suficiente para justificar a velocidade de transformação de piruvato em glicose, mesmo no fígado normal, e que, para além disso, não é induzida nem pelo jejum nem pelos glicocorticóides e pode mesmo estar diminuída no fígado do rato diabético <sup>266, 466, 524</sup>. Parece assente, no entanto, que a função desta enzima seja outra: que desempenhe um papel importante na lipogénese, pela transformação do oxalacetato em piruvato, com passagem por malato e síntese de NADPH.

O passo seguinte ao da carboxilação do piruvato no caminho da síntese da glicose é o da transformação do oxalacetato em fosfo-enolpiruvato. A enzima que catalisa esta transformação foi descrita por UTTER & KURAHASHI <sup>525</sup>, em 1954, e a sua localização é exomitocôndrica <sup>192, 359, 448, 525</sup>.

As duas reacções iniciais da gliconeogénese a partir do piruvato estão assim separadas pelas membranas mitocôndricas (Fig. 6).

Para que a sequência se verifique será necessário que exista uma migração de oxalacetato do espaço endomitocôndrico para o espaço

exomitocôndrico. Este problema foi investigado por LARDY, PAETKAU & WALTER <sup>286</sup>, os quais verificaram numa grande variedade de meios contendo piruvato, bicarbonato e mitocôndrias de fígado de Rato que o oxalacetato praticamente não se acumula; os resultados indicam que o oxalacetato não atravessa as paredes mitocôndricas e que, para se dar a sua transferência, deverá ser transformado em malato (por redução) ou em citrato (por condensação com o acetyl-CoA) ou em aspartato (por transaminação). Estas seriam as substâncias que poderiam *transferir* o oxalacetato através das paredes das mitocôndrias.

HAYNES <sup>192</sup> sugere também, com originalidade, que a passagem se dê na forma de malato ou de fumarato ou de ambos, rejeitando a alternativa do citrato, por KORNACKER & LOWENSTEIN <sup>244</sup> terem verificado que a enzima clivante do citrato tem uma actividade diminuída com o jejum e por SHRAGO & YOUNG <sup>467</sup> terem também verificado que o citrato é um precursor relativamente pouco importante do fosfo-enolpiruvato, quando comparado com o malato.

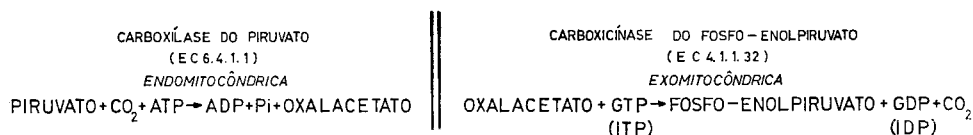


Fig. 6 — Compartimentação da carboxilase do piruvato e da carboxicinase do fosfo-enolpiruvato.

A literatura mostra-nos uma grande concordância neste aspecto. Encontramos apenas uma discordância, a de KREBS <sup>258</sup> quando afirma, em 1967, que o oxalacetato pode passar como tal, mas não nos fornece pormenores nem relativamente ao estudo que fez nem quanto à valorização do fenómeno de transferência.

Aliás, no estudo que HASLAM & KREBS <sup>188</sup> publicaram em 1968 foi demonstrado que a entrada do oxalacetato nas mitocôndrias isoladas é o factor limitante da oxidação dos nucleotídeos endomitocôndricos pelo oxalacetato exógeno, pois verifica-se um aumento de cerca de 1 000 vezes quando o ensaio é feito com mitocôndrias hepáticas desintegradas em vez de intactas. É incontestável, então, a inferência feita pelos autores de que a entrada rápida do oxalacetato nas mitocôndrias necessita de mecanismos apropriados. Para além disto, porém, devemos notar ainda — e isso parece-nos fundamental — que HASLAM & KREBS <sup>188</sup> medem a velocidade de entrada, quando o que nos interessa, nos fenómenos que estamos a considerar, é a velocidade de saída. Portanto, o dispositivo experimental de LARDY, PAETKAU & WALTER <sup>286</sup> é, a nosso ver, mais adequado que o de HASLAM & KREBS <sup>188</sup> para o estudo deste problema.



Do estudo de LARDY, PAETKAU & WALTER<sup>286</sup> devemos ainda salientar que a disponibilidade de alfa-oxoglutarato pode limitar a velocidade de formação de fosfo-enolpiruvato e que a adição de um sistema aceitador

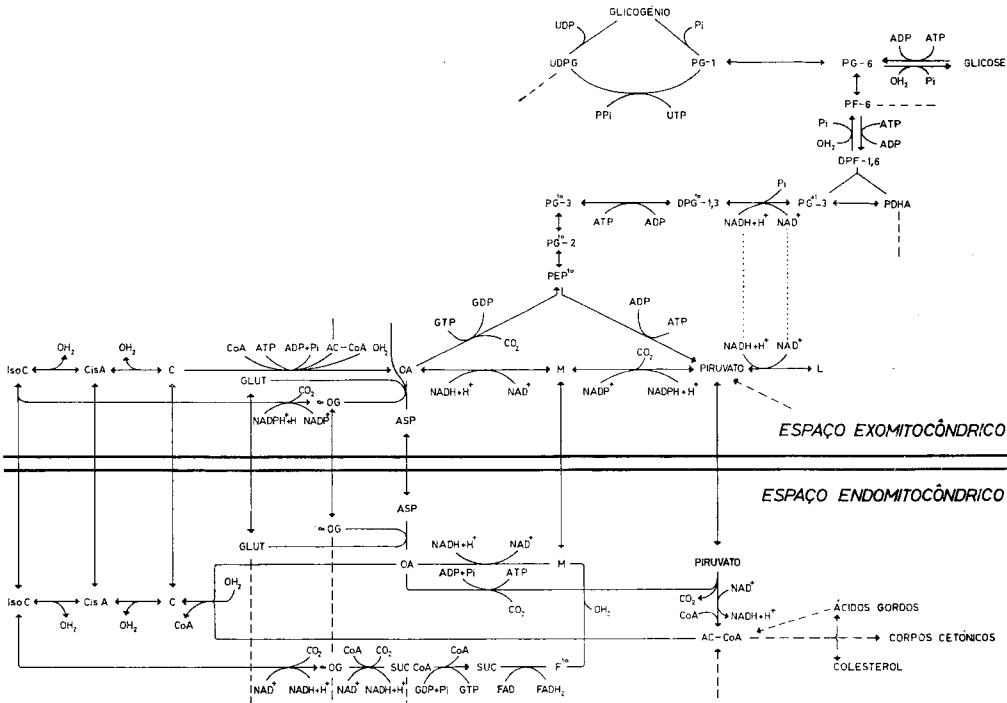


Fig. 7 — Gliconeogênese. Transposição das paredes mitocondriais.

AC-CoA — acetil-coenzima A; ASP — aspartato; C — citrato; CisA — cis-aconitato; CoA — coenzima A; DPF-1,6 — difosfato de frutose-1,6; DPGto-1,3 — difosfato de glicero-1,3; Fto — fumarato; GLUT — glutamato; IsoC — isocitrato; L — lactato; M — malato; OA — oxalacetato;  $\alpha$ OG —  $\alpha$ -oxoglutarato; PDHA — fosfato de di-hidroxiacetona; PEPto — fosfo-enolpiruvato; PF-6 — fosfato de frutose-6; PG-1 — fosfato de glicose-1; PG-6 — fosfato de glicose-6; PGal-3 — fosfato de gliceraldeído-3; PGPto-2 — fosfato de glicero-2; PGPto-3 — fosfato de glicero-3; Pi — fosfato inorgânico; PPI — pirofosfato inorgânico; SUC — succinato; SUC-CoA — succinil-coenzima A; UDP — uridinodifosfato; UDPG — uridinodifosfato de glicose; UTP — uridinotrifosfato.

de fosfato, tal como a hexocínase mais glicose, reduz para valores mínimos a velocidade do processo, a demonstrar claramente a necessidade de ATP. Os mesmos autores referem que, embora no espaço exomitocondríco a formação de oxalacetato a partir do malato seja contrariada pela constante de equilíbrio, que é desfavorável à transformação, ela

encontrar-se-á facilitada pelas proporções do malato e NAD<sup>+</sup> relativamente ao oxalacetato e NADH.

Sobre o esquema que apresentamos integrado na Fig. 7, é necessário apontar (e prever) as características das diversas enzimas e as modificações que as actividades podem sofrer nas diversas situações e com os diversos tratamentos.

O efeito da acetil-CoA sobre a carboxilase do piruvato, descoberto por UTTER & KEECH <sup>523</sup>, é uma *modificação* enzimática do maior interesse, dado que a dependência da acetil-CoA é absoluta (a velocidade da reacção é nula na ausência da acetil-CoA) e a modificação diz respeito à velocidade máxima e não à afinidade <sup>447</sup>.

O problema, em geral, como SCRUTTON & UTTER <sup>448</sup> referem e nós apontámos já, está cheio de escolhos, dado o simplismo dos ensaios das actividades enzimáticas para os diversos tecidos e espécies. Por isso, todas as hipóteses fundamentadas sobre os dados disponíveis serão necessariamente provisórias.

Alguns desses dados com interesse referem-se às capacidades catalíticas máximas e às *K<sub>m</sub>* das enzimas.

No *Quadro III* apresentamos as capacidades catalíticas máximas para enzimas *exclusivas* da gliconeogénese. Salientamos o interesse que pode ter a alta capacidade da transaminase glutamo-oxalacética.

### QUADRO III

Capacidades catalíticas máximas para enzimas da gliconeogénese (segundo SCRUTTON & UTTER <sup>448</sup>, 1968).

Enzima	Fígado	
	No Rato	Nas diversas espécies estudadas
µmoles / min / g de peso em húmido, a 37 °C		
Carboxilase do piruvato	6,7	8,3 (1,7-17)
Carboxicínase do fosfo-enolpiruvato	6,7	13 (2,2-33)
Fosfátase do difosfato de frutose-1,6	15	20 (6-37)
Transaminase glutamo-pirúvica	17	23 (1-90)
Transaminase glutamo-oxalacética	130	72 (10-130)

84 Relativamente aos valores de *K<sub>m</sub>*, que apresentamos no *Quadro IV*, há dificuldades que não estão resolvidas.

QUADRO IV

Enzimas do metabolismo do oxalacetato — valores da  $K_m$  (segundo SCRUTTON & UTTER <sup>448</sup>, 1968)

Enzima	$K_m$ para o oxalacetato
Síntase do citrato	10 $\mu$ M
Carboxicínase do fosfo-enolpiruvato	50 — 100 $\mu$ M
Desidrogénase do malato	40 — 100 $\mu$ M
Transaminase glutamo-oxalacética	

O cálculo da concentração do oxalacetato, pela relação NAD/NADH e postulando uma distribuição uniforme, dá valores da ordem de 1 a 6  $\mu$  M <sup>568</sup>.

Perante estes factos, e embora com as reservas já referidas, para explicar a entrada do oxalacetato no caminho da gliconeogénese, SCRUTTON & UTTER <sup>448</sup> propõem duas hipóteses — a de uma compartimentação diferencial do oxalacetato e a da existência de um efector desconhecido.

A preparação do fígado isolado e perfundido tem-se mostrado, neste campo, de grande utilidade. EXTON & PARK <sup>122</sup> verificaram que nos fígados de animais em jejum o piruvato é convertido em oxalacetato 2 vezes mais rapidamente do que em acetil-CoA e que a conversão do oxalacetato em fosfo-enolpiruvato é 3 vezes mais rápida do que em citrato.

As proporções alteram-se nos animais alimentados, a favor das reacções oxidativas <sup>139, 242</sup>.

Estes resultados podem ser parte da solução possível do problema que FRITZ <sup>147</sup> equaciona como vimos (pág. 64) e a que responde com a solução dos dois *pools* de acetil-CoA.

Como salientam SCRUTTON & UTTER <sup>448</sup>, o facto mais notável destes resultados é o de que durante a gliconeogénese máxima se mantenha no ciclo de Krebs um fluxo relativamente alto. Isto pode, na verdade, reflectir as necessidades de ATP para o caminho gliconeogénico, como aqueles autores propõem, mas quando analisamos estes dados no contexto dos problemas da cetogénese, concluimos que têm de ser olhados com todas as reservas os resultados obtidos com as enzimas isoladas e com os meios habituais de que se dispõe para o seu estudo.

O conhecimento do efeito das situações e dos tratamentos sobre as duas actividades enzimáticas que neste contexto agora mais nos interessam tem também muito interesse. LARDY <sup>283</sup> refere quer aumentos da actividade exomitocôndrica da carboxicínase do fosfo-enolpiruvato do fígado de Rato, relativamente aos animais alimentados que servem como teste-

munhas, nos tratamentos pela hidrocortisona, cortisona e glicagina e ainda no jejum e na diabetes (aloxânica, induzida pela mano-heptulose e pela ablação do pâncreas) quer valores inferiores aos das testemunhas nos animais realimentados após o jejum, nos animais adrenalectomizados e alimentados e nos animais tratados com insulina.

Resultados semelhantes são os obtidos por WAGLE & ASHMORE<sup>537, 538</sup>, em 1963, no fígado de animais aloxanizados.

Relativamente à actividade mitocôndrica da carboxilase do piruvato, HENNING *et al.*<sup>197</sup> relatam o seu aumento pela ministração de cortisol e WAGLE<sup>536</sup> encontra um aumento de três a cinco vezes, relativamente ao normal, induzido pela diabetes aloxânica.

A comparação dos resultados obtidos pela determinação das actividades enzimáticas não se torna possível quer pela diversidade de condições experimentais quer pela diversidade dos métodos. O problema tem, no entanto, como veremos, muito interesse.

4.º — KREBS<sup>258</sup>, em 1967, retoma o problema da transferência mitocôndrica sob um outro ângulo, propondo que a questão fundamental não é a da passagem do esqueleto carbonado (para KREBS o oxalacetato pode atravessar as paredes mitocôndricas, como já referimos) mas a dos equivalentes reductores necessários para a síntese da glicose a partir do piruvato. Segundo KREBS, o único par de substratos com os itens necessários é o malato-oxalacetato.

5.º — Quando, no sentido em que KREBS o faz, se toma a cetogénese como um tipo de *respiração*, põe-se de novo o problema da regulação deste processo, mas agora numa base mais ampla.

Parece-nos que razões de ordem energética impõem uma crítica que pode mesmo vir a impossibilitar a relação dos dois fenómenos, na perspectiva em que são hoje geralmente conjugados, ou a deslocá-la das suas coordenadas actuais; de qualquer modo, vem mostrar a necessidade de aprofundar o problema.

Assim:

a) Por um lado, a cetose é geralmente referida a um estado catabólico:

— «a cetose pode ser considerada como um estado catabólico total em que há diminuições consideráveis nas sínteses de glicogénio, proteínas e lipídeos», diz BRESSLER<sup>50</sup>;

- «a exposição ao frio é cetogénica, porque conduz a uma reacção catabólica generalizada que é mediada pela hipófise», dizem JOHNSON, PASSMORE & SARGENT <sup>223</sup>;
  - a chave que falta na cetose é a insulina, como dizem ENGEL & AMATRUDA <sup>114</sup>, e a insulina é, como sabemos, o anabolizante universal.
- b) Por outro lado, nas condições propícias para a gliconeogénese, a relação ATP/ADP no fígado e nos seus compartimentos endo e exomitocôndrico há-de ser alta:
- O ATP, o GTP ou o ITP são necessários para a síntese do oxalacetato e do fosfo-enolpiruvato e também do difosfo-1,3-glicerato.
  - A carboxilase do piruvato é inibida pelo ADP <sup>232</sup> que também inibe a carboxicínase do fosfo-enolpiruvato <sup>210</sup>.

Assim, os dois termos da relação parecem ter sentidos opostos:

- a cetose com um significado catabólico;
- a gliconeogénese necessitando de uma concentração alta de ATP, embora ocorrendo, quando máxima, em condições de deficiência glicídica.

Os argumentos apontados para a primeira situação podem parecer demasiadamente imprecisos. O atributo *catabólico* necessita de uma explicitação energética.

Ora os doseamentos do ATP e do ADP, bem como do AMP, revelam abaixamento dos valores do primeiro e aumento dos valores dos últimos, como se pode ver num trabalho de WIELAND <sup>560</sup> que reúne resultados obtidos por diversos investigadores; a relação ATP/ADP diminui nas condições de cetose e é restaurada pela ministração de insulina. Os valores apresentados por START & NEWSHOLM <sup>490</sup> confirmam os resultados reunidos por WIELAND e mostram que a relação ATP/AMP também se encontra diminuída no jejum e na diabetes aloxânica, que são as duas condições que estudam.

O mecanismo proposto por SHEPHERD & GARLAND <sup>459</sup> e evocado também por ATKINSON <sup>9</sup>, em 1968, segundo o qual o ATP aumentaria nas condições de jejum e inibiria a síntese do citrato, não é apoiado por tais factos.

Estes resultados, evidentemente, não consideram as peculiares condições que podem ser criadas pela compartimentação celular, mas, como dizem START & NEWSHOLM <sup>490</sup>, na ausência de informações acerca de tal compartimentação, as teorias da regulação metabólica deverão concordar com os factos de que se dispõe.

ATKINSON <sup>7, 8, 9, 190</sup> estuda pormenorizadamente o problema da regulação metabólica pelo ATP, ADP e AMP e conclui que a tendência para a acetil-CoA entrar no ciclo de Krebs será tanto maior quanto menor o armazenamento de ATP da célula. Este dado, só por si, como podemos concluir dos resultados a que aludimos, permitirá pensar que não são justificáveis algumas das teorias propostas neste campo do metabolismo.

Para além do papel do citrato e do estado redox, deverá ser procurada, como na última parte desta dissertação voltaremos a mostrar, a influência de outras modificações; em nosso entender, deve ser também revisto o problema das formas de energia celular tomando em conta não só as concepções clássicas <sup>180, 292, 293, 399, 400, 471, 472, 473</sup> sobre a fosforilação oxidativa, mas também as possibilidades abertas pelas teorias de MITCHEL <sup>344, 345</sup> e de GREEN <sup>174</sup>, num contexto de fenomenologia de membranas. Este caminho, embora cheio de dificuldades, parece-nos poder abrir perspectivas que, englobando a problemática das inadequações surgidas em múltiplos pontos, situem os problemas noutra nível, o qual, apesar dos múltiplos esforços, não pode ser atingido nos quadros actuais.

O exemplo de um trabalho muito recente de KREBS <sup>260</sup> permitir-nos-á documentar bem o que dizemos. KREBS consegue demonstrar *in vitro* (com homogeneizado de fígado) que a capacidade cetogénica é função da concentração do ATP. E diz: *The feature shared by the various «ketogenic» substances is the generation of ATP and, as a continuous generation of ATP is required to maintain a high concentration, it is to be expected that substrate amounts, rather than catalytic amounts, are required* <sup>260</sup>. A seguir, apresenta então referências segundo as quais os inibidores da fosforilação oxidativa são fortemente anticetogénicas nas preparações de fígado.

Lembremos que LANGDON <sup>282</sup> defende uma teoria inversa ao fazer intervir os ácidos gordos como agentes de desconjunção.

Esta propriedade poderia, na verdade, explicar a correlação entre a cetogénese e a gliconeogénese que estamos a discutir; a este último fenómeno KREBS alude também, embora não na perspectiva em que a tomamos aqui.

No entanto, os achados com este ensaio *in vitro* não têm, como vimos, apoio *in vivo*, e parece-nos de aplicar a estas considerações o comentário conclusivo de START & NEWSHOLM <sup>490</sup> que atrás apontámos.

- 6.º — Referimos, por último, no conjunto destes problemas, que, segundo a elegante demonstração experimental de GARLAND <sup>152</sup>, há nas mitocôndrias de fígado de Rato um mecanismo de regulação que faz com que num sistema com mitocôndrias isoladas a oxidação da palmitoil-carnitina se faça para:
- *acetacetato* — quando a fosforilação está conjugada e a respiração estimulada ao máximo pelo ADP;
  - *beta-hidroxibutirato* — quando a respiração é limitada por uma falta relativa de ADP;
  - *citrato* — quando a fosforilação oxidativa está desconjugada.

Estes dados são interpretados à luz das modificações da síntese do citrato, que o ATP condiciona.

A adição de ATP e oligomicina às mitocôndrias que estão a oxidar palmitoil-carnitina com produção de citrato tem como efeito uma diminuição da síntese do citrato e um aumento na síntese de acetacetato e, segundo o mesmo GARLAND, a inibição da síntese do citrato nestas condições não é tão grande como a observada quando o ATP é gerado endomitocôndricamente, o que leva a postular a compartimentação.

As experiências demonstram também que um efeito da oxidação de palmitoil-carnitina é a diminuição da afinidade aparente da translócase dos nucleotídeos da adenina para o ADP exomitocôndrico; e, segundo o autor, este efeito pode ser de considerável significado na determinação das relações ATP/ADP exomitocôndricas.

Por outro lado, desde que a *K<sub>m</sub>* da síntese do citrato para o oxalacetato é dependente da concentração e estado dos nucleotídeos, como aliás já vimos, GARLAND conclui que é impossível separar os significados da concentração endomitocôndrica de oxalacetato e da concentração dos nucleotídeos.

Então, quanto à intensificação da cetogénese, o ponto importante será ou uma queda da concentração do oxalacetato ou um aumento da fosforilação ou ambos.

GARLAND reconhece que é possível, *in vitro*, tornar efectivo qualquer dos mecanismos, mas que os dados experimentais obtidos *in vivo* contrariam a teoria, e conclui pela necessidade de procurar algum outro mecanismo que não o da diminuição da concentração endomitocôndrica de oxalacetato como determinante do aumento da síntese do acetacetato.

Para além das dificuldades levantadas quando abordámos o problema da concentração do oxalacetato no fígado e da reversão da cetose por intermediários do ciclo de Krebs, a questão aparece-nos assim numa perspectiva mais ampla, com maiores dificuldades ainda.

## E. CONCLUSÃO

A revisão que acabámos de fazer, não só dos aspectos sob que têm sido encarados os problemas da cetose e da cetogénese, mas também das teorias que têm sido propostas para explicar o aparecimento desta situação e interpretar o seu significado, mostra-nos como são apropriadas as palavras de KREBS quando diz que este é *a field full of a bewildering mass of detailed and uncoordinated information* <sup>255</sup>.

Problema enzimológico cheio de pontos controversos, problema metabólico cuja regulação permanece encoberta, problema endocrinológico cheio de incógnitas, a cetose tem sido assim encarada, parcelarmente, com um certo rigorismo de escolas e na interpretação estreita de estudos isolados, na impossibilidade não conformada de abranger num conjunto simples de postulados.

Na revisão crítica que acabámos de fazer, ficou demonstrado como nenhuma das teorias propostas é aceitável.

Aludimos também ao facto de este problema ter, para além do interesse científico, um interesse prático directo, que vai do problema económico da cetose bovina à clamante situação da acidose diabética.

O nosso interesse por este campo de estudo nasceu por tudo isso e por pressentirmos que encobertos na situação podem estar, como dissemos e justificámos, problemas básicos da Bioquímica e da Química Fisiológica, em cujo caminho pode ser encontrado, mais uma vez, impulso decisivo para colocar as perspectivas dos problemas num nível superior.

As experiências que serão relatadas a seguir foram planeadas no sentido de equacionar alguns dos problemas; ver-se-á que nesse movimento encontrámos a possibilidade de trânsito da hipótese para a tese.



## II

# CONTRIBUIÇÃO EXPERIMENTAL

*In this connection it should be remembered that studying regulatory processes in living material means leaving behind the solid basis of classical biochemistry and penetrating into an area where exact experimental proof is difficult to obtain. It is therefore indispensable to accumulate whatever information is available in order to build up a theory compatible with the evidence.*

O. WIELAND <sup>560</sup>

- A. Introdução
- B. Condições experimentais gerais. Métodos analíticos. Proveniência das substâncias utilizadas na experimentação e nos reagentes. Estudo estatístico
- C. Estudos *in vivo*
  - Esquemas experimentais e apresentação de resultados*
  - 1. Cetose do jejum
  - 2. Cetose em ratos com alimentação intermitente
  - 3. Estudos com esteróides gliconeogénicos e com a *metformina*
  - 4. Estudo de efeitos da actividade muscular
  - 5. Estudo de efeitos da ministração de uma dieta gorda e de *triamcinolona*
  - 6. Estudo de efeitos da temperatura ambiente
  - 7. Relação do azoto ureico para o azoto total da urina na intoxicação pela *floridzina*
  - 8. Estudo de efeitos da ministração de cloreto de amónio e cloreto de amónio e ornitina
- D. Estudos *in vitro*
  - Condições experimentais*
  - 1. Estudos com a incubação de fatias de fígado
  - 2. Estudos com a perfusão de fígado isolado
  - Apresentação de resultados*
  - 1. Estudos com a incubação de fatias de fígado
  - 2. Estudos com a perfusão de fígado isolado

## A. INTRODUÇÃO

Perante a multiplicidade de situações em que a cetose se desenvolve, pareceu-nos aconselhável começar pelo estudo daquelas que, pelas suas condições, pudessem ter mais interesse do ponto de vista fisiológico e apresentar um conjunto de problemas aparentemente mais simples. Pensámos também poder adquirir assim uma experiência pessoal que nos permitisse valorizar melhor os resultados já apresentados pelos investigadores que trabalham nesta matéria e, se possível, uma integração de conhecimentos.

Tivemos sempre presente que a atitude da maioria dos investigadores que neste campo assumem posição doutrinária bem patenteada e sistemática (e como vimos vários são) conduz à limitação dos aspectos considerados desta realidade surpreendente e intrigante que é a cetose.

Nesta conjuntura, os esquemas experimentais sucederam-se, guiados por um fio lógico e resultante, por um lado, dos nossos próprios pressupostos e reflexões iniciais e, por outro, sucessivamente, do confronto da experiência própria com os dados da literatura e do confronto das teorias dos diversos autores com a realidade que íamos observando.

A cetose do jejum é considerada como paradigmática. Por aí começámos. Para além do estudo da situação metabólica em si mesma, as experiências poderiam fornecer-nos indicações sobre uma possível correlação do desenvolvimento da cetose com a gliconeogénese que AMATRUDA & ENGEL<sup>2</sup> documentaram e discutiram.

A verificação de que os nossos dados, repetidamente observados, não coincidiam com os de AMATRUDA & ENGEL<sup>2</sup> levou-nos ao aprofundamento do problema. A experimentação, desenvolvida em quatro Séries de animais e com algumas variáveis introduzidas, permitiu-nos tirar conclusões que nos parecem de relevante importância.

Para além de outras características, a situação de jejum patenteia, conjuntamente, em relação à situação nutricional oposta, um aumento da gliconeogénese e uma diminuição da lipogénese. A ambos os factos

tem sido atribuída uma responsabilidade no desenvolvimento da cetose, que também tem sido contestada e negada. Pareceu-nos, por isso, conveniente abordar estes dois aspectos de modo especial.

Perante problemas controversos não nos parece que a atitude mais conveniente seja a tentativa de verificação, apenas, dos resultados alheios nas condições em que foram obtidos. Pela experiência que temos da verdade de reacções simétricas ao mesmo estímulo <sup>201, 202</sup>, parece-nos que o mais aconselhável será observar o que pode haver de diferente nas condições experimentais que possa justificar as diferenças de resultados. Acontecerá muitas vezes que com o aprofundamento do estudo tenhamos de dizer, também, com FREINKEL <sup>140</sup>, que *As in all apparently «clear-cut» biological alternatives, the «either-or» has become an «and»*.

Pareceu-nos que na nossa situação, que é ponto de partida, e nas condições de que dispúnhamos, seria mais aconselhável tentar adquirir experiência com a utilização de esquemas que pudessem explorar os problemas num sentido de certo modo inverso.

A experimentação permite-nos procurar a *contraprova*, e esta é necessária para valorizar os achados, limitar as conclusões e certificar a adequação das teorias. Relativamente a estes problemas pretendíamos na verdade que os nossos esquemas possibilitassem o dinamismo da *contraprova*.

No que respeita à lipogénese, sabe-se da literatura <sup>80, 209, 298, 502, 509 510, 511</sup> que há uma situação em que este processo pode ser intensamente induzido e de modo relativamente simples. Referimo-nos à adaptação de animais de experiência, de alimentação contínua, ao fornecimento diário da dieta durante um tempo limitado. Nestes animais fomos verificar o que se passa durante o ciclo de 24 h em parâmetros adequados que fornecem indicações gerais. Como veremos, os dados obtidos são valiosos, embora o caminho nos fique aberto, também aqui, para novas investigações.

Quanto ao fenómeno da gliconeogénese, planeámos uma exploração do mesmo tipo dinâmico. As relações da cetogénese com este processo têm sido estudadas em situações metabólicas em que a gliconeogénese está ou intensificada ou em evidência.

Ora, os trabalhos de F. MEYER <sup>337, 338, 339</sup> e de J. STERNE <sup>499, 500, 501</sup>, radicados numa problemática cheia de interesse e ainda hoje não solucionada, que é a do mecanismo de acção das biguanidas «antidiabéticas», trouxeram-nos a informação de que a *metformina* actuaria por diminuição da gliconeogénese. Embora correndo todos os riscos possíveis resultantes das dificuldades de interpretar fenómenos fisiológicos quando se utilizam drogas estranhas ao organismo, tentámos observar as relações dos dois fenómenos explorando as possibilidades de modificar a gliconeogénese por diminuição, com o emprego da *metformina*, e por aumento,

noutra *Série* experimental simultânea, com a utilização de uma substância comprovadamente gliconeogénica, a *triamcinolona*.

A experiência veio demonstrar-nos que os resultados de F. MEYER não são reprodutíveis nas nossas condições; a investigação experimental que fizemos sobre a eliminação do azoto urinário e a releitura atenta dos seus trabalhos mostraram-nos também que as conclusões daquele autor não são seguras. Concluímos então que, para esclarecimento do mecanismo da acção antidiabética da *metformina*, são necessárias novas investigações, e esse é também um caminho cheio de interesse que se nos abriu.

Entretanto, a experiência adquirida com o esteróide gliconeogénico recomendou o emprego deste valiosíssimo instrumento de estudo noutros passos do caminho que seguimos.

Ainda na tentativa de estudar a correlação da gliconeogénese com a cetogénese, os sugestivos resultados de KREBS & YOSHIDA <sup>272</sup>, relativos à indução das enzimas daquele processo, levaram-nos à investigação de efeitos da actividade muscular. A exploração dos esquemas que planeámos forneceu-nos resultados com muito interesse na perspectiva do nosso trabalho e ainda dados adicionais que poderão vir a ser esclarecidos com ulteriores investigações. Os esquemas experimentais realizados neste sentido têm uma problemática que excede a do caminho que seguimos, como aliás todos os outros; por outro lado, não nos foi possível obter muitas das informações que os esquemas poderiam dar para esclarecimento das dúvidas que existem no nosso campo de trabalho.

Estes aspectos, quer os que excedem de momento a perspectiva do nosso estudo quer os que poderiam ter contribuído para um maior esclarecimento e não puderam ser colhidos, serão apenas apontados, uma vez que em nenhuma das situações nos queremos afastar da orientação proposta pelo ponto de partida e pela finalidade que temos em vista. Embora muitas possibilidades nos tivessem sido abertas e os motivos de reflexão surgissem em cada ponto do caminho, procuraremos evitar as referências aos aspectos que do nosso ponto de vista consideramos laterais.

Uma das teorias que procura explicar os problemas da cetogénese é, como vimos, a que atribui responsabilidade à excessiva concentração de substratos susceptíveis de serem transformados pela sequência das reacções enzimáticas próprias deste processo. Tal teoria aflora na problemática dos esquemas anteriores. Por outro lado, nesta mesma perspectiva, há aspectos que não têm sido esclarecidos nem sequer claramente formulados e que nos parecem do maior interesse, quer relativamente aos problemas endocrinológicos da cetose quer relativamente ao próprio fenómeno metabólico da cetogénese. Destes, um que sempre nos interessou muito é o dos efeitos dos glicocorticóides que revertem a cetose

do jejum, mas dos quais está dito serem cetogénicos na diabetes <sup>444, 562</sup>. É sabido que não só o jejum <sup>34</sup> mas também a ministração de dietas hiperlipídicas <sup>42, 43</sup> criam situações metabólicas que têm pontos comuns com as da diabetes.

Os efeitos dos glicocorticóides sobre a dinâmica dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados podem parecer, numa primeira aproximação, compatíveis com a acção dos mesmos agentes sobre a cetonemia da diabetes e incompatíveis com o seu efeito sobre o mesmo parâmetro no caso do jejum e da cetose bovina, por exemplo. Esta é mesmo uma situação em que os esteróides gliconeogénicos são usados terapêuticamente.

Quanto à reversão da cetose de jejum, já a comprovámos com a *triamcinolona*.

Por outro lado ainda, um dos aspectos confusos dos resultados referidos por SCOW & CHERNICK <sup>444</sup> é o que diz respeito à correlação do conteúdo hepático de lipídeos com a cetose.

Por tudo isto pareceu-nos desejável abordar este conjunto de problemas da cetose, o que conseguimos com dois esquemas experimentais. No primeiro utilizámos uma dieta gorda, do mesmo tipo da empregada nas experiências de WIELAND & WEISS <sup>562</sup>, e a *triamcinolona* e as duas juntas, como processos de induzir um aumento da acidemia gorda; no planeamento do segundo tivemos presente o conhecimento dos resultados das experiências sobre a influência da exposição ao frio na mobilização lipídica. Os dados da literatura <sup>319</sup> permitiam-nos pensar, também, na adequação deste último esquema para explorar, nestas circunstâncias, a possível amplitude das variações lipídicas, referidas por SCOW & CHERNICK <sup>444</sup>.

O amadurecimento do problema da utilização de substratos, no conceito amplo da homeostasia calórica <sup>136, 254, 256</sup>, patente já anteriormente no esquema experimental em que estudámos efeitos da actividade muscular, levou-nos a concluir que a maioria dos estudos feitos sobre a cetose pecam por uma omissão relativamente à origem e qualidade de tais substratos.

Na generalidade das situações em que a cetose, como situação clínica em Medicina Humana ou Veterinária e não apenas experimental, acompanha a gliconeogénese, esta processa-se fundamentalmente a partir de substratos proteicos. O pressuposto teleológico de que a produção de glicose a partir de protídeos se destina a cobrir necessidades energéticas do tecido nervoso e das células do sangue <sup>253</sup> e de que essas são *necessidades limitadas e constantes*, bem como a atenção especial dedicada ao papel energético dos ácidos gordos <sup>401, 402</sup> fizeram com que o problema da origem da glicose, em tais situações, deixasse de ter acuidade e fosse esquecido.

Ora, nestas situações, isto é, quando as disponibilidades glicídicas de um organismo diminuem, é necessário ter em conta que a mobilização de substratos não é apenas lipídica, mas também protídica, e sobretudo, que esta não é constante, mas variável.

A variação da mobilização protídica acompanha a gravidade do *deficit* calórico criado pela variação da despesa. Isto parece-nos de uma importância fundamental e, no entanto, não tem sido equacionado como convém na amplitude que uma perspectiva actual dos problemas da cetose forçosamente há-de ter.

Aqui se nos descobriu a fecundidade magnífica de um juízo de PETERS & VAN SLYKE <sup>380</sup>, de 1946, a exarar uma intuição que os conhecimentos da época não permitiram adiantar e de que os sucessores, talvez pelos motivos apontados, não colheram as consequências.

Dando-nos conta de tudo quanto a reflexão sobre a experiência anterior nos proporcionou e a colheita bibliográfica em dispersos locais nos permitiu então, o que será inventariado e criticado na última parte deste nosso trabalho, a nossa experimentação tomou um rumo adequado.

No esquema experimental em que, pelas motivações já apontadas, procurámos estudar a influência do frio, introduzimos agora também o estudo de outros parâmetros — os doseamentos da ureia e do azoto eliminados na urina — como meios de ajuizar da mobilização proteica global.

A verificação de que a relação do azoto urinário ureico para o azoto urinário total se mantém levou-nos a formular a hipótese de uma relação entre a cetogénese e a ureogénese.

Num esquema subsequente verificámos que a mesma relação se mantém também na situação experimental que se acompanha do mais elevado grau de cetose, isto é, na intoxicação pela *floridzina*.

Com outro esquema experimental tentámos ainda obter informação sobre os possíveis efeitos da ministração de cloreto de amónio *in vivo*.

É convicção geral, como vimos na primeira parte desta nossa dissertação, que o grau de cetose é determinado principalmente pelas variações da produção e do consumo dos corpos cetónicos e que desses dois factores o primeiro é o mais importante. Em resumo, poderemos dizer que é convicção geral que os problemas da cetose são fundamentalmente os problemas da cetogénese.

Esta convicção foi profundamente ampliada e dinamizada pela força da hipótese de trabalho que apresentámos em trânsito para a tese e que nos levou a desejar a exploração do condicionamento da cetogénese, embora tivessem ficado outros múltiplos caminhos abertos que desejaríamos investigar também. Este estudo, nas nossas condições, teria de se iniciar e ficar por limitadas experiências *in vitro*.

Inicialmente trabalhámos com a incubação de fatias de fígado obtido de animais em que induzimos situações metabólicas apropriadas.

Os últimos estudos referidos neste trabalho são feitos com a perfusão do fígado isolado.

Com ambos os tipos de preparação, tentámos abordar, à luz da orientação que deixámos formulada, alguns dos problemas que nos preocupam.

A pausa em que nos encontramos justifica-se-nos pela convicção que colhemos do conjunto das nossas experiências de que é possível, desde já, conjugar os nossos dados e os alheios num corpo que, quando não nos satisfaz pelo silêncio com que responde a certas interrogações, nos apresenta, no entanto, caminhos de evidente fecundidade em que é necessário prosseguir.

Este é, em suma, o *itinerário* das experiências que vamos relatar e, *pari passu*, comentar na generalidade.

Finalmente, na terceira e última parte desta dissertação, tomaremos em conjunto os resultados obtidos e faremos o seu confronto com aqueles dados da literatura cuja agudeza ficou relevada na primeira parte — quando mostrámos a inadequação das teorias correntes que os pretendem explicar — e, também agora, com aqueles que a nossa própria tese dinamiza no sentido de uma confluência que não foi ainda convenientemente apontada na literatura e que nos parece prometedoramente fecunda.

## B. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS GERAIS. MÉTODOS ANALÍTICOS. PROVENIÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NA EXPERIMENTAÇÃO E NOS REAGENTES. ESTUDO ESTATÍSTICO.

### 1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS GERAIS

#### ANIMAIS DE EXPERIÊNCIA

Todo o nosso trabalho experimental foi realizado com a utilização do Rato como animal de experiência. Esta é a espécie mais vezes utilizada pelos diversos investigadores nos estudos relacionados com os problemas discutidos e em que estamos interessados.

Embora o Homem seja efectivamente o melhor animal de experiência<sup>59</sup>, nós recusamo-nos a aceitar aqui os termos dessa formulação. E o Rato pareceu-nos a espécie mais conveniente para um estudo experimental com a finalidade do nosso, especialmente nas nossas condições.

O inconveniente que a espécie escolhida apresenta respeita à pequena quantidade de sangue utilizável, o que limita as possibilidades de doseamentos simultâneos e sucessivos com o mesmo animal de modo a obtermos perfis metabólicos desenvolvidos no tempo. Quando o pretendemos fazer, o inconveniente foi contornado pela utilização de um certo número de animais para a marcação de cada ponto médio, com a utilização simultânea de um grupo testemunha em cada tipo de experiência, de modo a minimizar, para além da influência da variabilidade individual, a variabilidade com a época do ano e com os factores ecológicos.

Assim os inconvenientes são compensados, dado que a necessidade de multiplicar as observações tem inerente a vantagem de uma observação mais ampla. Se a variabilidade da cetonemia se verifica tanto no que respeita ao indivíduo como às condições, o efeito de certas variáveis resultará mais purificado com o aumento do número de observações, aumento que poderia ser limitante com outras espécies, como por exemplo o Cão e o Macaco. Condições como as respeitantes à uniformidade e à facilidade de reconhecimento de *pedigree*, alimentação e alojamento são de resolução mais fácil com animais que tenham o pequeno porte e as características de reprodução do Rato. Esta espécie possibilita-nos uma uniformidade de condições que não seria fácil nem seria possível com outras espécies. O Cão tem, para além disso, a particularidade de apresentar uma certa resistência ao desenvolvimento da cetose<sup>475</sup>.

Dos outros animais de experiência, de pequeno porte, a Cobaia é também algumas vezes utilizada nas investigações sobre a cetose. Esta espécie teria, no entanto, para estudos como os que pretendíamos, o inconveniente de seu próprio condicionamento nutritivo.

Depois das já referidas, as espécies que mais vezes se utilizam no estudo da cetose pertencem ao grupo dos Ruminantes, mas essa escolha é feita pela apresentação e premência de problemas específicos — o que não é, por agora, o nosso caso.

Nas nossas experiências utilizámos sempre ratos brancos Wistar, machos, de duas origens: ou criados no nosso Laboratório ou originários do Biotério do Centro de Biologia do Instituto de Ciência da Fundação C. Gulbenkian. Aqueles são originários do Biotério do Instituto G. Marañón de Madrid, do Centro de Investigaciones Biológicas, do Consejo Superior de Investigaciones Científicas, onde nos foram oferecidos os primeiros em Março de 1967.



As disponibilidades do nosso Laboratório não permitiram, no entanto, a partir de certa altura do desenvolvimento do nosso trabalho, utilizar o número de ratos desejável, nas condições desejadas. Por isso passámos a utilizar, em certos esquemas experimentais, os ratos da segunda proveniência, obtidos em óptimas condições.

No relato de cada uma das experiências referiremos a proveniência dos animais.

## ALIMENTAÇÃO

A dieta de manutenção dos ratos criados no nosso Laboratório foi inicialmente a mesma que é utilizada no Instituto G. Marañón, de Madrid. Trata-se de uma dieta equilibrada, produzida e comercializada pela firma *Piensos Condor, S. L.*, de Madrid, e com a seguinte composição fornecida pelos produtores: proteínas 21,98 p. 100; gorduras 2,59 p. 100; glicídeos 47,55 p. 100; minerais 10,63 p. 100; fibra 6,21 p. 100; água 11,04 p. 100.

Esta dieta foi utilizada também com uma *Série* experimental, para estudo da sua influência no desenvolvimento da cetose do jejum subsequente, e com uma outra *Série* experimental quer como dieta de manutenção, anteriormente ao período experimental, quer como alimentação fornecida apenas durante duas horas por dia durante um longo período.

Dada, porém, a dificuldade de obtenção desta dieta, apesar das facilidades concedidas para a sua importação, quer pela firma produtora quer pelas Entidades Oficiais dos dois países, passámos depois a utilizar a dieta 41-B produzida por *E. Dixon & Sons*, de Inglaterra, e comercializada em Portugal pela firma INECIL, de Lisboa. Trata-se de uma dieta estudada pelo *National Institute for Medical Research*, Mill Hill, de Londres, mas de cuja composição tudo quanto conseguimos saber é que na sua feitura entram cereais, farinha de peixe, leite em pó, levedura de cerveja seca, sais minerais e vitaminas com a seguinte distribuição final em princípios imediatos: proteínas 13,5 p. 100; gorduras 3,5 p. 100; glicídeos 49,0 p. 100; celulose 1,5 p. 100; água 12,5 p. 100; vitaminas, sais e *excipientes*, q. b. para 100.

Temos a informação de que é sempre esta também a dieta fornecida, desde início, aos ratos que utilizámos da segunda proveniência.

Quer com uma dieta quer com a outra, quando em período de manutenção, são fornecidas também cenouras duas vezes por semana.

Qualquer das dietas de manutenção mostrou-se-nos conveniente, a avaliar pela reprodução, pelo crescimento e pelo aspecto dos animais e, ainda, pelos valores encontrados nos parâmetros experimentalmente estudados quando em condições base.

Dado, no entanto, que para um estudo como o que desejávamos fazer se torna necessário um conhecimento mais preciso da composição da dieta <sup>187</sup>, utilizámos em todas as experiências, com excepção das já referidas, ratos alimentados durante as duas semanas que precederam o início da experiência com uma dieta semi-sintética habitualmente utilizada nas investigações do nosso Laboratório e que é a dieta descrita por WATSON, CAMERON & WITTS <sup>545</sup>, apenas com algumas modificações introduzidas por SOBRINHO-SIMÕES.

A composição da dieta, p. 100 (em peso), para além das vitaminas que se adicionam, é a seguinte: amido de milho — 68; caseína (não purificada) — 25; óleo de fígado de bacalhau — 2; óleo de amendoim — 2; mistura salina — 3.

Juntam-se, por kg: tiamina — 10 mg; riboflavina — 20 mg; piridoxina — 10 mg; pantotenato de cálcio — 20 mg; vitamina K3 — 4 mg; ácido nicotínico — 100 mg; cloreto de colina — 1000 mg.

A cada rato são dadas ainda 2 000 U de vitamina A e 200 U de vitamina D, dissolvidas em duas gotas de azeite neutro, colocadas no recipiente das gaiolas individuais que contêm a comida, duas vezes por semana.

A mistura salina <sup>217</sup> contém, p. 100 (em peso): CO<sub>3</sub>Ca — 54,300; CO<sub>3</sub>Mg — 2,500; ClNa — 6,900; ClK — 11,200; SO<sub>4</sub>Mg — 1,600; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K — 21,200; PO<sub>4</sub>Fe, 4OH<sub>2</sub> — 2,050; IK — 0,008; SO<sub>4</sub>Mn — 0,035; FNa — 0,100; (SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>Al<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>K<sub>2</sub> — 0,017; SO<sub>4</sub>Cu — 0,090.

Todos os sais utilizados foram de pureza R. G..

Num dos esquemas experimentais utilizámos também uma dieta gorda. A imprecisão da sua composição radica na necessidade que tínhamos de obter condições semelhantes às descritas por WIELAND & WEISS <sup>562</sup>: utilizámos gordura de porco fumada, de origem comercial e habitualmente destinada à alimentação humana.

A água, fornecida sem restrições aos animais de experiência, foi sempre a água potável de consumo geral.

## ALOJAMENTO

Excepto quando o indicarmos, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metálicas durante o período experimental e nas duas semanas precedentes em que foram observados para nos certificarmos do seu estado sanitário geral.

## TEMPERATURA

A temperatura ambiente habitual foi de  $22 \pm 2$  °C.

## CARACTERÍSTICAS DA ATMOSFERA E DURAÇÃO DOS PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO À LUZ

Não foram nem condicionadas, nem determinadas. Procurou-se que houvesse sempre uma renovação conveniente do ar, e os ciclos luz-obscuridade foram os naturais. No relato de cada experiência constará a data da sua realização.

## SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS NAS EXPERIÊNCIAS *IN VIVO*

Foi feito sempre por decapitação com guilhotina apropriada (*Harvard apparatus Co., Inc.*) com o mínimo de *stress*, sem qualquer anestesia, dado que esta introduz alterações nos parâmetros que pretendíamos estudar: o éter causa uma rápida e prolongada diminuição da concentração sanguínea dos corpos cetónicos <sup>185</sup>, não obstante ser o anestésico que produz o menor dos *stresses* metabólicos <sup>490</sup>.

Quando não indicado, o sacrifício dos animais fez-se sempre entre as 9 e 10 h.

## COLHEITAS DE SANGUE

Foi feita para copos com pequenas quantidades de heparina seca, arrefecidos em gelo moído. O tempo entre a colheita e o início dos tratamentos próprios de cada método analítico foi reduzido sempre ao mínimo possível.

O plasma, no caso dos doseamentos dos ácidos gordos, foi obtido por centrifugação em centrifugador refrigerado a 4 °C e extraído imediatamente, ainda que outras experiências do nosso Laboratório tenham mostrado que o plasma pode ser conservado no congelador a - 20 °C, sem que o título dos ácidos gordos se altere significativamente.

## COLHEITA DO FÍGADO

Fez-se imediatamente após a decapitação e colheita do sangue; o fígado foi logo cortado em fragmentos e estes distribuídos do seguinte modo: em tubos de centrifugador, para doseamento do glicogénio; em copos, para a determinação do resíduo seco total; em vidros de relógio, para a determinação da percentagem de azoto; e em sacos de plástico, para a determinação do peso do fígado restante.

O maior cuidado foi posto em reduzir ao mínimo os tempos entre a colheita e a pesagem e o início da digestão alcalina, para a determinação do glicogénio, e entre a colheita e a congelação a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para o fígado restante; durante todas as operações procurou-se manter a temperatura dos fragmentos o mais próximo possível de  $0^{\circ}\text{C}$ .

## COLHEITA DE URINA

Nas experiências em que foi feita, os animais foram instalados em gaiolas metabólicas utilizadas habitualmente no nosso Laboratório, cuja descrição se encontra num trabalho de EMÍDIO RIBEIRO, SOBRINHO-SIMÕES & ANA MARIA MESQUITA <sup>412</sup>. A colheita foi sempre feita para recipientes com tolueno.

## 2. MÉTODOS ANALÍTICOS

### DOSEAMENTO DOS CORPOS CETÓNICOS

O doseamento dos corpos cetónicos por métodos químicos constituiu sempre um problema de difícil solução que, como acentuaram JOHNSON, PASSMORE & SARGENT <sup>223</sup> corria, em dificuldade e delicadeza, paralelamente aos outros suscitados pelos corpos cetónicos.

A dificuldade encontra-se ultrapassada, já desde 1962, graças, também e uma vez mais, ao trabalho do grupo de KREBS <sup>569</sup>, pelo estabelecimento de métodos enzimáticos para o doseamento do acetacetato e do beta-hidroxibutirato.

Dado, no entanto, que não possuímos no nosso Laboratório equipamento necessário para a obtenção da respectiva enzima e dado que a comercialização desta só se verificou por volta de 1965, sendo contudo a sua obtenção extremamente onerosa, nos nossos primeiros anos de trabalho procurámos adquirir experiência com os métodos químicos que montámos e estudámos pormenorizadamente.

Finalmente, graças ao nível de exigências e ao esforço perseverante do nosso Director de Serviço, acabámos por dispor de condições para utilizar apenas os métodos enzimáticos nas experiências que integram este trabalho.

A quantificação destas substâncias começou a fazer-se em 1917, por VAN SLYKE <sup>530, 531</sup>, com a utilização do expediente descoberto por DENIGÉS <sup>85, 86</sup>: quando a acetona é fervida na presença de sulfato mercúrico e ácido sulfúrico, dá um precipitado que é muitas vezes mais pesado do que a acetona que contém, de tal maneira que passa a ser possível pesar o que por si mesmo não o era. A acetona pode ser então determinada, não só por pesagem do precipitado, mas também por titulação, com iodeto de potássio, do mercúrio que o precipitado contém, depois da sua conversão em cloreto de mercúrio.

EDSON <sup>108</sup>, que estudou o método de colaboração e sob a orientação de KREBS, em 1935, descreve a sua aplicação à microanálise.

102 Durante a fervura dá-se a descarboxilação do acetacetato; a determinação da acetona correspondente ao beta-hidroxibutirato é feita, então, no filtrado, depois da oxidação pelo dicromato.

O método, no entanto, nem é específico nem permite recuperações com erros inferiores a  $\pm 10$  p. 100; também não é suficientemente sensível para permitir estudos com concentrações da ordem das fisiológicas, pois não se forma qualquer precipitado com quantidades de corpos cetônicos da ordem dos 5 mg/100 ml <sup>512</sup>.

Por tudo isto foram múltiplas as tentativas feitas, a partir destes trabalhos pioneiros, para encontrar um método químico satisfatório; e são múltiplas as variantes sucessivas que estão descritas no sentido de resolver os defeitos das antecedentes.

O que pretendemos aqui, agora, é dar apenas uma perspectiva desta problemática e não historiar o problema, tanto mais que o podemos considerar ultrapassado no que respeita ao acetacetato e ao beta-hidroxibutirato, como dissemos, pelos métodos enzimáticos, e relativamente à acetona, pela cromatografia gasosa <sup>141, 142, 503</sup>.

A generalidade dos métodos químicos utilizados para o doseamento dos corpos cetônicos tem os passos fundamentais comuns que apontámos anteriormente:

- *doseamento da acetona* após a sua *extração* ou *extração* de um produto que a contenha;
- *descarboxilação do acetacetato*, que é espontânea e se completa nos extractos de ácido tricloracético por simples aquecimento em banho-maria fervente durante 5 min <sup>544</sup> e em meio com ácido clorídrico 0,1 N, a 37 °C, em 16 h <sup>485</sup>;
- *oxidação do beta-hidroxibutirato* pelo dicromato em solução com ácido sulfúrico, com obtenção do acetacetato que passa a ser considerado como o foi o preexistente.

A *extração da acetona* é feita o mais das vezes por destilação <sup>25, 455, 512</sup>, o que acarreta perdas consideráveis, ou por difusão <sup>452, 512, 554, 555</sup> utilizando as cápsulas de Conway; uma variante deste último método é a desenvolvida no nosso Laboratório sob a orientação de SOBRINHO-SIMÕES com o emprego de frascos de Warburg modificados, como os que adiante serão referidos para a difusão da amónia <sup>533</sup>.

O *doseamento da acetona*, para além de poder ser gravimétrico como já vimos, pode ser nefelométrico <sup>463</sup>, iodométrico <sup>550</sup>, colorimétrico ou ainda por cromatografia gasosa <sup>141, 142, 503</sup>.

Os métodos colorimétricos são de dois tipos consoante empregam o salicilaldeído ou a 2,4-dinitrofenilhidrazina.

O primeiro, o que emprega o salicilaldeído, foi desenvolvido por BEHRE & BENEDICT <sup>27</sup> e BEHRE <sup>25, 26</sup>. É medida a intensidade da cor vermelha da di-[hidroxibenzal]-acetona; tal como o nefelométrico e o iodométrico, necessita do isolamento prévio da acetona.

O segundo, com o emprego da 2,4-dinitrofenilhidrazina, dispensa o isolamento prévio da acetona que se faz já na forma de hidrazona e aproveita a solubilidade desta no tetracloreto de carbono; foi desenvolvido por GREENBERG & LESTER <sup>177</sup> e justificado pela solubilidade particular da hidrazona.

A *conversão do acetacetato em acetona* é feita por aquecimento em meio ácido, como dissemos.

A *conversão do beta-hidroxibutirato em acetona* é feita, como também apontámos, por oxidação em acetacetato e subsequente descarboxilação deste, na presença de dicromato e ácido sulfúrico.

A conversão pode ser realizada ou durante a destilação da acetona ou por refluxo em tubos fechados (para referências ver o trabalho de PROCOS <sup>395</sup>). Ambos têm inconvenientes. Para os evitar foi introduzida a autoclavagem, com redução ulterior do dicromato pelo sulfito de sódio, e extração da hidrazona pelo tetracloreto de carbono, por MICHAELS *et al.* <sup>341</sup>. MAYES & ROBSON <sup>326</sup> descrevem também um aparelho com que pretenderam obviar aos inconvenientes dos dois processos e reunir as vantagens.

## DOSEAMENTO QUÍMICO DO ACETACETATO

Para este em particular, o problema do doseamento põe-se de um modo um tanto diferente, mesmo antes do aparecimento dos métodos enzimáticos, desde que estão estudados e descritos métodos cuja problemática se afasta da esboçada na sequência anteriormente descrita.

Desde há muito que, por um lado, dispomos de um método manométrico e, por outro, de um método colorimétrico. LEHNINGER <sup>391</sup> faz ainda menção de um método fluorimétrico.

O método manométrico merece a maior confiança quando se trata de soluções puras de acetacetato e é, para esta substância, o método padrão. Fundamenta-se na descarboxilação da substância, em presença de catalisadores, e determinação manométrica do anidrido carbónico. Tem como inconveniente a notória falta de especificidade, pois doseia, em conjunto, pelo menos os ácidos *oxo* em *beta*, substâncias que chegaram a ser designadas conjuntamente, nos escritos científicos, como *corpos cetónicos* <sup>108</sup>.

Descrevê-lo-emos adiante, quando tratarmos da aferição das soluções padrão de acetacetato.

O método colorimétrico foi definitivamente introduzido por WALKER <sup>544</sup> em 1954 e permitiu, desde então, que a investigação neste campo se tornasse mais segura e mais fácil.

ROSENTHAL <sup>418</sup>, em 1949, tinha descrito um método para doseamento do acetacetato em filtrados de sangue, em que os produtos formados pela sua conjugação com a paranitranilina diazotizada eram extraídos num solvente não miscível e aí doseados colorimetricamente. O método emprega uma reacção geral, de descrição já muito antiga <sup>340</sup>, dos compostos aromáticos diazo com substâncias que contenham um grupo metileno reactivo, com formação de compostos azo mistos, tautómeros das hidrazonas.

WALKER <sup>544</sup> fez o estudo pormenorizado da reacção, dos seus produtos e das suas condições óptimas, e descreveu, então, um método semelhante ao anterior, mas que tem sobre ele as vantagens provenientes de um estudo muito cuidadoso.

Embora não sendo específico, pois o ácido ascórbico, o ácido oxalacético e outros ácidos *oxo* em *beta* também reagem, ele pode ser empregado com erros relativamente muito pequenos, dada a diferente reactividade dessas substâncias, a sua instabilidade ou a limitada interferência dos produtos que formam.

O método que KREBS utilizou nos seus estudos até 1962 mostrou-se-nos valioso, embora tenha, para grande parte dos nossos estudos, um inconveniente considerável: as quantidades habituais de acetacetato no sangue estão muito próximas dos limites mais baixos das possibilidades de doseamento, o que significa sensibilidade inadequada para estudos do tipo dos que desejávamos realizar.

Toda esta perspectiva, ao dar-nos conta dos esforços que durante as últimas décadas foram feitos para melhorar as condições de ensaio, dá-nos também a ideia da convicção da importância dos problemas que se pretendiam abordar e, com isso, do merecimento excepcional do grupo de KREBS ao facultar-nos uma possibilidade de o fazermos agora em boas condições.

## MÉTODOS ENZIMÁTICOS DE WILLIAMSON, MELLANBY & KREBS \*\*\*

A notável vantagem destes métodos é a especificidade própria da sua natureza. A recuperação das substâncias quando adicionadas ao sangue é, com o respectivo desvio padrão,  $104 \pm 5,75$  p. 100 para o beta-hidroxi-butirato e  $99 \pm 6,25$  p. 100 para o acetacetato.

Apontemos que a recuperação máxima do beta-hidroxi-butirato com os métodos químicos é da ordem dos 86 p. 100 <sup>177</sup>.

Nestes métodos é utilizada a desidrogenase do beta-hidroxi-butirato [D(-)] extraída de uma bactéria, *Rhodospseudomonas spheroides* que, como certas outras, acumula um polímero do beta-hidroxi-butirato.

Esta enzima tem acção semelhante à que GREEN *et al.* <sup>176</sup> encontraram no miocárdio de Porco; a mesma actividade tem sido, também, como vimos, muito estudada nas mitocôndrias de fígado, a partir dos trabalhos de LEHNINGER <sup>296</sup>.

O grupo de KREBS começou por utilizar uma preparação enzimática <sup>577</sup> que ulteriormente foi purificada <sup>330, 569</sup>; depois descreveu mesmo, com BERGMAYER *et al.* <sup>37</sup>, a cristalização da enzima.

Hoje, como dissemos, ela pode ser facilmente obtida, pois encontra-se comercializada. A enzima catalisa a reacção:



A constante de equilíbrio da reacção é  $K [H^+] = 1,42 \times 10^{-9}$ , a 25 °C <sup>368</sup>.

Esta enzima permite o doseamento do acetacetato e do beta-hidroxibutirato pelo evoluir da extinção a 340 m $\mu$ : a pH 8,5 a reacção desloca-se da esquerda para a direita, desde que o acetacetato seja fixado, por exemplo, pela hidrazina; na presença de excesso de NADH, a pH 7,0, a redução do acetacetato faz-se praticamente na totalidade.

O método permite trabalhar com amostras de sangue da ordem dos 100 a 150 mg, com a técnica de colheita em pequenas tiras de material de *nylon*, descrita por WILLIAMSON & WILSON <sup>571</sup>, colheita que pode fazer-se na cauda do Rato.

## Metódica

### 1. Desproteínização

#### REAGENTES NECESSÁRIOS

- *Solução de ácido perclórico* a 30 p. 100 (peso/volume).
- *OHK* a 20 p. 100 (peso/volume).
- «*Indicador Universal*» B. D. H.

A desproteínização do sangue, colhido para copos com heparina e mantidos em gelo moído, foi feita sempre imediatamente, embora esteja referido para o sangue humano <sup>569</sup> que não há perdas apreciáveis do acetacetato durante pelo menos 18 h, desde que o sangue seja mantido a 0 °C.

Medimos o sangue para tubos de centrífugador mantidos em gelo, contendo um volume igual da solução de ácido perclórico.

Mistura-se cuidadosamente o conteúdo com uma vareta fina de vidro e deixa-se o tubo introduzido em gelo durante 10 min. Depois centrifuga-se durante 10 min, a 0-4 °C, a 3000 g. O sobrenadante é passado para um tubo de centrífugador graduado, previamente arrefecido.

O volume decantado é anotado.

Juntam-se 5  $\mu$ l de «*Indicador Universal*» B.D.H. e neutraliza-se (pH 7-8) com solução de hidróxido de potássio a 20 p. 100.

Regista-se o volume exacto da solução gasta na neutralização.

O tubo é introduzido durante 30 min em gelo moído e depois centrifugado a 3000 g durante 10 min.

O sobrenadante é decantado para um tubo que se introduz em gelo e é utilizado para o doseamento de acetacetato e do beta-hidroxibutirato.

### 2. Determinação espectrofotométrica

Utilizámos um espectrofotómetro Beckman DU.

Comprimento de onda — 340 m $\mu$ .

Tinas com 1 cm de trajecto da luz.

Volume final da mistura na tina — 3,1 ml.

A) DO ACETACETATO

REAGENTES NECESSÁRIOS

— *Amortecedor de fosfatos de potássio* 0,1 M; pH 7,0.

— *NADH* — aproximadamente  $6 \times 10^{-3}$ .

Ajustámos a concentração da solução de modo a que 0,1 ml diluído para 3,1 ml, dê uma extinção entre 0,900 e 1,000 a 340 m $\mu$ .

Utilizámos tinas de quartzo para a referência, para o branco e para os problemas. Esta solução foi preparada sempre na ocasião de ser utilizada.

— *Desidrogénase do beta-hidroxitirato* [D(-)] — solução com cerca de 1000 U/ml (\*).

— *Solução de acetacetato* preparada como adiante se refere, de concentração conhecida, cerca de 0,20  $\mu$ moles/2,0 ml.

ESQUEMA (valores em ml)

Tinas N.º	0	1	2	3
	Tina de referência	Tina do ensaio	Tina do branco	Tina do padrão
Amortecedor de fosfatos	—	1,0	1,0	1,0
Amostra (com 0,05-0,20 $\mu$ moles)	—	2,0	—	—
Água	3,1	—	2,0	—
Solução de acetacetato	—	—	—	2,0
Solução de NADH	—	0,1	0,1	0,1
Tapa-se cada uma com <i>parafilm</i> e mistura-se por inversão				
Extinção	0	Ei <sub>1</sub>	Ei <sub>2</sub>	Ei <sub>3</sub>
Solução de desidrogénase (0,025 ml)	—	×	×	×
Extinção	0	..	..	..
(leituras de 5 em 5 min até se obter estabilização ou paralelismo dos ensaios com o branco)	0	..	..	..
	0	Ef <sub>1</sub>	Ef <sub>2</sub>	Ef <sub>3</sub>
		$\Delta E_1 =$ $= E_{i_1} - E_{f_1}$	$\Delta E_2 =$ $= E_{i_2} - E_{f_2}$	$\Delta E_3 =$ $= E_{i_3} - E_{f_3}$
$\Delta E$		$\Delta E_e =$ $= \Delta E_1 - \Delta E_2$		$\Delta E_p =$ $= \Delta E_3 - \Delta E_2$

(\*) Uma unidade da actividade enzimática é definida \*\*\* como a quantidade de enzima que causa uma diminuição da extinção de 0,010/min a 340 m $\mu$ , a 20-25 °C, num sistema que contenha: 100  $\mu$ moles de *tris* (pH 7,6); 0,5  $\mu$ moles de NADH; e 10  $\mu$ moles de acetacetato, num volume final de 3,0 ml.

B) DO BETA-HIDROXIBUTIRATO [D(-)]

REAGENTES NECESSÁRIOS

— Amortecedor de tris 0,1 M; pH 8,5.

— Amortecedor de hidrato de hidrazina pH 8,5 que se obtém misturando 1 ml de hidrato de hidrazina e 5 ml de CIH, IN e diluindo para 20 ml com água.

— NAD<sup>+</sup> (aproximadamente  $1,3 \times 10^{-2}$  M)  
A solução foi preparada sempre no dia em que a empregámos.

— Desidrogénase do beta-hidroxibutirato [D(-)], como para o doseamento do acetacetato.

— Solução de beta-hidroxibutirato [D, L] contendo 0,05 a 0,20  $\mu$ moles de beta-hidroxibutirato [D(-)] em 1,5 ml.

ESQUEMA (valores em ml)

Tinas N.º	0	1	2	3
	Tina de referência	Tina do ensaio	Tina do branco	Tina do padrão
Amortecedor de hidrazina	—	1,0	1,0	1,0
Amortecedor de tris	—	0,5	0,5	0,5
Amostra (contendo de 0,05 a 0,20 $\mu$ moles)	—	1,5	—	—
Água	3,1	—	1,5	—
Solução de beta-hidroxibutirato [D, L]	—	—	—	1,5
Solução de NAD <sup>+</sup>	—	0,1	0,1	0,1
Tapa-se cada uma com <i>parafilm</i> e mistura-se por inversão				
Extinção (leituras até à estabilização)	0	Ei <sub>1</sub>	Ei <sub>2</sub>	Ei <sub>3</sub>
Solução de desidrogénase (0,025 ml)	—	×	×	×
Extinção (leituras de 10 min em 10 min até se obter estabilização ou paralelismo dos ensaios com o branco)	0	..	..	..
	0	..	..	..
	0	Ef <sub>1</sub>	Ef <sub>2</sub>	Ef <sub>3</sub>
	—	$\Delta E_1 =$ $= Ef_1 - Ei_1$	$\Delta E_2 =$ $= Ef_2 - Ei_2$	$\Delta E_3 =$ $= Ef_3 - Ei_3$
$\Delta E$		$\Delta E_e =$ $= \Delta E_1 - \Delta E_2$	—	$\Delta E_p =$ $= \Delta E_3 - \Delta E_2$



### 3. Cálculos

Os cálculos são semelhantes para os dois casos.

— Coeficiente de extinção específica do NADH a 340 m $\mu$  [cm<sup>2</sup>/ $\mu$ moles] = 6,22 <sup>211</sup>.

— Volume final da mistura na tina — 3,1 ml.

1.º — *Determinação da quantidade de substância no ensaio*

$$x = \mu\text{moles/ensaio} = \frac{\Delta E e \times 3,1}{6,22} = 0,498 \times \Delta E$$

2.º — *Concentração por ml de amostra*

É necessário considerar a diluição sofrida pela amostra na desproteínezão e na neutralização subsequente e ainda a quantidade de água da amostra. No caso do sangue, esta poderá ser, e é com certeza, variável nas diversas situações, pelo que será cometido um erro na expressão dos resultados, se não for determinada de cada vez.

Nós consideramos, como aconselha BERGMEYER <sup>30</sup>, o valor de 80 p. 100 de água para o sangue.

Seja:

A — o valor do volume da amostra desproteínezada.

B — o valor da soma de A com o da solução de potassa gasta na neutralização.

V — o valor do volume da amostra assim preparada, colocada na tina.

X — o valor do volume de sangue desproteínezado, igual ao volume de solução desproteínezante.

Teremos:

— Volume de água total = X + 0,8 X = 1,8 X

— Factor para o volume de sangue pipetado =  $\frac{B}{V} \times \frac{1,8 X}{A}$

— Factor por ml de sangue =  $\frac{B}{V} \times \frac{1,8 X}{A X} = \frac{B}{V} \times \frac{1,8}{A}$

—  $\mu$ moles de acetacetato ou de beta-hidroxibutirato/ml de sangue =  
=  $\Delta E \times 0,498 \times 1,8 \times \frac{B}{A} \times \frac{1}{V} = \Delta E \times \frac{B}{A} \times \frac{1}{V} \times 0,896$

A inclusão dos padrões, quer na técnica de doseamento do acetacetato quer na do beta-hidroxibutirato, tem por finalidade, apenas, a verificação das condições de trabalho.

#### PREPARAÇÃO DO ACETACETATO

Utilizámos o método descrito por KREBS & EGGLESTON <sup>263</sup>.

Num balão juntamos 2,6 ml de etilacetato destilado recentemente, 10,2 ml de OHNa, 2 N, e água até 20 ml. O éster é hidrolisado colocando o balão em banho-maria a 40 °C durante 1 h.

A solução é então neutralizada com ClH, 1N, utilizando o tornesol como indicador, e passada, com lavagens sucessivas do balão, com um total de 20 ml de água, para um balão de evaporador rotativo. Neste é reduzida a um volume de 5 ml, para retirar o etanol. Transfere-se a solução para um balão graduado e, também com lavagens sucessivas do balão do evaporador rotativo, leva-se a 20 ml.

Esta solução *stock* (cerca de 1 M) é distribuída por tubos de ensaio e armazenada no congelador a - 20 °C.

## DOSEAMENTO MANOMÉTRICO DO ACETACETATO

A concentração exacta da solução é determinada de cada vez, utilizando o método manométrico desenvolvido, como já dissemos, por EDSON<sup>108</sup>, com a colaboração e sob a orientação de KREBS. Neste método aproveita-se a propriedade que a anilina tem, tal como outras aminas primárias, de acelerar a descarboxilação dos ácidos com função *oxo* em *beta*. O citrato de anilina permite obter uma concentração mais alta de anilina, dada a sua maior solubilidade, o que possibilita completar a reacção mais rapidamente.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

- Solução de ácido cítrico a 50 p. 100 (peso/volume).
- Anilina.
- Solução de citrato de anilina. — Prepara-se juntando volumes iguais de anilina e de ácido cítrico a 50 p. 100. A mistura é fortemente ácida.

### Metódica

No compartimento principal do frasco de Warburg coloca-se um volume de 2,0 ml da amostra e 0,3 ml da solução de ácido cítrico a 50 p. 100.

No ramo lateral colocam-se 0,4 ml da solução de citrato de anilina.

Um frasco para o termobarómetro é tratado da mesma maneira, utilizando 2,0 ml de água em vez da amostra.

Os frascos são adaptados aos manómetros e os conjuntos colocados no incubador com o banho a 25 °C.

Depois de um período de 20 min de agitação para equilíbrio:

- verifica-se o aperto dos frascos e das rolhas dos ramos laterais;
- desnivelam-se convenientemente os manómetros;
- misturam-se os conteúdos do ramo lateral e do compartimento principal;
- reinicia-se a agitação.

São feitas leituras de 10 em 10 min, até valores constantes.

O tempo necessário, incluindo o do equilíbrio, vai de 1 h a 1,5 h.

Nos nossos ensaios, para obtermos leituras dentro da escala dos conjuntos manométricos de que dispomos, dado que a solução inicial é aproximadamente 1 M, diluímo-la a 3/1000.

Os cálculos são feitos de acordo com a teoria do método<sup>96, 520</sup>.

## DOSEAMENTO DA GLICOSE

Consoante o tipo das experiências, o doseamento da glicose foi feito no sangue, no líquido de incubação ou no líquido de perfusão e em soluções neutralizadas depois da hidrólise ácida do glicogénio, sempre pelo método enzimático que utiliza a glicose-oxidase e a peroxidase para a obtenção de oxigénio atómico e a ortodiamisidina como indicador de oxirredução. A variante seguida foi, com pequenas modificações, a descrita por RAABO & TERKILDSEN<sup>398</sup>.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

1.º — Solução aquosa de dicloreto de ortodiamisidina — 250 mg/100 ml.

2.º — Solução de enzimas:

Glicose-oxidase em pó ( <i>crude powder, Sigma</i> )	3 g
Peroxidase	15 mg
Amortecedor de fosfatos, M/15; pH 7	1000 ml

Dissolvem-se e passa-se com aspiração por filtro do tipo Schleicher & Schüll 589. 109

## Metódica

Relativamente ao sangue, a preparação das amostras foi feita sempre pelo método de SOMOGYI <sup>483</sup>: hemólise inicial (0,5 ml de sangue e 2,5 ml de água) e desproteínização pelo hidróxido de bário (1,0 ml) e sulfato de zinco (1,0 ml), nas condições indicadas por aquele autor.

Este é o processo que se tem mostrado mais conveniente para retirar do meio as substâncias que interferem com as reacções.

Depois da filtração por papel de filtro, são utilizados na mistura de ensaio 0,2 ml de filtrado pipetados para tubos contendo 0,1 ml de uma solução de cloreto de ortodiansidina e 6,0 ml da solução de enzimas.

O branco contém 0,2 ml de água em vez da amostra desproteínizada; com cada série fazem-se também ensaios com soluções padrão contendo 10, 40 e 60  $\mu\text{g}$  de glicose em 0,2 ml.

As amostras foram diluídas sempre que necessário para a obtenção de valores de extinção utilizáveis.

Depois da incubação a 37 °C durante 30 min, as determinações da extinção são feitas dentro de 30 min a 436  $\text{m}\mu$ .

Os ensaios foram sempre feitos em duplicado e os resultados expressos em  $\mu\text{moles/ml}$ .

Nos doseamentos no líquido de incubação e no líquido de perfusão não foi feita desproteínização prévia, dado que trabalhámos sempre com preparações e meios de incubação relativamente simples.

Nestes casos foi determinado sempre o valor do meio inicial respectivo.

## DOSEAMENTO DO GLICOGÉNIO

O método que utilizámos compreende: 1) a extracção do glicogénio pelo processo de GOOD KRAMER & SOMOGYI <sup>165</sup>, descrito também por PFLEIDERER <sup>382</sup>, em que são modificados apenas alguns pormenores do método mais antigo de PLÜGER; 2) a hidrólise ácida do glicogénio; 3) a neutralização da solução; 4) o doseamento da glicose.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

— Etanol a 95 p. 100 (volume/volume).

—  $\text{SO}_4 \text{H}_2$ , 2N.

— OHK, a 30 p. 100 (peso/volume).

— OH Na, 2 N.

## Metódica

### 1. Extracção do glicogénio

— Ao fragmento de tecido colocado num tubo de centrífugador, pesado e sempre arrefecido, juntam-se, por grama de tecido, 2,0 ml de solução de potassa a 30 p. 100.

— O tubo é aquecido em banho-maria fervente até se obter, por digestão, uniformidade do conteúdo (cerca de 15 min).

— Retira-se o tubo do banho e juntam-se-lhe 3,5 ml de etanol a 95 p. 100.

— Aquece-se de novo até início da fervura.

— Deixa-se arrefecer à temperatura ambiente.

— Centrifuga-se.

— Decanta-se o sobrenadante que é rejeitado. O precipitado contém o glicogénio.

— Lava-se com cerca de 3 ml de etanol a 95 p. 100.

— Centrifuga-se.

— Decanta-se o sobrenadante.

— Retiram-se os restos de álcool, aquecendo em banho-maria fervente.

## 2. Hidrólise do glicogénio

- Adicionam-se ao precipitado contido no tubo de centrífugador 2 ml de uma solução de  $\text{SO}_4 \text{H}_2$ , 2N.
- Coloca-se o tubo durante 120 min em banho-maria fervente.
- Deixa-se depois arrefecer à temperatura ambiente.

## 3. Neutralização da solução de glicose

- Faz-se pela adição de solução de  $\text{OHNa}$ , 2N, até pH 5-7.
- Completa-se, no fim, para um volume conveniente, por exemplo 10 ml.

## 4. Doseamento da glicose

- É feito sempre pelo método enzimático referido, utilizando 0,2 ml da amostra ou de uma diluição conveniente.

## 5. Expressão dos resultados

Foi feita em  $\mu\text{moles}$  de glicose do glicogénio por grama de tecido.

## DOSEAMENTO DO LACTATO

Utilizámos o método enzimático.

A desidrogenase láctica catalisa a reacção



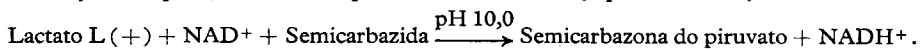
Constante da reacção —  $K_c = 2,9 \times 10^{-12} [\mu\text{moles/l}]^{207}$ .

O equilíbrio da reacção pende, assim, para a esquerda; para que se dê a transformação total do lactato em piruvato é necessário que o sistema contenha, para além de  $\text{NAD}^+$  em excesso, uma substância que fixe o piruvato. Estão neste caso a hidrazina e a semicarbazida que se transformam, respectivamente, em hidrazona e semicarbazona do piruvato.

Preferimos um processo que empregue a semicarbazida, visto que, embora a reacção se desenvolva com uma velocidade menor, a extinção do meio mantém antes e depois da reacção uma estabilidade que nem sempre se consegue com a hidrazina.

A fixação dos prótons fica assegurada se o meio for alcalino.

A reacção completa, no caso do processo de OLSON <sup>387</sup>, que utilizámos, será:



## Metódica

### 1. Desproteínização do sangue

#### REAGENTE NECESSÁRIO

— *Solução de ácido perclórico a 6 p. 100 (peso/volume).*

Faz-se com volume igual de solução de ácido perclórico, misturada cuidadosamente com vareta de vidro fina e centrifugação ulterior a 3 000 g.

## 2. Determinação espectrofotométrica

Utilizámos um espectrofotómetro Beckman DU.

Comprimento de onda — 340 m $\mu$ .

Tinas de 1 cm de trajecto da luz.

Volume final da mistura — 3,0 ml.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

1. *Amortecedor de glicina e semicarbazida* 0,2 M; pH 10,0.
2. *Suspensão de desidrogénase láctica* contendo cerca de 2 mg de proteína/ml.
3. *NAD<sup>+</sup>*
4. Mistura contendo 6,0 ml de reagente 1.; 0,4 ml do reagente 2. e 10 mg de *NAD<sup>+</sup>*.

### ESQUEMA (valores em ml)

Tubos N.º	1	2
	Ensaio	Branco
Reagente 4.	2,90	2,90
Amostra desproteïnizada	0,10	—
Água	—	0,10

- Mistura-se o conteúdo de cada tubo, por agitação.
- Colocam-se em banho-maria a 37 °C durante 60 min.
- Passa-se o conteúdo dos tubos para tinas de espectrofotómetro.
- Determina-se e extinção (E) do ensaio, contra o branco, fazendo leituras sucessivas até valor constante.

Pode ser necessário repetir as determinações com diluição das amostras desproteïnizadas.

### 3. Cálculos

$$\mu\text{moles de lactato no ensaio} = \frac{E \times 3,00}{6,22}$$

Para a expressão dos resultados em  $\mu$ moles por ml de sangue fazemos os cálculos como para o acetacetato e beta-hidroxiubutirato, tomando o valor de 80 p. 100 para a água do sangue.

### DOSEAMENTO DO PIRUVATO

Utilizámos também o método enzimático e seguimos a técnica estudada por SEGAL, BLAIR & WYNGAARDEN <sup>451</sup>.

Como vimos, o equilíbrio da reacção catalisada pela desidrogénase láctica pende para a formação do lactato. Na presença de um excesso de NADH pode considerar-se que praticamente todo o piruvato se transforma em lactato.

Os autores do processo que utilizámos encontraram, como valores de recuperação do piruvato adicionado ao sangue, 97 a 104 p. 100 do valor teórico, e os duplicados mostraram-lhes desvios, em média, de 3 p. 100 <sup>451</sup>.

### Metódica

#### 1. Desproteïnização e neutralização do desproteïnizado

##### REAGENTES NECESSÁRIOS

1. *Solução de ácido perclórico* a 6 p. 100 (peso/volume).
2. *Solução de fosfato bipotássico* 1,1 M.

A desproteïnização do sangue e a neutralização do desproteïnizado fazem-se do seguinte modo:

- Adiciona-se, num tubo de centrifugador, à solução de ácido perclórico, um volume igual de sangue.
- Mistura-se bem, com vareta de vidro fina.
- Centrifuga-se a 3 000 g.
- Juntam-se a 3,0 ml do sobrenadante 1,0 ml do reagente 2.
- Mistura-se bem e introduz-se o tubo em gelo moído, durante 10 min.
- Centrifuga-se durante 10 min a 3 000 g.
- Decanta-se.
- Aquece-se o sobrenadante decantado até 25 °C.

## 2. Determinação espectrofotométrica

Condições gerais como para o doseamento do lactato.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

1. *Amortecedor de fosfatos* 0,1 M; pH 7,4.
2. *Solução de NADH* — 1,0 mg/ml.
3. *Suspensão de desidrogénase láctica* em amortecedor de fosfatos (reagente 1) com uma concentração de 2,0 mg de proteína por ml.

ESQUEMA (valores em ml)

Tinas N.º	1	2
	Ensaio	Branco
Amortecedor de fosfatos	0,7	0,7
Solução de NADH	0,2	0,2
Amostra desproteïnizada e neutralizada	2,0	—
Água	—	2,0
Tapa-se cada uma com <i>parafilm</i> e mistura-se por inversão		
Extinção	$E_{i_1}$	$E_{i_2}$
Suspensão de desidrogénase (0,1 ml)	×	×
Extinção (leituras de 2 em 2 min até valor constante)	$E_{f_1}$	$E_{f_2}$
$\Delta E_1 = E_{i_1} - E_{f_1}$ $\Delta E_2 = E_{i_2} - E_{f_2}$		

## 3. Cálculos

Fazem-se como para o lactato, tomando para cada ensaio a diferença  $\Delta E_1 - \Delta E_2$ .

## TITULAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS NÃO ESTERIFICADOS NO PLASMA

Utilizámos o método de DOLE & MEINERTZ <sup>101</sup>, com modificações introduzidas por CAMPBELL & GREEN <sup>60</sup>, no sentido de simplificar a extracção proposta por TROUT, ESTES & FRIEDBERG <sup>517</sup>, e por SOBRINHO-SIMÕES, no nosso Laboratório, com a finalidade de facilitar a titulação final, pelo emprego de uma solução de indicador semelhante à empregada por VAN DE KAMER *et al.* <sup>526</sup>.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

#### I. Mistura de extracção

— Álcool isopropílico	40 partes (volumes)
— Heptano redestilado	10 »
— SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> , 2N	1 »

#### II. Solução alcalina de neutralização

1. Solução *stock* de potassa — solução a 50 p. 100 (peso/volume), em água.
2. Solução de trabalho, concentrada (aproximadamente 0,1 N).

Prepara-se juntando:

Solução II. 1.	0,5 ml
Álcool metílico	1,0 ml
Álcool isobutílico	q. b. para 50 ml

3. Solução de trabalho (aproximadamente 0,02 N)

Dilui-se a 1/5 a solução II. 2. com álcool isobutílico.

#### III. Solução do indicador de pH

1. Solução *stock* de azul de timol a 0,1 p. 100 em água.
2. Solução de trabalho. — Dilui-se a solução III. 1. a 1/10 com álcool etílico redestilado recentemente.

Esta solução deve ser ligeiramente ácida. Pode ser necessário ajustá-la, com ácido clorídrico diluído ou com solução de titulação, de modo a que 1 ml da solução de indicador necessite de cerca de 10 µl da solução de titulação de trabalho, para se neutralizar.

Se a solução do indicador é demasiadamente ácida, o branco será muito alto; se é alcalina, fixará anidrido carbónico e parte da acidez do extracto será neutralizada pelo bicarbonato do indicador.

#### IV. Solução padrão

1. Solução *stock*.

Prepara-se uma solução contendo 853 mg de ácido palmítico (peso molecular = 256) por litro, em heptano.

2. Solução de trabalho.

Dilui-se a solução IV. 1. a 1/10.

A concentração desta solução será  $85,3 \text{ mg/l} = 1000/3 \text{ } \mu\text{Eq/l} \approx 333 \text{ } \mu\text{Eq/l} \approx 333 \text{ m}\mu\text{Eq/ml}$ .

## Metódica

### 1. Extracção

Faz-se utilizando provetas de 25 ml, com rolha de vidro.

ESQUEMA (valores em ml)

N.º da proveta	1	2	3
	Ensaio	Padrão	Branco
Plasma	1,0	—	—
Água	—	1,0	1,0
Mistura de extracção	5,0	5,0	5,0
— Agitam-se durante 1 min			
— Deixam-se em repouso durante 5 min			
Heptano	3,0	—	3,0
Solução padrão de trabalho	—	3,0	—
Água	3,5	3,5	3,5

— Agitam-se durante 1 min.

— Deixam-se em repouso durante 3 min.

— Retiram-se 3 ml da fase superior para tubos de centrifugador de 15 ml.

— Rolham-se até se fazer a titulação.

### 2. Titulação

Juntam-se 2 ml da solução do indicador (III. 2.) ao tubo de centrifugador que contém a amostra.

Titula-se (com a solução II. 3.) utilizando uma microbureta, enquanto se faz passar através dos líquidos contidos no tubo, por meio de uma pipeta de Pasteur introduzida até à proximidade do fundo, uma corrente de azoto gasoso, depois de este borbulhar através de uma solução de soda diluída.

O borbulhar do azoto no tubo em que se faz a titulação, para além de misturar as duas fases (indicador e extracto), tem a vantagem de substituir a agitação que habitualmente se faz durante as titulações para homogeneizar a concentração do reagente que se vai adicionando até obter a viragem, neste caso para verde.

### 3. Cálculos

São feitos deduzindo o valor do branco do dos ensaios e tomando como referência o volume da solução alcalina gasta para o padrão.

## DOSEAMENTO DOS TRIGLICERÍDEOS DO FÍGADO

Utilizámos, apenas com algumas modificações, o método de BUTLER, MALING, HORNING & BRODIE <sup>57</sup>, que é uma aplicação do método descrito por VAN HANDEL & ZILVERSMIT <sup>52b</sup>.



É feita pelo clorofórmio a extracção das gorduras de um homogeneizado do tecido, em presença de *zeolite* que fixa os fosfolípidos, o colesterol e os colesterídeos. O extracto clorofórmico é, então, seco e saponificado. O glicerol é doseado utilizando o ácido cromotrópico, que forma um complexo corado com o aldeído fórmico que se obtém pela oxidação do glicerol com metaperiodato, cujo excesso é retirado pelo arsenito.

#### REAGENTES NECESSÁRIOS

1. *Amortecedor de fosfatos* M/15; pH 7,0.
2. *Zeolite activada* (\*) de 80-100 *mesh*.  
A activação faz-se por aquecimento durante 4 h, a 125 °C <sup>528</sup>.  
Mantém-se fechada em frasco de vidro.
3. *Potassa em solução alcoólica* (0,4 p. 100).  
Dissolvem-se 2 g de potassa em etanol redestilado, a 95 p. 100, e leva-se a 100 ml. Diluem-se 10 ml desta solução *stock* para 50 ml, com etanol redestilado, a 95 p. 100, no dia de utilização.
4. *Ácido sulfúrico* 0,2 N.
5. *Metaperiodato de sódio* 0,05 M.  
Dissolvem-se 1,07 g de metaperiodato de sódio em 100 ml de água.
6. *Arsenito de sódio* 2,0 M (\*\*).  
Dissolvem-se 9 g de soda e 20 g de trióxido arsénico e diluem-se para 100 ml com água.
7. *Solução de ácido cromotrópico* (ácido 4,5-di-hidroxi-2,7-naftalenedissulfónico) a 0,2 p. 100.  
Dissolvem-se 2 g de ácido cromotrópico (ou 2,24 g do seu sal sódico) em 200 ml de água.  
Separadamente adicionam-se 600 ml de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> concentrado a 300 ml de água arrefecida em gelo; quando fria, adiciona-se esta solução à solução de ácido cromotrópico. Armazena-se em garrafa castanho-escura e prepara-se de 2 em 2 ou de 3 em 3 semanas.
8. *Solução padrão de triglicerídeos* (0,05 mg/l).  
Dissolvem-se 0,5 g de azeite em clorofórmio para um volume de 100 ml, num balão graduado, rolhado com rolha de vidro. Diluem-se os padrões de trabalho a 1 p. 100 com clorofórmio. É conveniente verificar gravimetricamente a concentração da solução na altura em que se prepara e depois quando for usada, para evitar aumentos por evaporação.
9. *Clorofórmio*.  
É suficiente o *technical grade*, redestilado.  
Mantém-se em garrafa escura.

#### Metódica

1. Homogeneizam-se 2 a 10 g de tecido com 9 volumes de amortecedor de fosfatos (reagente 1), durante 90 s, num *waring blender*.

---

(\*) Utilizámos uma zeolite sintética produzida pela firma americana W. A. TAYLOR Company. BUTTLER *et al.* <sup>57</sup> não fazem referência ao tamanho do grão da zeolite. Para o plasma de Rato, CHENG & ZILVERSMIT <sup>78</sup> e VAN HANDEL <sup>527</sup> dizem ser necessário que a zeolite seja 80-100 *mesh*, o que, estranhamente, parece ser desnecessário para as outras espécies.

(\*\*) VAN HANDEL & ZILVERSMIT <sup>528</sup> propõem que esta solução seja 0,5 M, mas segundo BUTTLER *et al.* <sup>57</sup> o aumento da concentração baixa a extinção do branco não saponificado.

2. Imediatamente depois, transfere-se 1 ml do homogeneizado para uma proveta graduada, de rolha de vidro, que já contenha cerca de 4 g de zeolite activada, molhada com 2 ml de clorofórmio.
  3. Adicionam-se 18 ml de clorofórmio.
  4. Agita-se de vez em quando, num período de 4 h, ou deixa-se, de preferência, uma noite em repouso.
  5. Filtra-se por papel de filtro grosseiro desengordurado.
  6. Pipeta-se uma alíquota do filtrado, contendo cerca de 0,05 mg de triglicérides (geralmente de 0,125 a 1,000 ml), para cada um de três tubos de rolha de vidro, nos quais sucessivamente se executam as operações indicadas no esquema seguinte, em que são referidos também os tubos correspondentes ao padrão.
- Para cada ensaio e para o padrão fazem-se determinações em duplicado e um branco.

ESQUEMA

N.º dos tubos (de rolha de vidro e de 15 × 130 mm)	Volumes adicionados (ml)	Ensaio			Padrão		
		1	2	3	4	5	6
Padrão (8)	1,0	—	—	—	×	×	×
Extracto clorofórmico dos ensaios	(0,125-1,000)	×	×	×	—	—	—
Secam-se por evaporação a cerca de 80 °C.							
Solução alcoólica de potassa (3)	0,5	—	×	×	—	×	×
Álcool a 90 p. 100	0,5	×	—	—	×	—	—
Colocam-se em banho-maria a 60-70 °C durante 20 min, até o cheiro do álcool desaparecer.							
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> , 0,2 N (4)	0,5	×	×	×	×	×	×
Colocam-se em banho-maria fervente, brando, durante 15 min. Deixam-se arrefecer.							
Metaperiodato (5)	0,1	×	×	×	×	×	×
Deixam-se em repouso durante 10 min depois de misturar.							
Arsenito de sódio (6)	0,1	×	×	×	×	×	×
Deixam-se em repouso durante 10 min depois de misturar (até desaparecer a cor amarela do iodo).							
Reagente de ácido cromotrópico (7)	5,0	×	×	×	×	×	×
<ul style="list-style-type: none"> <li>— Mistura-se.</li> <li>— Colocam-se os tubos rolhados em banho-maria fervente durante 30 min, na ausência de luz excessiva.</li> <li>— Deixam-se arrefecer.</li> </ul> <p>(A cor mantém-se estável durante várias horas.)</p>							
Extinção a 570 mμ		E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>

## Cálculos

Calculámos o valor dos triglicerídeos por ensaio e depois por grama de tecido, tendo em conta a diluição sofrida com a homogeneização e com a extracção clorofórmica.

Para o ensaio teremos o seguinte factor:

$$R = \frac{\frac{E_2 + E_3}{2} - E_1}{\frac{E_5 + E_6}{2} - E_4}$$

Sendo A o volume da alíquota do extracto clorofórmico, em ml, teremos:

$$\text{Triglicerídeos (mg/g de tecido)} = \frac{200}{A} \times R \times 0,05 = 10 \frac{R}{A}$$

## DOSEAMENTO DO AZOTO

O doseamento do azoto fez-se por nesslerização <sup>297</sup>, depois de transformado em sulfato de amónio, durante a oxidação da matéria orgânica, feita pelo ácido sulfúrico e dióxido de selénio, em tubo de ensaio e à chama, até início da evaporação do ácido sulfúrico, e depois, também, pela adição de peróxido de hidrogénio. O processo seguido é essencialmente o mesmo para todos os produtos a analisar (fígado, urina, fezes, dieta); as diferenças dizem respeito apenas ao tratamento que precede a incineração e às diluições feitas para obter uma amostra com quantidade de azoto adequada ao ensaio colorimétrico.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

1. *Mistura oxidante* — ácido sulfúrico a 50 p. 100 (volume/volume) com dióxido de selénio a 1 p. 100 (peso/volume).
2. *Água oxigenada* a 100 volumes.
3. *Reagente de Nessler*. Foi preparado segundo KING <sup>299</sup>:  
Dissolvem-se inicialmente 15 g de iodeto de potássio em 10 ml de água e depois, nessa solução, 11,25 g de iodo cristalino. Juntam-se então 15 g de mercúrio e a mistura, arrefecida em água, agita-se até o sobrenadante perder a cor amarela. Decanta-se o líquido para um balão de 100 ml e verifica-se, com uma gota, se se obtém a cor azul com um cozimento de amido a 1 p. 100. Se assim não acontecer, junta-se mais solução iódica, preparada como se disse, até que o resultado seja positivo. A totalidade da solução é diluída para o volume de 100 ml e junta-se sobre 485 ml de solução de hidróxido de sódio a 10 p. 100.  
Se esta solução final ficar turva, deixa-se sedimentar antes de ser usada.
4. *Solução padrão* — solução de sulfato de amónio com 10 µg de azoto por ml.

### DOSEAMENTO NO FÍGADO

Fragmentos de fígado de peso conhecido (cerca de 500 mg) são mergulhados em 2 ml de mistura oxidante até solubilização, em tubo rolhado. A solução é levada a 50 ml com água tridestilada. Retira-se um alíquota (1 ml) a que se adiciona um volume igual da mesma mistura oxidante; depois de aquecimento prolongado, junta-se água oxigenada, gota a gota, retirando de cada vez o tubo da chama um pouco antes da junção das gotas.

Depois da incineração, a solução é levada a 10 ml com água tridestilada.

O ensaio colorimétrico é feito com 1 ml desta solução, 7 ml de água tridestilada e 2 ml de reagente de Nessler. Os ensaios do padrão são feitos com 1 ml da solução padrão, 7 ml de água tridestilada e 2 ml de reagente de Nessler.

Os cálculos são feitos tendo em conta o peso do fragmento e as diluições.

#### DOSEAMENTO NA URINA

O volume da urina de um dia é levado a um volume conhecido (por exemplo 10 ml). É feita então uma segunda diluição, por exemplo de 1/50; 1 ml desta diluição é incinerado, como foi referido anteriormente para o fígado, levado a 20 ml, e o azoto é doseado e os cálculos feitos como já foi descrito.

#### DOSEAMENTO NAS FEZES

À totalidade das fezes de um dia ou de alguns dias é adicionado um volume de mistura oxidante (10 ml, por exemplo) num balão com rolha esmerilada, que é colocado, pelo menos durante uma noite, a 37 °C. A suspensão que se obtém é levada a 50 ml, com água tridestilada. Faz-se a incineração de 2 ml da suspensão que é homogeneizada por agitação imediatamente antes de retirar essa amostra.

A solução obtida é então levada a 50 ml com água tridestilada e o doseamento feito com uma alíquota desta última solução ou, se necessário, de uma sua diluição.

#### DOSEAMENTO DA UREIA E DA AMÓNIA

##### DOSEAMENTO DA UREIA NO SANGUE

Para o doseamento da ureia no sangue utilizámos o método enzimático descrito por BERNT & BERGMAYER <sup>32</sup>, cujos passos fundamentais são a transformação da ureia em anidrido carbónico e amónia, por acção da urêiase, e a nesslerização para determinar a amónia formada.

##### DOSEAMENTO DA UREIA NA URINA

Para o doseamento da ureia na urina, dado que com o método anterior muitas vezes se obtém turvação no ensaio colorimétrico final, que impossibilita o rigor do doseamento, e dadas as grandes quantidades de ureia presentes, utilizámos o método da diacetilmonoxima tal como COULOMBE & FAVREAU o descreveu em 1963 <sup>32</sup>, apenas com uma modificação que, sendo teoricamente de grande significado, na prática se nos mostrou não ter grande importância. Como VARLEY <sup>532</sup> recomenda, fizemos a duplicação dos ensaios, de modo que o branco seja tratado pela urêiase; é o valor da extinção deste, subtraído do valor da do branco da própria urêiase (de modo habitual praticamente igual a zero), que é descontado no valor do ensaio.

Para isso, a urina de 24 h é levada a um volume conhecido, por exemplo 10 ml, e a partir dessa é feita outra diluição, por exemplo a 1/25. Então o processo diversifica-se: faz-se nova diluição a 1/2, de que é retirado 0,1 ml para ensaio pelo método da diacetilmonoxima; por outro lado, é retirado 1 ml para um tubo de centrifugador a que se juntam 0,1 ml da suspensão de urêiase utilizada no método anterior e 0,9 ml de água. Depois de misturar, deixa-se em incubação durante 15 min à temperatura ambiente, centrifuga-se e retiram-se 0,1 ml para o ensaio colorimétrico. O branco da urêiase é determinado empregando água tridestilada em vez da urina.

## DOSEAMENTO DA UREIA E DA AMÔNIA NOS MEIOS DE INCUBAÇÃO E DE PERFUSÃO

Verificámos, aquando da montagem dos métodos de análise, que se o meio de incubação ou de perfusão for tratado pelo método de BERT & BERGMAYER <sup>32</sup> se observa, sistematicamente, a turvação no ensaio colorimétrico final. Por isso, e dadas aqui as pequeníssimas quantidades de ureia presentes, fizemos o doseamento pela quantificação da amónia extraída do meio por microdifusão depois de concluída a reacção enzimática, utilizando o método desenvolvido por SOBRINHO-SIMÕES para a microdeterminação da ureia, que já foi utilizado por C. S. TORRES em 1960 <sup>515</sup>. O branco do ensaio mede, como é óbvio, a quantidade de amónia presente, desde que tenhamos o cuidado de fazer a colheita rapidamente e de tapar as unidades de microdifusão imediatamente, para evitar as perdas.

Quando ao meio de perfusão adicionámos o cloreto de amónio, no sentido de estudar os seus efeitos metabólicos, o doseamento foi feito após diluição apropriada (1/10). Estudámos o método neste sentido e mostrou-se-nos conveniente.

### REAGENTES NECESSÁRIOS

1. *Suspensão de urêiase* — 250 mg de urêiase em 5,0 ml de uma mistura de volumes iguais de glicerol e água tridestilada.
2. *Solução saturada de carbonato de potássio*.
3. *Solução padrão de ureia* — 400 mg por litro, em água.
4. *Solução padrão de sulfato de amónio* — 161 mg por litro, em água.
5.  $SO_4H_2$ , 1N.
6. *Glicerol neutro*.
7. *Reagente de Nessler*, diluído a 1/10 com água tridestilada.

### Metódica

#### 1. Reacção enzimática e microdifusão

No frasco de Warburg modificado por SOBRINHO-SIMÕES (Fig. 8) colocámos:

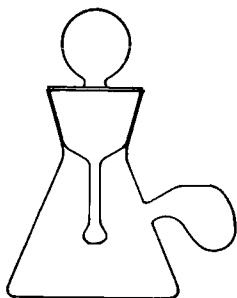


Fig. 8 — Frasco de Warburg, modificado por SOBRINHO-SIMÕES.

— no ramo lateral — 0,5 ml da solução saturada de carbonato de potássio;

— no compartimento principal — 1,0 ml da amostra e, sem misturar inicialmente com a primeira, 0,1 ml da suspensão de urêiase.

A vareta apensa à rolha do frasco, que é despolida, é então mergulhada, até meio, num pequeno copo contendo  $SO_4H_2$ , 1 N e, seguidamente, sacudida fortemente para ficar apenas com uma camada líquida aderente.

A superfície esmerilhada da rolha do frasco é lubrificada com uma quantidade mínima de glicerol neutro e o frasco devidamente rolhado. Então, mantendo o fundo desta unidade apoiado na superfície horizontal da mesa de trabalho, fazemos a sua agitação suavemente, de modo a misturar, agora, a amostra com a suspensão de urêiase. Deixamos depois em repouso durante 15 min, à temperatura ambiente (incubação). Segue-se a passagem da solução de carbonato do ramo lateral para o compartimento principal e a difusão da amónia, para o que colocamos os frascos durante 45 min numa estufa a 50 °C.

## 2. Determinação colorimétrica

Para as tinas do espectrofotômetro Beckman DU, pipetam-se 3,3 ml de reagente de Nessler diluído, em que se imerge depois a vareta apenas à rolha do frasco, mexendo, para que o sulfato de amônio que a impregna passe para o líquido e reaja. As tinas são em seguida tapadas e o conteúdo uniformizado por sucessivas inversões.

Determina-se a extinção a 436 m $\mu$  dentro de um período inferior a 5 min.

Com cada série de ensaios, que são sempre feitos em duplicado, fazem-se também brancos igualmente em duplicado, em que se não junta suspensão de uréia mas água tridestilada; brancos em que a amostra é substituída por água tridestilada; padrões em que são utilizados 20  $\mu$ l da solução padrão de ureia referida; e padrões em que são utilizados 0,1 ml de solução padrão de sulfato de amônio. Os volumes são sempre completados com água para o mesmo volume final.

Os cálculos fazem-se tendo em conta o volume da amostra, as diluições sofridas e a extinção dos padrões.

## DETERMINAÇÃO DA ÁGUA NO FÍGADO

Foi feita colocando numa estufa a 95-100 °C um fragmento de fígado de peso determinado, num copo já previamente tareado, por período de 24 h; o arrefecimento foi feito num exsiccador contendo gel de sílica. Repetimos as operações até obtermos peso constante.

Como salienta SOBRINHO-SIMÕES, que refere outros métodos mais rigorosos, este processo não é isento de erros, mas «trabalhando com tecidos não exangues, a própria variabilidade da quantidade de sangue não justifica o emprego de métodos mais precisos»<sup>475</sup>.

## 3. PROVENIÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NA EXPERIMENTAÇÃO E NOS REAGENTES

Nas experiências *in vivo* utilizámos:

- *Triamcinolona*, na forma de diacetato, fornecida pela *American Cyanamid Company, Wayne, New Jersey, U. S. A.*, por intermédio da *Sociedade Farmacêutica Abecassis, S. A. R. L., Lisboa*; utilizámos o produto comercializado com o nome de *Aristocort* que contém, em suspensão, 40 mg de diacetato de *triamcinolona* por ml;
- *Metformina*, na forma de cloreto, fornecida pelos *Laboratoires Aron, Paris*, por intermédio dos *Laboratórios Químico-Biológicos Delta, Massamá, Queluz*;
- *Floridzina* e cloreto de amônio, R. G., *B. D. H. (British Drug House)*;
- *Ornitina-L*, R. G., *Sigma (Sigma Chemical Company, St., Louis, Mo., U. S. A.)*

Nas experiências *in vitro* utilizámos:

- *Butirato de sódio*, R. G., *cloreto de amônio*, R. G., e *bicarbonato de amônio*, R. G., *B. D. H.*;
- *Glicagina (Glucagon)* cristalizada, *frutose*, R. G., *leucina-L*, R. G., e *ornitina-L*, R. G., *Sigma*;

— Insulina bovina cristalizada fornecida por *Novo Industri A/S, Copenhagen*, por intermédio de *J. A. Baptista d'Almeida, Lda., Lisboa*, e por *Farwerke Hoechst A. G.*, através de *Hoechst Portuguesa, S. A. R. L., Lisboa*;

— Piruvato, *R. G., Merck*.

Nas colheitas de sangue e na preparação do fígado isolado utilizámos:

— Heparina, comercializada por *Evans Medical, Ltd*, com o nome de *Pularin*.

Nos doseamentos enzimáticos utilizámos:

— Desidrogénase do beta-hidroxibutirato [D(-)] e NAD<sup>+</sup> da *C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, Germany*.

— Urêiase, *B. D. H.*

— Glicose-oxidase, peroxidase, desidrogénase láctica, cloreto de ortodiansidina e NADH, *Sigma*.

Todos os outros reagentes necessários nos processos de doseamento que utilizámos foram *B. D. H., Merck* ou *Sigma* e de pureza *R. G.*

#### 4. ESTUDO ESTATÍSTICO

Para o apuramento da informação que, conforme os casos, julgámos conveniente obter, fizemos, com os resultados obtidos nas nossas experiências, as operações que passamos a referir.

— Determinação de médias aritméticas.

— Determinação do desvio padrão da média (Standard Error of the Mean — S. E. M.)<sup>132</sup>.

— Determinação de *path coefficients*<sup>299</sup>.

— Recuperação de valores teóricos pelo método de Yates<sup>132</sup>.

— Cálculo da significância estatística da diferença de médias, pelo método do *t* de Student<sup>132</sup>.

— Análise de variância<sup>132</sup>.

— Cálculo, pelo método dos quadrados mínimos, de curvas de segundo grau cujos integrais definidos em determinado período sejam iguais aos valores médios correspondentes aos mesmos períodos; e estudo subsequente destas curvas: normalização das curvas, evidenciação de efeitos e cálculo desses efeitos na forma de percentagens.

## C. ESTUDOS *IN VIVO*

### ESQUEMAS EXPERIMENTAIS E APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

#### 1. CETOSE DO JEJUM

##### a) PRIMEIRA SÉRIE

As nossas primeiras observações foram feitas em ratos criados no nosso Laboratório e alimentados *ad libitum*, até ao momento de iniciarem o período experimental de jejum, sempre com a dieta comercial de proveniência espanhola.

Os pesos iniciais dos ratos variaram entre 204 e 387 g.

A sua distribuição foi feita de modo a obtermos, nos diferentes *Grupos*, pesos médios aproximados.

Foram sacrificados 6 *Grupos* de animais: um de ratos alimentados até ao momento do sacrifício e os outros com 1, 2, 3, 4 e 5 dias de jejum, apenas com água *ad libitum*.

Todos estes *Grupos* foram constituídos por 4 ratos, com excepção do último que foi constituído por 3.

Estas observações foram feitas nos últimos dias de Abril de 1968.

No sangue destes animais foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxibutirato e a glicose. Os resultados obtidos são apresentados no *Quadro V* e, juntamente com outros, nas Figs. 9, 10, 11 e 12.

As perdas de peso observadas nos diversos dias de jejum figuram no *Quadro VI*.

O número de observações de cada parâmetro em cada *Grupo* está indicado tanto nos *Quadros* desta *Série* como nos das outras, dado que algumas vezes não foi possível obter resultados, ou por ser escasso o volume do sangue obtido ou por acidente ocorrido durante os processos de doseamento.

#### COMENTÁRIO

Verifica-se que os valores médios da concentração dos corpos cetónicos sanguíneos dos animais em jejum são sempre superiores aos dos animais alimentados. O valor médio mais alto é atingido no primeiro dia de jejum; depois, os valores médios decrescem até ao 4.º dia, para voltar a subir ao 5.º dia.



## QUADRO V

## CETOSE DO JEJUM

1.<sup>a</sup> Série

As concentrações do acetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose são expressas em  $\mu\text{moles/ml}$  e o peso em gramas. Os valores apresentados indicam as médias dos resultados individuais de cada Grupo ( $\pm$  S. E. M.). Cada Grupo é constituído por 4 animais, excepto quando indicado entre parêntesis.

Dias de jejum	SANGUE						PESO	
	Acetato	$\beta$ -hidroxibutirato	Acetato + $\beta$ -hidroxibutirato	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetato}}$	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetato} + \beta\text{-hidroxibutirato}} \times 100$	Glicose	Inicial	Final
Alimentados . . .	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,5$	$60,0 \pm 6,4$	$6,35 \pm 0,09$	$244 \pm 15$	—
1	$0,30 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,07$	$1,15 \pm 0,09$	$3,1 \pm 0,6$	$74,2 \pm 3,7$	$5,28 \pm 0,25$	$262 \pm 30$	$230 \pm 28$
2	$0,22 \pm 0,09$	$0,84 \pm 0,33$	$1,06 \pm 0,42$	$3,8 \pm 0,7$	$77,9 \pm 3,5$	$6,17 \pm 0,47$	$265 \pm 18$	$227 \pm 16$
3	$0,19 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,22$	$0,82 \pm 0,23$	$3,2 \pm 1,0$	$73,2 \pm 5,3$	$5,68 \pm 0,40$	$255 \pm 32$	$209 \pm 37$
4	$0,13 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,11$	$0,43 \pm 0,13$	$2,2 \pm 0,4$	$67,1 \pm 3,7$	$4,00 \pm 0,53$	$237 \pm 13$	$170 \pm 13$
5	$0,18 \pm 0,06$ (3)	$0,57 \pm 0,16$ (3)	$0,75 \pm 0,21$ (3)	$3,4 \pm 0,7$ (3)	$75,6 \pm 4,0$ (3)	$4,63 \pm 0,30$ (3)	$310 \pm 40$ (3)	$230 \pm 34$ (3)

QUADRO VI  
CETOSE DO JEJUM  
1.<sup>a</sup> Série

Variações do peso dos animais. Os pesos são expressos em gramas e os valores apresentados indicam as médias dos resultados individuais de cada conjunto ( $\pm$  S. E. M.). Entre parêntesis figura o número de animais que constitui em cada dia de jejum o respectivo conjunto.

DIAS DE OBSERVAÇÃO						DIAS DE JEJUM	PERDAS DE PESO	
1. <sup>o</sup>	2. <sup>o</sup>	3. <sup>o</sup>	4. <sup>o</sup>	5. <sup>o</sup>	6. <sup>o</sup>		Valores absolutos	p. 100
$263 \pm 12$	$237 \pm 11$					1. <sup>o</sup>	$26 \pm 1$	9,9
(19)						2. <sup>o</sup>	$14 \pm 1$	5,9
	$239 \pm 13$	$225 \pm 13$				3. <sup>o</sup>	$12 \pm 1$	5,3
	(15)					4. <sup>o</sup>	$14 \pm 1$	6,5
		$225 \pm 17$	$213 \pm 17$			5. <sup>o</sup>	$13 \pm 1$	5,4
		(11)						
			$215 \pm 22$	$201 \pm 21$				
			(7)					
				$243 \pm 35$	$230 \pm 34$			
				(3)				

As variações da concentração dos dois corpos cetónicos são quase paralelas durante todo o período experimental, excepto no que respeita ao primeiro e segundo dias de jejum, em que há maior variação da concentração do acetacetato.

A relação média beta-hidroxibutirato/acetacetato aumenta até ao 2.<sup>o</sup> dia de jejum, para baixar depois até ao 4.<sup>o</sup> dia e atingir no 5.<sup>o</sup> dia um valor semelhante ao do 3.<sup>o</sup>.

A percentagem do beta-hidroxibutirato relativamente ao valor da soma dos dois corpos cetónicos sofre variações semelhantes.

Quanto à glicemia, observámos que há variações e que os valores médios oscilam com sentido inverso do dos valores médios dos corpos cetónicos no 1.<sup>o</sup> e 2.<sup>o</sup> dia de jejum para, a partir de então, apresentarem o mesmo sentido de variação.

A perda de peso é maior durante o primeiro dia de jejum, o que está certamente influenciado pelo facto de a pesagem inicial incluir o valor da alimentação contida no tubo digestivo. Não nos é possível anular esta causa de variação, recorrendo a um tipo de pesagem especial, sem perturbar o fenómeno em estudo.

Os valores obtidos no doseamento dos dois corpos cetónicos nesta nossa primeira Série experimental, embora sejam da mesma ordem, diferem dos encontrados com os mesmos métodos por BERRY, WILLIAMSON & WILSON <sup>33</sup>, em 1965, que para comparação apresentamos no Quadro VII.

QUADRO VII

Resultados referidos por BERRY, WILLIAMSON & WILSON <sup>23</sup>.

CETOSE DO JEJUM

As concentrações do acetacetato e do beta-hidroxibutirato são expressas em  $\mu$ moles/ml de sangue e os valores apresentados indicam as médias dos resultados individuais de cada *Grupo* ( $\pm$  S. D.).

Condições experimentais	Dias de jejum	N.º de animais	Acetacetato	$\beta$ -hidroxibutirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxibutirato	$\beta$ -hidroxibutirato / Acetacetato
Alimentados com dieta equilibrada	—	13	0,20 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,2
Em jejum	{ 1	7	0,80 $\pm$ 0,13	2,10 $\pm$ 0,40	2,90 $\pm$ 0,52	2,6 $\pm$ 0,6
	{ 2	17	0,74 $\pm$ 0,18	1,89 $\pm$ 0,37	2,63 $\pm$ 0,50	2,6 $\pm$ 0,5

Estes autores estudaram apenas três grupos experimentais com 13, 7 e 17 ratos respectivamente, a que correspondem os três primeiros *Grupos* desta nossa *Série*. Os valores que obtivemos são aproximadamente metade dos referidos por aqueles, com excepção dos do acetacetato para o primeiro *Grupo*, em que os nossos valores são aproximadamente 1/5 dos seus, e dos do beta-hidroxibutirato, também para os animais alimentados, que são praticamente os mesmos.

Relativamente ao primeiro *Grupo*, o aspecto mais saliente é o da possível duração do próprio jejum, pois, tratando-se de animais não condicionados nem tratados nem observados de perto, não temos possibilidade de saber se eles deixaram de comer imediatamente antes ou se já deixaram de comer há algumas horas. A influência deste factor pode ainda ser alterada por outros: o tempo de permanência dos alimentos na parte superior do tubo digestivo e a velocidade de absorção, por exemplo.

Os valores da percentagem do beta-hidroxibutirato, relativamente à soma dos dois corpos cetónicos doseados, são semelhantes aos referidos para o Homem por GAMMELTOFT <sup>149</sup>.

Os valores da glicemia sugeriram, numa primeira fase do jejum (até ao segundo dia de jejum), uma correlação inversa entre estes e os da cetonemia, mas, a partir de então, as variações das duas grandezas têm o mesmo sentido.

Quando tomámos em conjunto as duas grandezas de todos os animais da *Série*, não foi encontrada qualquer correlação definida entre a glicemia e a concentração dos dois corpos cetónicos.

Neste aspecto, as nossas observações só em parte são concordantes com as de AMATRUDA & ENGEL <sup>2</sup>, em que é apontada uma correlação inversa entre as duas grandezas, facto de que estes autores tiram ilações quanto ao significado dos fenómenos da cetogénese e da gliconeogénese

que muito nos interessava abordar. A diversidade dos resultados poderia ser explicada pela diversidade dos métodos. Especialmente no que respeita à glicose, determinada nos estudos daqueles autores pela propriedade redutora dos sais de cobre (método de Nelson & Somogyi), a diversidade poderia ter interesse, dado verificar-se na fase de jejum mais prolongado e ser então possível a interferência de outras substâncias redutoras que não a glicose.

Os resultados que obtivemos tornaram desejável a introdução de algumas variantes no mesmo esquema experimental.

#### b) SEGUNDA SÉRIE

Utilizámos ratos da mesma colónia dos anteriores, alimentados *ad libitum* até ao momento do início do jejum experimental com uma dieta semi-sintética cuja composição já referimos.

Os pesos iniciais dos ratos variaram entre 184 e 313 g.

A experiência foi realizada durante os meses de Dezembro de 1968 e Janeiro de 1969.

O primeiro Grupo (13 ratos) foi constituído por animais a comer *ad libitum* até ao momento do sacrifício; os outros foram sacrificados ao fim de períodos variáveis de jejum: um (12 ratos), dois (8 ratos), três (4 ratos), quatro (7 ratos), cinco (9 ratos) e seis (3 ratos) dias de jejum, com água *ad libitum*.

No sangue foram feitos doseamentos do acetacetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro VIII e, juntamente com outros, nas Figs. 9, 10, 11 e 12.

#### COMENTÁRIO

Os valores são da mesma ordem de grandeza dos da primeira Série e, embora as linhas das médias de valores sejam ligeiramente diferentes, os conjuntos de resultados das duas Séries não são significativamente diferentes.

A possibilidade de existência de uma correlação entre os valores médios da glicemia e da soma dos dois corpos cetónicos doseados é sugerida até ao 4.º dia de jejum. Nesta Série, verificámos que no 3.º dia as variações médias das duas grandezas têm também sentido inverso; a partir, porém, do 4.º dia as duas grandezas têm o mesmo sentido de variação.

Quando tomámos, em conjunto, os valores dos dois parâmetros em todos os animais desta Série, não foi verificada qualquer correlação definida.

## QUADRO VIII

## CETOSE DO JEJUM

2.<sup>a</sup> Série

As concentrações do acetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose são expressas em  $\mu$ moles/ml de sangue e o peso em gramas. Os valores apresentados indicam as médias dos resultados individuais de cada Grupo ( $\pm$  S. E. M.). O número de animais de cada Grupo está indicado entre parêntesis.

Dias de jejum	Acetato	$\beta$ -hidroxibutirato	Acetato + $\beta$ -hidroxibutirato	$\beta$ -hidroxibutirato / Acetato	$\beta$ -hidroxibutirato / $\beta$ -hidroxibutirato + Acetato $\times 100$	Glicose	Peso	
							Inicial	Final
Alimentados . . .	$0,10 \pm 0,01$ (13)	$0,29 \pm 0,06$ (9)	$0,39 \pm 0,05$ (9)	$3,8 \pm 0,8$ (9)	$75,3 \pm 4,7$ (9)	$5,77 \pm 0,29$ (13)	$276 \pm 10$ (13)	—
1	$0,33 \pm 0,04$ (12)	$1,17 \pm 0,09$ (12)	$1,50 \pm 0,11$ (12)	$4,1 \pm 0,5$ (12)	$78,3 \pm 1,9$ (12)	$4,88 \pm 0,22$ (12)	$272 \pm 8$ (12)	$263 \pm 8$ (12)
2	$0,20 \pm 0,03$ (8)	$0,72 \pm 0,10$ (8)	$0,92 \pm 0,12$ (8)	$3,8 \pm 0,2$ (8)	$78,2 \pm 1,6$ (8)	$5,28 \pm 0,17$ (8)	$258 \pm 6$ (8)	$236 \pm 6$ (8)
3	$0,40 \pm 0,02$ (4)	$0,78 \pm 0,13$ (4)	$1,18 \pm 0,13$ (4)	$2,0 \pm 0,4$ (4)	$65,2 \pm 4,7$ (4)	$4,72 \pm 0,28$ (4)	$205 \pm 7$ (4)	$173 \pm 7$ (4)
4	$0,19 \pm 0,05$ (7)	$0,69 \pm 0,14$ (7)	$0,88 \pm 0,18$ (7)	$4,0 \pm 0,6$ (7)	$78,1 \pm 3,0$ (7)	$5,81 \pm 0,44$ (7)	$269 \pm 7$ (7)	$222 \pm 7$ (7)
5	$0,23 \pm 0,03$ (9)	$0,54 \pm 0,10$ (9)	$0,77 \pm 0,12$ (9)	$2,5 \pm 0,4$ (9)	$68,3 \pm 3,3$ (9)	$5,44 \pm 0,17$ (9)	$252 \pm 15$ (9)	$199 \pm 13$ (9)
6	$0,09 \pm 0,02$ (3)	$0,37 \pm 0,03$ (3)	$0,46 \pm 0,05$ (3)	$4,4 \pm 0,9$ (3)	$80,6 \pm 2,7$ (3)	$5,20 \pm 0,35$ (3)	$298 \pm 12$ (3)	$230 \pm 12$ (3)
Em jejum								

Em resumo, podemos dizer que as variações introduzidas parecem não influenciar significativamente os resultados relativamente à *Série* anterior.

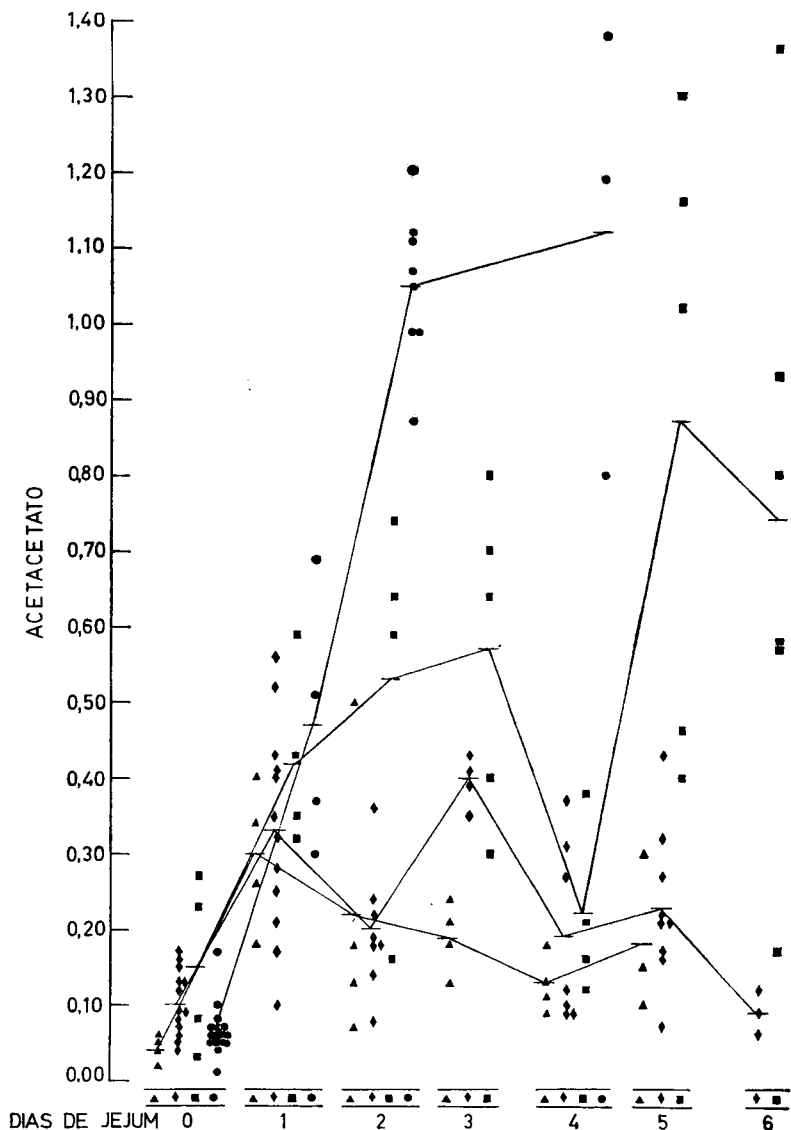


Fig. 9 — Estudos do jejum. Acetato, em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue. Representação de todos os valores individuais, das médias e dos perfis das médias:  $\blacktriangle$  — 1.ª Série;  $\blacklozenge$  — 2.ª Série;  $\bullet$  — 3.ª Série;  $\blacksquare$  — 4.ª Série.

c) TERCEIRA SÉRIE

Nesta terceira *Série* de experiências utilizámos ratos de outra proveniência (Biotério do Centro de Biologia da Fundação C. Gulbenkian), alimentados com a dieta semi-sintética já referida. A conveniência do estudo desta *Série* propôs-se-nos ao sermos surpreendidos pelos altos valores de cetonemia encontrados quando utilizámos animais da mesma proveniência no desenvolvimento de esquemas experimentais que serão referidos adiante.

Estas experiências foram realizadas em Junho e Julho de 1969.

Os pesos iniciais dos ratos variaram entre 144 e 204 g.

Os ratos do primeiro *Grupo* (20 ratos) tiveram alimentação *ad libitum* até ao momento do sacrifício. Os do segundo (4 ratos), do terceiro (8 ratos) e do quarto (3 ratos) *Grupos* foram sacrificados com um, dois e quatro dias de jejum, respectivamente.

O número de parâmetros explorados nesta experiência foi aumentado. Doseámos no sangue o acetacetato, o beta-hidroxibutirato e a glicose; foram ainda titulados os ácidos gordos não esterificados do plasma. O fígado foi pesado e nele foram determinados o glicogénio, o azoto e a água.

QUADRO IX  
CETOSE DO JEJUM  
3.<sup>a</sup> *Série*

As concentrações do acetacetato, do beta-hidroxibutirato e do azoto são expressos em percentagem do peso do fígado húmido em gramas. Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados indicados entre parêntesis.

Dias de jejum	SANGUE						
	Acetacetato	$\beta$ -hidroxibutirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxibutirato	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetacetato}}$	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetacetato} + \beta\text{-hidroxibutirato}} \times 100$	Glicose	
Alimentados . . .	0,07 $\pm$ 0,01 (16)	0,16 $\pm$ 0,07 (16)	0,23 $\pm$ 0,07 (16)	2,0 $\pm$ 0,4 (16)	56,7 $\pm$ 4,8 (16)	5,81 $\pm$ 0,1 (16)	
Em jejum	1	0,47 $\pm$ 0,09 (4)	2,14 $\pm$ 0,47 (4)	2,61 $\pm$ 0,55 (4)	4,6 $\pm$ 0,4 (4)	81,7 $\pm$ 1,3 (4)	4,38 $\pm$ 0,1 (4)
	2	1,05 $\pm$ 0,04 (8)	5,08 $\pm$ 0,48 (8)	6,13 $\pm$ 0,50 (8)	4,8 $\pm$ 1,1 (8)	82,1 $\pm$ 1,4 (8)	3,73 $\pm$ 0,0 (8)
	4	1,12 $\pm$ 0,17 (3)	5,62 $\pm$ 0,65 (3)	6,74 $\pm$ 0,82 (3)	5,1 $\pm$ 0,3 (3)	83,5 $\pm$ 0,7 (3)	3,88 $\pm$ 0,0 (3)

Os resultados obtidos são apresentados no *Quadro IX* e, em conjunto com outros, nas Figs. 9, 10, 11, 12 e 13.

#### COMENTÁRIO

Verifica-se que nesta *Série* os valores médios encontrados com o jejum para os corpos cetônicos sanguíneos são maiores que os das *Séries* anteriores.

Tomando as duas *Séries* anteriores como um conjunto apenas, verificamos que a diferença das médias da soma dos dois corpos cetônicos no segundo dia desse conjunto e desta *Série* é altamente significativa ( $t = 11,614$ ;  $P = \text{infinitesimal}$ ).

A relação beta-hidroxibutirato/acetacetato e a percentagem do beta-hidroxibutirato relativamente à soma dos dois corpos cetônicos sobem até ao 4.º dia de jejum.

Os abaixamentos glicémicos médios com o jejum são também maiores.

A possibilidade da existência de uma correlação inversa entre a soma dos dois corpos cetônicos e a glicemia é sugerida até ao segundo dia de jejum, mas deixa de ser aparente no 4.º dia.

glicose são expressas em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue; a dos ácidos gordos em  $\text{m}\mu\text{Eq/ml}$  de plasma. glicogénio é expresso em  $\mu\text{moles}$  de glicose do glicogénio/g de fígado húmido. Os pesos são expressos individuais obtidos em cada *Grupo* ( $\pm$  S. E. M.). O número de animais de cada *Grupo* está

PLASMA		FÍGADO				
Ácidos gordos	Peso final	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Água	Azoto	Glicogénio
$36 \pm 90$ (15)	$173 \pm 4$ (20)	$6,380 \pm 0,295$ (16)	$3,7 \pm 0,1$ (16)	$68,2 \pm 0,22$ (16)	$2,78 \pm 0,15$ (16)	$264 \pm 32$ (15)
$83 \pm 35$ (4)	$137 \pm 2$ (4)	$3,865 \pm 0,090$ (4)	$2,8 \pm 0,1$ (4)	$68,8 \pm 0,06$ (4)	$3,23 \pm 0,19$ (4)	$14 \pm 3$ (4)
$72 \pm 135$ (7)	$156 \pm 3$ (8)	$4,198 \pm 0,091$ (8)	$2,7 \pm 0,0$ (8)	$67,7 \pm 0,33$ (8)	$2,96 \pm 0,20$ (8)	$21 \pm 10$ (8)
$16 \pm 181$ (3)	$132 \pm 4$ (3)	$3,825 \pm 0,161$ (3)	$2,9 \pm 0,1$ (3)	$68,2 \pm 0,27$ (3)	$2,88 \pm 0,20$ (3)	$6 \pm 2$ (3)



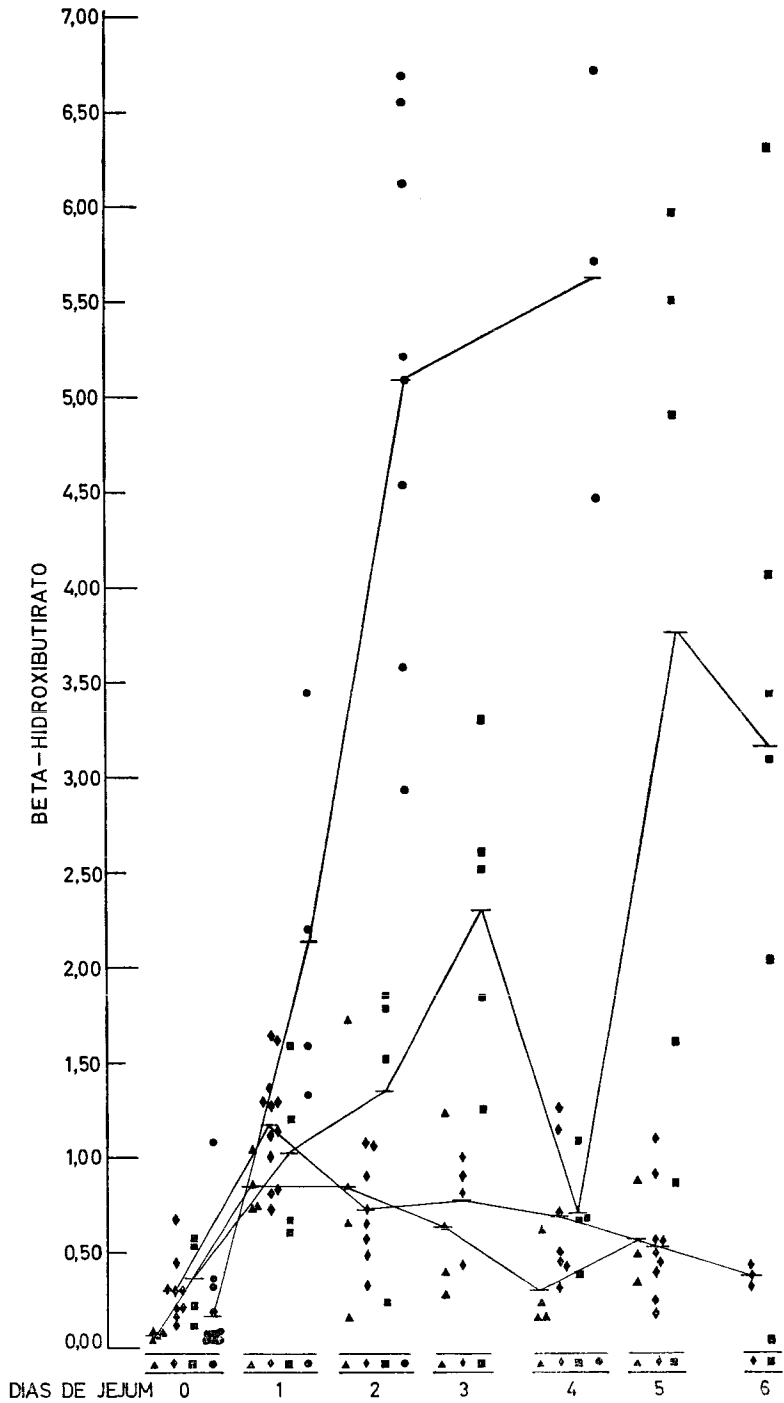
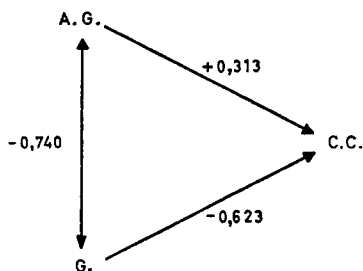


Fig. 10 — Estudos do jejum. *Beta-hidroxibutirato*, em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue. Representação de todos os valores individuais, das médias e dos perfis das médias:  $\blacktriangle$  — 1.<sup>a</sup> Série;  $\blacklozenge$  — 2.<sup>a</sup> Série;  $\bullet$  — 3.<sup>a</sup> Série;  $\blacksquare$  — 4.<sup>a</sup> Série.

Os valores dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados sofrem com o prolongamento do jejum variações médias que no primeiro e segundo dias têm o mesmo sentido de variação que as variações médias dos corpos cetónicos, mas sentidos inversos no quarto dia.

Dadas as discrepâncias evidentes que se verificam quando se procura encontrar nos resultados que obtivemos indicações de uma correlação directa dos valores da cetonemia com os da acidemia gorda e de uma correção inversa dos valores da cetonemia com os da glicemia, investigámos matematicamente as possíveis influências mútuas da acidemia gorda e da glicemia e de ambas sobre a cetonemia, uma vez que assim poderíamos descobrir a influência de uma possível soma de efeitos.

Tomando, nesta *Série*, em conjunto, as três grandezas respeitantes aos mesmos animais ( $n = 25$ ), excluindo, assim, os casos em que faltava a determinação de uma das grandezas, e supondo que a glicemia (G.) e a concentração dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados (A. G.) se influenciam mutuamente e ambas determinam a concentração dos corpos cetónicos (C. C. = acetacetato + beta-hidroxibutirato), encontramos os *path coefficients* seguintes:



A relação do peso do fígado para o peso do rato é significativamente maior no caso dos animais alimentados do que nos outros ( $t = 8,982$ ;  $P = \text{infinitesimal}$ ). Esta relação aparentemente não varia quando consideramos os diversos tempos de jejum estudados.

A concentração do glicogénio hepático sofre também com o jejum uma diminuição muito acentuada, como era de esperar.

A diferença da média dos valores da concentração do glicogénio hepático dos animais alimentados ( $264 \pm 32 \mu\text{moles de glicose/g}$ ), para a média dos valores de todos os outros como um grupo ( $16 \pm 5 \mu\text{moles de glicose/g}$ ) é altamente significativa ( $t = 7,651$ ;  $P = \text{infinitesimal}$ ).

As variações da concentração do glicogénio hepático com o prolongamento do jejum não apresentam diferenças significativas.

A diminuição da concentração do glicogénio contribui, como é óbvio, para a diminuição do peso do fígado. No entanto, quando subtraímos ao peso do fígado dos animais alimentados o peso do glicogénio que contém, verificámos que as diferenças são ainda altamente significativas. Isso deve-se, certamente, à retenção de água que a acumulação de glicogénio acarreta e, possivelmente, ao maior teor de outras substâncias.

O assunto merece ser reinvestigado, inclusivamente por caminhos que já iniciámos <sup>477</sup>.

No jejum prolongado os valores obtidos com os animais desta proveniência, nos doseamentos do acetacetato e do beta-hidroxibutirato, são significativamente diferentes dos valores encontrados com os animais da primeira proveniência. No entanto, há ainda diferenças relativa-

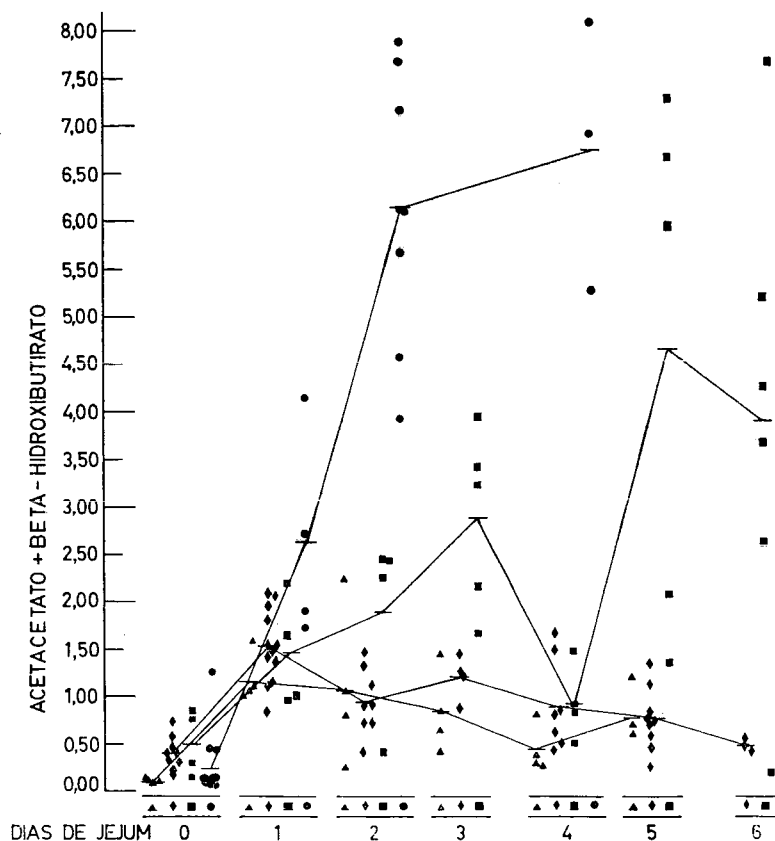


Fig. 11 — Estudos do jejum. Soma do acetacetato e do beta-hidroxibutirato, em  $\mu$ moles/ml de sangue. Representação de todos os valores individuais, das médias e dos perfis das médias:

▲ — 1.ª Série; ◆ — 2.ª Série; ● — 3.ª Série; ■ — 4.ª Série.

mente aos resultados de BERRY, WILLIAMSON & WILSON <sup>33</sup>, que fundamentalmente dizem respeito:

- nos animais alimentados e nos animais com um dia de jejum, à relação beta-hidroxibutirato/acetacetato e não ao valor da soma das concentrações dos dois, pois estes nossos valores são, nestas condições, sobreponíveis aos apresentados por aqueles autores;
- nos animais com dois dias de jejum, aos valores absolutos e à relação.

Quanto ao valor da percentagem do beta-hidroxibutirato relativamente à soma dos dois, GAMMELTOFT <sup>149</sup> refere que *the proportion of the two acids showed variations depending on the total concentration of the ketone bodies in the blood... In the low or normal range the  $\beta$ -hydroxybutyric acid accounts for 70-90 per cent of the ketone bodies in the blood and with increasing concentration the ratio: Reductant/oxidante approaches 1*. Os dados de BERRY, WILLIAMSON & WILSON <sup>33</sup> não apoiam esta afirmação. Pelos resultados apresentados por estes autores podemos calcular que, para um valor de acetacetato + beta-hidroxibutirato igual a 0,28  $\mu$ moles/ml,

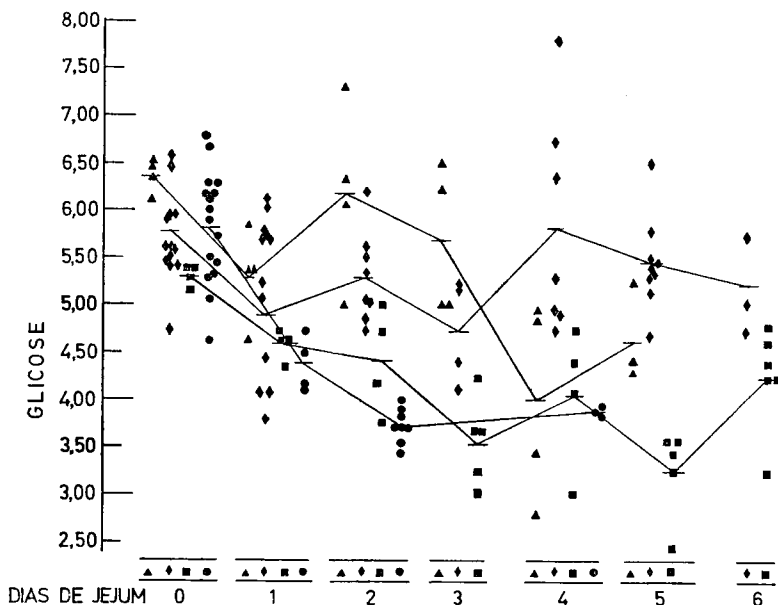


Fig. 12 — Estudos do jejum. Glicose, em  $\mu$ moles/ml de sangue. Representação de todos os valores individuais, das médias e dos perfis das médias:  
 ▲ — 1.ª Série; ◆ — 2.ª Série; ● — 3.ª Série; ■ — 4.ª Série.

QUADRO X  
CETOSE DO JEJUM  
4.<sup>a</sup> Série

As concentrações do acetacetato, do beta-hidroxi-  
butirato e o azoto são expressos em percentagem do peso do fígado. O glicogénio  
Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos

Dias de jejum	SANGUE						
	Acetacetato	$\beta$ -hidroxi- butirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi- butirato	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butirato}}{\text{Acetacetato}}$	$\frac{\text{Acetacetato}}{\text{Acetacetato} + \beta\text{-hidroxi-butirato}} \times 100$	Glicose	
Alimentados . . . . .	0,15 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,12	0,51 $\pm$ 0,17	2,7 $\pm$ 0,3	72,1 $\pm$ 2,3	5,31 $\pm$ 0,06	
Em jejum . . . . .	1	0,42 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,24	1,44 $\pm$ 0,29	2,3 $\pm$ 0,3	69,3 $\pm$ 2,4	4,57 $\pm$ 0,08
	2	0,53 $\pm$ 0,13	1,35 $\pm$ 0,38	1,88 $\pm$ 0,50	2,4 $\pm$ 0,4	69,2 $\pm$ 3,6	4,42 $\pm$ 0,28
	3	0,57 $\pm$ 0,09 (5)	2,30 $\pm$ 0,35 (5)	2,87 $\pm$ 0,42 (5)	4,3 $\pm$ 0,6 (5)	80,1 $\pm$ 2,0 (5)	3,55 $\pm$ 0,21 (5)
	4	0,22 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,15	0,92 $\pm$ 0,20	3,4 $\pm$ 0,3	76,7 $\pm$ 1,5	4,04 $\pm$ 0,38
	5	0,87 $\pm$ 0,18 (5)	3,76 $\pm$ 1,05 (5)	4,65 $\pm$ 1,22 (5)	4,0 $\pm$ 0,5 (5)	80,5 $\pm$ 1,2 (5)	3,24 $\pm$ 0,21 (5)
	6	0,74 $\pm$ 0,16 (6)	3,15 $\pm$ 0,85 (6)	3,89 $\pm$ 1,01 (6)	3,7 $\pm$ 0,8 (6)	81,4 $\pm$ 1,1 (6)	4,24 $\pm$ 0,22 (6)

o beta-hidroxi-  
butirato representa 28,6 p. 100, e para um valor de  
2,90  $\mu$ moles/ml, representa 72,4 p. 100.

Os nossos resultados, neste aspecto, condizem de uma maneira  
geral, com os referidos pelos investigadores de Oxford.

#### d) QUARTA SÉRIE

Dado que no esquema anterior aumentáramos o número dos  
parâmetros em estudo e que, por outro lado, tínhamos como variante,  
além da proveniência dos animais, a época do ano, voltámos a utilizar  
animais da primeira proveniência para uma reinvestigação destes aspectos.

Nesta Série, utilizámos ratos criados no nosso Laboratório e ali-  
mentados *ad libitum* com a dieta semi-sintética referida.

Os pesos iniciais dos ratos variaram entre 152 e 308 g.

A sua distribuição foi feita por grupos, de modo a obtermos neles  
pesos médios iniciais muito aproximados.

A experiência foi realizada nos meses de Junho e Julho de 1969.

Foram sacrificados 7 Grupos de animais: o primeiro, constituído  
por 4 ratos alimentados *ad libitum* até ao momento do sacrifício; o  
136 segundo e terceiro, por 4 ratos cada um, sacrificados, respectivamente,

glicose são expressas em  $\mu$ moles/ml de sangue; a dos ácidos gordos em  $m\mu$ Eq/ml de plasma. A água é expresso em  $\mu$ moles de glicose do glicogénio/g de fígado húmido. Os pesos são expressos em gramas. em cada *Grupo* ( $\pm$  S. E. M.). Cada *Grupo* é constituído por 4 animais, excepto quando indicado entre parêntesis.

PLASMA		PESO			FÍGADO			
Ácidos gordos	Inicial	Final	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Água	Azoto	Glicogénio	
529 $\pm$ 45 (2)	255 $\pm$ 4	—	7,676 $\pm$ 0,673	3,0 $\pm$ 0,2	68,2 $\pm$ 0,4	3,39 $\pm$ 0,25	153 $\pm$ 37	
571 $\pm$ 27	252 $\pm$ 14	233 $\pm$ 11	5,823 $\pm$ 0,174	2,5 $\pm$ 0,1	69,3 $\pm$ 0,4	3,61 $\pm$ 0,20	48 $\pm$ 6	
650 $\pm$ 52	244 $\pm$ 8	227 $\pm$ 10	5,406 $\pm$ 0,173	2,4 $\pm$ 0,1	67,4 $\pm$ 0,6	3,48 $\pm$ 0,37	37 $\pm$ 13	
1020 $\pm$ 188 (5)	231 $\pm$ 32 (5)	209 $\pm$ 27 (5)	5,130 $\pm$ 0,480 (5)	2,5 $\pm$ 0,1 (5)	67,9 $\pm$ 0,6 (5)	3,14 $\pm$ 0,21 (5)	40 $\pm$ 10 (5)	
681 $\pm$ 175	258 $\pm$ 9	209 $\pm$ 14	5,122 $\pm$ 0,215	2,5 $\pm$ 0,7	69,4 $\pm$ 0,3	3,45 $\pm$ 0,17	42 $\pm$ 8	
909 $\pm$ 147 (5)	235 $\pm$ 21 (5)	196 $\pm$ 17 (5)	4,864 $\pm$ 0,338 (5)	2,5 $\pm$ 0,1 (5)	67,3 $\pm$ 1,0 (5)	3,17 $\pm$ 0,37 (5)	32 $\pm$ 4 (5)	
1040 $\pm$ 147 (6)	217 $\pm$ 10 (6)	173 $\pm$ 7 (6)	4,405 $\pm$ 0,177 (6)	2,6 $\pm$ 0,1 (6)	68,7 $\pm$ 0,7 (6)	3,27 $\pm$ 0,19 (6)	21 $\pm$ 7 (6)	

com 1 e 2 dias de jejum; o quarto, constituído por 5 ratos sacrificados com 3 dias de jejum; o quinto, por 4 ratos, com 4 dias de jejum; o sexto, por 5 ratos, com 5 dias de jejum; o sétimo, por 6 ratos, com 6 dias de jejum.

No sangue e no fígado fizemos os doseamentos das substâncias que foram também determinadas na *Série* anterior.

Os resultados obtidos são apresentados no *Quadro X* e, em conjunto com todos os outros destes estudos do jejum, nas Figs. 9, 10, 11, 12 e 13.

#### COMENTÁRIO

Verificámos que os valores obtidos pelo doseamento dos corpos cetónicos nos animais alimentados e nos animais com um dia de jejum caem dentro dos valores correspondentes obtidos para os grupos das *Séries* anteriores. O mesmo já não acontece, no entanto, relativamente aos valores obtidos para o 2.º e 3.º, 5.º e 6.º dias de jejum, em que se verificam valores significativamente mais altos do que para os animais da mesma proveniência nas experiências anteriores.

Relativamente aos valores obtidos com animais da outra proveniência, verifica-se que os valores para o 2.º e 4.º dias são significativamente

mais baixos. Obtêm-se assim, nesta *Série*, valores intermediários entre as duas primeiras *Séries* e a terceira anteriores.

Comparando os valores obtidos no 2.<sup>o</sup> dia de jejum verifica-se que as médias são significativamente diferentes das obtidas nas duas primeiras *Séries* consideradas como um conjunto ( $t = 2,696$ ;  $P \approx 0,02$ ) e que tal diferença é ainda mais significativa relativamente à 3.<sup>a</sup> *Série* ( $t = 5,326$ ;  $P < 0,001$ ).

Os valores obtidos na titulação dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados são significativamente mais baixos nesta *Série* do que na anterior, não só no 2.<sup>o</sup> e 4.<sup>o</sup> dias de jejum, mas também no primeiro.

Considerando os valores da glicemia, verificámos que são diferentes dos das *Séries* anteriores no que respeita quer aos animais alimentados

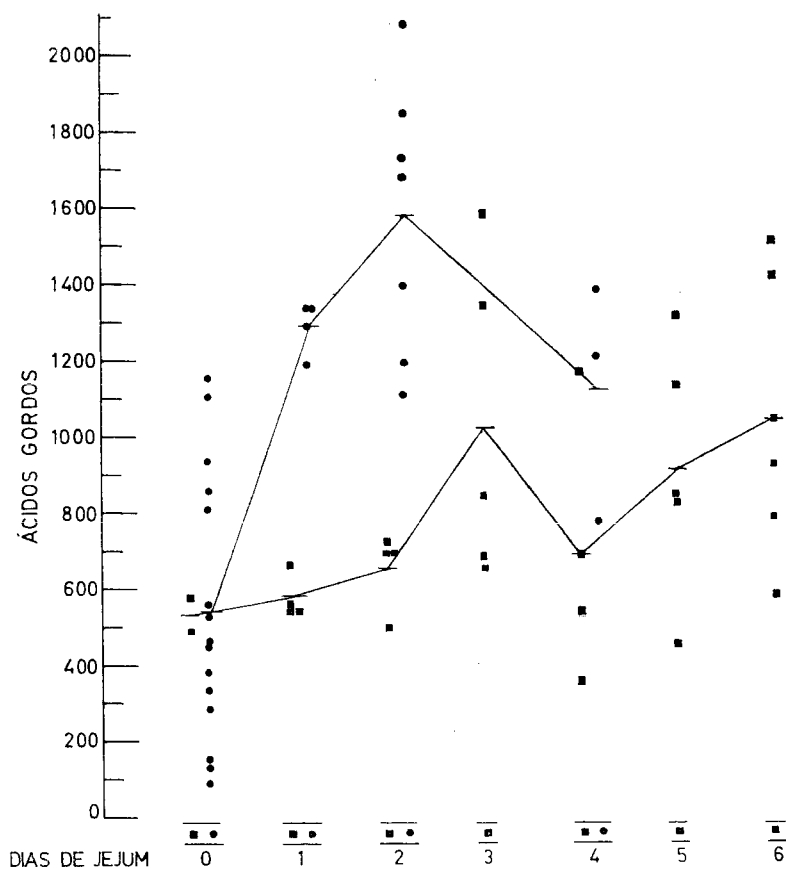
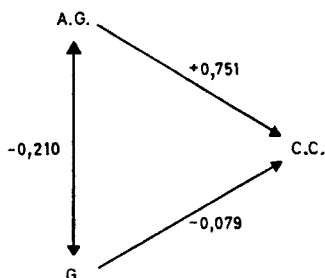


Fig. 13 — Estudos do jejum. Ácidos gordos, em  $m\mu\text{Eq/ml}$  de plasma. Representação de todos os valores individuais, das médias e dos perfis das médias: 3.<sup>a</sup> *Série* (●) e na 4.<sup>a</sup> *Série* (■).

quer aos obtidos com um, dois e quatro dias de jejum; mas são em média mais baixos no 3.º, 5.º e 6.º dias.

Aqui a possibilidade de uma correlação inversa entre a cetonemia e a glicemia é sugerida até ao 6.º dia de jejum.

Tomando, nesta *Série*, em conjunto, as três grandezas respeitantes aos mesmos animais ( $n = 30$ ), tal como fizemos para a *Série* anterior, e supondo que a glicemia (G.) e a concentração dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados (A. G.) se influenciam mutuamente e ambas determinam a concentração dos corpos cetónicos (C. C. = acetato + beta-hidroxibutirato), encontrámos os *path coefficients* seguintes:



A relação do peso do fígado para o peso do rato é significativamente maior no caso dos animais alimentados do que no dos outros; esta relação não apresenta variações com o prolongamento do jejum. O mesmo se verifica com a concentração do glicogénio hepático, tal como acontecia também na *Série* anteriormente estudada, pelo que lembramos o comentário já então feito.

As variações médias da percentagem de água e de azoto nos fígados dos diversos grupos não são significativas.

#### COMENTÁRIO GERAL

Considerando agora no seu conjunto os dados obtidos nas quatro *Séries* experimentais, os comentários que se nos afiguram de maior importância são os seguintes:

- 1.º — Os valores obtidos nos doseamentos da glicemia e dos corpos cetónicos sanguíneos nos animais alimentados constituem, para cada caso, um conjunto apenas, que se diferencia bem dos resultados obtidos no primeiro dia de jejum, os quais constituem também, para cada caso, um só conjunto; afastam-se apenas o valor médio relativamente alto de glicemia obtido na primeira *Série* para os animais com um dia de jejum e o valor médio relativamente alto de cetonemia nos animais da terceira *Série* também no primeiro dia de jejum. 139



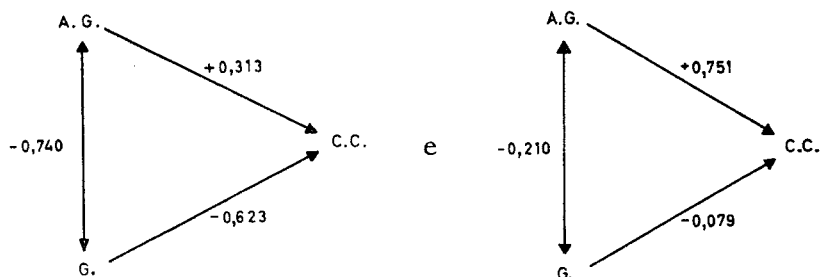
- 2.º — As quedas dos valores glicémicos médios dos animais com um dia de jejum, face aos animais alimentados, são sempre da mesma ordem para as diversas *Séries*, e muito semelhantes. Relativamente à subida da cetonemia, esta parece ser maior na 3.ª *Série* do que nas outras, constituindo todas as outras, neste aspecto, um grupo apenas, com reactividade aparentemente idêntica.
- 3.º — Relativamente à cetonemia e à glicemia a dispersão de valores é grande, de uma maneira geral; considerada, no entanto, no conjunto dos *Grupos* de cada *Série* e no próprio conjunto das *Séries*, verifica-se que, de uma maneira geral, a dispersão é relativamente pequena quer para os animais alimentados quer para os animais com um dia de jejum, mas aumenta quando o jejum se prolonga. Parece-nos, assim, que os factores com efeitos mais variáveis que contribuam para o condicionamento da cetose poderão ter uma quota parte mais importante quando o jejum se prolonga; parece-nos também que pode haver factores que nas primeiras condições não sejam eficazes mas que o possam vir a ser quando o jejum se prolonga.
- 4.º — As nossas quatro *Séries* experimentais diferem entre si, como vimos, por condições bem determinadas que passamos a considerar.
- a) A primeira difere de todas as outras pela alimentação prévia dos animais; as diferenças entre as duas dietas parecem não ter influência significativa sobre o desenvolvimento da cetose no jejum subsequente ao seu consumo.
- b) A terceira difere de todas as outras pela proveniência dos animais.  
Parece indubitável que se trata de uma «raça» particularmente aconselhável para o estudo do desenvolvimento da cetose, pelos altos valores encontrados nos doseamentos dos corpos cetónicos.
- c) A quarta difere da segunda e da terceira pela época do ano em que foi estudada.  
Esta é uma das circunstâncias conhecidas por diversos estudos como influente nos parâmetros endocrinológicos <sup>513</sup> e nos seus efeitos metabólicos, designadamente lipídicos e afins.

Entre as componentes, conhecidas umas, possíveis outras e completamente ignoradas ainda outras, das variações sazonais, conta-se a duração dos períodos de luz e de obscuridade que nas nossas experiências não foram artificialmente condicionados. Parece-nos, no entanto, que este ponto deve ser ulteriormente estudado. Outra influência possível respeita ao grau de humidade, uma vez que os meses em que o comportamento desta quarta *Série* se verifica, são os de Junho e Julho.

Estes são alguns dos aspectos de um problema que se nos afigura ser muito mais vasto e que por isso necessita de ulteriores investigações.

5.<sup>o</sup> — O aspecto, para nós, de momento, mais relevante destes nossos estudos diz respeito às correlações possíveis em que se tem procurado explorar a quota-parte dos três tipos de substratos energéticos mais importantes do organismo: glicose, ácidos gordos e corpos cetónicos.

Para além dos aspectos parciais já apontados, verificámos que na 3.<sup>a</sup> e na 4.<sup>a</sup> *Séries* experimentais os *path coefficients* encontrados são, respectivamente, os seguintes:



As diferenças são suficientemente evidentes.

Estes resultados mostram-nos que as correlações propostas por uns e contestadas por outros, e a que não fazemos agora referência por ter sido feita na primeira parte desta dissertação, podem ser igualmente verdadeiras.

Este nosso estudo demonstra que na discussão deste problema têm de ser ponderados outros factores além dos que o são habitualmente.

As variações internas de um sistema que podemos considerar constituído pelas três variáveis (glicemia, academia gorda e cetonemia) não parecem ter significado causal no condi-

cionamento da cetose, mas parecem ser condicionadas por influências estranhas ao próprio sistema.

- 6.<sup>o</sup> — Um dos aspectos, muitas vezes salientado, da perspectiva que relaciona a cetose com o metabolismo glicídico é o que se refere à concentração do glicogénio hepático.

Pudemos verificar uma relação geral entre os valores encontrados para os animais alimentados e os encontrados para o conjunto dos animais em jejum, mas as variações da cetonemia através do prolongamento do jejum não têm qualquer relação aparente com a concentração do glicogénio hepático. Bem sabemos que este é um dado estático e no condicionamento interessará, mais do que este, o aspecto dinâmico da concentração do glicogénio.

Será esta também uma motivação para prosseguirmos os nossos estudos neste domínio.

- 7.<sup>o</sup> — As nossas experiências fornecem resultados que, pela grandeza relativa das dispersões, levam a propor os períodos de 1 e 2 dias de jejum como os mais aconselháveis para o estudo das influências dos factores conhecidos ou para o estudo do próprio fenómeno global da cetogénese; os períodos de jejum mais prolongados parecem ser particularmente aconselháveis para o estudo dos factores que se desconhecem.

Na perspectiva que acabamos de traçar, verificamos que a influência de qualquer das duas variáveis mais vezes apontadas (ácidos gordos e glicose) se torna menos nítida com o prolongamento do jejum.

Salientámos que na terceira *Série*, aos 4 dias de jejum, a tendência da variação da cetose é positiva e a dos ácidos gordos é negativa; na quarta *Série* verifica-se exactamente o contrário. Quanto à glicemia, verifica-se que na primeira *Série*, a partir do 2.<sup>o</sup> dia, há relativamente à cetose paralelismo de tendências, o qual na segunda *Série* se verifica a partir do 4.<sup>o</sup> dia de jejum; do 2.<sup>o</sup> para o 4.<sup>o</sup> dia de jejum, na terceira *Série*, há também paralelismo; só na quarta *Série* é que a sugestão da correlação inversa se mantém até ao fim do período de estudo.

- 8.<sup>o</sup> — Se as variações de dia para dia, que acabámos de apontar no estudo do jejum prolongado, correspondem a autênticos ciclos com períodos diferentes de *Série* para *Série*, é um outro aspecto que necessita de estudo ulterior.

9.º — Relativamente à própria situação experimental — o jejum — utilizada nestes estudos para evidenciar a cetose, devemos considerar que, quando retiramos a dieta aos animais, lhes retiramos do mesmo passo as substâncias minerais, com excepção das que continuam a ser fornecidas pela água. Dado o conhecimento que temos da importância destas substâncias, designadamente nos aspectos metabólicos que mais nos interessam <sup>335, 429</sup>, não deixaremos de apontar a necessidade de fazer a exploração destes problemas, em investigações ulteriores.

## 2. ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE

### a) PRIMEIRA SÉRIE

Na primeira *Série* de experiências em que explorámos este esquema experimental, utilizámos ratos criados no nosso Laboratório e alimentados sempre *ad libitum*, antes e durante a experiência, com a dieta comercial de proveniência espanhola.

Nas 24 h que antecederam o início do período de utilização do regime alimentar, os animais ficaram em jejum. Foram pesados antes de lhes ser fornecida a comida e as pesagens foram feitas sempre nessas condições para evitar a influência variável da dieta ingerida.

Utilizámos 14 ratos com pesos compreendidos entre 245 e 400 g (média 315 g). Durante 43 dias os animais tiveram acesso à comida das 9 às 11 h. O período experimental decorreu nos meses de Maio e Junho de 1968.

Verificámos que inicialmente os ratos consumiram pequenas quantidades de alimento e perderam peso, mas que ao fim de uma a duas semanas estavam aparentemente adaptados ao regime alimentar.

A média dos pesos dos ratos ao fim do período experimental foi de 343 g.

Então os animais foram divididos em 4 *Grupos* e estes sacrificados em tempos diferentes: um *Grupo* (4 ratos) com 22 h de jejum, quando a comida começou a ser fornecida aos restantes; outro *Grupo* (2 ratos), imediatamente após 2 h de acesso à comida; o terceiro e quarto *Grupos* (4 ratos cada), 6 e 10 h, respectivamente, após o início do acesso à comida.

Durante todo o tempo os animais tiveram água *ad libitum*.

No sangue de todos os ratos foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxibutirato e a glicose.

Os valores encontrados ficaram no *Quadro XI* e estão representados na Fig. 14.

## QUADRO XI

## CETOSE EM RATOS COM ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE

1.<sup>a</sup> Série

As concentrações do acetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose são expressas em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue e o peso em gramas. Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos em cada *Grupo* ( $\pm$  S. E. M.). Cada *Grupo* é constituído por 4 animais, excepto quando indicado entre parêntesis.

Condições experimentais	Acetato	$\beta$ -hidroxibutirato	Acetato + $\beta$ -hidroxibutirato	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetato}} \times 100$	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetato} + \beta\text{-hidroxibutirato}} \times 100$	Glicose	Peso
22 h de jejum . . . . .	0,29 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,11	1,20 $\pm$ 0,15	3,2 $\pm$ 0,1	75,4 $\pm$ 1,4	4,85 $\pm$ 0,03	283 $\pm$ 16
Imediatamente após a refeição . . . . .	0,08 $\pm$ 0,01 (2)	0,16 $\pm$ 0,11 (2)	0,24 $\pm$ 0,13 (2)	2,0 $\pm$ 0,9 (2)	64,5 $\pm$ 10,0 (2)	7,89 **** (2)	332 $\pm$ 67 (2)
6 h de jejum . . . . .	0,05 *	0,07 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	1,4 $\pm$ 0,1	57,3 $\pm$ 2,6	7,74 $\pm$ 0,43	371 $\pm$ 15
10 h de jejum . . . . .	0,006 **	0,13 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,14	***	90,7 $\pm$ 1,9	6,68 $\pm$ 0,35	360 $\pm$ 22

\* Em três dos ensaios = 0,05 e em um = 0,06.

\*\* Três valores inferiores a 0,005 e em um = 0,011.

\*\*\* Não são apresentados, em face dos valores extremamente baixos do acetato.

\*\*\*\* O mesmo valor nos dois ensaios.

Os valores obtidos nos doseamentos têm uma dispersão muito pequena, quando comparados com os das experiências anteriores. O facto deve estar relacionado com as próprias condições nutricionais.

É evidente uma relação inversa entre os valores dos corpos cetónicos e da glicemia. No entanto, há uma profunda diferença entre este tipo de experiências e o dos estudos anteriores, que reside no facto de a subida glicémica resultar aqui de um fornecimento de glicose vindo do exterior, enquanto que no decurso do jejum as oscilações do sistema têm outras causas.

A contraposição dos perfis hemáticos das grandezas exploradas não nos permite, no entanto, só por si, justificar uma correlação causal.

O resultado visível da experiência sugere uma analogia com as provas de hiperglicemia provocada, as quais pretendem explorar a função insulinogénica, *desideratum* que parece justificado por trabalhos recentes <sup>111, 428, 454</sup>. E está referido <sup>135</sup>, como vimos já, que a insulina, só por si, tem o efeito de reverter a cetose do jejum. A correlação pode ter, na verdade, a mediação insulínica.

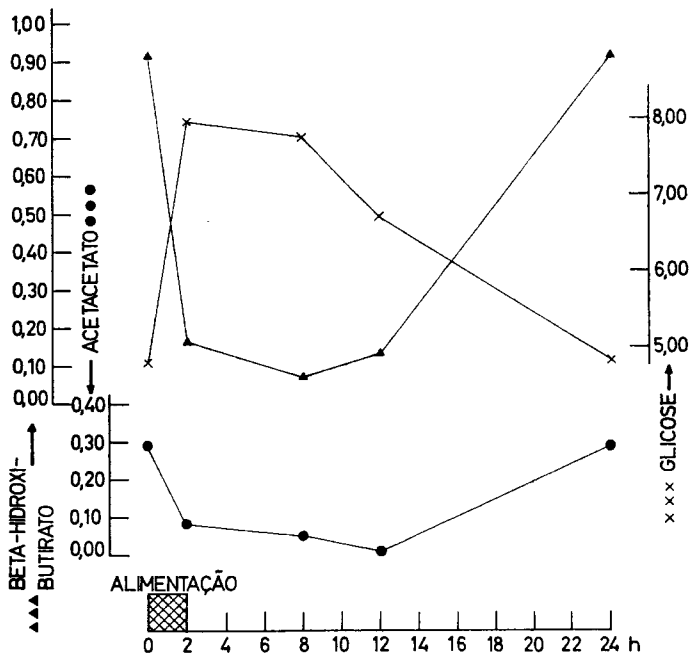


Fig. 14 — Estudos em ratos com alimentação intermitente. 1.<sup>a</sup> Série. Acetato, beta-hidroxi-butarato e glicose, em  $\mu$ moles/ml de sangue — valores das médias. Os resultados obtidos às 0 h são também marcados às 24 h.

A experiência adquirida com a exploração do esquema permite pensar na sua utilização para uma multiplicidade de estudos em que se deseje uma uniformidade relativa de resultados.

De um ponto de vista que muito nos interessava, ficou comprovado que os ratos adaptados no sentido de um condicionamento da lipogênese aumentada — fenómeno que está bem documentado <sup>80, 95, 209, 298, 502, 509, 510, 511</sup> — desenvolvem um padrão de cetose de jejum aparentemente semelhante ao dos ratos alimentados sempre *ad libitum*.

## b) SEGUNDA SÉRIE

Em face dos resultados anteriores, tornou-se desejável obter maior número de informações, explorando maior número de parâmetros.

Nesta segunda *Série* de experiências os ratos utilizados foram da mesma proveniência dos anteriores, mas alimentados com a dieta semi-sintética que referimos.

O período experimental decorreu nos meses de Março e Abril de 1969.

Utilizámos 32 ratos com pesos compreendidos entre 207 e 281 g (média 244 g).

QUADRO XII  
CETOSE EM RATOS COM ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE

2.<sup>a</sup> *Série*

As concentrações d  
a dos ácidos gordos ex  
gênio é expresso em  $\mu$ mol  
Os pesos são expressos em  
( $\pm$  S. E. M.). Cada *Grupo*

Condições experimentais	SANGUE					Glicose	PLASMA Ácidos gordos
	Acetacetato	$\beta$ -hidroxi- butirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi- butirato	$\beta$ -hidroxi- butirato Acetacetato	$\beta$ -hidroxi- butirato Acetacetato + $\beta$ -hidroxi- butirato		
22 h de jejum	$0,14 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,10$	$3,8 \pm 0,2$	$78,9 \pm 0,9$	$5,67 \pm 0,12$	$557 \pm 5$
Imediatamente	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
após a refeição	$0,04 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,0$	$56,1 \pm 0,7$	$6,61 \pm 0,43$	$209 \pm 4$
	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
6 h de jejum	$0,02 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$2,4 \pm 0,3$	$69,6 \pm 3,7$	$6,12 \pm 0,22$	$155 \pm 3$
	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(4)
10 h de jejum	$0,07 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,09$	$0,24 \pm 0,12$	$2,2 \pm 0,2$	$67,8 \pm 2,8$	$5,56 \pm 0,22$	$324 \pm 16$
	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)

Os ratos ficaram em jejum nas 24 h que antecederam o primeiro período alimentar experimental e passaram a ter alimento durante 2 h por dia (das 9 às 11 h), regime que durou 35 dias.

Os animais foram então divididos primeiramente em 4 Grupos de 8 e, depois, cada Grupo em 2 Subgrupos de 4.

A glicose foi doseada no sangue de todos os animais; num dos Subgrupos de cada Grupo foram doseados no sangue o acetacetato e o beta-hidroxibutirato; no plasma dos ratos do outro Subgrupo foram titulados os ácidos gordos.

No fígado de todos os animais foram doseados o glicogénio, os triglicerídeos, o azoto e a água.

Os resultados obtidos são apresentados no Quadro XII e na Fig. 15.

#### COMENTÁRIO

Como se pode ver, o perfil da variação dos corpos cetónicos é muito semelhante ao obtido com os animais da Série anterior.

A curva da glicemia tem a particularidade de, às 10 h de jejum, registar valor médio ligeiramente mais baixo que o inicial.

acetacetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose são expressas em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue ( $\pm$  S. E. M.);  $\mu\text{Eq/ml}$  de plasma. A água e o azoto são expressos em percentagem do peso do fígado. O glicogénio e a glicose do fígado são expressos em  $\mu\text{Eq/g}$  de fígado húmido. Os triglicerídeos são expressos em  $\text{mg/g}$  de fígado húmido. Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos em cada Grupo constituído por 8 animais, excepto quando indicado entre parêntesis.

PESO		FÍGADO					
Com 22 h de jejum	No momento do sacrifício	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Água	Azoto	Glicogénio	Triglicerídeos
232 $\pm$ 12	231 $\pm$ 12	5,554 $\pm$ 0,269	2,6 $\pm$ 0,1	69,4 $\pm$ 0,2	2,94 $\pm$ 0,11	27 $\pm$ 5	10,3 $\pm$ 1,3
232 $\pm$ 10	252 $\pm$ 15	6,354 $\pm$ 0,457	2,5 $\pm$ 0,1	69,8 $\pm$ 0,3	2,83 $\pm$ 0,17	103 $\pm$ 22	6,7 $\pm$ 1,5
224 $\pm$ 11	238 $\pm$ 10	6,926 $\pm$ 0,250	3,2 $\pm$ 0,1	68,1 $\pm$ 0,2	2,42 $\pm$ 0,13	431 $\pm$ 36	6,5 $\pm$ 0,6
227 $\pm$ 8	236 $\pm$ 9	7,121 $\pm$ 0,466	3,0 $\pm$ 0,1	68,3 $\pm$ 0,1	2,58 $\pm$ 0,16	391 $\pm$ 23	7,1 $\pm$ 0,5



Nas determinações feitas, o glicogénio atinge os valores mais altos 6 h após o fim do período alimentar e 10 h após o mesmo período apresenta já um valor menor que esse.

É de notar, no entanto, que pela laparotomia feita para obtenção do fígado, verificámos que todos os animais, às 10 h de jejum, tinham ainda no estômago grandes quantidades de alimentos. O seu estômago apresentava-se também com dimensões aparentes muito superiores às dos animais a comer *ad libitum*.

Este problema merece ulterior aprofundamento, dado que, nestas condições, um regime alimentar com um período relativamente curto de ingestão de alimentos não corresponde a um período de digestão e absorção também curto.

Apesar disso, verifica-se já nessa altura uma tendência não só para a diminuição do glicogénio hepático, mas também para a subida dos corpos cetónicos e dos ácidos gordos.

Não se verificam variações significativas dos triglicerídeos, do azoto e da água do fígado.

Os valores obtidos no doseamento dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados, acompanhando os dos corpos cetónicos nas suas variações através do tempo, fazem com que se devam apontar, para além da correlação já referida no comentário anterior, também as correlações dos valores dos ácidos gordos, por um lado, com os dos corpos cetónicos e, por outro, com os da glicemia.

A mesma interpretação é, contudo, também aqui válida. O sistema constituído pelos três tipos de substratos respiratórios sofre variações que não têm o significado de variações intrínsecas.

A tendência para a queda dos valores médios da glicemia verifica-se já às 6 h de jejum (relativamente ao termo do período alimentar), tal como na curva da *Série* anterior.

Note-se nas Figs. 14 e 15 (de ambas as *Séries*, portanto) que o sentido da variação dos parâmetros estudados no sangue é o mesmo entre os pontos que marcam as 2 e as 8 h, portanto nas primeiras 6 h de jejum. Há até um certo paralelismo na descida da glicemia, da cetonemia e dos ácidos gordos. Este facto, junto também com o da subida do glicogénio hepático, mais fortalece a ideia da necessidade de encontrar nas possíveis correlações destas grandezas um nexa não de causalidade entre si, mas de comum dependência de uma causa externa ao sistema.

Relativamente à relação beta-hidroxibutirato/acetacetato, embora os valores sejam em número relativamente reduzido, fica-nos a impressão de que, neste aspecto, tem mais importância o estado nutricional dos animais do que os valores absolutos da concentração dos corpos cetónicos.

A presença de alimentos no estômago, às 10 h de jejum, impõe uma investigação ulterior e, em face dos resultados obtidos, põe o problema da possibilidade de velocidades diferentes na digestão, absorção e metabolização dos diversos alimentos.

Este esquema experimental mostrou-se-nos, assim, do ponto de vista em que nos colocámos, de uma apreciável fecundidade.

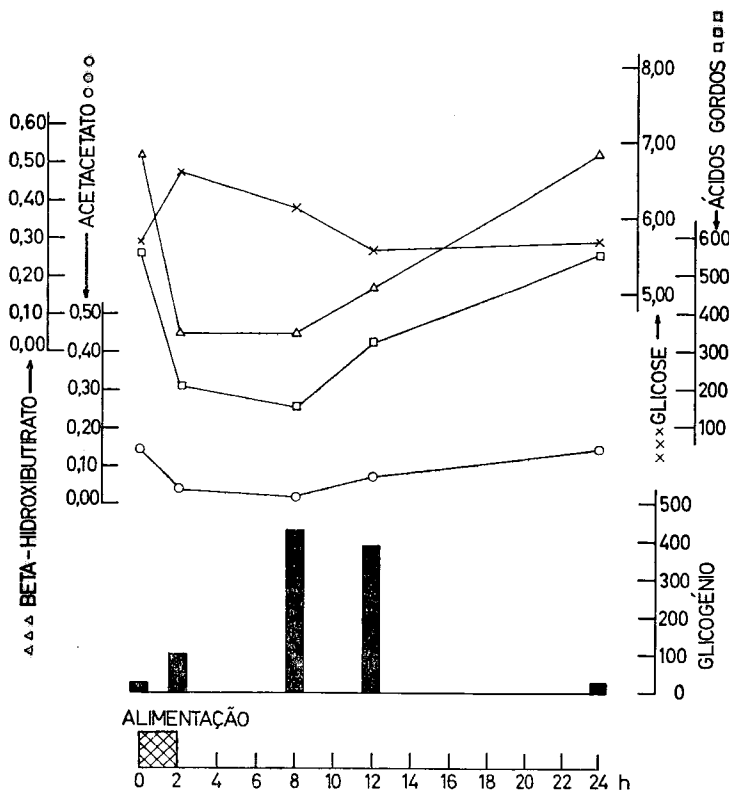


Fig. 15 — Estudos em ratos com alimentação intermitente. 2.ª Série. Acetacetato, beta-hidroxibutirato e glicose, em  $\mu$ moles/ml de sangue; ácidos gordos, em mEq/ml de plasma; glicogênio em  $\mu$ moles de glicose do glicogênio/g de fígado húmido. Os resultados obtidos às 0 h são também marcados às 24 h.

### 3. ESTUDOS COM ESTERÓIDES GLICONEOGÉNICOS E COM A METFORMINA

O desenvolvimento deste esquema teve em vista, como já se disse, explorar situações em que a gliconeogénese fosse farmacológicamente induzida ou inibida, para o que nos baseámos nos trabalhos de F. MEYER<sup>337, 338, 339</sup> e de J. STERNE<sup>499, 500, 501</sup> em que é postulada uma

acção metabólica das biguanidas «antidiabéticas» sobre a gliconeogénese.

O esteróide gliconeogénico utilizado inicialmente neste trabalho foi a *triamcinolona*, dado que se trata de uma substância cujos efeitos estão muito bem documentados <sup>519, 548</sup>.

A solução de cloreto de *metformina* e a suspensão de diacetato de *triamcinolona* foram feitas em solução de cloreto de sódio a 9 g/l, para ser injectado 1 ml/100 g de peso de rato.

As injeções foram feitas intraperitonealmente.

Em todas estas experiências utilizámos ratos da colónia do nosso Laboratório, alimentados com a dieta semi-sintética.

#### a) PRIMEIRA SÉRIE

Nesta Série de experiências, estudada em Abril de 1969, utilizámos 12 ratos divididos por 4 Grupos.

A todos os animais foi retirada a comida 24 h antes da hora prevista para o sacrifício.

### QUADRO XIII ESTUDOS COM ESTERÓIDES GLICONEOGÉNICOS E COM A METFORMINA

As concentrações do acetato são expressos em percentagem do peso. Os pesos são expressos em gramas. O

#### 1.ª Série

Condições experimentais	N.º de animais	SANGUE				
		Acetacetato	$\beta$ -hidroxi-butilato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi-butilato	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butilato}}{\text{Acetacetato}}$	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butilato}}{\text{Acetacetato} + \beta\text{-hidroxi-butilato}} \times 100$
Ministração de						
1. Diacetato de <i>Triamcinolona</i> + cloreto de sódio	4	0,79 $\pm$ 0,30	1,63 $\pm$ 0,65	2,42 $\pm$ 0,94	2,1 $\pm$ 0,2	67,1 $\pm$ 0,2
2. Cloreto de sódio.	2	0,52 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,75	1,69 $\pm$ 0,95	2,0 $\pm$ 0,9	62,1 $\pm$ 12,8
3. Cloreto de <i>Metformina</i> + cloreto de sódio e diacetato de <i>triamcinolona</i> + cloreto de sódio	4	0,91 $\pm$ 0,12	2,01 $\pm$ 0,17	2,92 $\pm$ 0,18	2,3 $\pm$ 0,3	69,1 $\pm$ 2,7
4. Cloreto de sódio + cloreto de sódio	2	0,83 $\pm$ 0,20	1,85 $\pm$ 0,79	2,68 $\pm$ 0,98	2,2 $\pm$ 0,5	67,3 $\pm$ 4,6

1.º Grupo — 4 ratos com pesos iniciais de 102, 149, 154 e 196 g. Injecção de diacetato de *triamcinolona* (1 mg/100 g) e sacrifício 3 h após.

2.º Grupo — 4 ratos com pesos iniciais de 139, 148, 161 e 173 g. Injecção de cloreto de *metformina* (5 mg/100 g), injecção de diacetato de *triamcinolona* (1 mg/100 g) 1 h após e sacrifício 3 h após a última injecção.

3.º Grupo — 2 ratos com pesos iniciais de 164 e 159, injecção de solução de cloreto de sódio a 9 g/l (1 ml/100 g) e sacrifício 3 h após.

4.º Grupo — 2 ratos com o peso inicial de 145 e 171 g, injecção de solução de cloreto de sódio a 9 g/l (1 ml/100 g), nova injecção da mesma solução 1 h após, e sacrifício 3 h após a última.

As perdas médias de peso durante as 24 h de jejum foram 12, 16, 14 e 21 g para o 1.º, 2.º, 3.º e 4.º grupos, respectivamente.

No sangue destes animais foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxibutirato e a glicose. No fígado fizemos a determinação do glicogénio, do azoto e da água.

Os resultados obtidos figuram no *Quadro XIII*.

Como se pode ver, não há qualquer diferença significativa entre os valores obtidos nos diversos grupos.

tato, do beta-hidroxibutirato e da glicose são expressas em  $\mu$ moles/ml de sangue. A água e o azoto do fígado. O glicogénio é expresso em  $\mu$ moles de glicose do glicogénio/g de fígado húmido. Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos em cada *Grupo* ( $\pm$  S. E. M.).

Glicose	PESO			Peso	Água	FÍGADO		
	Inicial	Com 24 h de jejum	Perda de peso			$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Azoto	Glicogénio
5,48 $\pm$ 0,33	150 $\pm$ 19	138 $\pm$ 9	12 $\pm$ 2	4,781 $\pm$ 0,681	3,5 $\pm$ 0,2	70,2 $\pm$ 0,3	2,49 $\pm$ 0,30	10 $\pm$ 3
5,45 $\pm$ 0,72	162 $\pm$ 3	148 $\pm$ 1	14 $\pm$ 4	4,267 $\pm$ 0,122	2,9 $\pm$ 0,1	72,6 $\pm$ 2,0	2,16 $\pm$ 0,21	4 $\pm$ 2
5,46 $\pm$ 0,13	155 $\pm$ 7	139 $\pm$ 6	16 $\pm$ 2	4,526 $\pm$ 0,246	3,3 $\pm$ 0,1	70,7 $\pm$ 0,1	2,46 $\pm$ 0,09	11 $\pm$ 2
4,84 $\pm$ 0,28	158 $\pm$ 12	137 $\pm$ 14	21 $\pm$ 1	4,575 $\pm$ 0,537	3,4 $\pm$ 0,1	70,8 $\pm$ 0,3	2,11 $\pm$ 0,07	7 $\pm$ 1

b) SEGUNDA SÉRIE

Os inesperados resultados obtidos na Série anterior fizeram com que repetíssemos o esquema experimental, utilizando exactamente o glicocorticóide utilizado por MEYER *et al.* <sup>339</sup>, isto é, a hidrocortisona (na forma de fosfato).

A todos os ratos foi retirada a comida 24 h antes da hora prevista para o sacrifício.

As soluções foram feitas em solução de cloreto de sódio a 9 g/l, para dar 1 ml/100 g de peso do rato. As doses de hidrocortisona que indicámos referem-se à substância base e não ao seu sal.

Esta experiência foi feita em Junho de 1969.

Utilizámos também 4 grupos.

1.º Grupo — 4 ratos com pesos iniciais de 145, 148, 240 e 288 g. Injecção de hidrocortisona (4 mg/100 g) e sacrifício 3 h após.

QUADRO XIV  
ESTUDOS COM ESTERÓIDES GLICONEOGÉNICOS E COM A METFORMINA  
2.ª Série  
(para legenda ver QUADRO XIII)

Condições experimentais	N.º de animais	SANGUE				
		Acetacetato	$\beta$ -hidroxi-butirato	$\beta$ -hidroxi-butirato + Acetacetato	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butirato}}{\text{Acetacetato}} \times 10$	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butirato}}{\text{Acetacetato} + \beta\text{-hidroxi-butirato}} \times 10$
Ministração de						
1. Hidrocortisona + cloreto de sódio	4	0,67 $\pm$ 0,12	2,28 $\pm$ 0,32	2,95 $\pm$ 0,44	3,5 $\pm$ 0,3	77,7 $\pm$ 1,3
2. Cloreto de sódio	2	0,87 $\pm$ 0,14	2,47 $\pm$ 0,02	3,34 $\pm$ 0,15	2,9 $\pm$ 0,5	74,2 $\pm$ 2,8
3. Cloreto de Metformina + cloreto de sódio e Hidrocortisona + cloreto de sódio	4	0,90 $\pm$ 0,24	2,24 $\pm$ 0,54	3,14 $\pm$ 0,75	2,6 $\pm$ 0,3	71,2 $\pm$ 2,5
4. Cloreto de sódio + cloreto de sódio	3	0,55 $\pm$ 0,03	1,82 $\pm$ 0,26	2,37 $\pm$ 0,25	3,3 $\pm$ 0,6	76,1 $\pm$ 2,9

2.º Grupo — 4 ratos com pesos iniciais de 140, 200, 212 e 273 g. Injeção de cloreto de *metformina* (5 mg/100 g), injeção de hidrocortisona (4 mg/100 g) 1 h após, e sacrifício 3 h após a última injeção.

3.º Grupo — 2 ratos com pesos iniciais de 198 e 248. Injeção de solução de cloreto de sódio a 9 g/l (1 ml/100 g) e sacrifício 3 h após.

4.º Grupo — 3 ratos com pesos iniciais de 199, 208 e 214 g. Injeção de solução de cloreto de sódio a 9 g/l, (1 ml/100 g), nova injeção 1 h após, e sacrifício 3 h após a última.

No sangue destes animais foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxiacetato e a glicose. No fígado fizemos a determinação do glicogénio, do azoto e da água.

Os resultados obtidos são apresentados no *Quadro XIV*.

Verificámos novamente que não há qualquer diferença significativa entre os valores obtidos nos diversos *Grupos*.

PESO				FÍGADO				
Glicose	Inicial	Com 24 h de jejum	Perda de peso	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Glicogénio	Água	Azoto
4,43 ± 0,25	205 ± 35	193 ± 37	12 ± 2	4,848 ± 0,856	2,5 ± 0,1	67,7 ± 0,4	3,2 ± 0,1	21 ± 7
3,70 ± 0,20	223 ± 25	206 ± 26	17 ± 1	5,885 ± 0,347	2,9 ± 0,2	66,8 ± 0,7	3,1 ± 0,5	2 ± 0
4,63 ± 0,21	206 ± 27	192 ± 25	14 ± 3	5,048 ± 0,568	2,6 ± 0,1	69,7 ± 0,4	3,1 ± 0,2	23 ± 3
4,83 ± 0,17	207 ± 4	190 ± 10	17 ± 6	5,035 ± 0,370	2,6 ± 0,1	68,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	14 ± 5

c) TERCEIRA SÉRIE

Julgáramos conveniente observar, antes de mais, o efeito da minis- tração das drogas sobre a eliminação do azoto, numa primeira aproxima- ção do seu possível efeito sobre a gliconeogénese, tanto mais que essa influência está apontada, por exemplo, para a *fenformina* na Cobaia <sup>518</sup>, e não sofre dúvida para os glicocorticóides.

Utilizámos nesta experiência 23 ratos da colónia do nosso Labora- tório, alimentados com a dieta semi-sintética, que foram colocados sepa- radamente em gaiolas metabólicas.

A experiência foi realizada em Dezembro de 1968 e Janeiro de 1969.

Numa primeira fase, durante uma semana, a comida foi fornecida *ad libitum* e pesada todos os dias e a urina e as fezes recolhidas todos os dias.

Durante este período prévio verificámos que os ratos tinham um comportamento normal relativamente ao metabolismo global do azoto.

QUADRO XV  
ESTUDOS COM ESTERÓIDES GLICONEOGÉNICOS  
E COM A METFORMINA

O azoto é expresso em miligra-  
mas cada Grupo ( $\pm$  S. E. M.).

3.<sup>a</sup> Série

Dias de jejum		N.º de animais	ELIMINAÇÃO DE AZOTO				
			Na urina				
			1	2	3	4	1
1.º GRUPO <i>TRIAMCINOLONA</i>	Valores absolutos	7	175 $\pm$ 6	168 $\pm$ 16	147 $\pm$ 13	148 $\pm$ 15	10 $\pm$ 5
	P. 100 g		104 $\pm$ 4	110 $\pm$ 9	104 $\pm$ 10	120 $\pm$ 13	6 $\pm$ 1
2.º GRUPO <i>METFORMINA</i>	Valores absolutos	8	97 $\pm$ 8	83 $\pm$ 6	78 $\pm$ 9	70 $\pm$ 6	14 $\pm$ 3
	P. 100 g		57 $\pm$ 6	51 $\pm$ 3	51 $\pm$ 5	48 $\pm$ 3	8 $\pm$ 1
3.º GRUPO <i>TESTEMUNHA</i>	Valores absolutos	8	93 $\pm$ 6	80 $\pm$ 5	93 $\pm$ 6	72 $\pm$ 26	14 $\pm$ 4
	P. 100 g		54 $\pm$ 5	49 $\pm$ 3	60 $\pm$ 4	49 $\pm$ 7	8 $\pm$ 1

No fim dessa semana a comida foi retirada e os ratos passaram a ter acesso apenas à água; foram pesados diariamente, e as urinas e as fezes recolhidas também diariamente, para o doseamento do azoto.

Os ratos foram injectados no início do período de jejum e depois de 24 em 24 horas.

Os animais foram divididos em 3 Grupos.

1.º Grupo — 7 ratos — Injecção diária de diacetato de *triamcinolona* (1 mg/100 g) em solução de cloreto de sódio a 9 g/l, para dar 1 ml/100 g.

2.º Grupo — 8 ratos — Injecção diária de cloreto de *metformina* (5 mg/100 g) em solução de cloreto de sódio a 9 g/l, para dar também 1 ml/100 g.

3.º Grupo — 8 ratos — Injecção diária de solução de cloreto de sódio a 9 g/l (1 ml/100 g).

A experiência prolongou-se até à morte dos animais.

No Quadro XV apresentamos os resultados do doseamento do azoto, na urina e nas fezes, em valores absolutos e em valores referidos

nas e o peso em gramas. Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos em

			PESO				
Nas fezes			Inicial	Perdas de peso			
2	3	4		1	2	3	4
9 ± 3	4 ± 1	4 ± 1	169 ± 4	16 ± 1	11 ± 1	9 ± 1	10 ± 1
6 ± 2	3 ± 1	3 ± 1		9,5 ± 0,8	7,2 ± 0,5	6,3 ± 0,6	7,5 ± 0,6
7 ± 2	8 ± 1	4 ± 1	169 ± 6	7 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 1
4 ± 1	5 ± 1	3 ± 1		4,1 ± 0,6	4,9 ± 0,3	5,8 ± 0,2	5,5 ± 0,4
13 ± 7	5 ± 1	6 ± 2	172 ± 7	8 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	8 ± 1
8 ± 4	3 ± 1	4 ± 1		4,7 ± 0,6	4,9 ± 0,5	6,4 ± 0,5	5,5 ± 0,8



a 100 g de peso no início de cada dia de jejum. São também apresentadas os pesos iniciais dos ratos e as perdas de peso, em valor absoluto e em percentagem relativamente ao peso no início de cada dia de jejum.

São apresentados apenas, como se pode ver, os resultados referentes aos 4 primeiros dias de jejum. Verifica-se, com o prolongamento da experiência até à morte dos animais, que nas 24 h ou nas 48 h que a precedem há perdas muito grandes de azoto. Como a morte dos diferentes animais se deu, com períodos variáveis, a partir do 6.º dia, se assim não fizéssemos, os resultados compreenderiam essa causa de variações.

Como se pode verificar, os ratos injectados com *triamcinolona* têm perdas urinárias de azoto muito maiores do que os outros. A perda de peso destes animais é também significativamente maior, especialmente nos primeiros dias. A sobrevivência dos componentes deste Grupo não se mostrou, no entanto, inferior: os animais morreram entre o 6.º e o 9.º dias de tratamento, sem que se mostrassem diferenças entre os três Grupos.

Por outro lado, os nossos resultados demonstram que, nestas condições, a *metformina*, quando injectada em ratos, não diminui nem as perdas do azoto nem as perdas de peso, pelo que esta substância deixou de ter, relativamente à perspectiva que nos interessava, a importância que especialmente pelos estudos de MEYER *et al.*<sup>339</sup> nos parecera ter.

Veremos, a propósito da Série experimental que se segue, que também nesse estudo a influência da *metformina* se não fez sentir numa série de parâmetros estudados.

#### d) QUARTA SÉRIE

Na tentativa de conseguirmos um esquema experimental em que a gliconeogénese fosse diversamente modificada, procurámos estudar também a influência do tratamento dos animais com a *triamcinolona* e a *metformina* iniciando-o já antes do começo do período de jejum. Um grupo tratado ao mesmo tempo, mas apenas com solução de cloreto de sódio, serviu de testemunha.

Todos os animais foram injectados de 24 em 24 h, durante 4 dias; tiveram comida *ad libitum* durante os 3 primeiros dias e ficaram em jejum, apenas com acesso à água, durante as últimas 24 h que precederam o sacrifício.

As soluções foram preparadas como para as Séries anteriormente referidas.

Nesta *Série* experimental dividimos 12 ratos em 3 *Grupos*:

1.º *Grupo* — Pesos: 204, 240, 244, 267 g. Injecção diária de 1 mg/100 g, de diacetato de *triamcinolona*.

2.º *Grupo* — Pesos: 175, 221, 255, 265 g. Injecção diária de 5 mg/100 g, de cloreto de *metformina*.

3.º *Grupo* — Pesos: 179, 231, 240, 253 g. Injecção diária de 1 ml/100 g, de solução de cloreto de sódio.

A experiência foi realizada em Março de 1969.

No sangue dos animais foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxi-butirato e a glicose.

No fígado foram determinados o glicogénio, o azoto e a água. Os resultados figuram no *Quadro XVI* e na Fig. 16.

#### COMENTÁRIO

Verificámos que, durante os três dias de tratamento anteriores ao período de jejum, os ratos do 1.º *Grupo* perderam em média 24 g, enquanto que os dos 2.º e 3.º *Grupos* ganharam, também em média, respectivamente, 10 e 9 g.

O tratamento prévio não influenciou, no entanto, a perda média de peso durante as 24 h de jejum, que foi para os 1.º, 2.º e 3.º *Grupos*, respectivamente, 14, 13 e 14 g.

Verificámos que os ratos do 1.º *Grupo* apresentaram uma relação do peso do fígado para o peso do corpo significativamente mais elevada do que a dos outros; a percentagem de azoto do fígado dos ratos deste 1.º *Grupo* foi também significativamente mais baixa. Para estas diferenças contribuirá certamente no 1.º *Grupo* a altíssima concentração do glicogénio relativamente aos outros dois *Grupos*, que não apresentaram entre si diferenças significativas.

Não houve variações aparentes na percentagem de água nos diversos *Grupos*.

Como se pode verificar no *Quadro XVI* e na Fig. 16, no que respeita aos corpos cetónicos, o *Grupo* tratado com *triamcinolona* apresentou valores médios mais baixos do que os outros dois, embora no que respeita ao acetacetato as diferenças não sejam significativas.

A relação beta-hidroxi-butirato/acetacetato e a percentagem do beta-hidroxi-butirato para a soma dos dois corpos cetónicos são significativamente mais baixas no 1.º *Grupo*. A relação aparente destes valores 157

QUADRO XVI  
ESTUDOS COM ESTERÓIDES GLICONEOGÊNICOS  
E COM A METFORMINA

Condições experimentais	N.º de animais	SANGUE					Glicose
		Acetacetato	$\beta$ -hidroxi-butirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi-butirato	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butirato}}{\text{Acetacetato}} \times 100$	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butirato}}{\text{Acetacetato} + \beta\text{-hidroxi-butirato}} \times 100$	
Tratamento com							
1. <i>Triamcinolona</i>	4	0,29 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,22	2,0 $\pm$ 0,3	65,4 $\pm$ 3,4	8,03 $\pm$ 0,8
2. <i>Metformina</i>	4	0,56 $\pm$ 0,10	1,89 $\pm$ 0,08	2,46 $\pm$ 0,17	3,6 $\pm$ 0,4	77,5 $\pm$ 2,5	4,84 $\pm$ 0,1
3. Cloreto de sódio, apenas	4	0,44 $\pm$ 0,02	1,87 $\pm$ 0,31	2,31 $\pm$ 0,32	4,3 $\pm$ 0,8	80,0 $\pm$ 2,9	4,49 $\pm$ 0,1

com os valores das somas dos dois corpos cetónicos não nos deve impedir de pensar, no entanto, que tais factos possam estar relacionados com as condições metabólicas criadas pelo tratamento.

Os valores da glicemia e da concentração do glicogénio hepático aparecem com variações de sentido inverso, relativamente aos dos corpos cetónicos, altamente significativas.

Não há qualquer diferença entre o *Grupo* tratado com *metformina* e o *Grupo* tratado apenas com cloreto de sódio, no que respeita aos valores da glicose sanguínea e ao glicogénio hepático.

Quando comparamos os 3 *Grupos*, as diferenças verificadas nas concentrações dos parâmetros glicídicos documentam os conhecidos efeitos do esteróide utilizado sobre a gliconeogénese <sup>519</sup>. Especialmente no que respeita à glicemia, pode verificar-se que o tratamento com *triamcinolona*, feito nestas condições, não só impede a hipoglicemia do jejum, como também faz aparecer uma hiperglicemia. Ao contrário do que muitas vezes se vê escrito <sup>61, 63</sup>, pensamos que esta condição não deve ser chamada diabética.

Os valores encontrados no doseamento dos corpos cetónicos permitem-nos concluir que o tratamento com *triamcinolona* impede o desenvolvimento da cetose do jejum.

A flagrância destes factos é suficientemente grande para termos de ver com atitude crítica qualquer teoria que pretenda fundamentar o desenvolvimento da cetose nos processos de gliconeogénese.

4.<sup>a</sup> Série

Influência do tratamento prévio sobre as alterações metabólicas do jejum  
(Para legenda ver a do QUADRO XIII)

PESO					FÍGADO				
No 3. <sup>o</sup> dia de tratamento	Varição com o tratamento	Após 24 h de jejum	Varição com o jejum	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Água	Azoto	Glicogénio	
39 ± 13	215 ± 8	-24 ± 4	201 ± 10	-14 ± 0	7,912 ± 0,318	3,9 ± 0,2	67,2 ± 0,3	2,5 ± 0,2	417 ± 41
29 ± 20	239 ± 18	+10 ± 4	226 ± 18	-13 ± 2	5,506 ± 0,414	2,4 ± 0,1	68,5 ± 0,4	3,4 ± 0,1	17 ± 3
26 ± 16	235 ± 16	+ 9 ± 2	221 ± 17	-14 ± 2	5,440 ± 0,400	2,5 ± 0,1	67,3 ± 0,5	3,3 ± 0,2	11 ± 4

É certo que temos de entrar em consideração com as acções múltiplas dos esteróides gliconeogénicos e com a sua variabilidade de tecido para tecido. Sobre o tecido adiposo, por exemplo, os glicocorticóides têm, simultaneamente, efeitos de mobilização dos ácidos gordos não esterificados, de inibição da reesterificação dos mesmos, de inibição da captação de glicose, de inibição da oxidação da glicose, de diminuição da lipogénese <sup>124, 222</sup>, o que lhes confere um lugar diferente do das autênticas hormonas lipolíticas ou genéricamente do das outras substâncias lipolíticas. É conhecido, por outro lado, o papel que os glicocorticóides têm sobre a sensibilidade da lipase do tecido adiposo à adrenalina e sobre o metabolismo hepático dos triglicerídeos e das lipoproteínas <sup>319, 456, 492</sup>. Pode admitir-se também que os glicocorticóides possam ter uma acção directa sobre o próprio fenómeno da cetogénese.

Seja no entanto como for, não podemos é deixar de salientar a concomitância de um aumento da gliconeogénese com um efeito anti-cetogénico.

Relativamente à *metformina*, parece-nos poder concluir-se que sobre os parâmetros estudados, nas nossas condições experimentais, ela é totalmente inoperante. É difícil, aliás, compreender como J. STERNE <sup>501</sup> possa ter escrito ainda recentemente o seguinte parágrafo:

*The whole action of biguanides may be explained by an inhibition of glyconeogenesis but, as they remain experimentally active in hepatectomized animals, such a conclusion cannot be accepted without further consideration.* 159

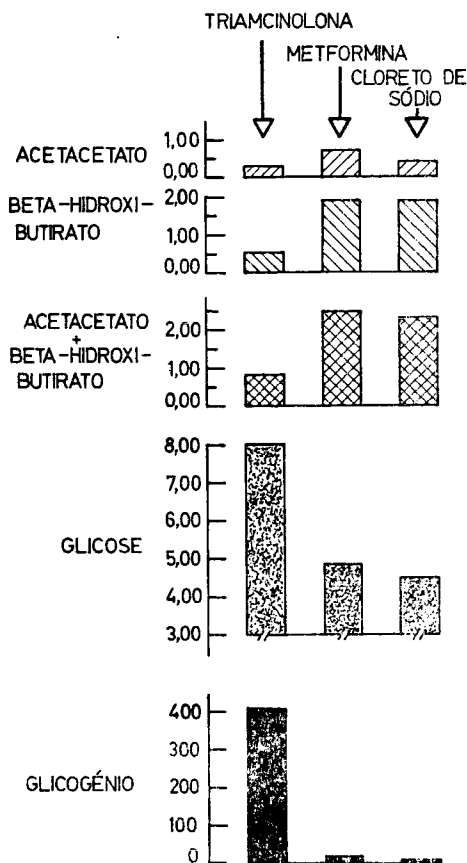


Fig. 16 — Estudos com a triamcinolona e com a metformina. 4.ª Série. Acetacetato, beta-hidroxibutirato, acetacetato + beta-hidroxibutirato e glicose, em  $\mu$ moles/ml de sangue; glicogênio, em  $\mu$ moles de glicose do glicogênio/g de fígado húmido.

Aliás o mesmo autor diz mais adiante, depois de rever alguns dados da literatura, que *under clinical conditions there is no marked effect of biguanides on nitrogen metabolism* <sup>501</sup>.

#### 4. ESTUDO DE EFEITOS DA ACTIVIDADE MUSCULAR

A actividade muscular executada pelos animais de experiência nestes estudos processou-se segundo o método que RICHTER <sup>413</sup> estudou e KREBS & YOSHIDA <sup>272</sup> aplicaram em trabalhos realizados no âmbito das suas investigações sobre a gliconeogénese.

Esta actividade desenvolveu-se durante um período de natação em banho de água com profundidade suficiente para não permitir quaisquer apoios. A água é mantida a 37 °C por recirculação rápida com passagem

através de um dispositivo termostático. A recirculação da água é feita com uma bomba elevatória que recebe a água que sai do banho quando ultrapassa um nível constante e a eleva de modo a que volte ao banho em jacto dirigido verticalmente de cima para baixo e de uma altura conveniente. Este jacto cria condições que obrigam os animais de experiência a uma movimentação constante.

Utilizámos nestas experiências 54 ratos com pesos compreendidos entre 122 e 225 g, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Fundação Calouste Gulbenkian, alimentados com a dieta semi-sintética referida, durante os quinze dias que as precederam.

Estas experiências foram realizadas nos últimos dias do mês de Junho de 1969.

Os ratos foram divididos em 3 Séries. O alojamento fez-se em conjunto, por Séries, e não individualmente.

#### a) PRIMEIRA SÉRIE

Ratos não treinados na execução da actividade muscular, a comer *ad libitum* até ao momento da experiência.

#### b) SEGUNDA SÉRIE

Ratos treinados na execução da actividade muscular, a comer *ad libitum* até ao momento da experiência. O treino foi feito de maneira progressiva, de modo a totalizar 32 h de actividade num período de 9 dias — condições referidas por KREBS & YOSHIDA <sup>272</sup> como convenientes para a indução dos processos da gliconeogénese.

No primeiro dia, os ratos tiveram um período de treino de meia hora. No segundo dia, 2 períodos de meia hora, com intervalos de 15 minutos. No terceiro e quatro dias, 4 períodos de uma hora (2 de manhã e 2 de tarde), com intervalos de 10 minutos tanto entre os dois primeiros como entre os dois últimos, e um intervalo de 2 horas, com acesso à alimentação, entre os períodos da manhã e os da tarde. No sexto e sétimo dias, dois períodos de 1,5 h, com intervalos de 15 minutos. No oitavo dia, 4 períodos de 1,5 h, como no quinto dia. No nono dia, três períodos de 1,5 h, segundo um esquema semelhante ao do 8.º dia, mas com exclusão do último período.

c) TERCEIRA SÉRIE

Ratos não treinados, com 48 h de jejum.

O período experimental da natação foi de 30 min para todas as Séries.

Na primeira Série foram sacrificados 8 animais quando os outros iniciavam o período de exercício muscular; e, sucessivamente, Grupos de 4 animais: imediatamente após o período de natação e 3 h e 6 h após o início do período de natação.

Na segunda Série foram sacrificados, com os mesmos intervalos da Série anterior, os ratos de quatro Grupos, constituídos, respectivamente, por 4, 4, 5 e 5 animais.

QUADRO XVII  
ESTUDOS DE EFEITOS DA ACTIVIDADE MUSCULAR

As concentrações de  
Os ácidos gordos são expressos em  
gênio é expresso em  $\mu$ moles de  
as médias dos resultados individuais

Condições experimentais	SANGUE						
	Acetacetato	$\beta$ -hidroxi- butirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi- butirato	$\beta$ -hidroxi- butirato Acetacetato	$\beta$ -hidroxi- butirato $\times 100$ Acetacetato + $\beta$ -droxi- butirato	Glicose	Lactato
I—Não treinados, a comer							
1. Antes	0,06 $\pm$ 0,01 (8)	0,05 $\pm$ 0,01 (8)	0,11 $\pm$ 0,03 (8)	0,9 $\pm$ 0,1 (8)	33,4 $\pm$ 5,9	5,13 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,0
2. Imediatamente após	0,05 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	2,6 $\pm$ 0,3	71,6 $\pm$ 1,5	7,14 $\pm$ 0,23	4,57 $\pm$ 0,4
3. 3 h após	0,15 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,18	1,7 $\pm$ 0,2	62,6 $\pm$ 3,3	5,31 $\pm$ 0,14	1,46 $\pm$ 0,2
4. 6 h após	0,26 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,05	1,4 $\pm$ 0,3	56,6 $\pm$ 4,8	4,92 $\pm$ 0,46	1,57 $\pm$ 0,2
II—Treinados, a comer							
1. Antes	0,09 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,03	1,9 $\pm$ 0,1	64,7 $\pm$ 1,9	6,53 $\pm$ 0,24	1,91 $\pm$ 0,1
2. Imediatamente após	0,06 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,03	3,8 $\pm$ 0,6	78,2 $\pm$ 2,7	7,86 $\pm$ 0,08	5,33 $\pm$ 1,2
3. 3 h após	0,27 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,16	1,01 $\pm$ 0,19	2,7 $\pm$ 0,3	71,5 $\pm$ 2,7	5,24 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,3
4. 6 h após	0,33 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,16	1,11 $\pm$ 0,20	2,4 $\pm$ 0,3	69,6 $\pm$ 3,1	4,77 $\pm$ 0,38	1,03 $\pm$ 0,3
III—Não treinados, em jejum							
1. Antes	1,08 $\pm$ 0,05	4,43 $\pm$ 0,82	5,51 $\pm$ 0,86	4,1 $\pm$ 0,6	79,5 $\pm$ 2,1	3,68 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,3
2. Imediatamente após	0,66 $\pm$ 0,06	2,69 $\pm$ 0,34	3,35 $\pm$ 0,41	4,1 $\pm$ 0,1	80,2 $\pm$ 0,6	3,79 $\pm$ 0,11	4,84 $\pm$ 0,3
3. 3 h após	1,02 $\pm$ 0,13	5,38 $\pm$ 0,49	6,40 $\pm$ 0,60	5,3 $\pm$ 0,5	84,1 $\pm$ 1,1	3,40 $\pm$ 0,08	1,19 $\pm$ 0,3
4. 6 h após	1,00 $\pm$ 0,15	3,87 $\pm$ 0,38	4,87 $\pm$ 0,38	3,9 $\pm$ 0,8	79,3 $\pm$ 2,9	3,62 $\pm$ 0,04	1,95 $\pm$ 0,3

Na terceira Série todos os Grupos tiveram um mesmo número de animais (4) e foram sacrificados também com os intervalos das Séries anteriores.

Cada Série de experiências foi realizada num dia. Todas as experiências começaram à mesma hora (9 h).

No sangue destes animais foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxibutirato, a glicose, o lactato e o piruvato, e no plasma foram titulados também os ácidos gordos não esterificados.

No fígado foram determinados o glicogénio, o azoto e a água.

Os resultados obtidos são apresentados no Quadro XVII e nas Figs. 17, 18, 19 e 20.

acetacetato, do beta-hidroxibutirato, da glicose, do lactato e do piruvato são expressas em  $\mu$ moles/ml de sangue.  $\mu$ Eq/ml de plasma. A água e o azoto são expressos em percentagem do peso do fígado. O glicogénio do glicogénio/g de fígado húmido. Os pesos são expressos em gramas. Os valores apresentados exprimem obtidos em cada Grupo ( $\pm$  S. E. M.). O número de animais de cada Grupo ou é 4 ou está indicado entre parêntesis.

PLASMA				FÍGADO				
Piruvato	$\frac{\text{Lactato}}{\text{Piruvato}}$	Ácidos gordos	Peso	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Água	Azoto	Glicogénio
08 $\pm$ 0,00	14,3 $\pm$ 0,6	410 $\pm$ 97 (8)	185 $\pm$ 6	7,373 $\pm$ 0,417	4,0 $\pm$ 0,1	69,1 $\pm$ 0,1	2,01 $\pm$ 0,15	430 $\pm$ 12
16 $\pm$ 0,00	29,4 $\pm$ 2,5	1104 $\pm$ 157	212 $\pm$ 2	7,655 $\pm$ 0,529	3,6 $\pm$ 0,2	69,4 $\pm$ 0,1	2,25 $\pm$ 0,24	263 $\pm$ 81
10 $\pm$ 0,01	14,9 $\pm$ 1,3	1040 $\pm$ 140	191 $\pm$ 5	6,494 $\pm$ 0,153	3,4 $\pm$ 0,0	68,7 $\pm$ 0,1	2,95 $\pm$ 0,37	237 $\pm$ 59
11 $\pm$ 0,02	14,2 $\pm$ 1,0	1122 $\pm$ 102	184 $\pm$ 9	5,834 $\pm$ 0,374	3,2 $\pm$ 0,1	69,4 $\pm$ 0,1	2,82 $\pm$ 0,10	129 $\pm$ 29
11 $\pm$ 0,02	18,6 $\pm$ 2,4	862 $\pm$ 96	201 $\pm$ 3	7,498 $\pm$ 0,189	3,7 $\pm$ 0,2	71,4 $\pm$ 0,1	2,78 $\pm$ 0,29	122 $\pm$ 27
24 $\pm$ 0,03	23,4 $\pm$ 3,0	1076 $\pm$ 110	210 $\pm$ 7	7,939 $\pm$ 0,158	3,8 $\pm$ 0,1	73,1 $\pm$ 1,2	2,87 $\pm$ 0,09	115 $\pm$ 44
05 $\pm$ 0,01	16,8 $\pm$ 2,2	1445 $\pm$ 201	188 $\pm$ 9	6,687 $\pm$ 0,242	3,6 $\pm$ 0,2	70,8 $\pm$ 0,7	3,37 $\pm$ 0,36	87 $\pm$ 14
06 $\pm$ 0,01	18,5 $\pm$ 1,8	1609 $\pm$ 252	176 $\pm$ 10	6,112 $\pm$ 0,435	3,6 $\pm$ 0,2	70,3 $\pm$ 0,6	4,13 $\pm$ 0,38	48 $\pm$ 25
12 $\pm$ 0,02	7,9 $\pm$ 0,4	1229 $\pm$ 72	162 $\pm$ 3	4,371 $\pm$ 0,121	2,7 $\pm$ 0,1	68,0 $\pm$ 0,5	2,75 $\pm$ 0,23	35 $\pm$ 17
45 $\pm$ 0,03	10,8 $\pm$ 0,9	1517 $\pm$ 111	184 $\pm$ 1	4,550 $\pm$ 0,130	2,5 $\pm$ 0,1	68,2 $\pm$ 0,3	1,92 $\pm$ 0,28	14 $\pm$ 5
09 $\pm$ 0,02	13,2 $\pm$ 6,7	1579 $\pm$ 101	181 $\pm$ 11	5,041 $\pm$ 0,355	2,8 $\pm$ 0,1	66,4 $\pm$ 0,5	2,60 $\pm$ 0,26	6 $\pm$ 2
06 $\pm$ 0,02	32,5 $\pm$ 6,1	1600 $\pm$ 167	140 $\pm$ 11	4,132 $\pm$ 0,311	3,0 $\pm$ 0,2	68,0 $\pm$ 0,3	2,88 $\pm$ 0,30	20 $\pm$ 12



Como se pode ver (Fig. 17), as concentrações do lactato e do piruvato sobem durante o período de actividade muscular e apresentam valores da ordem dos valores base às 2,5 h e 5,5 h depois de terminado.

Quanto ao lactato, parece não haver variações significativas de *Série* para *Série* no que respeita à evolução dos perfis das suas concentrações através do tempo. É de notar, no entanto, que os animais treinados não mostram nestas experiências níveis inferiores aos não treinados, das outras *Séries*.

Já relativamente ao piruvato, verificámos que os ratos em jejum apresentam valores que os distinguem dos outros.

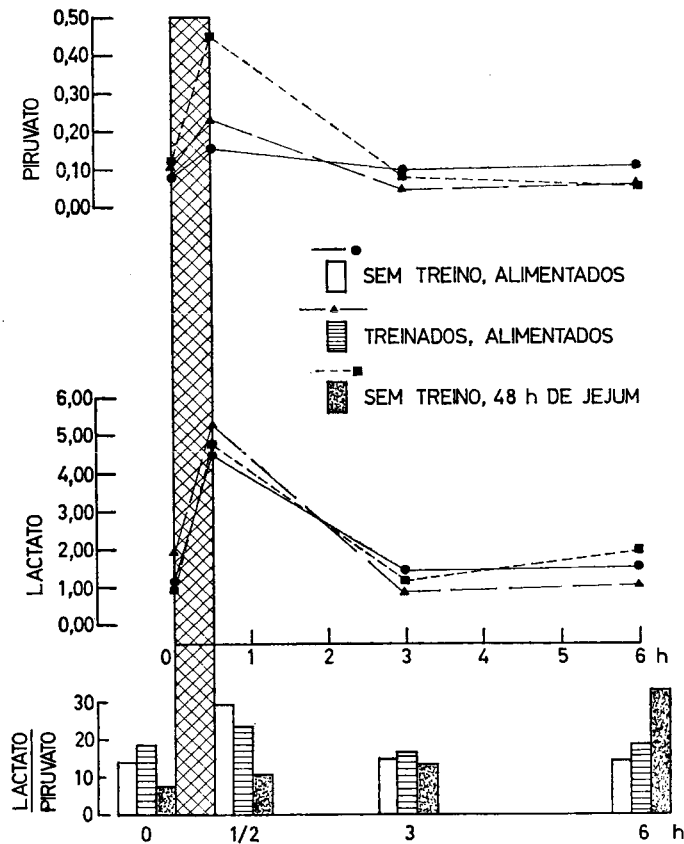


Fig. 17 — Estudo de efeitos da actividade muscular. Piruvato e lactato, em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue.

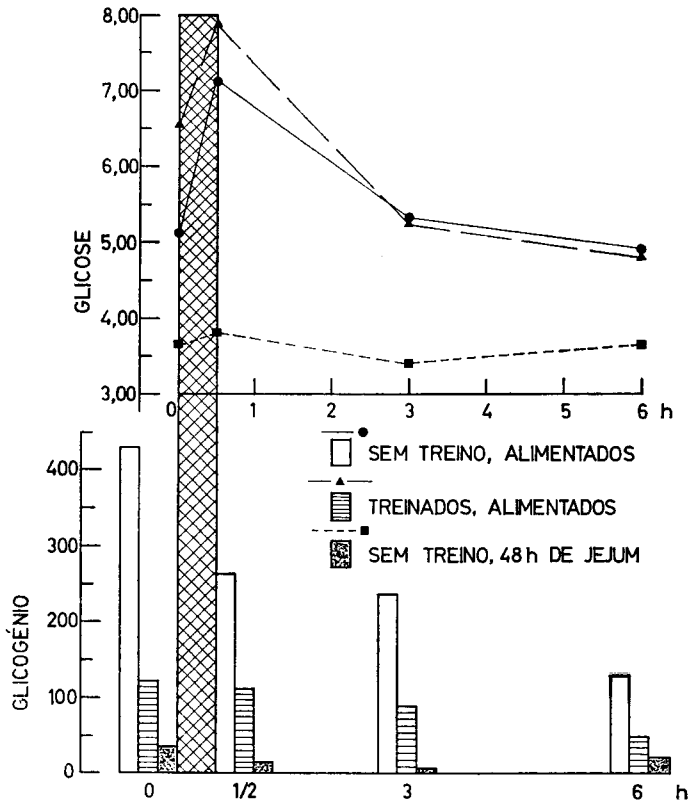


Fig. 18 — Estudo de efeitos da actividade muscular. Glicose, em  $\mu$ moles/ml de sangue; glicogénio, em  $\mu$ moles de glicose do glicogénio/g de fígado húmido.

No que se refere à relação das concentrações lactato/piruvato, verificámos que a sua evolução é diferente quando se comparam as duas primeiras com a última *Série*: nas primeiras, a relação, que é mais alta no fim do período de actividade, desce e depois mantém-se nas horas seguintes; na última *Série*, os valores continuam a subir nas horas seguintes.

Nos ratos treinados parece haver com o esforço uma subida menor desta relação do que nos ratos também alimentados mas não treinados.

Relativamente aos parâmetros glicídicos verificámos que os valores base diferem (Fig. 18) e que surpreendentemente os ratos treinados apresentam valores glicémicos médios superiores aos dos não treinados e alimentados; o valor do glicogénio hepático é significativamente mais elevado nos primeiros, sem que haja diferença na porção ponderal do fígado em relação ao peso do corpo.

Em todas as *Séries* há subidas glicémicas durante o esforço, embora os valores médios nos ratos em jejum, que têm valores base muito baixos, manifestem apenas essa tendência.

Nos resultados obtidos às 3 e 6 h nas duas primeiras *Séries*, patenteia-se uma tendência semelhante, com valores semelhantes. É, no entanto, de notar que após o termo do esforço os ratos não treinados não apresentam ainda valores inferiores aos que se observam antes do esforço.

A queda dos valores do glicogénio com o esforço parece ser menor nos ratos treinados do que nos ratos alimentados não treinados.

Os resultados obtidos com os ratos treinados, que apresentam valores glicémicos mais altos, sugerem que o *pool* glicídico nestas condições possa ser menor e mais estável.

Os parâmetros estudados nada nos permitem, no entanto, concluir relativamente às velocidades da gliconeogénese, dado que não determinámos as velocidades de síntese e de utilização da glicose e do glicogénio no organismo destes animais.

As subidas glicémicas e os decréscimos das concentrações glicogénicas podem ser talvez explicados fundamentalmente ou principalmente como efeitos adrenérgicos, o que nos é sugerido pelos dados da literatura <sup>110, 172, 236</sup>.

A subida glicémica observada nos ratos treinados, que é da mesma ordem da verificada nos ratos alimentados não treinados, acompanhada de uma queda da concentração do glicogénio muito menor do que a destes outros animais, sugere variações na utilização periférica da glicose e variações na velocidade da gliconeogénese.

Parece-nos que, neste aspecto, o perfil obtido com ratos em jejum possa ter subjacente a mesma problemática.

Todos estes pontos necessitam de esclarecimentos ulteriores.

As variações da acidemia gorda observadas com a actividade muscular (Fig. 19) são aparentemente do mesmo tipo nas três *Séries* experimentais.

Apesar de os níveis base de cada *Série* serem diferentes, em todas se verifica uma subida da acidemia gorda com o esforço.

A interpretação anterior relativamente ao mecanismo das subidas glicémicas é também compatível com este facto <sup>110, 237</sup>; ambas as variações podem ser efeitos adrenérgicos.

Nos outros dois tempos explorados, os mais tardios, a acidemia gorda continua a subir na *Série* dos ratos treinados, enquanto que nas duas outras *Séries* se verifica uma estabilização nos valores observados imediatamente após a actividade muscular.

Relativamente aos parâmetros acima apontados, reconhecamos que  
166 a subida da concentração dos ácidos gordos plasmáticos, às 3 e 6 h,

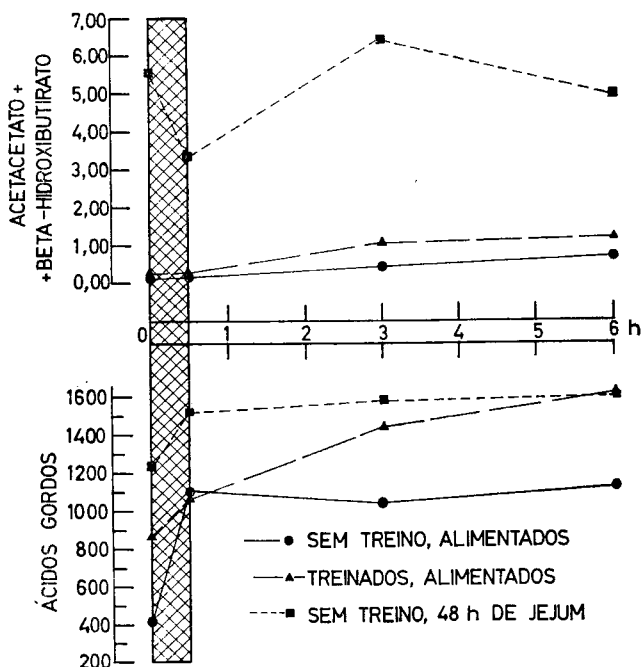


Fig. 19 — Estudo de efeitos da actividade muscular. Acetacetato + beta-hidroxibutirato, em  $\mu$ moles/ml de sangue; ácidos gordos, em  $m\mu$ Eq/ml de plasma.

se verifica com variações mínimas nos valores do glicogénio, enquanto que a estabilização nas outras Séries, em valores altos para os ratos em jejum e em valores não tão altos para os ratos alimentados, se verifica para os primeiros praticamente com ausência de variações do glicogénio e para os segundos com a sua queda progressiva.

Note-se ainda que a subida da acidemia gorda com o esforço na Série dos ratos treinados é paralela à da Série dos ratos em jejum, enquanto que é muito maior na dos ratos não treinados e alimentados, onde também se parte de valores mais baixos.

Os parâmetros cuja exploração mais nos interessava eram, no entanto, como é óbvio, os respeitantes aos corpos cetónicos; a exploração dos outros destinava-se, fundamentalmente, a investigar as possíveis correlações.

Ora, quanto aos corpos cetónicos, devemos referir, em primeiro lugar, que as condições das nossas experiências não são as propícias para a exploração do chamado fenómeno de COURTICE-DOUGLAS<sup>83, 223, 224, 225, 375</sup>. Porém, a consideração do perfil apresentado no tempo pela concentra-

ção dos corpos cetónicos nestas experiências tem, como veremos, muito interesse.

Nas duas primeiras *Séries* verificámos que, apesar das variações encontradas nos parâmetros glicídicos e nas concentrações dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados, os valores dos corpos cetónicos antes e depois do esforço praticamente não diferem e a sua subida às 3 e 6 h é lenta e possivelmente relacionada com a privação alimentar através do tempo.

Note-se, no entanto, que, apesar de serem muito pequenas as diferenças nas concentrações dos corpos cetónicos, as dos ratos treinados são as maiores e que parecem corresponder, também às 3 e 6 h de estudo, às concentrações mais elevadas dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados.

Ao concluirmos o trabalho com as duas primeiras *Séries*, a observação dos perfis das concentrações sanguíneas dos principais substratos energéticos na economia do organismo mostrou-nos, então: variações do mesmo sentido da glicemia e da acidemia gorda (com variações inversas do glicogénio hepático) e estabilização das concentrações dos corpos cetónicos. Embora a subida da glicemia possa ser explicada pela descida do glicogénio hepático, estas observações vieram tornar patente:

- a) que o conhecimento da concentração das substâncias no sangue não basta para inferir da sua participação no metabolismo;
- b) que o sistema dos substratos respiratórios, embora possa, noutras condições, sofrer mudanças internas correlativas (e até causais), nestas condições apresenta mudanças que devem ser explicadas por influências externas ao próprio sistema, possivelmente de natureza hormonal e provavelmente adrenérgica.

Aquela observação e estas conclusões tornaram desejável o estudo da terceira *Série*, em que partimos de uma base de concentrações elevadas de ácidos gordos e de corpos cetónicos e muito baixas de glicose e glicogénio.

Foi então aqui que, para além dos aspectos já analisados, nós pudemos verificar um comportamento completamente diferente, em relação às *Séries* anteriores: uma queda da concentração dos corpos cetónicos com a actividade muscular (Figs. 19 e 20).

Estas observações sugerem-nos os seguintes comentários:

- Embora com todas as reservas anteriormente expendidas relativamente à participação dos combustíveis quando se não

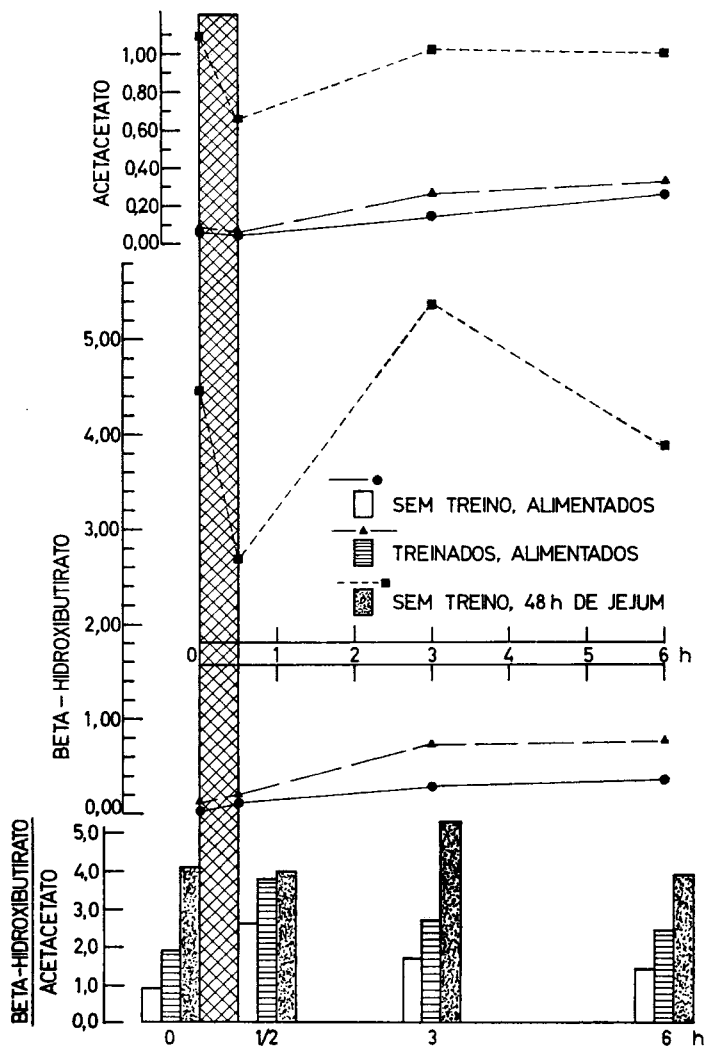


Fig. 20 — Estudo de efeitos da actividade muscular. Acetacetato e beta-hidroxiubutirato, em  $\mu$ moles/ml de sangue.

conhecem as velocidades de produção e consumo (*turnover*) das substâncias, fica-nos a impressão de que os corpos cetônicos constituem substratos de importância *major* durante o esforço. Se assim for, fica a descoberto todo o problema da necessidade de uma regulação da tomada selectiva e/ou da utilização dos corpos cetônicos, tanto como está patente em todas as teorias a necessidade de uma regulação da produção.

- A conclusão de que as variações internas dos sistemas dos substratos respiratórios não são rigorosamente interdependentes torna-se muito evidente.
- O abaixamento da concentração dos corpos cetônicos no sangue, quando aí se verifica um aumento da concentração dos ácidos gordos, mostra-nos claramente que as concentrações destas substâncias não são necessariamente e obrigatoriamente interdependentes. Sem recorrermos à utilização de substâncias estranhas à própria situação metabólica, como FOSTER<sup>135</sup> o faz com a injeção de glicose ou de insulina, e o grupo de KREBS<sup>570</sup> com glicose, glicerol e di-hidroxiacetona para obter o efeito oposto, podemos dissociar as duas grandezas.
- Tem interesse também comparar entre si as três Séries, no que respeita ao diverso comportamento dos parâmetros ácidos gordos plasmáticos e corpos cetônicos sanguíneos. Podemos concluir facilmente, pela observação da Fig. 19, que enquanto a acidemia gorda dos animais alimentados e treinados evoluciona às 3 e 6 horas de observação para valores que se aproximam às 3 horas e coincidem às 6 horas com os dos animais em jejum, a concentração sanguínea dos corpos cetônicos nestes animais mantém-se sempre muito próxima da dos animais alimentados e sem treino e muitíssimo longe da dos animais em jejum. Esta observação é suficiente para levantar a necessidade de outros processos de regulação que não o das correlações internas do sistema dos principais substratos respiratórios.

Um outro aspecto que interessa analisar diz respeito à relação beta-hidroxibutirato/acetato.

Poderemos ver (Fig. 20) que as variações desta relação são paralelas nas duas primeiras Séries de animais: o valor da relação sobe com o esforço e diminui posteriormente de um modo lento, não atingindo às 6 horas os valores do tempo zero.

Na terceira Série, a evolução é diferente: o valor da relação mantém-se com o esforço, sobe quando o beta-hidroxibutirato atinge o valor máximo e desce às 6 horas. Este último aspecto, tomado isoladamente, poderia fazer pensar que a relação varia no mesmo sentido das variações do beta-hidroxibutirato, mas a observação conjunta das duas Séries mostra-nos que a inferência não é válida e que essa não pode ser a explicação ou pelo menos a única explicação. Salienta-se a proximidade

dos valores numéricos da relação nos animais da segunda e da terceira *Séries* logo após o esforço, com valores absolutos de corpos cetónicos tão diferentes.

O outro comentário que se nos afigura necessário é o que diz respeito à comparação das relações dos dois sistemas redox: beta-hidroxibutirato/acetacetato e lactato/piruvato.

Consideradas em si mesmas nos diversos tempos e não no seu evoluir, verifica-se que, com excepção do que se encontra às 6 horas, as relações lactato/piruvato mais baixas correspondem às relações beta-hidroxibutirato/acetacetato mais altas, o que diferencia os estados metabólicos. O estado metabólico às 6 horas é também diferente pela coincidência no sentido da variação.

A relação inversa destes sistemas redox, na medida em que dependem de actividades enzimáticas situadas em locais celulares diferentes <sup>119, 120</sup> não põe em causa as considerações de BÜCHER & KLINGENBERG <sup>54</sup> e BERRY, WILLIAMSON & WILSON <sup>33</sup>, antes mais as valorizam, e revelam o interesse dos fenómenos de membrana na regulação metabólica.

Além disso, verificámos que cada uma das relações tem uma evolução quase paralela quando comparamos as duas primeiras *Séries* experimentais, embora na Fig. 17 se verifique que as linhas que unem os valores da relação lactato/piruvato se cruzam quando se passa dos valores apresentados antes do esforço para os valores que apresentam imediatamente depois.

O facto mais estranho que se nos depara é o do aumento progressivo, na terceira *Série* experimental, da relação lactato/piruvato nos tempos observados. Tal facto necessita de ser ulteriormente estudado.

Estes dados sugerem-nos uma nota relativa às oscilações dos sistemas redox no estado de jejum: é possível que o valor mais alto da relação beta-hidroxibutirato/acetacetato, às 3 horas, corresponda a uma oscilação com um período mais longo do que o correspondente nos animais alimentados; a subida progressiva da relação lactato/piruvato traduziria a extensão desse período.

HOHORST *et al.* <sup>207</sup>, no estudo do jejum e do hipotireoidismo, encontram valores da relação lactato/piruvato semelhantes a estes que nós encontrámos nos animais com 6 horas jejum.

Tais autores também se surpreendem com o facto, mas não propõem qualquer interpretação. Se o fenómeno de base estiver relacionado com o estado nutricional ou energético do organismo, é possível que no jejum o esforço se venha a reflectir à distância por um efeito de exaustão que resulte num aumento progressivo da carência.

Quanto a nós, e relativamente aos corpos cetónicos, estas observações e considerações situam-se num campo onde estão encobertas mas 171



actuanes as próprias funções dos corpos cetónicos na economia do organismo. Em novas investigações havemos de voltar ao assunto.

Este esquema situa-se também no âmbito de toda a problemática do conhecido efeito benéfico da actividade muscular sobre a homeostasia glicídica na diátese diabética <sup>162, 227, 397, 430, 435, 558</sup>, uma situação que, como a de jejum, se caracteriza por uma actualização intensiva dos fenómenos metabólicos da gliconeogénese, mas tal problemática não é abrangida agora pela perspectiva desta dissertação.

##### 5. ESTUDO DE EFEITOS DE UMA DIETA GORDA E DA TRIAMCINOLONA

Utilizámos nestas experiências 31 ratos provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Fundação Calouste Gulbenkian, alimentados nos 15 dias que precederam o período experimental com a dieta semi-sintética referida.

Estes ratos foram divididos em 4 *Grupos*. Os animais do 1.º e do 2.º *Grupo* continuaram a ser alimentados durante o período experimental de 4 dias com a dieta semi-sintética. Aos ratos do 3.º e do 4.º *Grupo* foi fornecida gordura de porco fumada durante o mesmo período, como no estudo de WIELAND & WEISS <sup>562</sup> que foi o trabalho que nos levantou em parte a problemática que desejávamos abordar.

Estas experiências foram realizadas nos primeiros dias de Fevereiro de 1970.

A partir do início da experiência, o tratamento feito aos animais foi o seguinte:

- Os ratos do 1.º *Grupo* (8 ratos), alimentados com a dieta semi-sintética, foram injectados intraperitonealmente, às 48 horas e 72 horas do período experimental, com 1 ml/100 g de peso, de uma solução de cloreto de sódio a 9 g/l.
- Os ratos do 2.º *Grupo* (8 ratos), alimentados com a dieta semi-sintética, foram injectados intraperitonealmente com diacetato de triamcinolona (1 mg/100 g de peso, em solução de cloreto de sódio a 9 g/l para dar 1 mg/1 ml), às 48 horas e 72 horas do período experimental.
- Os ratos do 3.º *Grupo* (7 ratos), alimentados com gordura, foram injectados às 48 horas e 72 horas, como os do 1.º *Grupo*.
- Os ratos do 4.º *Grupo* (8 ratos), alimentados com gordura, foram injectados às 48 horas e 72 horas com diacetato de triamcinolona, como os do 2.º *Grupo*.

A comida foi pesada diàriamente.

Todos os animais foram sacrificados ao fim das 96 horas de observação e tratamento.

No sangue de todos os ratos utilizados neste esquema foi doseada a glicose e no sangue dos 4 primeiros ratos de cada *Grupo* foram doseados também o acetacetato e o beta-hidroxibutirato; nestes mesmos ratos também foram titulados os ácidos gordos plasmáticos.

No fígado de todos os animais foram determinados o glicogénio, o azoto e a água.

Os resultados obtidos figuram nos *Quadros XVIII* e *XIX* e na Fig. 21.

#### COMENTÁRIO

Como pode ser visto no *Quadro XVIII*, durante os primeiros três dias, nesta experiência, os ratos alimentados com dieta semi-sintética e injectados com *triamcinolona* consumiram quantidades de comida semelhantes às consumidas pelos ratos alimentados com a mesma dieta e injectados apenas com cloreto de sódio. No entanto, no 4.º dia de tratamento, os primeiros consumiram menos: estatisticamente, a diferença das médias no 4.º dia é altamente significativa ( $P < 0,001$ ), enquanto que a diferença que se verifica nos pesos dos animais dos dois grupos não o é.

Os ratos que consomem a dieta gorda, tal como acontecia no trabalho de WIELAND & WEISS<sup>562</sup>, comem pequenas quantidades e irregularmente. À influência da ingestão de gordura sobre os processos metabólicos poder-se-á somar, então, a influência de um *deficit* calórico.

No que respeita à percentagem do peso do fígado em relação ao peso do corpo, pode ver-se no *Quadro XIX* que os ratos alimentados com a dieta semi-sintética e tratados com *triamcinolona* apresentam valores mais altos do que os dos outros *Grupos* — o que aconteceu também em todas as *Séries* anteriores, quando o glicogénio hepático tinha uma maior concentração.

Relativamente à percentagem de água do fígado, os ratos alimentados com dieta gorda apresentam uma relação nitidamente diminuída.

A percentagem de azoto é maior no fígado dos animais alimentados com a dieta gorda e tratados com *triamcinolona*.

Para nós tem interesse muito particular o que respeita às concentrações das substâncias de que apresentamos os valores na Fig. 21, isto é, glicose, acetacetato e beta-hidroxibutirato do sangue, ácidos gordos não esterificados do plasma, e glicogénio hepático.

Relativamente à relação beta-hidroxibutirato/acetacetato, devemos notar que os valores mais baixos se observam no 1.º *Grupo* e que entre 173

## QUADRO XVIII

## ESTUDO DE EFEITOS DA MINISTRAÇÃO DE UMA DIETA GORDA E DE TRIAMCINOLONA

Os valores exprimem as médias dos resultados individuais obtidos em cada *Grupo*, em gramas ( $\pm$  S. E. M.).

N.º de animais	1.º dia		2.º dia		3.º dia		4.º dia	
	Inicial	Peso No fim do 1.º dia	Consumo de dieta	Pesos	Consumo de dieta	Pesos	Consumo de dieta	Pesos
<b>1.º Grupo</b>								
Ratos alimentados com a dieta semi-sintética; injeção de cloreto de sódio								
8	158 $\pm$ 4	169 $\pm$ 5	13 $\pm$ 1	164 $\pm$ 4	14 $\pm$ 1	167 $\pm$ 5	16 $\pm$ 1	172 $\pm$ 6
								17 $\pm$ 1
<b>2.º Grupo</b>								
Ratos alimentados com dieta semi-sintética; injeção de triamcinolona								
8	160 $\pm$ 6	171 $\pm$ 6	13 $\pm$ 1	168 $\pm$ 7	16 $\pm$ 1	160 $\pm$ 5	14 $\pm$ 1	158 $\pm$ 5
								11 $\pm$ 1
<b>3.º Grupo</b>								
Ratos alimentados com gordura; injeção de cloreto de sódio								
7	163 $\pm$ 5	160 $\pm$ 6	*	160 $\pm$ 7	9 $\pm$ 3	157 $\pm$ 7	5 $\pm$ 1	154 $\pm$ 7
								3 $\pm$ 3
<b>4.º Grupo</b>								
Ratos alimentados com gordura; injeção de triamcinolona								
8	168 $\pm$ 6	167 $\pm$ 6	4 $\pm$ 2	164 $\pm$ 7	17 $\pm$ 1	154 $\pm$ 6	**	151 $\pm$ 6
								2 $\pm$ 2

\* Só dois comeram, um 7 e outro 3 g.

\*\* Só dois comeram, um 14 e outro 15 g.

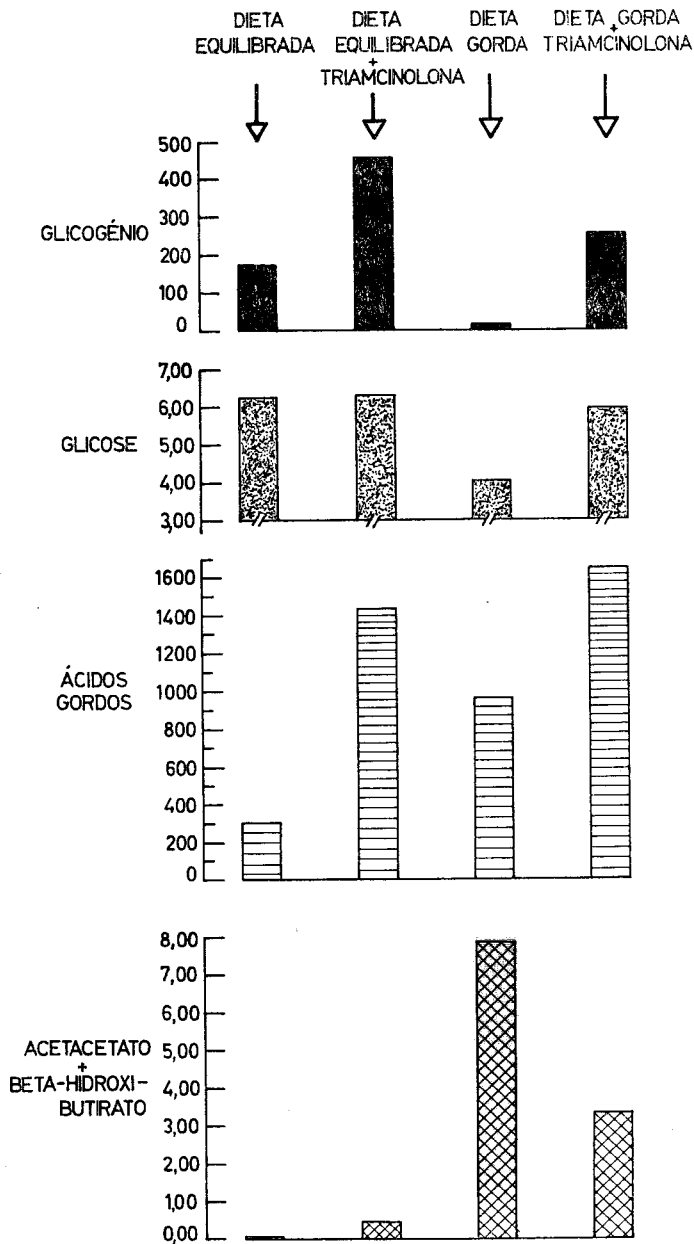


Fig. 21 — Estudo de efeitos de uma dieta gorda e da *triamcinolona*. Acetacetato, beta-hidroxibutirato e glicose, em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue; ácidos gordos, em  $\text{m}\mu\text{Eq/ml}$  de plasma; glicogênio, em  $\mu\text{moles}$  de glicose do glicogênio/g de fígado húmido.

QUADRO XIX

ESTUDO DE EFEITOS DA MINISTRAÇÃO DE UMA DIETA GORDA E DE *TRIAMCINOLONA*

As concentrações de ácidos gordos é expressa em  $\mu$ moles de glicose por ml de sangue. Os valores exprimem as médias dos resultados, excepto quando indicado em

Condições experimentais	SANGUE					Glicose
	Acetacetato	$\beta$ -hidroxi-butirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi-butirato	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butirato}}{\text{Acetacetato}}$	$\frac{\beta\text{-hidroxi-butirato}}{\text{Acetacetato} + \beta\text{-hidroxi-butirato}} \times 100$	
Dieta n.º 1	$0,04 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$	$1,8 \pm 0,7$	$57,6 \pm 7,9$	$6,29 \pm 0,10$
Dieta n.º 1 + <i>Triamcinolona</i>	$0,10 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,18$	$0,44 \pm 0,23$	$3,2 \pm 0,6$	$74,2 \pm 4,4$	$6,30 \pm 0,21$ (8)
Dieta gorda	$1,99 \pm 0,28$	$5,84 \pm 0,86$	$7,83 \pm 1,30$	$2,9 \pm 0,1$	$74,5 \pm 0,9$	$4,03 \pm 0,08$
Dieta gorda + <i>Triamcinolona</i>	$0,92 \pm 0,18$	$2,45 \pm 0,49$	$3,37 \pm 0,67$	$2,6 \pm 0,0$	$72,5 \pm 0,4$	$5,96 \pm 0,20$ (8)

os outros Grupos não há variações significativas. Em face das grandes variações de concentração dos dois corpos cetónicos, seria de esperar, se o valor da relação fosse determinado pelo valor absoluto de qualquer dos corpos cetónicos estudados ou da sua soma, que esta relação tivesse também grandes variações, o que se não verifica.

Compararemos seguidamente os efeitos das variáveis estudadas:

- a) Comparando, entre si, no que respeita aos parâmetros representados na Fig. 21, os dois primeiros Grupos que consumiram a dieta semi-sintética, podemos verificar que a *triamcinolona* induziu aumento de concentração do glicogénio hepático, dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados e dos corpos cetónicos, quer do acetacetato quer do beta-hidroxibutirato, e não induziu modificações aparentes da glicemia.
- b) Comparando entre si os dois últimos Grupos, que consumiram a dieta gorda, podemos verificar que a *triamcinolona* induziu aumento da concentração do glicogénio hepático e dos ácidos gordos plasmáticos e que a glicose sanguínea acompanha nas

acetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose são expressas em  $\mu$ moles/ml de sangue; a dosagem em  $\mu$ Eq/ml de plasma. A água e o azoto são expressos em percentagem do peso do fígado. O glicogénio do glicogénio/g de fígado húmido. Os pesos são expressos em gramas. Os valores apresentados são os resultados individuais obtidos em cada Grupo (+ S. E. M.). Cada Grupo é constituído por 4 animais, e parêntesis.

PLASMA	PESO		FÍGADO			
	Peso	Peso do fígado / Peso do rato $\times 100$	Água	Azoto	Glicogénio	
313 $\pm$ 64	172 $\pm$ 6 (8)	6,533 $\pm$ 0,355 (8)	3,7 $\pm$ 0,2 (8)	68,2 $\pm$ 0,3 (8)	2,89 $\pm$ 0,09 (8)	177 $\pm$ 30 (8)
1433 $\pm$ 309	158 $\pm$ 5 (8)	8,125 $\pm$ 0,463 (8)	5,1 $\pm$ 0,2 (8)	67,6 $\pm$ 0,3 (8)	2,87 $\pm$ 0,15 (8)	457 $\pm$ 18 (8)
970 $\pm$ 66	154 $\pm$ 7 (7)	5,016 $\pm$ 0,245 (7)	3,2 $\pm$ 0,1 (7)	61,7 $\pm$ 1,8 (7)	2,96 $\pm$ 0,09 (7)	12 $\pm$ 4 (7)
1643 $\pm$ 78	151 $\pm$ 6 (8)	5,250 $\pm$ 0,235 (8)	3,4 $\pm$ 0,1 (8)	67,2 $\pm$ 0,6 (8)	3,70 $\pm$ 0,17 (8)	256 $\pm$ 15 (8)

suas variações as do glicogénio hepático, enquanto que os corpos cetónicos, quer o acetato quer o beta-hidroxibutirato, aparecem com concentrações muito diminuídas nos animais tratados pela *triamcinolona*.

Os efeitos concordantes da ministração de *triamcinolona* nos dois Grupos são, portanto, os que respeitam ao glicogénio hepático e aos ácidos gordos.

É necessário ter em conta que nos ratos tratados com *triamcinolona* e que comem a dieta semi-sintética o consumo da alimentação nas 24 horas que precederam o sacrifício foi significativamente inferior ao dos outros; no entanto, parece-nos que o aumento da concentração plasmática dos ácidos gordos não esterificados não pode ser atribuído à deficiência glicídica, quer porque a reversão da libertação dos ácidos gordos se faz *in vivo* com a ministração de quantidades mínimas de glicose <sup>64, 169</sup> quer também porque os parâmetros glicídicos não se nos mostram com valores diminuídos nestes animais: há aumento da concentração do glicogénio hepático e há manutenção do nível glicémico.

O aumento da concentração plasmática dos ácidos gordos parece ser, portanto, um efeito da ministração do esteróide, o que está de acordo com os dados da literatura <sup>166, 222, 409</sup>. Os efeitos divergentes da ministração de *triamcinolona*, nos dois *Grupos* a que foi ministrada, verificam-se, apenas, no que respeita à concentração sanguínea dos corpos cetónicos.

Um efeito diferente, quando comparamos os mesmos *Grupos*, é o que diz respeito ao aumento glicémico nos ratos que consomem gordura. Note-se, porém, que os valores de base que servem de comparação neste último caso são demasiadamente baixos, a traduzir, certamente, o jejum glicídico. Note-se também que o efeito da *triamcinolona* é o de modificar os níveis glicémicos e os do glicogénio hepático assim baixos, nestas condições de jejum glicídico, elevando-os para os que se observam nos animais alimentados *ad libitum* com uma dieta equilibrada.

- c) Comparando entre si o 1.<sup>o</sup> e o 3.<sup>o</sup> *Grupos* verificamos que a ministração da dieta gorda tem efeitos qualitativos globais semelhantes aos do jejum. É, no entanto, aparente que a cetose dos animais do 3.<sup>o</sup> *Grupo* possa ser quantitativamente mais importante do que a dos animais em jejum que tenham consumido previamente uma dieta equilibrada. Embora as experiências tivessem sido realizadas em épocas do ano diferentes, comparando a 3.<sup>a</sup> *Série* das experiências sobre o jejum (pág. 130) com este 3.<sup>o</sup> *Grupo*, verificámos que, aqui, ratos da mesma proveniência apresentam valores médios da acidemia gorda muito superiores e valores médios de corpos cetónicos inferiores.
- d) Comparando o 2.<sup>o</sup> e 4.<sup>o</sup> *Grupos* entre os quais, embora possa haver diferente grau de deficiência calórica, a variável mais importante é a qualidade da dieta, verificamos que nos animais alimentados com dieta gorda os parâmetros glicídicos se mostram com valores diminuídos, ainda que os da glicemia apenas ligeiramente; e verificámos que a concentração dos ácidos gordos plasmáticos se mostra aumentada e que este aumento se acompanha de aumento da concentração dos corpos cetónicos. Nestas condições tais efeitos parecem poder ser atribuídos à qualidade da dieta e às diferenças calóricas.
- e) Quanto às variações verificadas em cada um dos *Grupos* tratados com *triamcinolona*, relativamente aos termos de com-

paração com a mesma dieta, verificamos que, no tocante ao glicogénio hepático e aos ácidos gordos plasmáticos não esterificados, em ambos os pares houve subida; que, relativamente à glicemia, ela subiu no 4.º Grupo (quando comparado com o 3.º Grupo) enquanto que os valores são os mesmos para o 1.º e 2.º Grupos. Quanto aos corpos cetónicos, as variações foram inversas, isto é, subiram do 1.º para o 2.º e desceram do 3.º para o 4.º.

Estas últimas diferenças merecem atenção especial.

1.º — Comparando o 1.º e 2.º Grupos, relativamente ao glicogénio e glicemia, observamos que, para os mesmos valores de glicemia, a concentração de glicogénio hepático é maior nos ratos tratados com *triamcinolona*. Este efeito, embora possa ser atribuído vagamente a um factor de *capacidade de armazenamento* <sup>143</sup>, levanta os problemas quer de uma possível acção específica do esteróide sobre o sistema de síntese do glicogénio <sup>357</sup> quer de uma acção secundária do mesmo esteróide <sup>28, 273, 534</sup>, como é sugerido por experiências de outro tipo. Este efeito não toma nos animais alimentados com a dieta gorda a mesma relevância que apresenta nos animais alimentados com a dieta semi-sintética, devido às diferenças verificadas na glicemia, mas deve ser tomado em conta para ambos os casos.

2.º — Quanto à outra diferença apontada, isto é, à diminuição da concentração dos corpos cetónicos nos animais do 4.º Grupo em relação ao 3.º, comparada com a subida no 2.º Grupo em relação ao 1.º, uma vez que, considerando o que é geralmente aceite, as variações do glicogénio do 2.º Grupo a não explicam, a discussão deverá acentuar os pontos seguintes:

— Os animais do 2.º Grupo apresentam em relação ao 1.º Grupo uma possível diferença calórica que pode não existir do 4.º Grupo para o 3.º; esta, porém, não deve ser a verdadeira razão, dado que tais diferenças, a existirem, não acarretam variações glicídicas suficientes para explicar o efeito, pelo que se depreende dos dados da literatura.

— Do 3.º para o 4.º Grupo há variações glicémicas que não existem do 1.º para o 2.º. Estas, no entanto, 179



podem eventualmente explicar o que se passa entre o 3.º e o 4.º Grupo, mas não o que se passa entre o 1.º e o 2.º Grupo, evidentemente.

- Para além de outras diferenças possíveis não consideradas, fica-nos uma outra: a da variação quantitativa que se verifica na acidemia gorda do 1.º para o 2.º Grupo (maior do que a que se verifica do 3.º para o 4.º Grupo, em que, para além destas, há também as variações glicídicas).

Neste esquema experimental introduzem-se influências pelo menos de dois tipos: de dieta e da ministração de um esteróide. Os problemas levantados na interpretação do diverso comportamento dos ratos destes Grupos são, como se vê, múltiplos e complexos.

Esta experiência veio situar-nos novamente perante o problema da convergência de três parâmetros, considerado nas experiências sobre o jejum, a traduzir outros tantos tipos de fenómenos — glicídeos (gliconeogénese), lipídeos (lipogénese, lipólise, esterificação), corpos cetónicos (cetogénese).

A variabilidade então encontrada, dentro das Séries e de Série para Série, levou-nos a considerar a importância das influências externas em relação ao sistema dos três parâmetros. Nas experiências agora em consideração partimos das influências externas e, na perspectiva que nos interessa, o esquema experimental mostrou-se-nos particularmente rico, dado que pudemos observar dois factos que nos parecem de fundamental importância:

- 1.º — A ministração de *triamcinolona* induziu, em animais alimentados com gordura, aumentos simultâneos nos valores dos parâmetros glicídicos (glicemia e glicogénio hepático) e da concentração plasmática dos ácidos gordos, e simultaneamente, induziu uma diminuição da concentração dos corpos cetónicos sanguíneos.

A simples observação dos resultados dos 2 Grupos de animais alimentados com dieta gorda poderia levar a pensar na existência de uma correlação inversa entre a cetonemia, por um lado, e a acidemia gorda ou ainda a glicemia ou o glicogénio hepático, por outro.

- 2.º — A ministração de *triamcinolona* induziu, nos animais alimentados com a dieta semi-sintética, variações simultâneas de todos os parâmetros referidos. E a simples observação dos

resultados obtidos com estes animais poderia levar a pensar na existência de uma correlação directa entre a cetonemia, por um lado, e a acidemia gorda e/ou os parâmetros glicídicos, por outro.

Relativamente ao sistema dos substratos respiratórios considerado em conjunto, tratando-se de um sistema complexo, as influências externas tanto se podem fazer sentir sobre cada um dos componentes do sistema, por acção directa, como se podem imbricar com oscilações internas que se produzam por alteração de um dos componentes. Note-se que os efeitos da ministração de uma droga podem ser, e habitualmente são, múltiplos, diferentes e independentes. Neste contexto, os problemas levantados pela flagrância dos resultados desta experiência podem-nos levar à seguinte formulação: dado que a *triamcinolona* não é necessariamente por si mesma anticetogénica (resultados do 2.º Grupo) os mecanismos fundamentais da regulação da cetogénese ultrapassam o das correlações habitualmente apontadas (cetogénese-gliconeogénese e cetogénese-acidemia gorda); relativamente a estes mecanismos, as variações internas do sistema são de importância secundária, embora em condições propícias se possam manifestar claramente.

## 6. ESTUDO DE EFEITOS DA TEMPERATURA AMBIENTE

Utilizámos nestas experiências 20 ratos provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Fundação Calouste Gulbenkian, alimentados com a dieta semi-sintética durante duas semanas.

Estas experiências foram realizadas em Maio de 1969.

Os ratos, com pesos compreendidos entre 129 e 165 g, foram divididos em 5 Grupos com pesos médios aproximados.

Grupo 1 — 4 ratos alimentados *ad libitum* até ao momento de serem sacrificados (9 h) que é considerado o tempo zero de toda a experiência.

Todos os animais dos Grupos seguintes foram colocados em jejum a partir da altura do sacrifício dos animais do Grupo 1, ficando com água *ad libitum*.

*Grupo 2* — 4 ratos, mantidos à temperatura ambiente de 22 °C, sacrificados 3 h após o sacrifício dos do *Grupo 1*.

*Grupo 3* — 4 ratos, mantidos à temperatura ambiente de 4 °C, sacrificados 3 h após o sacrifício dos do *Grupo 1*.

*Grupo 4* — 4 ratos, mantidos à temperatura ambiente de 22 °C, durante 24 h.

*Grupo 5* — 4 ratos, mantidos à temperatura ambiente de 4 °C, durante 24 h.

Todos os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina colhida para copos contendo tolueno.

No sangue destes animais foram feitos os doseamentos do acetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose; foi feita também a titulação dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados. No fígado de todos os animais utilizados foram determinados o glicogénio, os triglicerídeos, o azoto e a água.

Na urina dos ratos dos dois últimos *Grupos*, cujo volume foi medido, doseámos a ureia e o azoto total.

Os resultados obtidos são apresentados no *Quadro XX* e na *Fig. 22*.

#### COMENTÁRIO

As diferenças verificadas entre os valores encontrados nos doseamentos relativos aos dois primeiros *Grupos* não são significativas. A dispersão dos resultados permitiria incluir todos os valores desses dois grupos num conjunto apenas, o que quer dizer que nos parâmetros estudados não se observaram alterações significativas com o jejum de 3 h. Acrescente-se que START & NEWSHOLM <sup>490</sup>, mesmo para um período de jejum de 6 h, também não encontraram diferenças significativas, em relação aos animais alimentados, quando dosearam no fígado a acetil-CoA, o citrato, o ATP, o ADP e o AMP. Os desvios marcados na *Fig. 22* entre estes 2 grupos não devem, por isso, ser valorizados.

Relativamente ao *Grupo 3* as diferenças são já, no entanto, muito significativas.

Os resultados obtidos são, como se pode ver, de descrição muito simples.

Com o jejum de 24 h há, como já tínhamos documentado, queda de valores glicémicos e do glicogénio hepático e subida dos corpos cetónicos sanguíneos e dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados.

A exposição dos animais ao frio durante 3 h induz quedas glicémicas muito semelhantes às do jejum de 24 h, sem que, no entanto, estas sejam acompanhadas por quedas semelhantes dos valores do glicogénio hepático.

A subida da concentração dos ácidos gordos com a exposição à temperatura ambiente de 4 °C durante 3 h é superior à subida que se verifica durante o jejum de 24 h, acontecendo o contrário com a subida do beta-hidroxibutirato, enquanto que a subida do acetacetato é da mesma ordem nos dois tempos e nas condições que estamos a considerar. As diferenças não são, no entanto, significativas.

A conclusão que podemos tirar é a de que a exposição ao frio durante o período de 3 h tem efeitos sobre a glicemia, assim como sobre as concentrações dos ácidos gordos plasmáticos e dos corpos cetónicos sanguíneos semelhantes às do jejum de 24 h e que a continuação da exposição ao frio durante o período de 24 h intensifica as variações verificadas já às 3 h, embora a razão de variação não seja a mesma nas primeiras 3 h e nas 21 h seguintes, pois diminui.

É de notar que as variações do glicogénio hepático nos dois tempos que estamos a considerar não se verificam, no entanto, com a mesma intensidade, dado que às 24 h de jejum elas são de uma ordem muito diferente da que se verifica com 3 h de exposição ao frio. Deveremos por isso considerar que, nestas condições, a metabolização do glicogénio hepático e a metabolização da glicose sanguínea possam ter cinéticas diferentes — problema que merece ser explorado por si mesmo, como pensamos fazer ulteriormente. Tudo se passa como se os factores de exaustão glicogénica encontrassem resistências imediatas que se não verificam no que respeita à glicemia.

Para além disso e com isso, terá interesse explorar o possível efeito adrenérgico <sup>110, 172</sup> sobre um e outro fenómeno, assim como a cinética da captação periférica. O interesse destes pontos ressalta mais ainda se compararmos o que se passa nesta situação de maior consumo de substratos respiratórios com o que se passa na já estudada situação de actividade muscular intensa. Os resultados finais são diferentes, pelo que, para além de pensarmos em diferentes factores regulatórios, deveremos pensar também na possibilidade de serem diferentes a captação e a utilização de substratos.

Os valores encontrados nos doseamentos dos triglicerídeos hepáticos foram os esperados e são da mesma ordem dos referidos por MAICKEL & YAMADA <sup>319</sup>. No entanto, a comparação dos valores encontrados nos diversos Grupos de animais permite-nos concluir que, contrário ao que SCOW *et al.* <sup>444, 446</sup> referem para os ratos diabéticos e WIELAND & WEISS <sup>562</sup> tomaram por certo, nas condições destas nossas

## QUADRO XX

## ESTUDO DE EFEITOS DA TEMPERATURA AMBIENTE

As concentrações do acetato, do beta-hidroxibutirato e da glicose são expressas em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue; a dos ácidos gordos em  $\text{m}\mu\text{Eq/ml}$  de plasma. A água e o azoto são expressos em percentagem do peso do fígado. O glicogénio é expresso em  $\mu\text{moles}$  de glicose do glicogénio/g de fígado húmido; os triglicérides em  $\text{mg/g}$  de fígado húmido; os pesos são expressos em gramas. A ureia, o azoto ureico e o azoto total da urina são expressos em miligramas e o volume da urina em mililitros. Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos em cada *Grupo* de animais (+ S. E. M.).

	SANGUE				PLASMA		PESO	
	Acetato	$\beta$ -hidroxibutirato	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetato}}$	$\frac{\text{Acetato} + \beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetato} + \beta\text{-hidroxibutirato}} \times 100$	Glicose	Ácidos gordos		
<i>Grupo 1</i> (Testemunha)	0,11 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,20	0,59 $\pm$ 0,23	4,3 $\pm$ 0,8	79,4 $\pm$ 2,9	5,61 $\pm$ 0,16	1011 $\pm$ 91	149 $\pm$ 3
<i>Grupo 2</i> 3 h de jejum 22 °C	0,11 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,08	2,5 $\pm$ 0,7	70,8 $\pm$ 5,6	5,79 $\pm$ 0,09	876 $\pm$ 109	146 $\pm$ 4
<i>Grupo 3</i> 3 h de jejum 4 °C	0,36 $\pm$ 0,03	1,43 $\pm$ 0,16	1,79 $\pm$ 0,18	4,0 $\pm$ 0,3	79,5 $\pm$ 1,2	4,64 $\pm$ 0,08	1494 $\pm$ 53	155 $\pm$ 5
<i>Grupo 4</i> 24 h de jejum 4 °C	0,46 $\pm$ 0,09	2,14 $\pm$ 0,47	2,60 $\pm$ 0,56	04,6 $\pm$ 0,4	81,7 $\pm$ 1,3	4,38 $\pm$ 0,15	1284 $\pm$ 34	137 $\pm$ 2
<i>Grupo 5</i> 24 h de jejum 4 °C	1,05 $\pm$ 0,19	4,32 $\pm$ 0,70	5,37 $\pm$ 0,16	4,1 $\pm$ 0,1	80,5 $\pm$ 0,5	3,33 $\pm$ 0,00	1851 $\pm$ 193	137 $\pm$ 4

## URINA

## FIGADO

	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Água	Azoto	Glicogénio	Triglicé- rídeos	Volume	Úreia	Azoto total	Azoto ureico	$\frac{\text{Azoto ureico}}{\text{Azoto total}} \times 100$
<i>Grupo 1</i>											
(Testemunha)	5,093 ± 0,248	3,4 ± 0,1	67,4 ± 0,2	3,2 ± 0,2	253 ± 29	7,4 ± 0,8					
<i>Grupo 2</i>											
3 h de jejum	4,820 ± 0,116	3,3 ± 0,1	67,8 ± 0,3	3,3 ± 0,3	225 ± 6	7,8 ± 1,9					
22 °C											
<i>Grupo 3</i>											
3 h de jejum	4,944 ± 0,219	3,2 ± 0,1	68,2 ± 0,3	3,2 ± 0,2	182 ± 38	8,3 ± 1,7					
4 °C											
<i>Grupo 4</i>											
24 h de jejum	3,865 ± 0,091	2,8 ± 0,1	68,8 ± 0,2	3,2 ± 0,2	14 ± 3	5,7 ± 1,0	1,2 ± 1,0	88,0 ± 15,1	59,9 ± 8,6	41,1 ± 7,1	71,2 ± 3,9
4 °C											
<i>Grupo 5</i>											
24 h de jejum	4,022 ± 0,199	2,9 ± 0,1	68,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2	1 ± 0	25,1 ± 3,2	3,4 ± 0,5	276,0 ± 12,6	180,2 ± 1,4	128,8 ± 5,9	71,4 ± 2,7
4 °C											
t						3,588	9,531	13,685	9,533	0,043	
P						≈ 0,01	< 0,001	Inf.al	< 0,001	> 0,90	

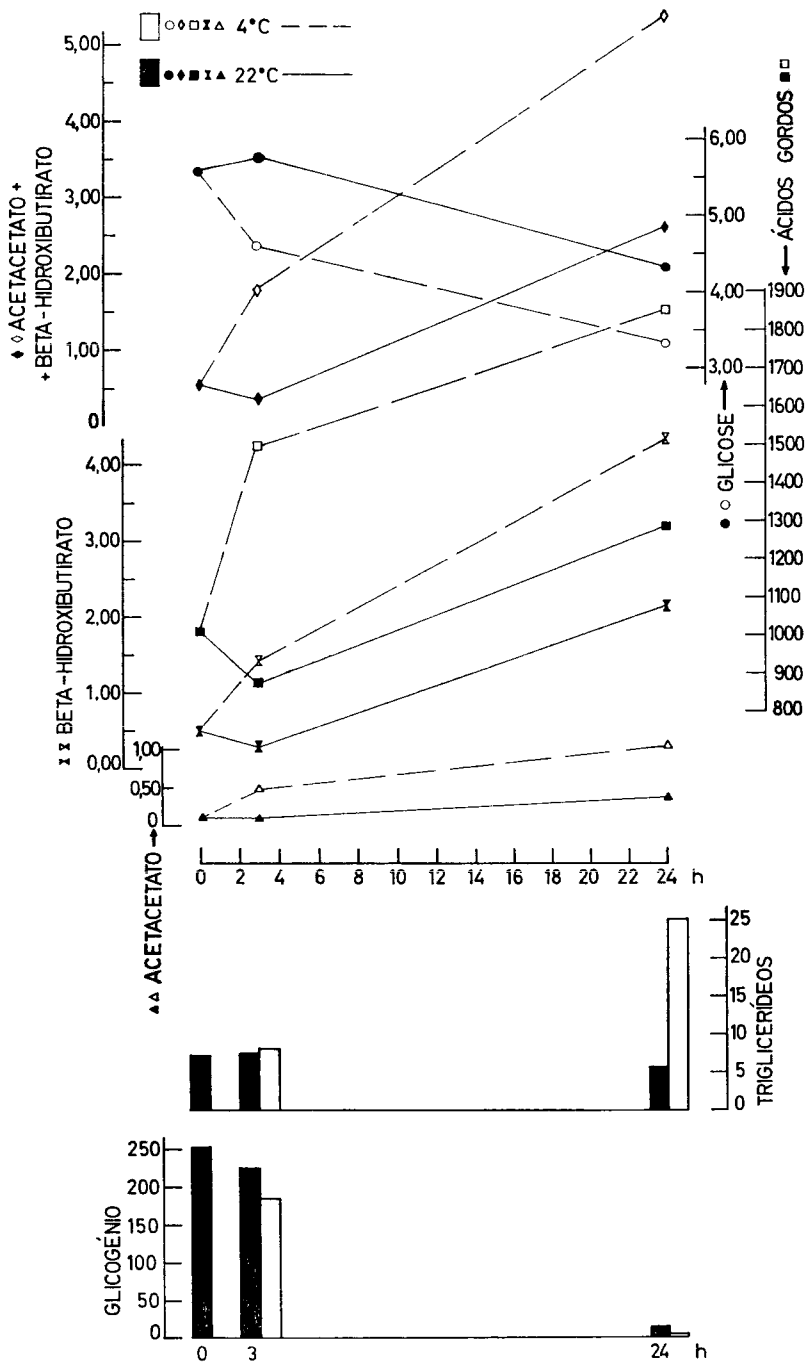


Fig. 22 — Estudo de efeitos da temperatura ambiente. Acetacetato, beta-hidroxiacetato e glicose, em  $\mu$ moles/ml de sangue; ácidos gordos, em  $m\mu$ Eq/ml de plasma; glicogénio, em  $\mu$ moles de glicose/g de fígado húmido; triglicerídeos, em mg/g de fígado húmido.

experiências as variações da concentração dos corpos cetônicos não se correlacionam com as dos triglicerídeos hepáticos. Os aumentos da cetonemia verificados com o jejum de 24 h (e também com a exposição a 4 °C, durante 3 h) não se acompanham nem são consequência de qualquer variação significativa na concentração dos triglicerídeos. Estas hão-de ter, certamente, para além da independência de variações, outros mecanismos de regulação.

Em globo, no que respeita aos parâmetros estudados nos dois casos, a problemática decorrente é em muitos aspectos semelhante à que encontramos em experiências já relatadas, aquando do estudo da recuperação metabólica após o jejum de 22 h, em ratos condicionados.

Estas experiências, tomadas em si mesmas, levariam à conclusão de que existiria uma correlação simples (aparentemente causal) entre a queda da glicemia e do glicogénio, por um lado, e, por outro, entre a subida da concentração dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados e a subida da concentração dos corpos cetônicos.

O estudo da concentração hepática dos triglicerídeos tem, no entanto, a grande vantagem de nos alertar relativamente à possibilidade de as variações verificadas nos parâmetros glicídicos, cetonémicos e da acidemia gorda, que parecem reflectir as oscilações internas e harmónicas dum sistema correlativo, poderem não ser senão aparentemente interdependentes.

O conjunto da experiência tem ainda a grande virtude de chamar a atenção para um outro parâmetro que não foi abordado nas experiências anteriormente relatadas e a que, na generalidade dos estudos recentes sobre a cetose, não é dada a devida relevância. Referimo-nos à eliminação de produtos azotados na urina, designadamente de ureia, que aumenta muito significativamente com a exposição ao frio, como podemos ver nos ratos com 24 h de jejum, colocados num ambiente a 4 °C. Não fizemos a determinação às 3 h, pois, dados os pequenos volumes de urina, os erros impediriam as conclusões, mas nada nos impede de pensar que o mesmo se verificará a esse tempo.

Como podemos ver também, a relação do azoto da ureia para o azoto total da urina mantém-se quando a eliminação de azoto aumenta, pelo que nos pareceu muito clara, nesta altura, a necessidade de incluir a ureificação na perspectiva do mecanismo da hiperketonemia e da cetogénese, como um processo que possa ser reconhecido de importância primária.

Esta experiência teve para nós um interesse muito especial, pois colocou-nos perante a hipótese de que partiremos para a tese expandida nesta dissertação.



## 7. RELAÇÃO DO AZOTO UREICO PARA O AZOTO TOTAL DA URINA NA INTOXICAÇÃO PELA *FLORIDZINA*

Dado que a injeção de *floridzina* em ratos produz uma cetose de grau elevadíssimo <sup>2</sup>, explorámos esta condição, fundamentalmente no sentido de investigarmos o que se passa quanto à relação dos valores urinários do azoto e da ureia — um motivo de interesse que o último esquema experimental nos suscitou.

Utilizámos 3 ratos provenientes da colónia do nosso Laboratório e alimentados com a dieta semi-sintética referida.

A experiência foi feita em Julho de 1969.

Estes ratos foram injectados com *floridzina*, na dose de 100 mg/100 g de peso do corpo, dissolvida numa mistura de volumes iguais de água e butano-2,3-diol <sup>269</sup>, colocados em jejum em gaiolas metabólicas, apenas com água *ad libitum*, e sacrificadas ao fim de 24 h. A urina eliminada por cada um dos animais de experiência durante este período de tempo foi recolhida na totalidade, em copos com tolueno.

Na altura do sacrifício o estado geral destes animais estava muitíssimo atingido.

No sangue e no fígado foram feitos doseamentos e determinações das grandezas cujos valores constam do *Quadro XXI*.

Foram determinados também os volumes da urina e o azoto total e a ureia eliminados.

Notemos, em especial, os graus de hipoglicemia e de cetonemia verificados.

Relativamente ao problema em estudo, verificámos que a relação do azoto da ureia para o azoto total é aproximadamente a mesma que

QUADRO XXI  
INTOXICAÇÃO PELA *FLORIDZINA*

As concentrações do acetato, do beta-hidroxiacetato e da glicogénio do peso do fígado. O glicogénio é expresso em centagem do peso do fígado. O azoto total da urina são expressos em miligramas. O volume num Grupo de 3 animais ( $\pm$  S. E. M.).

PESO			FÍGADO					
No início da experiência	Com 24 h de jejum	Variação	Peso	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	Água	Azoto	Glicogénio	Acetato
162 $\pm$ 16	148 $\pm$ 11	14 $\pm$ 5	5,375 $\pm$ 0,556	3,6 $\pm$ 0,2	68,2 $\pm$ 0,6	3,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,3	4,78 $\pm$ 0,8

verificáramos nas experiências anteriores (até ligeiramente superior), o que nos leva a concluir que nestes animais a ureogênese se processa com a mesma eficiência que nos animais normais e, pelos valores obtidos no que respeita à quantidade de substâncias eliminadas, com uma intensidade maior.

#### 8. EFEITOS DA MINISTRAÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO E DE CLORETO DE AMÔNIO E ORNITINA

O assentamento da nossa hipótese tornou desejável investigar os efeitos da ministração *in vivo* de cloreto de amônio e de cloreto de amônio e ornitina.

Em certas condições experimentais, o cloreto de amônio induz, *in vitro*, um aumento de formação de acetacetato<sup>3, 108</sup>. Apesar da sugestiva explicação que tem sido dada para este efeito<sup>405</sup>, o fenómeno continua por esclarecer, e *in vivo* não foi ainda possível reproduzi-lo, não obstante as múltiplas tentativas feitas nesse sentido<sup>568</sup>.

Neste contexto achámos conveniente desenvolver os esquemas experimentais do modo que passamos a relatar.

Todos os ratos utilizados nestes dois esquemas experimentais foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Biologia da Fundação Calouste Gulbenkian e alimentados com a dieta semi-sintética, desde as duas semanas que precederam o período experimental e também durante ele.

Estas experiências foram realizadas em Novembro de 1969.

butirato e da glicose são expressas em  $\mu$ moles/ml de sangue. A água e o azoto são expressos em  $\mu$ moles de glicose do glicogénio/g de fígado húmido. Os pesos são expressos em gramas. O azoto ureico e o da urina é expresso em ml. Os valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos

SANGUE					URINA				
$\beta$ -hidro- xibutirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi- butirato	$\beta$ -hidroxi- butirato	$\beta$ -hidroxi- butirato $\times 100$	Glicose	Volume	Azoto total	Azoto ureico	$\frac{\text{Azotoureico}}{\text{Azotototal}} \times 100$	
		Acetace- tato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi- butirato						
5,63 $\pm$ 0,93	11,41 $\pm$ 1,68	1,4 $\pm$ 0,5	58,3 $\pm$ 2,3	3,71 $\pm$ 0,33	19,4 $\pm$ 1,9	209,5 $\pm$ 39,4	162,9 $\pm$ 28,9	77,8 $\pm$ 2,0	

a) PRIMEIRA SÉRIE — MINISTRAÇÃO DE CLORETO DE AMÓNIO

1.º Grupo — 6 ratos de pesos compreendidos entre 120 e 160 g. Injecção intraperitoneal de 3 ml/100 g de peso, de uma solução de cloreto de amónio a 8 g/l (240 mg/kg), de 24 em 24 h, durante 5 dias. Sacrifício no 5.º dia de tratamento, duas horas após a última injecção.

2.º Grupo — 6 ratos de pesos compreendidos entre 144 e 177 g. Injecção intraperitoneal de 3 ml/100 g de peso, de uma solução de cloreto de sódio a 9 g/l, de 24 em 24 h, durante 4 dias. Sacrifício no 5.º dia de tratamento, duas horas após uma injecção de cloreto de amónio a 8 g/l (240 mg/kg).

3.º Grupo — Grupo testemunha — 6 ratos de pesos compreendidos entre 119 e 179 g. Tratamento idêntico ao dos anteriores, mas com injecção também de solução de cloreto de sódio no 5.º dia.

QUADRO XXII

ESTUDO DE EFEITOS DA MINISTRAÇÃO DE CLORETO DE AMÓNIO E CLORETO DE AMÓNIO E ORNITINA

As concentrações do acetoacetato e do  $\beta$ -hidroxi-butilirato são expressos em gramas. C

Condições experimentais	N.º de animais	Acetoacetato	$\beta$ -hidroxi-butilirato	Acetoacetato + $\beta$ -hidroxi-butilirato
<i>1.ª Série</i>				
1.º Grupo — $\text{CINH}_4$ durante 4 dias; $\text{CINH}_4$ no 5.º dia	6	0,09 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,07
2.º Grupo — $\text{CINa}$ durante 4 dias; $\text{CINH}_4$ no 5.º dia	6	0,08 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,07
3.º Grupo — $\text{CINa}$ durante 4 dias; $\text{CINa}$ no 5.º dia	6	0,04 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02
<i>2.ª Série</i>				
1.º Grupo — $\text{CINH}_4$ durante 4 dias; $\text{CINH}_4$ + Ornitina no 5.º dia	4	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02
2.º Grupo — $\text{CINa}$ durante 4 dias; $\text{CINH}_4$ + Ornitina no 5.º dia	4	0,09 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,06
3.º Grupo — $\text{CINa}$ durante 4 dias; $\text{CINa}$ + Ornitina no 5.º dia	4	0,17 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,09

Foi verificado na altura do sacrifício que todos os animais continham alimentos no estômago.

Na urina não havia acetona presente em quantidades detectáveis pelo *Ketostix* «Ames».

No sangue de todos os ratos foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxibutirato, a glicose e a ureia. Os resultados são apresentados no *Quadro XXII*, juntamente com as da segunda *Série*.

b) SEGUNDA SÉRIE — MINISTRAÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO E ORNITINA

Durante os 4 primeiros dias de tratamento, os ratos dos grupos desta *Série* tiveram tratamento idêntico ao dos animais dos *Grupos* correspondentes da *Série* anterior. Sacrificaram-se também no 5.º dia, duas horas após a injeção, e só esta diferencia o tratamento feito nesta *Série*.

acetato, do beta-hidroxibutirato, da ureia e da glicose são expressas em  $\mu\text{moles/ml}$  de sangue. Os pesos e valores apresentados exprimem as médias dos resultados individuais obtidos em cada *Grupo* ( $\pm$  S. E. M.).

$\beta$ -hidroxibutirato	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\text{Acetacetato} + \beta\text{-hidroxibutirato}} \times 100$	Ureia	Glicose	Pesos	
				No 1.º dia	No 5.º dia
$1,2 \pm 0,2$	$51,7 \pm 3,7$	$6,61 \pm 0,47$	$5,96 \pm 0,07$	$140 \pm 6$	$151 \pm 7$
$1,5 \pm 0,4$	$56,6 \pm 8,4$	$5,44 \pm 0,58$	$6,23 \pm 0,08$	$155 \pm 5$	$165 \pm 5$
$2,3 \pm 0,3$	$68,8 \pm 3,0$	$5,69 \pm 0,43$	$6,34 \pm 0,11$	$153 \pm 9$	$157 \pm 6$
$0,7 \pm 0,1$	$36,2 \pm 7,1$	$7,29 \pm 0,52$	—	$167 \pm 4$	$166 \pm 6$
$0,9 \pm 0,1$	$46,7 \pm 2,4$	$9,50 \pm 0,53$	—	$167 \pm 4$	$162 \pm 5$
$1,5 \pm 0,1$	$58,6 \pm 3,3$	$7,13 \pm 0,40$	—	$163 \pm 11$	$155 \pm 12$

1.º Grupo — 4 ratos de pesos compreendidos entre 131 e 187 g. Injecção intraperitoneal, no 5.º dia, de uma solução contendo ornitina-L (1 mmol/kg) e cloreto de amónio (240 mg/kg).

2.º Grupo — 4 ratos de pesos compreendidos entre 155 e 176 g. Tratamento no 5.º dia, idêntico ao do grupo anterior.

3.º Grupo — 4 ratos de pesos compreendidos entre 157 e 175 g. Injecção, no 5.º dia, de uma solução de cloreto de sódio a 9 g/l contendo ornitina-L (1 mmol/kg).

Foi verificado na altura do sacrifício que em todos os animais o estômago continha alimentos e que a urina não continha acetona detectável pelo *Ketostix* «Ames».

No sangue destes animais foram doseados o acetacetato, o beta-hidroxiubutirato e a ureia. Os resultados obtidos figuram no *Quadro XXII*, juntamente com os da primeira *Série*.

#### COMENTÁRIO

No plano destas nossas experiências, desenvolvidas em duas *Séries* de animais, postulámos, adoptando as conclusões de SCHIMKE<sup>437, 438, 439</sup>, que a ministração prévia de cloreto de amónio durante 4 dias induz aumento das actividades enzimáticas da ureogénese.

A dose de cloreto de amónio que empregámos é aproximadamente a indicada por BARNES & ELTHERINGTON<sup>18</sup>.

Pensávamos obter assim melhores condições para a evidenciação de um possível efeito do cloreto de amónio sobre a cetogénese *in vivo*.

Não nos permite o dispositivo experimental julgar da quantidade de ureia efectivamente sintetizada nas duas horas que antecedem o sacrifício dos animais, mas a observação dos valores da concentração da ureia no sangue dos animais da primeira *Série* sugere que, efectivamente, no primeiro *Grupo* de animais possa haver um aumento.

A ministração de ornitina-L foi feita na segunda *Série* com a intenção de intensificar a velocidade de ureogénese em condições enzimáticas prévias semelhantes às da primeira *Série*. Embora estejamos nas mesmas condições, relativamente à primeira *Série*, para fazer a apreciação da efectividade postulada, tudo a sugere, dado que todos os valores da concentração de ureia no sangue são mais elevados nesta segunda *Série*. No entanto, nesta mesma *Série*, os valores individuais da concentração de ureia no sangue dos animais do 2.º *Grupo* são mais altos do que os dos ratos do 1.º e 3.º *Grupos*. Como nesta segunda *Série* o factor em evidência é o efeito da ministração de ornitina, fica-nos a impressão de

que a ministração prévia de cloreto de amónio possa desencadear mecanismos que tornem menos efectiva a ministração ulterior de ornitina.

Relativamente à glicemia, parâmetro explorado na primeira *Série*, não se verificam variações significativas nos três *Grupos* experimentais.

Quanto ao parâmetro que mais nos interessava estudar, verificámos que na primeira *Série* de animais, embora os valores médios se dispusessem na ordem esperada pela hipótese, as variações da cetonemia não eram significativas.

Comparando as duas *Séries*, verificámos que os valores da cetonemia dos três *Grupos* experimentais sucessivos se dispunham numa ordem inversa.

A experiência da variabilidade observada nestes parâmetros levamos, no entanto, a não tirar conclusões de diferenças tão pequenas.

Uma sugestão nos é fornecida, contudo, pelos valores relativamente baixos de cetonemia e pela sua relativa homogeneidade — e essa é, englobando as duas *Séries* experimentais, a possibilidade da existência de outras acções metabólicas das substâncias ministradas nestas experiências, acções que podem encobrir o fenómeno que pretendíamos estudar. Apontamos, em apoio de que se considere esta sugestão, o conhecido efeito da ornitina-L sobre a secreção de insulina <sup>125</sup>, suficiente, na verdade, para obscurecer o efeito que procurávamos.

Estes são problemas que necessitam de ser reinvestigados.

Relativamente ao objecto principal destas nossas experiências, concluimos que os resultados obtidos nada nos permitem adiantar na resolução dos complexos problemas do efeito cetogénico do cloreto de amónio *in vitro* e da possível relação da ureogénese com a cetogénese, que é problema central na nossa hipótese de trabalho.

#### D. ESTUDOS *IN VITRO*

Dado o papel fundamental do fígado no metabolismo dos corpos cetónicos e colhida da literatura a generalizada convicção de que a regulação da cetonemia é um problema relacionado em primeiro lugar com a cetogénese, tornou-se desejável explorar este fenómeno directamente. E para além do próprio fenómeno da cetogénese, pareceu-nos conveniente investigar as suas relações com outros fenómenos hepáticos, geralmente apontados como responsáveis no desencadeamento e modulação da cetogénese, designadamente a metabolização de acetil-CoA em grande concentração, proveniente de ácidos gordos fornecidos ao fígado, e a gliconeogénese.

Em face do assentamento da nossa hipótese de trabalho, tornou-se desejável estudar simultaneamente o fenómeno da ureogénese, do qual, neste contexto, as espécies bibliográficas nos fornecem muito escassas informações, e essas aduzidas sempre ou apenas como testemunho da viabilidade das preparações hepáticas *in vitro*<sup>195</sup> ou apenas como parâmetro no estudo da acção de certas hormonas no âmbito da gliconeogénese, designadamente da insulina e da glicagina<sup>121, 122, 150</sup>.

Os nossos estudos *in vitro* foram realizados com os dois tipos de métodos que, pelas suas condições no que diz respeito à manutenção de estruturas, mais aconselháveis nos parecem quando o problema bioquímico em estudo é o da regulação de fenómenos celulares integrados. As primeiras experiências foram feitas com incubações de fatias de fígado num meio apropriado; numa segunda fase, foi feita a perfusão do fígado isolado.

## CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

### 1. ESTUDOS COM A INCUBAÇÃO DE FATIAS DE FÍGADO

Os processos utilizados foram em tudo muito semelhantes aos da escola de KREBS, descritos e apontados em vários artigos, designadamente por MELLANBY & WILLIAMSON<sup>335</sup>, KREBS, NOTTON & HEMS<sup>269</sup>, ROSS, HEMS & KREBS<sup>420</sup> e KREBS, WALLACE, HEMS & FREEDLAND<sup>271</sup>, apenas com algumas modificações que introduzimos para possibilitar o cumprimento do esquema experimental e o emprego dos métodos analíticos que utilizámos.

Os animais de experiência foram sacrificados sem anestesia, por decapitação com guilhotina apropriada (*Harvard apparatus Co., Inc.*), tal como nas experiências *in vivo*. O fígado foi retirado imediatamente depois e colocado num saco de plástico por sua vez já introduzido em gelo moído.

Após o arrefecimento do fígado, as fatias, de 0,3 a 0,4 mm de espessura, cortadas pelo processo de DEUTSCH<sup>90</sup> sem alguma vez lhe tocarmos com as mãos, tal como DELUCA & COHEN<sup>308</sup> pormenorizadamente descrevem, são mergulhadas em amortecedor de Krebs-Henseleit, preparado segundo a transcrição de DAWSON<sup>84</sup>, em placa de Petri colocada sobre gelo moído.

Anotemos que, segundo o grupo de KREBS<sup>420</sup>, as cifras do processo de gliconeogénese são maiores com este meio de incubação do que com qualquer dos outros ensaiados, designadamente os de BUCHANAN, HASTINGS & NESBETT<sup>52</sup> e HASTINGS, TENG, NESBETT & SINEX<sup>189</sup>.

Depois de uma permanência de 5 min na solução, com agitações ocasionais, para perda da glicose<sup>281</sup>, dos corpos cetónicos<sup>335</sup>, da ureia e de outras substâncias previamente existentes no tecido, as fatias são pesadas numa balança de torção para obtermos fragmentos com 150 mg de peso (peso em húmido); e cada um destes é colocado num frasco de incubação contendo 6 ml do líquido de incubação já referido, ou do mesmo meio de incubação com substrato dissolvido, a 0 °C.

Na mesma sequência são pesadas sempre fatias aproximadamente com o mesmo peso, para determinação do resíduo seco total e para determinação do glicogénio.

Os frascos, mantidos ainda em gelo moído, são gaseificados com carbogénio (95 p. 100 de oxigénio e 5 p. 100 de anidrido carbónico, durante 5 min.

Todas as experiências foram feitas com ensaios em duplicado.

Em cada *Série* de experiências foram preparados também 4 frascos nos quais as fatias foram mergulhadas em meio de incubação sem substratos: dois foram incubados com os outros da *Série* e dois permaneceram, entretanto, colocados em gelo.

A incubação foi feita em incubador de Dubnoff, com agitação (60 excursões por min), a 37 °C e durante 60 min. No fim deste período, os frascos foram retirados e colocados imediatamente em gelo moído. Depois do arrefecimento, as fatias foram retiradas para doseamento do glicogénio e foram colhidas amostras do líquido de incubação para doseamento da amónia, da ureia, da glicose, do acetacetato e do beta-hidroxibutirato, pelos métodos descritos anteriormente.

Os substratos foram utilizados sempre em concentrações de 10 mM e a sua solução foi feita imediatamente antes do uso.

Os resultados são expressos relativamente a peso de fígado seco e nos cálculos entrámos em consideração com o volume de água próprio dos fragmentos introduzidos no meio de incubação.

## 2. ESTUDOS COM A PERFUSÃO DO FÍGADO ISOLADO

De uma maneira geral as condições experimentais que utilizámos são uma combinação das de HEMS, ROSS, BERRY & KREBS <sup>195</sup>, WILLIAMSON, GARCIA, RENOLD & CAHILL <sup>575</sup>, SCHOLZ & BÜCHER <sup>440</sup> e FISHER & KERLY <sup>181</sup>.

### Meio de perfusão

Utilizámos como meio de perfusão o amortecedor de Krebs-Henseleit, já anteriormente referido, contendo albumina bovina («fracção V» em pó, *Sigma*) purificada como adiante se dirá, a pH 7,4. SCHOLZ & BÜCHER <sup>440</sup> demonstraram, por fluorometria de superfície e espectrofotometria de reflexão, pelos valores da tensão do oxigénio e das velocidades respiratórias, com a determinação das actividades enzimáticas e o doseamento dos metabolitos convenientes, a possibilidade de utilizar um meio sem hemoglobina, susceptível de permitir, inclusivamente, o estudo de ciclos de anoxia e da acção dos inibidores da respiração.

HEMS, ROSS, BERRY & KREBS <sup>195</sup> demonstraram que a falta de eritrócitos não tem qualquer repercussão, desde que os fígados pesem menos de 5 g e o fluxo do líquido de perfusão seja suficientemente rápido (não inferior a 30 ml/min), condições em que nos colocámos sempre.

A albumina do meio de perfusão foi tratada como KREBS, WALLACE, HEMS & FREEDLAND <sup>271</sup> recomendam. Inicialmente preparámos uma solução de concentração superior a 10 p. 100, em amortecedor de Krebs-Henseleit, que foi dialisada a 4 °C contra o mesmo amortecedor, mudado por 4 vezes, durante um período de 48 h. A concentração foi depois ajustada a 10 p. 100 (peso/volume). Ao prepararmos o meio de perfusão, utilizámos o volume necessário desta solução *stock* para obter a concentração já referida.

### Preparação do fígado isolado

Compreende os seguintes tempos:

#### a) Anestesia

O rato é anestesiado pelo Nembutal, como nos estudos de HEMS *et al.* <sup>195</sup>: injeccção intraperitoneal de 0,1 ml/100 g de peso do corpo, de uma solução a 6 p. 100 preparada imediatamente antes da injeccção.

#### b) Heparinização

Depois de anestesiado e fixado o rato para a operação, uma veia femoral é exposta e nela injectamos 0,1 ml de uma solução de cloreto de sódio a 9 g/l, contendo 100 U de heparina.



c) *Exposição do fígado e do pedículo hepático*

O abdómen é aberto por incisão xifo-púbica. Incisões perpendiculares a esta, dirigidas para os flancos, permitem expor convenientemente os órgãos abdominais. A hemorragia é cuidadosamente evitada com o emprego de pinças colocadas de modo a comprimir os bordos dos retalhos da parede abdominal.

Faz-se a secção do ligamento falciforme e do epíploo gastrepático para melhor manuseamento do fígado e conveniente exposição do seu pedículo.

As restantes vísceras são ligeiramente afastadas e protegidas com retalhos de gase embebidos em solução de cloreto de sódio a 9 g/l, de modo a obtermos uma boa exposição da área que nos interessa.

d) *Intubação do colédoco*

Junto da sua desembocadura duodenal, o colédoco é laqueado com um fio de seda, o que permitirá, pelo bloqueio do fluxo biliar, uma melhor visualização desta estrutura. A canulação faz-se abrindo com uma tesoura uma pequena botoeira no terço distal do colédoco e introduzindo um tubo de plástico (Portex PP 10) cortado em bisel. A operação é realizada com a ajuda de óculos de ampliação. O tubo de plástico é fixado na posição exacta com três laqueações de seda, após se ter verificado o fluir da bile.

e) *Canulação da veia porta e perfusão prévia*

Passam-se dois laços de seda à volta da veia porta, de tal modo que um se localize uns milímetros antes da bifurcação e o outro a 0,5-1 cm antes deste; um terceiro apanha largamente o mesentério e permitirá o mínimo de tracção ulteriormente necessária para a conveniente canulação da veia porta sem prejudicar o fluxo neste vaso.

O laço médio fica já disposto em nó, embora bastante largo para não perturbar a canulação, o que permite iniciar a perfusão sem qualquer demora.

Com o mínimo de tracção do último laço, faz-se então a introdução na veia porta de uma agulha Frankis-Evans n.º 16. A agulha está adaptada a um tubo de polietileno que conduz amortecedor de Krebs-Henseleit de um frasco de Mariotte. Este líquido está à temperatura ambiente e saturado da mistura gasosa (95 p. 100 de oxigénio e 5 p. 100 de anidrido carbónico) que nele borbulha intensamente, pelo menos durante os 30 min que precedem a sua utilização. Imediatamente antes de a canulação ser feita renova-se o líquido contido no tubo de polietileno a que está adaptada a cânula.

Imediatamente após a introdução da cânula, um ajudante abre a pinça que comprime o tubo de polietileno, para que se inicie o fluxo de amortecedor oxigenado. Concomitantemente aperta-se o nó que se deixara já feito, e com uma tesoura secciona-se a veia cava. Podemos assim evitar a interrupção da circulação porta e também o edema que resultaria do aumento da pressão nesse território.

A seguir são dados os outros nós. Um ajudante passa a manter o tubo de polietileno em posição tal que não haja nem angulação nem tracção da cânula.

Seguidamente desembaraça-se o órgão de todas as suas conexões e monta-se numa peça de plástico, de modo a permitir fixar a cânula e o tubo do colédoco nas melhores condições de perfusão e drenagem, respectivamente.

É de notar que, como é recomendado por WILLIAMSON, GARCIA, RENOLD & CAHILL <sup>575</sup>, o líquido desta perfusão prévia não contém albumina. Segundo os mesmos autores, deixa-se correr cerca de 100 ml deste amortecedor, com o que se faz a lavagem da árvore porta do fígado.

Imediatamente antes da passagem do fígado para a câmara de perfusão experimental, fazemos uma biópsia. O fragmento colhido é dividido em duas partes — uma para a determinação do resíduo seco total e outra para determinação do glicogénio.

A passagem do fígado para o aparelho de perfusão compreende uma interrupção do fluxo de perfusão da ordem de segundos.

### Aparelho de perfusão

O conjunto que construímos e utilizámos (Fig. 23) é, fundamentalmente, uma combinação dos dispositivos descritos por FISHER & KERLY<sup>131</sup>, HEMS, ROSS, BERRY & KREBS<sup>135</sup> e WILLIAMSON, GARCIA, RENOLD & CAHILL<sup>575</sup>.

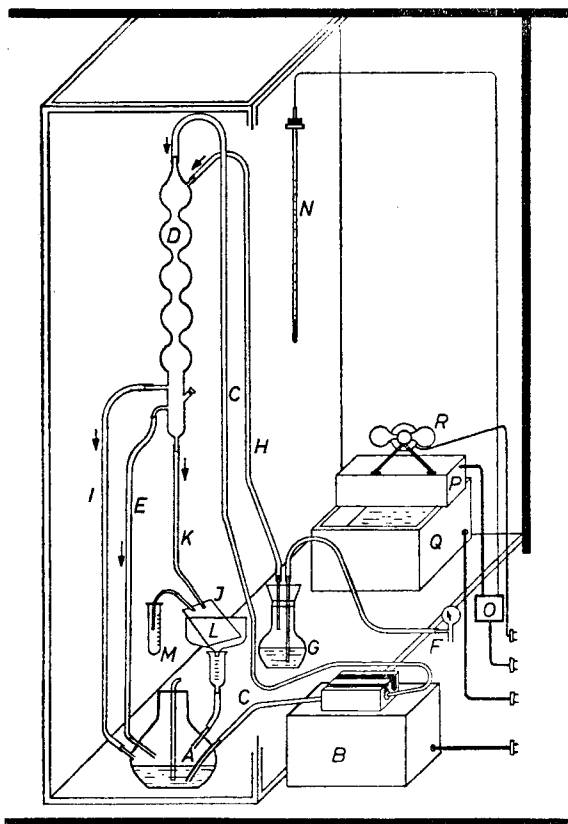


Fig. 23 — Aparelho de perfusão. A referência às letras é feita no texto.

O fígado, montado na peça de plástico já referida (J — ver Fig. 23 para a sinalética), é colocado numa taça de vidro (L) cujo escoamento se faz para o reservatório principal (A) com passagem por um tubo de vidro graduado em continuidade com um tubo de borracha cuja compressão permite medir o fluxo.

Do reservatório principal, o líquido de perfusão, drenado por um tubo de polietileno (C), é levado por acção de uma bomba peristáltica (*Harvard apparatus Co., Inc.*) para o oxigenador

ampolar (D) onde se espalha regularmente pelas paredes. Neste entra também, no mesmo sentido, a mistura gasosa (95 p. 100 de oxigénio e 5 p. 100 de anidrido carbónico) humidificada (F, G, H).

Na extremidade inferior do oxigenador há um reservatório de líquido com uma capacidade muito pequena. Deste reservatório, o líquido de perfusão passa para o fígado por intermédio de um tubo de polietileno (K) que, aquando da passagem do fígado para a câmara de perfusão, se liga à cânula introduzida na veia porta.

O nível líquido é mantido neste reservatório pela tubuladura lateral, por onde escoo o excesso, que regressa ao reservatório principal por um tubo (E).

A diferença fundamental que há no nosso dispositivo, em relação à generalidade dos sistemas de perfusão descritos na literatura, diz respeito ao sentido de circulação da mistura gasosa. Deste modo conseguimos reduzir ao mínimo a formação de bolhas no sistema e conseguimos que o tempo e a superfície de contacto da mistura gasosa com o líquido aumentem, pois ela atravessa também o reservatório principal passando do oxigenador para este por um tubo (I). A qualidade e as dimensões dos tubos são as referidas por HEMS, ROSS, BERRY & KREBS<sup>195</sup>. O nosso sistema difere do destes, para além disso, pelo tipo de fluxómetro. A diferença fundamental das nossas condições de trabalho, relativamente às daquele grupo, advêm de isolarmos o fígado de todas as outras estruturas, enquanto que os referidos investigadores perfundem o fígado *in situ* com canulação simultânea da veia cava.

Certas diferenças verificadas entre os seus e os nossos resultados podem ser atribuídas talvez a estas condições.

As restantes condições gerais de trabalho que utilizámos são também em linhas gerais as do grupo de Oxford. O aparelho está dentro de uma caixa com paredes de vidro, com janelas que se abrem apenas para as operações indispensáveis; o ambiente encontra-se saturado de vapor de água produzido por um humidificador (Q) e a temperatura é mantida a 35 °C por um dispositivo termostático (N, O, P).

A uniformidade da atmosfera no interior da câmara é assegurada pelo funcionamento contínuo de uma ventoinha (R).

A bile é recolhida num pequeno tubo graduado (M).

### Protocolo experimental

O protocolo de trabalho foi sempre o mesmo:

- O volume inicial do líquido de perfusão foi de 100 ml.
- Este líquido foi colocado inicialmente no reservatório principal e posto em circulação pelo menos 30 min antes de intercalarmos o fígado a perfundir, para adequado equilíbrio de temperatura e saturação de gases<sup>575</sup>.
- As colheitas de líquido de perfusão foram sempre feitas do reservatório principal pelo tubo próprio, aos 30, 60 e 90 min de perfusão.
- As adições foram feitas também por tubo próprio, imediatamente após a primeira colheita, aos 30 min, e a seringa e o tubo lavados com líquido de perfusão colhido para o efeito.
- Nos cálculos foram sempre consideradas as consequentes variações de volume.
- A perfusão foi interrompida sempre ao fim de 90 min. O fígado foi então rapidamente retirado e dele colhidos fragmentos para determinação de resíduo seco total e do glicogénio; o fígado restante foi também pesado.
- Os resultados são expressos em  $\mu$ moles da substância aparecida no meio ou dele desaparecida, por gramas de fígado seco, nos 3 períodos sucessivos de 30 min, com excepção da amónia que se exprime em concentração ( $\mu$ moles/ml). A relação beta-hidroxibutirato/acetato é calculada a partir das concentrações no meio de perfusão e referida, como é óbvio, ao momento das colheitas.

## APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

### 1. ESTUDOS COM A INCUBAÇÃO DE FATIAS DE FÍGADO

Todos os animais utilizados nestas experiências tinham pesos compreendidos entre 230 e 329 g; foram criados no nosso Laboratório e alimentados durante as duas semanas que precederam o sacrifício com a dieta semi-sintética.

Estas experiências foram realizadas em Fevereiro e Março de 1969.

Os nossos estudos desenvolveram-se em três *Séries* experimentais, que diferem pelas condições dos ratos de que foi retirado o fígado.

1.<sup>a</sup> *Série* — Ratos mantidos em jejum durante 48 h, com água *ad libitum*, e injeção subcutânea, feita no dorso, de uma solução de *floridzina* (1 g/kg de peso), numa mistura em volumes iguais de água e butano-2,3-diol, 4 h antes do sacrifício. Este é o processo usado por KREBS e col. <sup>269, 420</sup> para fazer a depleção do glicogénio hepático.

2.<sup>a</sup> *Série* — Ratos em jejum de 48 h, apenas com água *ad libitum* e sem qualquer outro tratamento.

3.<sup>a</sup> *Série* — Ratos a que foi permitido o acesso à comida e à água até ao momento do sacrifício.

Em cada experiência fizemos em duplicado a incubação de fatias quer em amortecedor de Krebs-Henseleit sem substrato quer no amortecedor em que foi dissolvido, conforme os casos, piruvato, frutose, leucina-L ou butirato, em concentração 10 mM; dois frascos com o meio de incubação sem substrato, em que foram mergulhadas fatias, permaneceram, em cada experiência, em gelo, enquanto os outros incubaram.

No líquido de incubação doseámos sempre a glicose, o acetacetato, a ureia e a amónia. Na primeira *Série* de experiências fizemos também o doseamento do beta-hidroxibutirato.

Nos fragmentos de fígado, depois da incubação, foi sempre determinado o glicogénio.

As diversas substâncias doseadas são expressas sempre em  $\mu$ moles/g de tecido incubado, seco; os números referentes à glicose exprimem a soma da glicose do glicogénio e da glicose do meio também em  $\mu$ moles por grama de tecido seco.

Os resultados obtidos são apresentados nos *Quadros* XXIII, XXIV e XXV e nas Figs. 24, 25 e 26.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Estudámos matemàticamente aqueles resultados cujo significado estatístico nos pareceu necessário ou conveniente verificar quer devido à ordem das diferenças encontradas entre os diversos valores quer devido à própria natureza das grandezas que esses valores quantificam e que lhes confere relevo particular no ensaio de interpretação que nos propomos. Estão neste caso os resultados obtidos nos doseamentos do acetacetato e da ureia.

Realizámos, para tanto, *análises de variância*, primeiro em cada uma das três *Séries* e depois globalmente nas três *Séries*.

No estudo de cada *Série* (*Quadros XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX e XXXI*), analisámos para cada parâmetro a variância de fígado para fígado (fracção *animais*), a variância com os tratamentos (fracção *tratamentos*), a interacção destas duas variáveis (fracção *interacção: animais × tratamentos*), e calculámos o significado das variações dos resultados em função do tratamento relativamente aos obtidos nos ensaios em que a incubação foi feita sem a adição de qualquer substrato.

O *Quadro XXXII* documenta o estudo global das *Séries*; nele as fracções *animais, tratamentos e interacção: animais × tratamentos* têm o mesmo significado que apresentamos nos documentos do estudo dentro

QUADRO XXIII

INCUBAÇÕES COM FATIAS DE FÍGADO

1.<sup>a</sup> *Série*. — Ratos em jejum há 48 h, injectados com *floridzina*.

Os valores exprimem as médias dos resultados. A ureia é expressa em  $\mu$ moles de amónia/g de tecido.

Parâmetros	Glicose	Acetacetato	$\beta$ -hidroxi-butirato	Acetacetato + $\beta$ -hidroxi-butirato		
VALORES INICIAIS (sem incubação)	5,17 $\pm$ 1,01	3,06 $\pm$ 0,66	9,24 $\pm$ 0,57	12,30 $\pm$ 1,1		
VALORES APÓS 60 MIN DE INCUBAÇÃO						
{ Sem substrato { Substrato adicionado	Sem substrato	16,99 $\pm$ 1,50	22,41 $\pm$ 0,76	27,14 $\pm$ 2,74	49,55 $\pm$ 3,6	
	{ Piruvato { Frutose { Leucina-L { Butirato	Piruvato	20,91 $\pm$ 2,51	2,49 $\pm$ 0,76	25,15 $\pm$ 1,73	27,64 $\pm$ 2,4
		Frutose	49,69 $\pm$ 6,05	0,85 $\pm$ 0,54	19,93 $\pm$ 1,27	20,78 $\pm$ 1,1
		Leucina-L	16,79 $\pm$ 0,98	25,76 $\pm$ 1,74	21,65 $\pm$ 2,07	47,41 $\pm$ 3,5
		Butirato	16,17 $\pm$ 0,16	33,05 $\pm$ 3,17	28,23 $\pm$ 2,72	61,28 $\pm$ 5,6

das Séries. Como se pode ver, foi feito também o estudo da variância entre as duas Séries diferentes de animais em jejum (fracção entre em jejum: 1.<sup>a</sup> × 2.<sup>a</sup> Série) e entre estas duas, como um conjunto, e a dos animais alimentados (fracção entre em jejum e alimentados: 1.<sup>a</sup> e 2.<sup>a</sup> Séries × 3.<sup>a</sup> Série).

Nos Quadros XXIII, XXIV e XXV, que indicam os resultados obtidos, figuram as médias dos valores encontrados nos ensaios replicados e, em muito raros casos, os de ensaios simples, quando, sempre devido exclusivamente a acidentes nos doseamentos, não foi possível obter as suas réplicas. No estudo da variância, sempre que faltava uma réplica, o seu valor teórico foi recuperado pelo método de Yates <sup>132</sup>, com perda de um grau de liberdade, como se pode ver nos Quadros.

#### COMENTÁRIO

##### a) PRIMEIRA SÉRIE (Fig. 24)

1.<sup>o</sup> — A observação dos resultados obtidos com a 1.<sup>a</sup> Série experimental permite-nos concluir que as fatias de fígado, nestas condições, evidenciam a capacidade gliconeogénica que lhes

obtidos em 2 experiências (n = 4; todos estão replicados), em  $\mu\text{moles/g}$  de tecido seco ( $\pm$  S. E. M.).  
seco ( $\pm$  S. E. M.).

$\beta$ -hidroxibutirato Acetacetato	$\beta$ -hidroxibutirato Acetacetato + $\beta$ -hidroxibutirato × 100	Ureia	Amónia	Ureia + Amónia
3,0 ± 1,1	75,1 ± 3,8	15,13 ± 1,05	12,55 ± 1,68	27,68 ± 2,57
1,2 ± 0,3	54,8 ± 4,4	27,83 ± 1,67	22,20 ± 2,07	50,03 ± 3,09
10,1 ± 9,2	91,0 ± 2,2	25,65 ± 3,66	20,50 ± 1,10	46,15 ± 2,62
23,4 ± 4,1	96,0 ± 2,5	23,15 ± 2,48	23,33 ± 2,19	46,48 ± 3,81
0,8 ± 0,1	45,7 ± 1,5	23,50 ± 1,79	23,50 ± 1,19	47,00 ± 2,88
0,9 ± 0,0	46,1 ± 1,4	27,05 ± 1,06	20,73 ± 1,44	47,78 ± 0,48

QUADRO XXIV  
INCUBAÇÕES COM FATIAS DE FÍGADO

2.<sup>a</sup> Série — Ratos em jejum há 48 h

Os valores exprimem as médias dos resultados obtidos em 6 experiências ( $n = 12$ , quando todos estão replicados, ou  $n = 11$ , como indicado, quando falta uma réplica), em  $\mu\text{moles/g}$  de tecido seco ( $\pm$  S. E. M.). A ureia é expressa em  $\mu\text{moles de amônia/g}$  de tecido seco ( $\pm$  S. E. M.).

PARÂMETROS	Glicose	Acetato	Ureia	Amônia	Ureia + Amônia	
VALORES INICIAIS (sem incubação)	$122,73 \pm 25,91$	$0,73 \pm 0,25$	$24,94 \pm 1,56$ (11)	$9,82 \pm 0,68$ (11)	$34,76 \pm 1,55$ (11)	
VALORES APÓS 60 MIN DE INCUBAÇÃO						
— Sem substrato	$145,37 \pm 22,10$	$7,98 \pm 1,05$	$37,46 \pm 2,73$ (11)	$18,52 \pm 0,99$	$55,98 \pm 2,77$ (11)	
— Substrato adicionado	Piruvato	$137,28 \pm 21,34$	$4,77 \pm 0,76$	$20,16 \pm 0,68$ (11)	$47,26 \pm 2,17$ (11)	
	Frutose	$172,81 \pm 20,68$	$2,86 \pm 0,68$	$19,80 \pm 1,47$	$51,99 \pm 2,88$	
	Leucina-L	$132,77 \pm 20,47$	$9,13 \pm 0,89$	$33,97 \pm 2,27$	$16,45 \pm 1,03$	$50,42 \pm 2,15$
	Butirato	$131,87 \pm 20,30$	$21,34 \pm 2,72$	$30,68 \pm 2,08$ (11)	$19,01 \pm 1,32$	$49,69 \pm 2,74$ (11)

QUADRO XXV

INCUBAÇÕES COM FATIAS DE FÍGADO

3.<sup>a</sup> Série — Ratos alimentados *ad libitum* até ao momento da experiência.

Os valores exprimem as médias dos resultados obtidos em 4 experiências (n = 8; todos estão replicados), em  $\mu\text{moles/g}$  de tecido seco ( $\pm$  S. E. M.). A ureia é expressa em  $\mu\text{moles}$  de amónia/g de tecido seco ( $\pm$  S. E. M.)

PARÂMETROS	Glicose	Acetacetato	Ureia	Amónia	Ureia + Amónia
VALORES INICIAIS (sem incubação)	787,37 $\pm$ 143,22	0,00 $\pm$ 0,00	30,03 $\pm$ 3,07	9,51 $\pm$ 0,92	39,54 $\pm$ 2,96
VALORES APÓS 60 MIN DE INCUBAÇÃO	785,09 $\pm$ 296,73	1,15 $\pm$ 0,23	43,38 $\pm$ 2,37	16,21 $\pm$ 1,14	58,59 $\pm$ 1,99
— Sem substrato					
— Substrato adicionado	Piruvato	1,84 $\pm$ 0,24	35,63 $\pm$ 3,66	17,28 $\pm$ 0,89	52,91 $\pm$ 3,03
	Frutose	1,14 $\pm$ 0,33	36,06 $\pm$ 3,16	16,39 $\pm$ 0,46	52,45 $\pm$ 2,76
	Leucina-L	2,17 $\pm$ 0,34	36,08 $\pm$ 2,86	12,89 $\pm$ 0,86	48,97 $\pm$ 2,70
	Butirato	5,15 $\pm$ 0,79	33,41 $\pm$ 2,42	16,94 $\pm$ 0,78	50,35 $\pm$ 1,96



QUADRO XXVI  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA

ACETACETATO

1.<sup>a</sup> Série

	G. L.	$\Sigma \square$	$\bar{\square}$	F	P
ANIMAIS	1	46,096	46,096	3,754	< 0,05
TRATAMENTOS	5	3980,197	796,039	64,829	Inf.al
INTERACÇÃO (animais $\times$ tratamentos)	5	90,547	18,109	1,475	$\approx$ 0,2
RESTO	12	147,348	12,279	—	—
TOTAL	23	4264,188	185,399	—	—

GRUPOS		$\bar{x}$	COMPARAÇÃO COM O GRUPO N.º 2		
N.º	Tratamentos		t	P	
1	sem {	incubação	3,057	7,808	< 0,001
2		substrato	22,405	—	—
3	com {	piruvato	2,485	8,039	< 0,001
4		frutose	0,845	8,701	< 0,001
5		leucina-L	25,755	1,352	$\approx$ 0,2
6		butirato	33,052	4,297	$\approx$ 0,001

é habitualmente reconhecida. Quando adicionámos ao meio os substratos estudados, verificámos que o piruvato e a frutose são, nestas condições, gliconeogénicos e que a frutose é, deste ponto de vista, muito mais efectiva do que o piruvato. Quer na presença de leucina-L quer na presença de butirato, não se verifica, nestas condições, qualquer alteração sensível da cifra de gliconeogénese que a preparação apresenta quando são disponíveis apenas os substratos endógenos.

2.º — Relativamente à capacidade cetogénica, verificámos que, como está descrito, os substratos endógenos são susceptíveis de transformação cetogénica. A diferença entre a quantidade de acetacetato encontrada após a incubação e a do ensaio

sem incubação é altamente significativa ( $P < 0,001$ ), como se pode ver no *Quadro XXVI*. Das substâncias ensaiadas nestas condições (ver *Quadro XXVI*), o butirato mostra-se cetogénico, sendo o seu efeito, do ponto de vista estatístico, altamente significativo ( $P \simeq 0,001$ ); o piruvato e a frutose, mostram-se anticetogénicos, encontrando-se para ambos valores de  $P < 0,001$ ; e a leucina não evidencia efeitos cetogénicos significativos ( $P \simeq 0,2$ ).

- 3.º — Relativamente ao beta-hidroxibutirato, verifica-se que também a leucina-L tem como efeito uma diminuição da quantidade encontrada.

Com os dados disponíveis não podemos, como é óbvio, afirmar que, relativamente ao beta-hidroxibutirato, as variações encontradas correspondam necessariamente a variações de síntese, pelo que consideramos a interpretação dos resultados com as naturais reservas.

- 4.º — Tem interesse, no entanto, considerar a relação beta-hidroxibutirato/acetacetato.

Verifica-se, no respeitante à quantidade final encontrada de beta-hidroxibutirato, que o comportamento face aos substratos é diferente do que se verifica relativamente ao acetacetato. Assim, tomando como referência os ensaios com incubação sem substratos, verifica-se que o butirato, praticamente, não evidencia qualquer efeito e que o mesmo se passa com o piruvato, enquanto que a leucina faz aumentar o acetacetato e diminuir o beta-hidroxibutirato; só com a frutose é que o comportamento é semelhante para estes dois parâmetros.

- 5.º — Quanto se considera o efeito dos substratos sobre a soma dos dois corpos cetónicos, verificamos que, dos quatro, só o butirato é finalmente «cetogénico», enquanto que a leucina-L praticamente não tem qualquer efeito, e o piruvato e a frutose são ambos «anticetogénicos», esta mais do que aquele.

Isto implica que o efeito sobre a relação beta-hidroxibutirato/acetacetato seja diferente de substância para substância, como se pode ver na Fig. 24.

Estes resultados parecem-nos de um interesse muito especial em face das interpretações que têm sido dadas aos valores da referida relação nas situações *in vivo*.

- 6.º — Com os doseamentos da ureia, comprovámos a capacidade ureogénica da preparação e verificámos que, com excepção 205

do butirato, todas as substâncias adicionadas tendem a diminuir a formação da ureia, embora nesta *Série* as diferenças não sejam estatisticamente significativas; veremos, no entanto, que numa apreciação global das *Séries* experimentais o facto adquire significado.

No caso do butirato, a diferença particular de comportamento poderá estar relacionada com o aumento da formação do acetato. Como será discutido no ensaio de interpretação final, estes factos são abrangidos pela perspectiva mais ampla da nossa tese, embora devam trazer sempre consigo a referência às condições particulares em que são obtidos.

7.º — Pudemos verificar que a formação de amónia não segue caminho exactamente paralelo ao da ureia.

QUADRO XXVII  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA

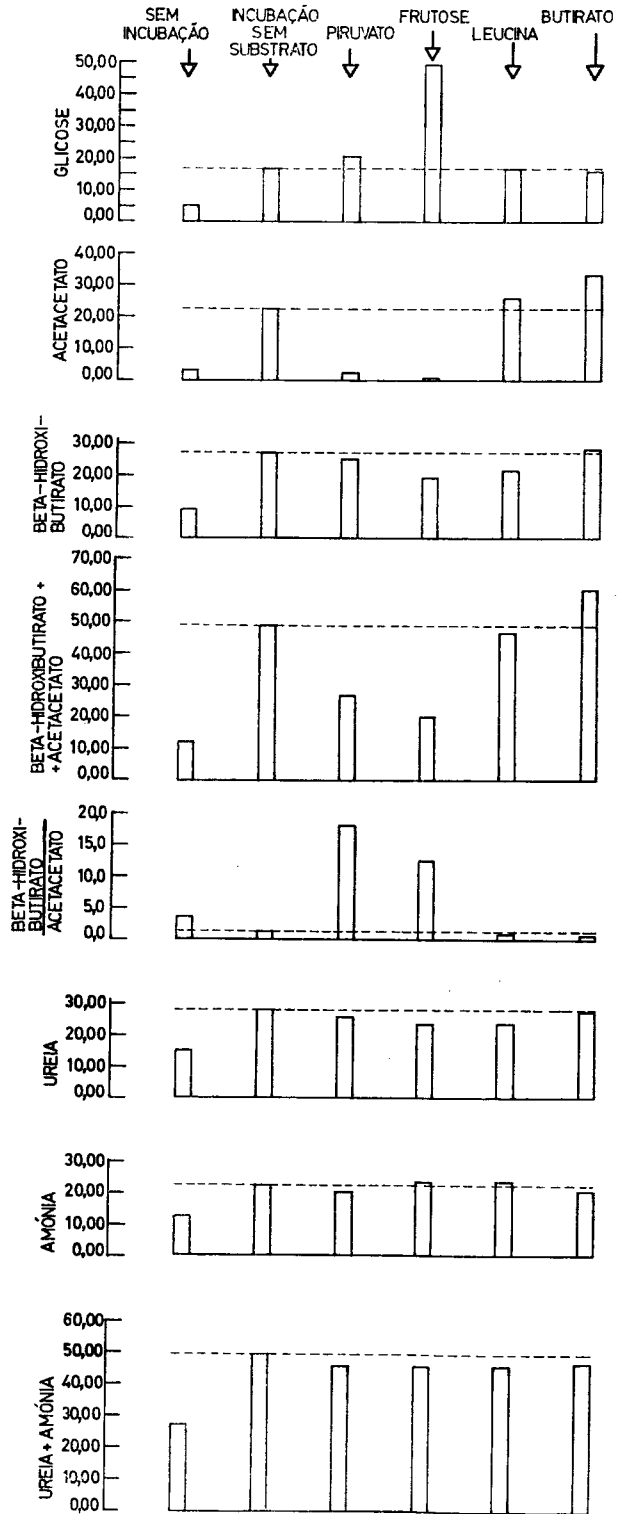
UREIA

1.ª *Série*

	G. L.	$\Sigma \square$	$\bar{\square}$	F	P
ANIMAIS	1	3,082	3,081	< 1	—
TRATAMENTOS	5	423,648	84,729	3,840	< 0,05
INTERACÇÃO (animais $\times$ tratamentos)	5	65,133	13,026	< 1	—
RESTO	12	264,750	22,062	—	—
TOTAL	23	756,613	32,896	—	—

GRUPOS		$\bar{x}$	COMPARAÇÃO COM O GRUPO N.º 2		
N.º	Tratamentos		t	P	
1	sem {	incubação	15,125	3,824	< 0,01
2		substrato	27,825	—	—
3	com {	piruvato	25,650	0,655	$\approx$ 0,5
4		frutose	23,150	1,408	$\approx$ 0,2
5		leucina-L	23,500	1,302	$\approx$ 0,2
6		butirato	27,050	0,233	$\approx$ 0,8



8.º — Relativamente à soma da ureia com a amónia, verificámos que todas as substâncias adicionadas tendem a diminuí-la. Este parâmetro talvez possa ser tomado como indicativo da capacidade de utilização dos substratos protídicos endógenos; nesta linha de interpretação poderíamos dizer que todas as substâncias adicionadas tendem a diminuir essa utilização.

Seria de esperar que o fornecimento de leucina-L aumentasse a formação de ureia, mas, em face dos resultados, será de considerar, talvez, que este ácido aminado sofra uma diluição muitíssimo grande que obscureça o efeito.

9.º — Adquire particular relevo o facto de que, consideradas no seu conjunto, relativamente ao acetacetato e à ureia, as diferenças nos resultados, que evidenciam os efeitos dos tratamentos, são, do ponto de vista estatístico, altamente significativas ( $P = \text{infinitesimal}$  para o caso do acetacetato — Quadro XXVI — e  $P < 0,05$  para o caso da ureia — Quadro XXVII). Anote-se que, apesar de as preparações de fígado obtidas dos diversos animais mostrarem comportamento diferente no que respeita à formação do acetacetato, a interacção não é estatisticamente significativa.

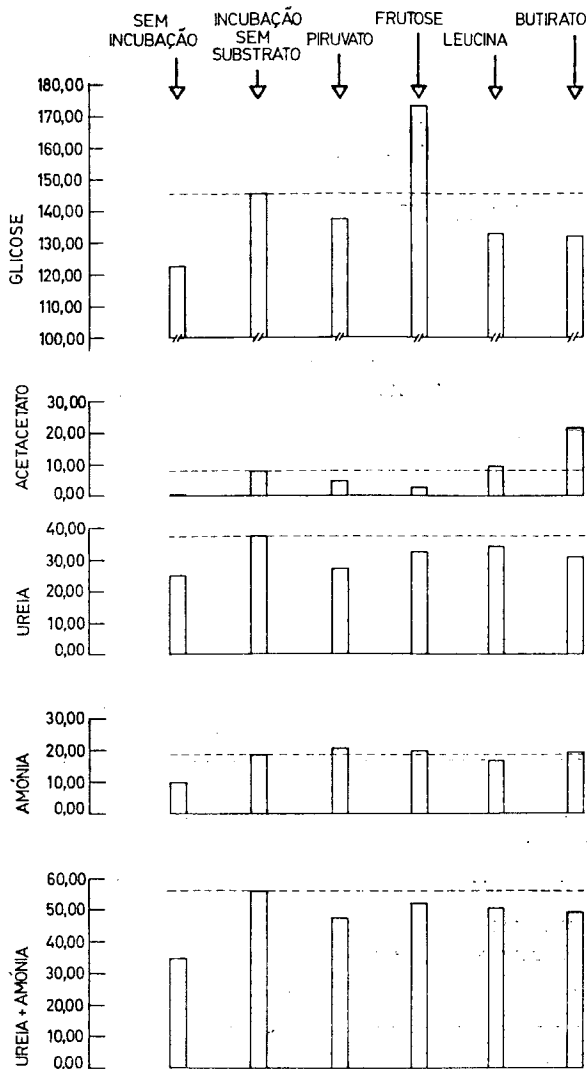
A variabilidade de fígado para fígado, no que se refere à produção de acetacetato, sugere-nos um paralelismo com a variabilidade que encontrámos nos ensaios *in vivo*, quando determinámos a concentração dos corpos cetónicos.

Os factos respeitantes a esta *Série*, que acabámos de comentar e às outras duas *Séries*, cujo comentário vamos fazer de seguida, serão retomados, quando a propósito, na terceira parte desta dissertação, onde pròpriamente serão discutidos, embora apenas na perspectiva da nossa tese.

#### b) SEGUNDA SÉRIE (Fig. 25)

1.º — Na 2.ª *Série* experimental não se ministrou *floridzina* aos animais de que foi obtido o fígado. Nota-se, com efeito que nesta *Série* a exaustão glicídica é de muito menor grau do que na primeira; o efeito é atribuível à falta daquele tratamento. Há, no entanto, a ter em conta que a *floridzina* não tem apenas o feito de exaustão glicídica e que alguns dos efeitos que lhe são conhecidos<sup>233, 234, 235, 546</sup> podem ter, particularmente neste campo, especial relevância.

Fig. 25 — Estudos com a incubação de fatias de fígado. 2.<sup>a</sup> Série. Valores das médias dos resultados de seis experiências em duplicado (Ver QUADRO XXIV), em  $\mu\text{moles/g}$  de tecido seco. Os valores referentes à glicose exprimem a soma da glicose do glicogénio e da glicose do meio, em  $\mu\text{moles/g}$  de tecido seco. A ureia é expressa em  $\mu\text{moles}$  de amónia/g de tecido seco.



Nesta Série, como se pode ver comparando os Quadros XXIV e XXIII, as variações dos valores médios de glicose são relativamente muito menores. Este facto explica a preferência que os autores dão aos animais tratados como na nossa 1.<sup>a</sup> Série, para estudos da gliconeogénese.

Salientamos que nesta 2.<sup>a</sup> Série só a frutose se revelou gliconeogénica. A propósito, lembramos apenas que, considerados os dois na sua totalidade, o caminho gliconeogénico a partir deste substrato é diferente do caminho a partir do piruvato.

Verificamos que o piruvato, a leucina-L e o butirato fizeram diminuir os valores médios da quantidade de glicose lançada no meio, quando se faz a comparação com o ensaio de incubação sem substrato. Estes efeitos necessitam de ulterior esclarecimento.

2.º — Quanto à formação de acetacetato, o perfil das variações é sobreponível ao da série anterior, designadamente com a leucina-L, cujo efeito também não é estatisticamente significativo ( $P \approx 0,7$ ; Quadro XXVIII).

É de notar a capacidade da preparação para produzir acetacetato ( $P \approx 0,001$ ; Quadro XXVIII), apesar de os níveis de

### QUADRO XXVIII

#### ANÁLISE DE VARIÂNCIA

##### ACETACETATO

##### 2.ª Série

	G. L.	$\Sigma \square$	$\bar{\square}$	F	P
ANIMAIS	5	314,061	62,812	2,459	$\approx 0,05$
TRATAMENTOS	5	3223,699	644,739	25,244	Inf.al
INTERACÇÃO (animais $\times$ tratamentos)	25	150,982	6,039	$< 1$	—
RESTO	36	919,457	25,540	—	—
TOTAL	71	4608,199	64,904	—	—

GRUPOS		$\bar{x}$	COMPARAÇÃO COM O GRUPO N.º 2		
N.º	Tratamentos		t	P	
1	sem {	incubação	0,729	3,516	$\approx 0,001$
2		substrato	7,984	—	—
3	com {	piruvato	4,772	1,557	$\approx 0,1$
4		frutose	2,860	2,484	$\approx 0,02$
5		leucina-L	9,130	0,557	$\approx 0,7$
6		butirato	21,337	6,472	$< 0,001$

produção serem significativamente mais baixos ( $P = \text{infinitesimal}$ ; *Quadro XXXII*) do que os verificados na 1.<sup>a</sup> *Série*.

3.<sup>o</sup> — A capacidade ureogénica das preparações, nestas condições, fica também amplamente comprovada ( $P < 0,001$ ; *Quadro XXIX*), sendo de notar que a diferença entre esta *Série* e a anterior é, do ponto de vista estatístico, altamente significativa ( $P = \text{infinitesimal}$ ; *Quadro XXXII*).

Note-se que das substâncias ensaiadas só a leucina-L não mostra efeito estatisticamente significativo ( $P \approx 0,1$ ; *Quadro XXIX*) e que, com este tipo de preparação, os efeitos verificados neste parâmetro se intensificaram relativamente

### QUADRO XXIX

#### ANÁLISE DE VARIÂNCIA

##### UREIA

##### 2.<sup>a</sup> *Série*

	G. L.	$\Sigma \square$	$\bar{\square}$	F	P
ANIMAIS	5	2182,978	436,595	19,103	< 0,001
TRATAMENTOS	5	1328,917	265,783	11,629	< 0,001
INTERACÇÃO (animais $\times$ tratamentos)	25	924,927	36,997	1,619	$\approx 0,2$
RESTO	32	731,370	22,855	—	—
TOTAL	67	5168,192	77,137	—	—

GRUPOS		$\bar{x}$	COMPARAÇÃO COM O GRUPO N.º 2		
N.º	Tratamentos		t	P	
1	sem {	incubação	24,936	6,141	< 0,001
2		substrato	37,455	—	—
3	com {	piruvato	27,100	5,080	< 0,001
4		frutose	32,192	2,637	< 0,02
5		leucina-L	33,967	1,748	$\approx 0,1$
6		butirato	30,682	3,323	$\approx 0,001$



à *Série* anterior. As diferenças verificadas entre a produção de ureia no ensaio com incubação sem substrato e a produção nos ensaios com substratos, que na primeira *Série*, estatisticamente, não eram significativas, tornam-se agora significativas, inclusivamente quando o butirato é o substrato, e apenas com a excepção já referida da leucina-L. Tem interesse, no entanto, apontar que, tanto nesta como na *Série* que se segue, a variabilidade de fígado para fígado em relação à ureogénese, que não era estatisticamente significativa na *Série* anterior, passa a ser altamente significativa, embora a interacção: *animais* × *tratamentos* não o seja e o efeito dos tratamentos seja altamente significativo (*Quadros XXIX e XXVII*).

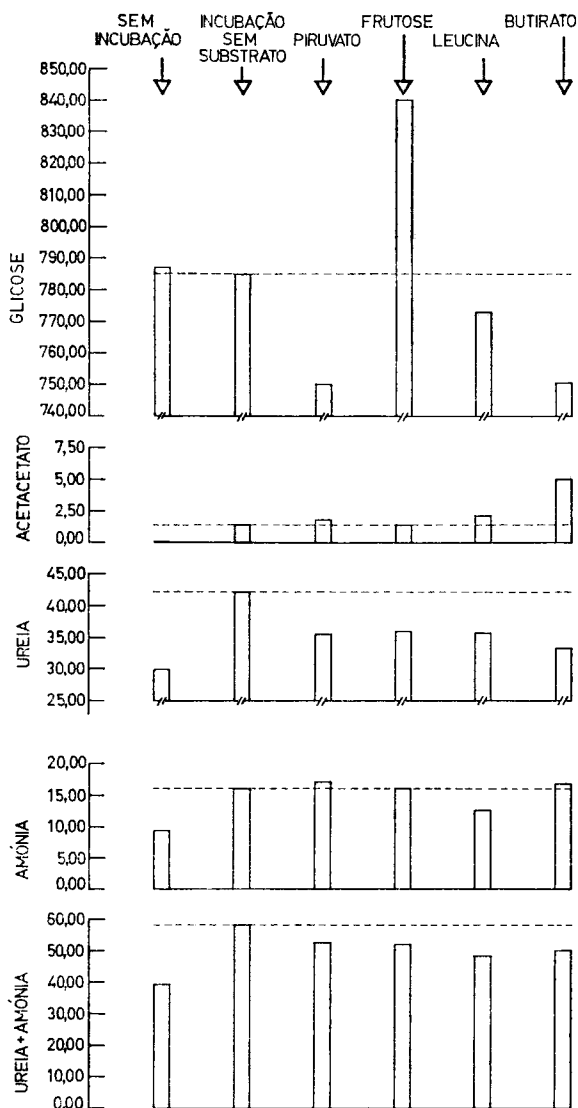
- 4.º — Relativamente à amónia e à soma da ureia e da amónia produzidas, referiremos que, de uma maneira geral, as considerações anteriormente feitas a propósito da 1.ª *Série* também aqui nos parecem válidas. Salientamos, apenas, que a soma das duas grandezas é influenciada principalmente pelos valores correspondentes da ureia.

c) TERCEIRA SÉRIE (Fig. 26)

- 1.º — Nesta 3.ª *Série*, os animais de que foi obtido o fígado tiveram alimentação *ad libitum* até ao momento do sacrifício. As disponibilidades das preparações em substratos utilizáveis são, neste caso, muito superiores, e o facto parece tornar-se patente nos valores da glicose, que são muitíssimo mais altos do que os encontrados nas *Séries* anteriores. Torna-se assim difícil valorizar e interpretar os efeitos dos diversos substratos sobre a gliconeogénese. Estes, com excepção da frutose, parecem ter maior efeito sobre o consumo do que sobre a produção de glicose. Pelo que respeita ao efeito do piruvato, os nossos resultados sugerem a possibilidade de se verificar, também com esta preparação *in vitro*, a efectividade do mecanismo de que CHAPPELL<sup>67</sup> faz uma revisão muito meritória ao considerar os sistemas mitocôndricos de transporte. Pensamos na possibilidade de transformação do piruvato em malato e na influência deste sobre a permeabilidade mitocôndrica. Os efeitos verificados, neste

aspecto, com os outros substratos necessitam também de serem esclarecidos com novas investigações.

Fig. 26 — Estudos com a incubação de fatias de fígado. 3.<sup>a</sup> Série. Valores das médias dos resultados de quatro experiências em duplicado (Ver QUADRO XXV), em  $\mu\text{moles/g}$  de tecido seco. Os valores referentes à glicose exprimem a soma da glicose do glicogénio e da glicose do meio, em  $\mu\text{moles/g}$  de tecido seco. A ureia é expressa em  $\mu\text{moles}$  de amónia/g de tecido seco.



Ainda relativamente à gliconeogénese, parece-nos dever ser salientado que no ensaio de incubação sem substrato não se obtém maior quantidade de glicose do que no ensaio sem incubação.

- 2.º — Os valores encontrados para a ureia parecem ter também o mesmo significado quanto à disponibilidade de substratos. Note-se que, neste aspecto, a diferença verificada entre esta *Série* e as duas anteriores é, do ponto de vista estatístico, altamente significativa ( $P = \text{infinitesimal}$ ; *Quadro XXXII*). A capacidade cetogénica destas preparações é também nitidamente diferente, quando a comparamos com as das *Séries* anteriores ( $P = \text{infinitesimal}$ ; *Quadro XXXII*).
- 3.º — Os níveis mínimos em que a síntese de acetacetato se verifica tornam mais difícil interpretar as variações do fenómeno; nestas circunstâncias, do ponto de vista estatístico, a leucina e o butirato apresentam efeitos respectivamente muito significativos e altamente significativos ( $P \approx 0,01$  e  $P = \text{infinitesimal}$ ; *Quadro XXX*). O que se verifica relativamente à formação de acetacetato com a adição de piruvato ou com a adição de

QUADRO XXX  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA

ACETACETATO

3.ª *Série*

	G. L.	$\Sigma \square$	$\bar{\square}$	F	P
ANIMAIS	3	12,778	4,259	7,202	$\approx 0,001$
TRATAMENTOS	5	122,940	24,588	41,578	Inf.al
INTERACÇÃO (animais $\times$ tratamentos)	15	27,549	1,836	3,106	$< 0,01$
RESTO	24	14,193	0,591	—	—
TOTAL	47	177,460	3,775	—	—

GRUPOS		$\bar{x}$	COMPARAÇÃO COM O GRUPO N.º 2	
N.º	Tratamentos		t	P
1	sem {	0,000	2,978	$< 0,01$
2		1,145	—	—
3	com {	1,840	1,808	$\approx 0,1$
4		1,143	0,003	$> 0,9$
5		2,172	2,672	$\approx 0,01$
6		5,146	10,406	Inf.al

frutose pode ser possivelmente interpretado como resultado de que a preparação se encontre saturada de substratos energéticos.

A diminuição da ureogênese verifica-se com qualquer dos substratos adicionados; estatisticamente, as diferenças em relação ao ensaio com incubação sem substrato são todas, pelo menos, muito significativas (*Quadro XXXI*).

4.<sup>o</sup> — Relativamente à amónia, o perfil das variações com a adição de substratos é muito semelhante ao da *Série* anterior; e o facto, bem como o respeitante à soma da ureia e da amónia nos diferentes ensaios, suscitar-nos-ia os mesmos comentários. Não deixaremos de acrescentar que, relativamente a estes parâmetros, algumas das variações encontradas revelam a conveniência de novas investigações.

QUADRO XXXI  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA

UREIA

3.<sup>a</sup> *Série*

	G. L.	$\Sigma \square$	$\bar{\square}$	F	P
ANIMAIS	3	2218,928	739,642	39,883	Inf.al
TRATAMENTO	5	657,651	131,530	7,092	≈ 0,001
INTERACÇÃO (animais × tratamentos)	15	272,230	18,140	< 1	—
RESTO	24	445,090	18,545	—	—
TOTAL	47	3593,899	76,465	—	—

GRUPOS			COMPARAÇÃO COM O GRUPO N.º 2		
N.º	Tratamentos	$\bar{x}$	t	P	
1	sem {	incubação	30,025	5,736	< 0,001
2		substrato	42,375	—	—
3	com {	piruvato	35,625	3,135	< 0,01
4		frutose	36,062	2,932	< 0,01
5		leucina-L	36,075	2,926	< 0,01
6		butirato	33,412	4,163	< 0,001

#### d) CONSIDERAÇÃO GLOBAL DAS TRÊS SÉRIES

1.º — Relativamente à formação do acetato, as preparações dos fígados dos diversos animais apresentam uma variabilidade que tem significado estatístico ( $P \approx 0,01$ ; Quadro XXXII) e que, como dissemos no comentário à 1.ª Série, será de considerar conjuntamente com os dados da variabilidade observada nos parâmetros da cetonomia, nas experiências realizadas *in vivo* que relatámos.

Mesmo assim, o estudo estatístico global indica-nos que as diferenças observadas nos resultados e interpretáveis como efeitos dos diversos tratamentos são em conjunto altamente significativas ( $P = \text{infinitesimal}$ ; Quadro XXXII) enquanto que a interação não é significativa.

Mais nos revela o mesmo estudo que as diferenças verificadas, relativamente a este parâmetro, entre as diversas Séries é altamente significativa. Estes nossos dados confirmam os do grupo de Oxford, obtidos com o fígado de Rato, isolado e perfundido, relativamente às diferenças entre o fígado de animais alimentados e o fígado de animais em jejum <sup>271</sup>.

As diferenças observadas entre as preparações de fígado de animais em jejum e de animais em jejum tratados pela *floridzina* poderão ser interpretadas na mesma perspectiva; parece-nos, no entanto, que deve ser considerada a possibilidade de a *floridzina* contribuir *per se* para o efeito final observado, o que necessitará de ser especialmente investigado.

2.º — Relativamente à capacidade ureogénica, o estudo estatístico mostra-nos igualmente diferenças globais apreciáveis (Quadro XXXII). As Figs. 24, 25 e 26, referentes às diversas Séries, mostram-nos, no entanto, de modo simples e impressivo que as variações de ureogénese e de síntese de acetato não se fazem obrigatoriamente no mesmo sentido, mas podem ter sentidos inversos — o que acontece notoriamente quando o meio contém frutose ou butirato.

O possível significado destas diferenças que agora desejamos destacar será procurado no ensaio de interpretação que constituirá a terceira parte deste trabalho.

Notemos também que em todas as três Séries estudadas há diferenças entre a quantidade de ureia observada nos ensaios com incubação sem substrato e a observada nos ensaios

sem incubação, e que essa diferença é em todos os casos estatisticamente pelo menos muito significativa.

3.º — Da reflexão sobre os valores da soma da ureia e da amónia encontrados nas diversas Séries, parece-nos poder propor-se como hipótese sugestiva, a confirmar com novas investigações, que a adição ao meio de substratos utilizáveis tem um efeito de poupança dos substratos protídicos endógenos. Com carácter de corolário, deverá também admitir-se que os efeitos específicos dos substratos sobre a cetogénese,

QUADRO XXXII  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA  
ESTUDO GLOBAL DAS TRÊS SÉRIES

		G. L.	$\Sigma \square$	$\bar{\square}$	F	P
ACETACETATO	ANIMAIS	9	372,936	41,437	2,760	$\approx 0,01$
	TRATAMENTOS	15	7 326,837	488,456	32,534	Inf.al
	Nas Séries INTERACÇÃO (animais $\times$ tratamentos)	45	269,078	5,979	< 1	—
	RESTO	72	1 080,998	15,014	—	—
	TOTAL	141	9 049,849	64,183	—	—
Entre Séries	ENTRE EM JEJUM (1.ª $\times$ 2.ª Série)	1	831,640	831,640	55,391	Inf.al
	ENTRE { EM JEJUM e ALIMENTADOS (1.ª e 2.ª $\times$ 3.ª Series)	1	1 845,484	1 845,484	122,919	Inf.al
	TOTAL	2	2 677,124	1 338,567	89,155	Inf.al
TOTAL		143	11 726,973	82,007	—	—
UREIA	ANIMAIS	9	4 404,987	489,443	23,093	Inf.al
	TRATAMENTOS	15	2 410,218	160,681	7,581	< 0,001
	Nas Séries INTERACÇÃO (animais $\times$ tratamentos)	45	1 262,290	28,051	1,323	$\approx 0,2$
	RESTO	68	1 441,210	21,194	—	—
	TOTAL	137	9 518,705	69,479	—	—
Entre Séries	ENTRE EM JEJUM (1.ª $\times$ 2.ª Série)	1	1 043,483	1 043,483	49,234	Inf.al
	ENTRE { EM JEJUM e ALIMENTADOS (1.ª e 2.ª $\times$ 3.ª Séries)	1	1 136,850	1 136,850	53,640	Inf.al
	TOTAL	2	2 180,333	1 090,167	51,437	Inf.al
TOTAL		139	11 699,038	84,165	—	—

nestas experiências, uma vez que são de sinal variável, deverão ser interpretados, em geral, como independentes da ureogênese. Parece-nos, no entanto, que devemos distinguir esses *efeitos específicos*, de uma outra relação geral que se pode verificar quando comparamos o que se passa por um lado nos ensaios com incubação sem substrato e por outro nos ensaios sem incubação. Para o estudo da correlação apontada, as investigações a desenvolver deverão ter em conta, para cada substrato, as variações com o tempo e com outros factores.

- 4.<sup>o</sup> — Considerada a capacidade de gliconeogénese, torna-se evidente, nestas experiências, a falta de correlação desta com a capacidade de síntese do acetato, não só no que respeita aos efeitos dos diversos substratos adicionados, mas também no tocante ao resultado da própria incubação, como acontece com a terceira *Série*. Estes nossos resultados dão a mesma indicação que as experiências de EXTON & PARK <sup>122</sup>, realizadas com o fígado isolado e perfundido, relativamente à falta de correlação dos dois fenómenos, correlação que é postulada, como vimos, por uma das principais teorias que pretendem explicar a regulação da cetogénese.

## 2. ESTUDOS COM A PERFUSÃO DO FÍGADO ISOLADO

Nos estudos empreendidos com este tipo de preparação tivemos por finalidade aumentar as informações obtidas nas experiências anteriores, designadamente no que respeita às relações entre a cetogénese, a ureogénese e a gliconeogénese; obter informes sobre a acção da insulina e da glicagina nestas condições; e abordar, especialmente, os problemas do efeito cetogénico do ião amónio.

As experiências realizadas até agora, de que damos conhecimento, são apenas uma parte das que planeámos, mas contribuem, no entanto, desde já, para formularmos a nossa tese.

Todas as experiências realizadas com esta preparação obedeceram a 218 um mesmo esquema, como já foi indicado.

Depois de um período de perfusão de 30 min, fizemos a adição da substância cujos efeitos nos interessava estudar.

Imediatamente antes desta adição, foi feita uma colheita do líquido de perfusão, para doseamentos, cujos resultados nos permitiram, juntamente com outros índices (fluxo de perfusão, cor do fígado, produção de bile), avaliar a viabilidade da preparação.

As outras colheitas foram feitas 30 e 60 min depois desta primeira, portanto aos 60 e 90 min de perfusão.

Em todos os estudos com experiências de perfusão semelhantes a estas, é considerado um período inicial, anterior a qualquer adição, como período de recuperação do fígado e estabilização das condições, cuja duração varia, ligeiramente, de escola para escola; como vimos, nós considerámos, com essa finalidade, um período de 30 min.

Realizámos 7 experiências sem adição de qualquer substância, para verificar a estabilidade da preparação durante o período de tempo estudado e para obter valores base.

As substâncias adicionadas nas diferentes experiências foram, conforme os casos:

- *Butirato* — em quantidade necessária para obtermos uma concentração 10 mM ao tempo da adição, adicionado num volume igual ao da primeira colheita.
- *Insulina* — 1 U de insulina cristalizada «Novo» em 0,1 ml de ácido clorídrico centinormal, de uma só vez, ou 5 U de insulina cristalizada «Hoechst», em 0,5 ml de ácido clorídrico centinormal, também de uma só vez.
- *Glicagina* — cristalizada «Sigma» — 200  $\mu$ g em 0,8 ml de amortecedor de glicina pH 10<sup>164</sup>, como num estudo de WILLIAMSON, GARCIA, RENOLD & CAHILL<sup>575</sup>.
- *Cloreto de amónio* — adicionado sempre na mesma quantidade absoluta (1 500  $\mu$ moles), em 1 ml de solução aquosa, como num trabalho de KREBS<sup>195</sup>.
- *Cloreto de amónio e ornitina* — adicionados sempre, também, nas mesmas quantidades absolutas (1 500  $\mu$ moles de cloreto de amónio e 400  $\mu$ moles de ornitina-L, no volume de 1 ml, em solução aquosa).
- *Bicarbonato de amónio* — adicionado sempre na mesma quantidade absoluta (1 500  $\mu$ moles), no volume de 1,5 ml em solução aquosa.



Utilizamos sempre como líquido de perfusão o amortecedor de Krebs-Henseleit com 2,6 p. 100 de albumina bovina (fracção V, em pó, «Sigma») purificada por diálise. E em dois dos Grupos experimentais o meio de perfusão foi enriquecido inicialmente com glicose (concentração inicial 10 mM). Nas experiências que integram um destes Grupos foi feita a adição de insulina (1 U de insulina «Novo» aos 30 min, como anteriormente) e nas do outro Grupo (*Grupo testemunha*) não foi feita qualquer adição ulterior. Em todas as outras experiências, o amortecedor de Krebs-Henseleit com albumina não teve inicialmente qualquer enriquecimento.

O débito de perfusão foi sempre igual ou superior a 30 ml/min, conseguido, em todos os casos, com uma pressão hidrostática de 30 cm de líquido de perfusão; todos os fígados produziram bile em volume da ordem do referido por WILLIAMSON *et al.* 575 e pelo grupo de KREBS 195; o pH do meio de perfusão manteve-se sempre com variações apenas da ordem de  $\pm 0,1$  unidade de pH.

São referidos os valores obtidos em 39 experiências, cuja distribuição pode ser vista no *Quadro XXXIII* que juntamente com as figuras documentam os resultados obtidos.

Os animais de que foi obtido o fígado, todos da colónia do nosso Laboratório, encontravam-se, na ocasião do sacrifício, em jejum de 24 h, apenas com água *ad libitum*, e foram alimentados nas duas semanas anteriores com a dieta semi-sintética.

Estas experiências foram realizadas de Janeiro a Abril do ano corrente.

Em todas as amostras e no líquido inicial de perfusão foram doseados o acetato, o beta-hidroxibutirato, a glicose, a ureia e a amónia; estas três últimas foram doseadas sempre em duplicado e o valor com que entramos nos cálculos é o da média dos dois ensaios; no fígado foi doseado o glicogénio, em amostras colhidas imediatamente antes e imediatamente depois do período de perfusão.

Os resultados obtidos são apresentados no *Quadro XXXIII* onde os valores relativos ao acetato, beta-hidroxibutirato, ureia e glicose exprimem o aparecimento ou desaparecimento das substâncias do meio de perfusão, em  $\mu$ moles por grama de tecido seco, nos três períodos de 30 min explorados, que são referidos; os valores referentes à amónia exprimem a concentração desta substância em  $\mu$ moles/ml no

QUADRO XXXIII

ESTUDOS COM A PERFUSÃO DO FÍGADO ISOLADO

Todos os resultados exprimem  $\mu$ moles da substância produzida para o meio, por grama de fígado seco, durante 30 min ( $\pm$  S. E. M.), com excepção dos que se referem à amónia, que exprimem a concentração em  $\mu$ moles/ml do meio ( $\pm$  S. E. M.) e à relação beta-hidroxibutirato/acetacetato que exprime a razão das concentrações no momento final dos períodos assinalados. Os valores referentes ao glicogénio exprimem a diferença, em  $\mu$ moles de glicose do glicogénio/g de tecido seco, entre o momento 0 e os 90 min de perfusão.

GRUPO N.º	PARÂMETROS CONDIÇÕES	ACETACETATO			$\beta$ -HIDROXIBUTIRATO			ACETACETATO + $\beta$ -HIDROXI- BUTIRATO			$\beta$ -HIDROXIBUTIRATO ACETACETATO			UREIA			AMÓNIA			GLICOSE			GLICOGÉNIO
		PERÍODOS EM MIN	0-30	30-60	60-90	0-30	30-60	60-90	0-30	30-60	60-90	0-30	30-60	60-90	0-30	30-60	60-90	0-30	30-60	60-90	0-30	30-60	60-90
1.	Sem adição (TESTEMUNHA)	17,58 $\pm$ 3,44 (7)	26,52 $\pm$ 3,18 (7)	31,50 $\pm$ 2,35 (7)	7,76 $\pm$ 1,14 (7)	9,56 $\pm$ 0,64 (7)	11,01 $\pm$ 1,35 (7)	25,35 $\pm$ 4,26 (7)	36,08 $\pm$ 3,62 (7)	42,51 $\pm$ 2,64 (7)	0,49 $\pm$ 0,06 (7)	0,41 $\pm$ 0,04 (7)	0,38 $\pm$ 0,03 (7)	18,31 $\pm$ 1,60 (7)	19,62 $\pm$ 2,95 (7)	18,76 $\pm$ 1,18 (7)	0,08 $\pm$ 0,01 (7)	0,08 $\pm$ 0,01 (7)	0,08 $\pm$ 0,01 (7)	75,47 $\pm$ 15,71 (7)	22,66 $\pm$ 7,45 (7)	10,13 $\pm$ 4,62 (7)	- 68,54 $\pm$ 29,69 (7)
2.	BUTIRATO (10 mM)	21,14 $\pm$ 4,33 (3)	72,48 $\pm$ 16,01 (3)	82,64 $\pm$ 17,05 (3)	12,47 $\pm$ 0,96 (3)	30,71 $\pm$ 7,80 (3)	30,81 $\pm$ 7,60 (3)	33,62 $\pm$ 5,25 (3)	103,22 $\pm$ 23,60 (3)	113,45 $\pm$ 24,64 (3)	0,62 $\pm$ 0,08 (3)	0,46 $\pm$ 0,02 (3)	0,41 $\pm$ 0,01 (3)	18,77 $\pm$ 2,36 (3)	12,18 $\pm$ 1,96 (3)	16,88 $\pm$ 3,64 (3)	0,13 $\pm$ 0,03 (3)	0,10 $\pm$ 0,02 (3)	0,12 $\pm$ 0,03 (3)	57,98 $\pm$ 21,16 (3)	17,18 $\pm$ 6,98 (3)	7,26 $\pm$ 3,28 (3)	- 47,75 $\pm$ 24,64 (3)
3.	INSULINA (1U)	33,19 $\pm$ 11,78 (3)	41,32 $\pm$ 4,31 (3)	38,93 $\pm$ 4,21 (3)	14,17 $\pm$ 4,26 (3)	15,89 $\pm$ 3,41 (3)	14,79 $\pm$ 4,22 (3)	47,76 $\pm$ 14,51 (3)	57,21 $\pm$ 7,07 (3)	53,72 $\pm$ 6,06 (3)	0,49 $\pm$ 0,16 (3)	0,41 $\pm$ 0,01 (3)	0,40 $\pm$ 0,12 (3)	33,14 $\pm$ 4,12 (3)	47,86 $\pm$ 9,05 (3)	73,60 $\pm$ 9,34 (2)	0,09 $\pm$ 0,02 (3)	0,17 $\pm$ 0,04 (3)	0,26 $\pm$ 0,14 (2)	52,57 $\pm$ 20,93 (3)	10,60 $\pm$ 11,33 (3)	- 3,30 $\pm$ 4,19 (3)	- 56,96 $\pm$ 27,50 (3)
4.	INSULINA (5U)	35,24 $\pm$ 6,61 (4)	45,43 $\pm$ 5,94 (4)	36,49 $\pm$ 12,76 (4)	12,99 $\pm$ 2,66 (4)	17,46 $\pm$ 4,14 (4)	14,99 $\pm$ 3,54 (4)	48,23 $\pm$ 8,26 (4)	61,39 $\pm$ 7,80 (4)	51,49 $\pm$ 15,86 (4)	0,39 $\pm$ 0,07 (4)	0,39 $\pm$ 0,06 (4)	0,39 $\pm$ 0,09 (4)	26,43 $\pm$ 5,06 (4)	48,02 $\pm$ 12,79 (4)	23,92 $\pm$ 2,56 (4)	0,16 $\pm$ 0,06 (4)	0,14 $\pm$ 0,02 (4)	0,20 $\pm$ 0,02 (4)	48,96 $\pm$ 8,85 (4)	17,43 $\pm$ 14,55 (4)	3,28 $\pm$ 12,30 (4)	- 17,11 $\pm$ 5,77 (4)
5.	Adição aos 30 min	26,83 $\pm$ 3,71 (5)	43,07 $\pm$ 10,92 (5)	42,70 $\pm$ 6,90 (4)	12,12 $\pm$ 3,05 (5)	9,75 $\pm$ 2,88 (5)	10,74 $\pm$ 2,73 (4)	38,95 $\pm$ 5,69 (5)	52,83 $\pm$ 13,58 (5)	53,44 $\pm$ 6,56 (4)	0,45 $\pm$ 0,09 (5)	0,41 $\pm$ 0,09 (5)	0,32 $\pm$ 0,07 (4)	30,03 $\pm$ 6,55 (5)	31,22 $\pm$ 6,75 (5)	45,29 $\pm$ 17,16 (5)	0,13 $\pm$ 0,03 (5)	0,15 $\pm$ 0,02 (5)	0,15 $\pm$ 0,03 (5)	60,69 $\pm$ 9,52 (5)	30,51 $\pm$ 8,90 (5)	12,02 $\pm$ 1,69 (5)	- 50,29 $\pm$ 22,64 (3)
6.	CLORETO DE AMÓNIO (1 500 $\mu$ moles)	39,21 $\pm$ 3,90 (5)	47,38 $\pm$ 7,50 (5)	36,51 $\pm$ 8,28 (4)	14,39 $\pm$ 2,52 (3)	- 4,56 $\pm$ 2,27 (3)	- 1,06 $\pm$ 1,72 (3)	53,60 $\pm$ 6,21 (5)	42,76 $\pm$ 5,38 (5)	37,01 $\pm$ 8,98 (4)	0,36 $\pm$ 0,03 (5)	0,11 $\pm$ 0,02 (5)	0,06 $\pm$ 0,02 (5)	20,68 $\pm$ 4,52 (3)	68,36 $\pm$ 23,10 (3)	89,82 $\pm$ 4,63 (3)	0,12 $\pm$ 0,03 (5)	16,43 $\pm$ 1,74 (5)	10,97 $\pm$ 1,13 (5)	58,62 $\pm$ 17,75 (3)	1,93 $\pm$ 16,65 (3)	- 11,87 $\pm$ 7,37 (3)	- 33,75 $\pm$ 15,56 (5)
7.	CLORETO DE AMÓNIO (1 500 $\mu$ moles) + ORNITINA (400 $\mu$ moles)	31,65 $\pm$ 5,83 (3)	22,06 $\pm$ 2,02 (3)	11,85 $\pm$ 5,51 (3)	10,04 $\pm$ 2,91 (3)	1,34 $\pm$ 1,75 (3)	1,74 $\pm$ 0,87 (3)	41,69 $\pm$ 7,81 (3)	23,40 $\pm$ 2,24 (3)	13,59 $\pm$ 5,71 (3)	0,33 $\pm$ 0,07 (3)	0,22 $\pm$ 0,05 (3)	0,20 $\pm$ 0,04 (3)	23,19 $\pm$ 5,21 (3)	84,28 $\pm$ 25,56 (3)	61,91 $\pm$ 17,39 (3)	0,10 $\pm$ 0,01 (3)	11,10 $\pm$ 0,71 (3)	8,14 $\pm$ 1,13 (3)	97,56 $\pm$ 32,22 (3)	0,46 $\pm$ 16,68 (3)	- 14,45 $\pm$ 17,06 (3)	- 87,73 $\pm$ 45,11 (3)
8.	BICARBONATO DE AMÓNIO (1 500 $\mu$ moles)	41,56 $\pm$ 10,87 (3)	27,16 $\pm$ 2,64 (3)	26,29 $\pm$ 5,24 (3)	8,15 $\pm$ 1,51 (3)	- 0,42 $\pm$ 0,66 (3)	- 2,09 $\pm$ 2,69 (3)	49,71 $\pm$ 9,88 (3)	26,74 $\pm$ 3,29 (3)	24,20 $\pm$ 4,41 (3)	0,24 $\pm$ 0,08 (3)	0,11 $\pm$ 0,03 (3)	0,07 $\pm$ 0,01 (3)	38,11 $\pm$ 13,14 (3)	92,08 $\pm$ 42,38 (3)	67,19 $\pm$ 11,54 (3)	0,16 $\pm$ 0,02 (3)	11,91 $\pm$ 0,12 (3)	10,13 $\pm$ 0,09 (3)	96,10 $\pm$ 27,78 (3)	- 23,52 $\pm$ 29,79 (3)	- 2,00 $\pm$ 13,02 (3)	- 69,00 $\pm$ 16,72 (3)
9.	GLICOSE (inicialmente 10 mM) (TESTEMUNHA)	27,96 $\pm$ 3,66 (2)	28,92 $\pm$ 0,46 (2)	16,65 $\pm$ 1,12 (2)	7,36 $\pm$ 0,42 (2)	3,31 $\pm$ 0,19 (2)	1,33 $\pm$ 0,89 (2)	33,32 $\pm$ 2,07 (2)	32,23 $\pm$ 0,26 (2)	17,98 $\pm$ 2,01 (2)	0,27 $\pm$ 0,02 (2)	0,18 $\pm$ 0,00 (2)	0,16 $\pm$ 0,01 (2)	12,13 $\pm$ 2,03 (2)	15,14 $\pm$ 3,86 (2)	12,04 $\pm$ 5,29 (2)	0,17 $\pm$ 0,03 (2)	0,17 $\pm$ 0,01 (2)	0,18 $\pm$ 0,01 (2)	- 2,64 $\pm$ 9,58 (2)	- 35,80 $\pm$ 17,32 (2)	- 12,16 $\pm$ 5,06 (2)	52,09 $\pm$ 48,84 (2)
10.	GLICOSE (inicialmente 10 mM); 1U de INSULINA aos 30 min	27,16 $\pm$ 5,15 (4)	23,40 $\pm$ 4,84 (4)	18,16 $\pm$ 0,04 (2)	9,63 $\pm$ 1,34 (4)	9,55 $\pm$ 1,18 (4)	6,34 $\pm$ 3,33 (4)	36,79 $\pm$ 6,18 (4)	32,95 $\pm$ 4,07 (4)	29,97 $\pm$ 2,43 (2)	0,38 $\pm$ 0,06 (4)	0,42 $\pm$ 0,08 (4)	0,44 $\pm$ 0,08 (4)	28,83 $\pm$ 13,10 (4)	33,31 $\pm$ 12,81 (4)	29,34 $\pm$ 3,10 (4)	0,13 $\pm$ 0,02 (4)	0,15 $\pm$ 0,05 (4)	0,19 $\pm$ 0,06 (4)	77,03 $\pm$ 51,32 (4)	- 56,67 $\pm$ 89,08 (4)	- 6,15 $\pm$ 31,03 (4)	- 7,69 $\pm$ 4,30 (4)

fim desses períodos; a relação beta-hidroxibutirato/acetacetato exprime a razão das concentrações destas substâncias também no momento final dos períodos assinalados.

#### TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE RESULTADOS

Com a finalidade de extrairmos dos dados experimentais os informes cuja obtenção nos pareceu adequada para o possível esclarecimento dos problemas que temos em vista, procedemos ao estudo matemático que passaremos a referir. O *Quadro XXXIV* e as Figs. 27, 28, 29, 30 e 31 documentam os resultados obtidos.

Para este estudo, quando numa série faltava um dos valores (o que se ficou a dever sempre a acidente nos doseamentos e aconteceu poucas vezes), o seu valor teórico foi recuperado pelo método de Yates <sup>132</sup>. Isso explica que algumas das médias utilizadas aqui difiram, embora apenas ligeiramente, das referidas no *Quadro XXXIII* que é elaborado somente com os valores obtidos nos doseamentos realizados.

A partir dos valores das médias que figuram no *Quadro XXXIV* determinámos, então, pelo método dos quadrados mínimos, a curva do segundo grau cujos integrais definidos, em cada meia hora, sejam iguais aos valores médios de produção observados nos mesmos períodos, pressupondo produções iguais a zero no momento zero. Nas figs. 27, 28, 29, 30 e 31 os valores médios e estas curvas são assinalados com A.

Dado, no entanto, que as produções médias durante a primeira meia hora, em que todos os grupos de experiências estavam nas mesmas condições (para cada um dos dois tipos de líquido inicial de perfusão), eram diferentes de *Grupo* para *Grupo*, normalizámos as curvas dividindo os valores de cada um dos pontos pelo da produção média da primeira meia hora. As curvas assim normalizadas são assinaladas nas Figs. com B.

Para evidenciar os efeitos dos tratamentos, subtraímos, ponto a ponto, aos valores de cada curva obtida com o tratamento, os valores correspondentes da curva do *Grupo* testemunha. A curva assim obtida é assinalada nas Figs. com C.

Por último, para facilitar a apreciação dos efeitos, as diferenças assim obtidas foram divididas pelos valores correspondentes da curva do *Grupo* de testemunhas e os quocientes expressos em percentagem. A curva obtida deste modo é assinalada nas Figs. com D.

Resulta, portanto, que a curva das percentagens terá valores de zero quando a produção, sob o efeito do tratamento, for igual à do grupo testemunha; será positiva quando lhe for superior e negativa quando lhe for inferior; estes valores negativos atingem -100 p. 100 quando a pro-

dução, por efeito do tratamento, for zero, e ultrapassam — 100 p. 100 quando, por efeito do tratamento, a substância considerada tiver sido consumida pela preparação (ou tiver de outra forma desaparecido do meio).

Deve ser considerado, também, que os pontos extremos das curvas que calculámos são menos significativos que os intermediários, porque resultam de extrapolação.

Todas as curvas calculadas, as que traduzem velocidades absolutas de produção (A), as que representam velocidades normalizadas (B), as que representam diferenças de duas velocidades de produção (C) e as que definem a relação de velocidades nos ensaios relativamente às testemunhas (D) são curvas que nos indicam a cinética de fenómenos de produção (ou, como é óbvio, de utilização).

Anotemos por fim que os resultados da análise apresentados no *Quadro XXXIV*, no que respeita à fracção *tempos*, exprimem a uniformidade da produção em cada uma das condições experimentais, mas não medem a alteração produzida relativamente ao *Grupo* testemunha como efeito do tratamento. Esta última é expressa na forma de percentagem, como dissemos, na coluna D das Figs. 27 a 31.

#### COMENTÁRIO

As curvas D, que exprimem em percentagem os efeitos dos tratamentos, relativamente às testemunhas, facilitam muitíssimo a apreciação dos resultados; por isso serão, fundamentalmente, as consideradas neste breve comentário.

1.º — Examinando os resultados obtidos com o doseamento do acetato, verificamos que, nestas experiências, a velocidade da sua produção só foi acentuadamente alterada quando adicionámos ao meio o butirato.

Os cálculos indicam que a percentagem de produção é de 136,9 p. 100, aos 52,5 min, relativamente às testemunhas. No grupo de experiências com adição de glicagina esboça-se também um aumento que os cálculos mostram ser de 7,2 p. 100 aos 37,5 min de perfusão. É de notar, no entanto, que a adição desta substância foi feita de uma só vez.

Em todas as outras experiências, designadamente naquelas em que adicionámos ao meio sais de amónio, as curvas mostram-nos velocidades de produção inferiores às do *Grupo* testemunha com excepção dos momentos iniciais, sempre dentro dos primeiros 30 min. Ora vimos já que os dados

referentes a esses momentos iniciais devem ser interpretados com as reservas próprias.

2.º — A velocidade de produção do beta-hidroxibutirato aumenta notoriamente como efeito da adição de butirato (107,2 p. 100 aos 52,5 min) e apenas muito ligeiramente pela adição de 5 U de insulina («Hoechst»), atingindo o valor de 12,8 p. 100 aos 37,5 min. Apreciável é, relativamente ao beta-hidroxibutirato, o que se passa nas experiências em que fizemos a adição de sais de amónio. Quando adicionámos apenas sais de amónio, não só a produção foi inibida, como passou a haver mesmo o «consumo», como efeito da adição.

Quando juntamente com o cloreto de amónio adicionámos ornitina-L, verificamos a completa inibição da produção de beta-hidroxibutirato.

3.º — No que respeita à relação beta-hidroxibutirato/acetacetato (*Quadro XXXIII*), verificamos que não se evidenciam variações nas experiências em que adicionámos o butirato, a glicagina, ou, quando a concentração da glicose é baixa, também a insulina. O enriquecimento do meio de incubação com glicose parece determinar valores muito baixos da referida relação; os valores são mais altos, da ordem dos verificados no *Grupo* em que se não fez qualquer adição ou enriquecimento, quando ao meio enriquecido com glicose se juntou a insulina. A relação atinge valores muitíssimo baixos quando se adicionam ao meio os sais de amónio e os valores sobem, embora apenas para os níveis dos verificados com o enriquecimento do meio em glicose, quando com o cloreto de amónio se juntou também a ornitina.

4.º — Relativamente à ureia, verificamos que o butirato faz diminuir a velocidade da sua formação e que todas as outras substâncias adicionadas a fazem aumentar, sendo assinalável, pela sua grandeza, o aumento com os sais de amónio, pela sua precocidade, o provocado pela adição de 5 U de insulina («Hoechst») e, pelo seu carácter tardio, os aumentos com a adição de 1 U de insulina («Novo») e com a adição de glicagina.

ESTUDOS COM A PERFUSÃO DO FÍGADO ISOLADO — ANÁLISE DE VARIÂNCIA

GRUPOS	PARÂMETROS	MÉDIAS NOS 3 PERÍODOS	G. L.	$\Sigma$	$\bar{x}$	F	P
1. TESTEMU- NHA	ACETACETATO	Preparações	6	435,441	72,573	1,212	$\approx 0,2$
		Tempos	2	695,994	347,997	5,813	$< 0,05$
		Resto	12	718,328	59,860	—	—
		Total	20	1849,763	92,488	—	—
	BETA-HIDROXI- BUTIRATO	Preparações	6	57,653	9,608	1,267	$\approx 0,2$
		Tempos	2	37,051	18,525	2,442	$> 0,05$
		Resto	12	91,031	7,585	—	—
		Total	20	185,735	9,286	—	—
	GLICOSE	Preparações	6	5904,067	984,011	1,537	$\approx 0,2$
		Tempos	2	16838,109	8419,054	13,153	$< 0,001$
		Resto	12	7681,180	640,098	—	—
		Total	20	30423,356	1521,167	—	—
UREIA	Preparações	6	140,396	23,399	$< 1$	—	
	Tempos	2	6,118	3,059	$< 1$	—	
	Resto	12	467,864	38,988	—	—	
	Total	20	614,378	30,718	—	—	
2. BUTIRATO	ACETACETATO	Preparações	2	2615,696	1307,848	6,716	$\approx 0,05$
		Tempos	2	6520,244	3260,122	16,741	$\approx 0,01$
		Resto	4	778,963	194,740	—	—
		Total	8	9914,903	1239,362	—	—
	BETA-HIDROXI- BUTIRATO	Preparações	2	490,503	245,251	4,323	$> 0,05$
		Tempos	2	670,032	335,016	5,906	$> 0,05$
		Resto	4	226,913	56,728	—	—
		Total	8	1387,448	173,431	—	—
	GLICOSE	Preparações	2	1933,906	966,953	3,487	$\approx 0,1$
		Tempos	2	4336,785	2168,392	7,819	$< 0,05$
		Resto	4	1109,236	277,309	—	—
		Total	8	7379,927	922,490	—	—
UREIA	Preparações	2	122,675	61,337	18,677	$\approx 0,01$	
	Tempos	2	69,033	34,516	10,508	$< 0,05$	
	Resto	4	13,139	3,284	—	—	
	Total	8	204,847	25,606	—	—	

ACETACETATO	$\bar{X}_1 = 33,186$	Preparações	2	757,807	378,903	5,165	> 0,05
	$\bar{X}_2 = 41,320$	Tempos	2	104,849	52,424	< 1	—
	$\bar{X}_3 = 38,930$	Resto	4	293,433	73,358	—	—
		Total	8	1156,089	144,511	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	$\bar{X}_1 = 14,173$	Preparações	2	79,336	39,667	< 1	—
	$\bar{X}_2 = 15,890$	Tempos	2	4,537	2,268	< 1	—
	$\bar{X}_3 = 14,790$	Resto	4	206,053	51,513	—	—
		Total	8	289,926	36,240	—	—
GLICOSE	$\bar{X}_1 = 52,566$	Preparações	2	851,612	425,806	< 1	—
	$\bar{X}_2 = 10,596$	Tempos	2	5076,148	2538,074	3,827	> 0,05
	$\bar{X}_3 = -3,303$	Resto	4	2652,478	663,119	—	—
		Total	8	8580,238	1072,529	—	—
UREIA	$\bar{X}_1 = 33,143$	Preparações	2	620,025	310,012	6,033	≈ 0,05
	$\bar{X}_2 = 47,856$	Tempos	2	2384,259	1192,129	23,200	< 0,01
	$\bar{X}_3 = 72,590$	Resto	3	154,151	51,383	—	—
		Total	7	3158,435	451,205	—	—
ACETACETATO	$\bar{X}_1 = 35,240$	Preparações	3	2079,340	693,113	5,049	> 0,05
	$\bar{X}_2 = 45,430$	Tempos	2	247,045	123,522	< 1	—
	$\bar{X}_3 = 36,492$	Resto	6	823,600	137,266	—	—
		Total	11	3149,985	286,362	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	$\bar{X}_1 = 12,985$	Preparações	3	351,716	117,238	7,901	< 0,05
	$\bar{X}_2 = 17,457$	Tempos	2	40,146	20,073	1,353	> 0,05
	$\bar{X}_3 = 14,992$	Resto	6	89,026	14,837	—	—
		Total	11	480,888	43,717	—	—
GLICOSE	$\bar{X}_1 = 48,955$	Preparações	3	1402,921	467,640	< 1	—
	$\bar{X}_2 = 17,432$	Tempos	2	4374,353	2187,176	3,372	> 0,05
	$\bar{X}_3 = 3,275$	Resto	6	3891,292	648,548	—	—
		Total	11	9668,566	878,960	—	—
UREIA	$\bar{X}_1 = 26,430$	Preparações	3	1040,746	346,915	1,599	> 0,05
	$\bar{X}_2 = 48,022$	Tempos	2	1404,445	702,222	3,237	> 0,05
	$\bar{X}_3 = 23,922$	Resto	6	1301,640	216,940	—	—
		Total	11	3746,831	340,621	—	—

(Continua)

QUADRO XXXIV (Continuação)

ESTUDOS COM A PERFUSÃO DO FÍGADO ISOLADO — ANÁLISE DE VARIÂNCIA

GRUPOS	PARÂMETROS	MÉDIAS NOS 3 PERÍODOS	G. L.	$\Sigma$	$\square$	F	P
ACETACETATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 26,834$	2	2401,370	1200,685	2,815	> 0,05
	Tempos	$\bar{X}_2 = 43,072$	2	1179,432	589,716	1,382	> 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = 47,446$	3	1279,689	426,562	—	—
	Total		7	4860,491	694,355	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 12,120$	2	121,120	60,560	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = 9,754$	2	16,909	8,454	< 1	—
	Resto	$\bar{X}_3 = 11,872$	3	346,306	115,435	—	—
	Total		7	484,335	69,190	—	—
GLICOSE	Preparações	$\bar{X}_1 = 60,688$	2	1031,611	515,805	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = 30,514$	2	6034,673	3017,336	4,978	> 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = 12,022$	4	2424,414	606,103	—	—
	Total		8	9490,698	1186,337	—	—
UREIA	Preparações	$\bar{X}_1 = 30,028$	2	4971,064	2485,532	3,698	> 0,05
	Tempos	$\bar{X}_2 = 31,224$	2	719,961	359,980	< 1	—
	Resto	$\bar{X}_3 = 45,286$	4	2688,617	672,154	—	—
	Total		8	8379,642	1047,455	—	—
ACETACETATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 39,210$	4	1815,122	453,780	7,643	< 0,01
	Tempos	$\bar{X}_2 = 47,376$	2	389,151	194,575	3,277	> 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = 35,124$	8	474,964	59,370	—	—
	Total		14	2679,237	191,374	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 14,386$	4	14,702	3,675	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = -4,558$	2	128,246	64,123	< 1	—
	Resto	$\bar{X}_3 = -1,056$	8	1161,669	145,208	—	—
	Total		14	1304,617	93,186	—	—
GLICOSE	Preparações	$\bar{X}_1 = 58,618$	4	2216,397	554,099	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = 1,926$	2	13954,222	6977,111	5,209	< 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = -11,868$	8	10715,667	1339,458	—	—
	Total		14	26886,286	1920,449	—	—
UREIA	Preparações	$\bar{X}_1 = 20,684$	4	2865,569	716,392	1,292	> 0,05
	Tempos	$\bar{X}_2 = 66,656$	2	12382,355	6191,177	11,170	< 0,01
	Resto	$\bar{X}_3 = 89,818$	8	4434,263	554,282	—	—
	Total		14	19682,187	1405,870	—	—

5. GLICAGINA

6. CLORETO  
DE  
AMÔNIO



ACETACETATO	$\bar{X}_1 =$	31,650	2	199,830	99,914	1,893	> 0,05
	$\bar{X}_2 =$	22,063	2	588,456	294,228	5,576	> 0,05
	$\bar{X}_3 =$	11,846	4	211,075	52,768	—	—
	Total	—	8	999,361	124,920	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	$\bar{X}_1 =$	10,040	2	6,838	3,419	< 1	—
	$\bar{X}_2 =$	1,336	2	144,748	72,374	4,321	> 0,05
	$\bar{X}_3 =$	1,743	4	66,991	16,747	—	—
	Total	—	8	218,577	27,322	—	—
GLICOSE	$\bar{X}_1 =$	97,560	2	1816,019	908,009	< 1	—
	$\bar{X}_2 =$	0,460	2	22199,958	11099,979	5,674	> 0,05
	$\bar{X}_3 =$	-14,450	4	7824,575	1956,143	—	—
	Total	—	8	31840,552	3980,069	—	—
UREIA	$\bar{X}_1 =$	23,186	2	4212,709	2106,354	5,003	> 0,05
	$\bar{X}_2 =$	84,276	2	5731,861	2865,930	6,807	≈ 0,05
	$\bar{X}_3 =$	61,913	4	1684,140	421,035	—	—
	Total	—	8	11628,710	1453,588	—	—
ACETACETATO	$\bar{X}_1 =$	41,563	2	153,463	76,731	< 1	—
	$\bar{X}_2 =$	27,163	2	441,397	220,698	1,160	> 0,05
	$\bar{X}_3 =$	26,290	4	761,242	190,310	—	—
	Total	—	8	1356,102	169,512	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	$\bar{X}_1 =$	8,150	2	2,838	1,419	< 1	—
	$\bar{X}_2 =$	-0,423	2	181,137	90,568	6,260	≈ 0,05
	$\bar{X}_3 =$	-2,090	4	57,873	14,468	—	—
	Total	—	8	241,848	30,231	—	—
GLICOSE	$\bar{X}_1 =$	96,100	2	262,415	131,207	< 1	—
	$\bar{X}_2 =$	-23,520	2	24395,154	12197,577	4,557	> 0,05
	$\bar{X}_3 =$	-1,996	4	10707,486	2676,871	—	—
	Total	—	8	35365,055	4420,632	—	—
UREIA	$\bar{X}_1 =$	38,110	2	7251,362	3625,681	2,707	> 0,05
	$\bar{X}_2 =$	92,076	2	4377,421	2188,710	1,634	> 0,05
	$\bar{X}_3 =$	67,193	4	5358,062	1339,515	—	—
	Total	—	8	16986,845	2123,355	—	—

(Continua)

QUADRO XXXIV (Continuação)

ESTUDOS COM A PERFUSÃO DO FÍGADO ISOLADO — ANÁLISE DE VARIÂNCIA

GRUPOS	PARÂMETROS	MÉDIAS NOS 3 PERÍODOS	G. L.	$\Sigma$	$\square$	F	P
ACETACETATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 27,960$	1	2,898	2,898	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = 28,915$	2	186,172	93,086	6,943	> 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = 16,650$	2	26,816	13,408	—	—
	Total		5	215,886	43,177	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 7,355$	1	0,054	0,054	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = 3,310$	2	37,722	18,861	19,384	< 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = 1,330$	2	1,946	0,973	—	—
	Total		5	39,722	7,944	—	—
GLICOSE	Preparações	$\bar{X}_1 = - 2,635$	1	109,227	109,226	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = - 35,795$	2	1165,949	582,974	1,608	> 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = - 12,160$	2	724,960	362,480	—	—
	Total		5	2000,136	400,027	—	—
UREIA	Preparações	$\bar{X}_1 = 12,130$	1	83,328	83,328	15,604	> 0,05
	Tempos	$\bar{X}_2 = 15,140$	2	12,452	6,226	1,166	> 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = 12,040$	2	10,681	5,340	—	—
	Total		5	106,461	21,292	—	—
ACETACETATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 27,157$	3	524,502	174,834	5,704	< 0,05
	Tempos	$\bar{X}_2 = 23,402$	2	243,121	121,560	3,966	> 0,05
	Resto	$\bar{X}_3 = 16,302$	6	183,899	30,649	—	—
	Total		11	951,522	86,502	—	—
BETA-HIDROXI- BUTIRATO	Preparações	$\bar{X}_1 = 9,630$	3	70,225	23,408	1,388	> 0,05
	Tempos	$\bar{X}_2 = 9,545$	2	28,181	14,090	< 1	—
	Resto	$\bar{X}_3 = 6,337$	6	101,201	16,866	—	—
	Total		11	199,607	18,146	—	—
GLICOSE + INSULINA	Preparações	$\bar{X}_1 = 77,032$	3	17771,189	5923,729	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = - 56,670$	2	36463,507	18231,753	< 1	—
	Resto	$\bar{X}_3 = - 6,145$	6	120610,144	20101,690	—	—
	Total		11	174844,840	15894,985	—	—
UREIA	Preparações	$\bar{X}_1 = 28,832$	3	710,873	236,957	< 1	—
	Tempos	$\bar{X}_2 = 33,305$	2	48,022	24,011	< 1	—
	Resto	$\bar{X}_3 = 29,335$	6	1489,769	248,294	—	—
	Total		11	2248,664	204,424	—	—

Na presença da glicose em concentração elevada, a insulina não altera a velocidade de produção de ureia.

Considerados em conjunto os resultados obtidos nestas experiências, verificamos que nelas não se torna evidente qualquer correlação entre a cetogénese e a ureogénese.

- 5.º — Quando observamos os dados relativos à produção de glicose, verificamos que apenas com a glicagina obtemos um aumento da «produção». O que se verifica neste aspecto no *Grupo* de experiências em que adicionámos 5 U de insulina leva-nos a pensar na possível contaminação desta insulina com glicagina, tanto mais que pela semi-soma dos resultados encontrados neste *Grupo* e no da glicagina obtemos valores sobreponíveis aos obtidos com o *Grupo* testemunha.

O facto necessita, no entanto, de ser reinvestigado, tanto mais que a semi-soma de efeitos não conduz a resultados semelhantes quando se consideram outros parâmetros.

No caso da adição de 1 U de insulina, verificamos uma aceleração precoce do consumo, que no caso da adição de 5 U é tardia.

De assinalar com muito especial relevo são os resultados obtidos pela adição de sais de amónio. Nestas experiências as curvas de velocidade de consumo fazem-nos lembrar as que obtivemos quando considerámos o beta-hidroxibutirato.

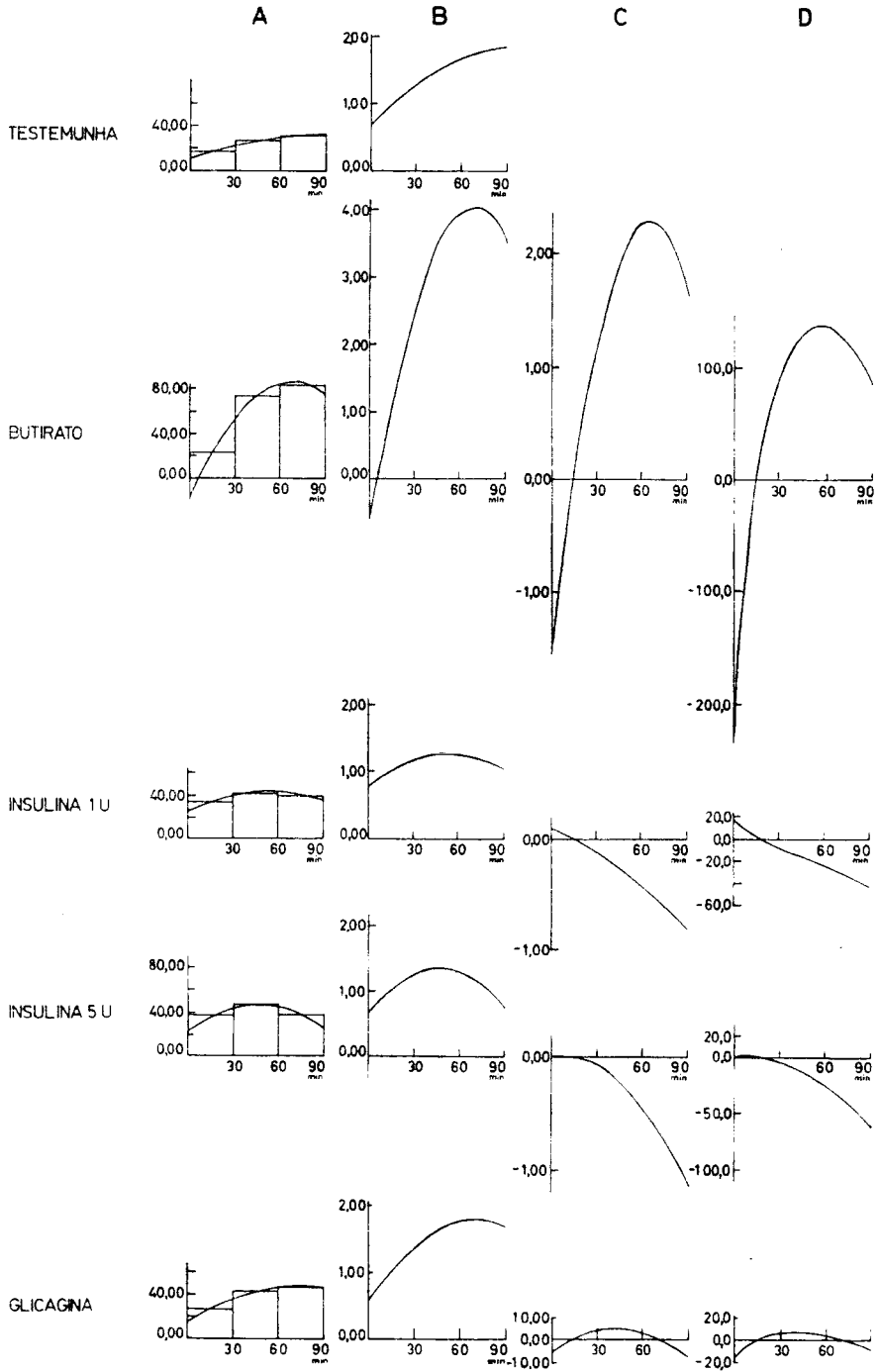
- 6.º — Habitualmente, nos estudos da gliconeogénese com o fígado isolado e perfundido, não é considerada a variação do glicogénio. Como foi dito, fizemos o doseamento desta substância antes e depois da perfusão.

Pudemos observar que o aumento da concentração do glicogénio só se verifica, entre esses dois pontos, no caso de o meio de perfusão conter glicose adicionada em alta concentração e na ausência de insulina, o que demonstra, tal como KESTENS<sup>238</sup> já havia verificado com o fígado de Cão, que o fígado de Rato, isolado, pode sintetizar glicogénio, desde que a concentração da glicose seja elevada.

Em todos os outros casos o fígado perdeu glicogénio.

Parece-nos de salientar, neste aspecto, o efeito da insulina, tanto mais que, relativamente ao metabolismo glicídico do fígado, tem sido diversamente interpretado.

# ACETACETATO



# ACETACETATO

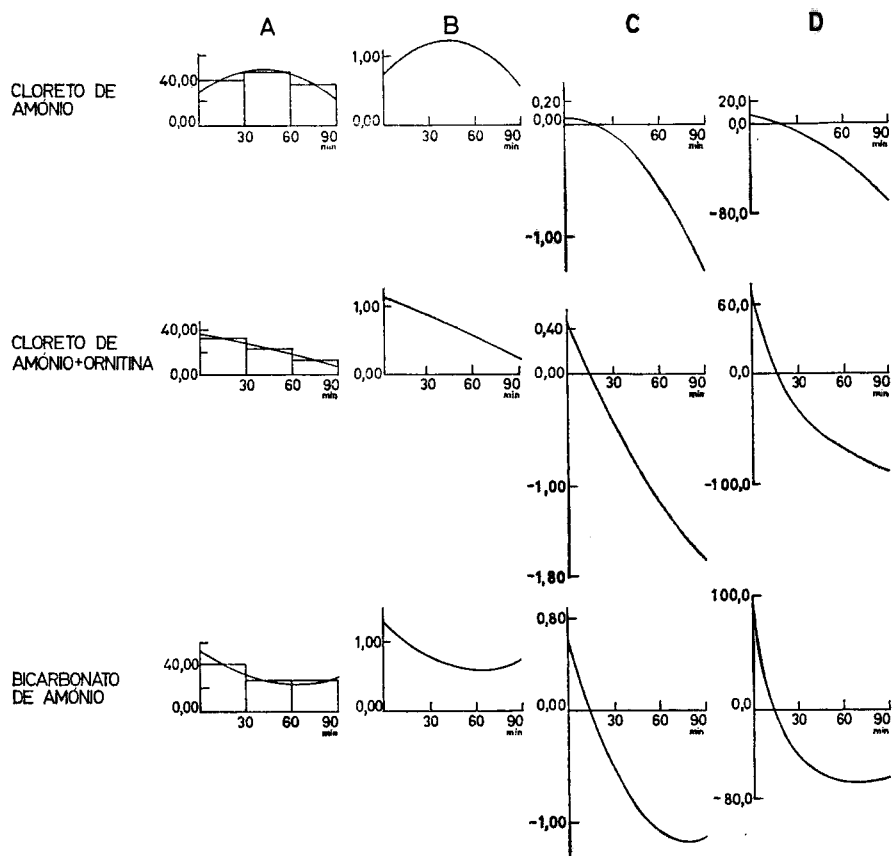
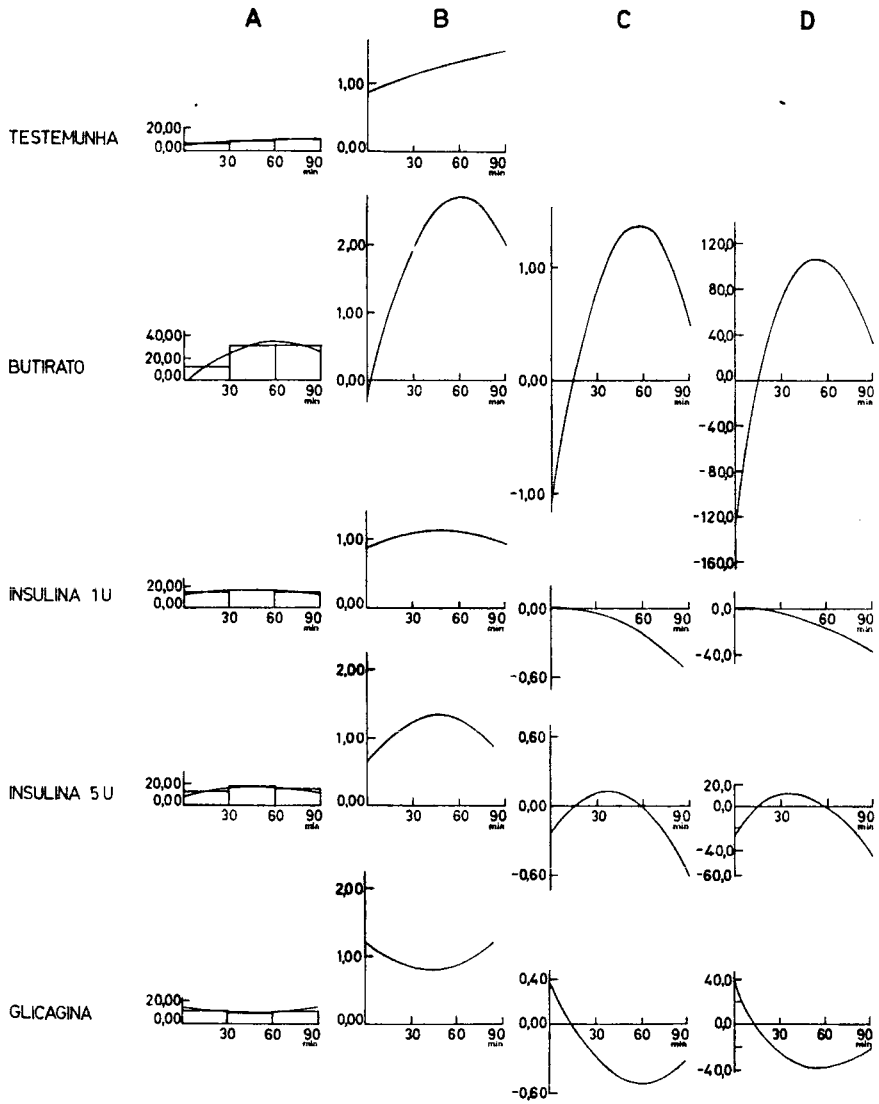


Fig. 27 — Estudos com a perfusão do fígado isolado. Produção de acetato.

Efeitos do butirato, da insulina (1U e 5U), da glicagina, do cloreto de amônio, do cloreto de amônio e ornitina e do bicarbonato de amônio.

Ver Quadros XXXIII e XXXIV e, no texto, para significado das colunas A, B, C e D, «Tratamento estatístico dos resultados».

# BETA -HIDROXIBUTIRATO



## BETA - HIDROXIBUTIRATO

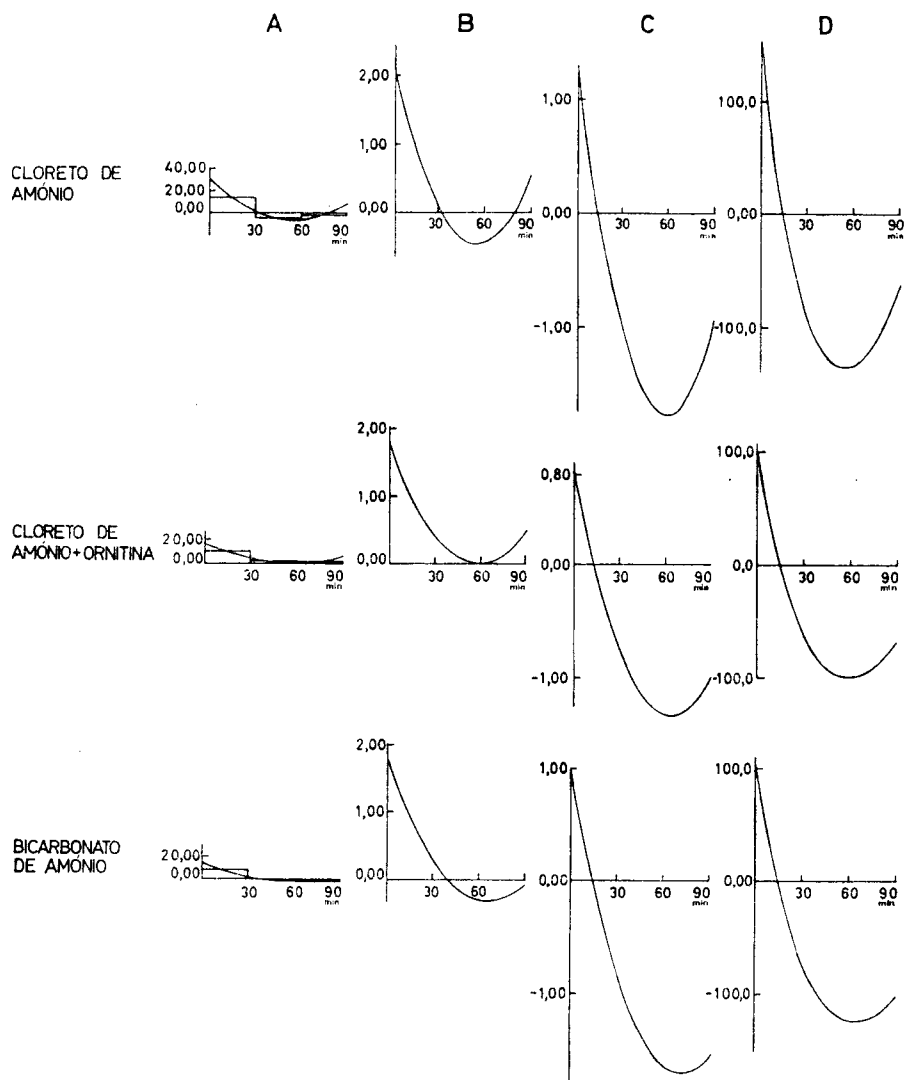


Fig. 28 — Estudos com a perfusão do fígado isolado. *Produção do beta-hidroxibutirato.*

Efeitos do butirato, da insulina (1U e 5U), da glicagina, do cloreto de amônio, do cloreto de amônio e ornitina e do bicarbonato de amônio.

Ver Quadros XXXIII e XXXIV e, no texto, para o significado das colunas A, B, C e D, «Tratamento estatístico dos resultados».

# UREIA

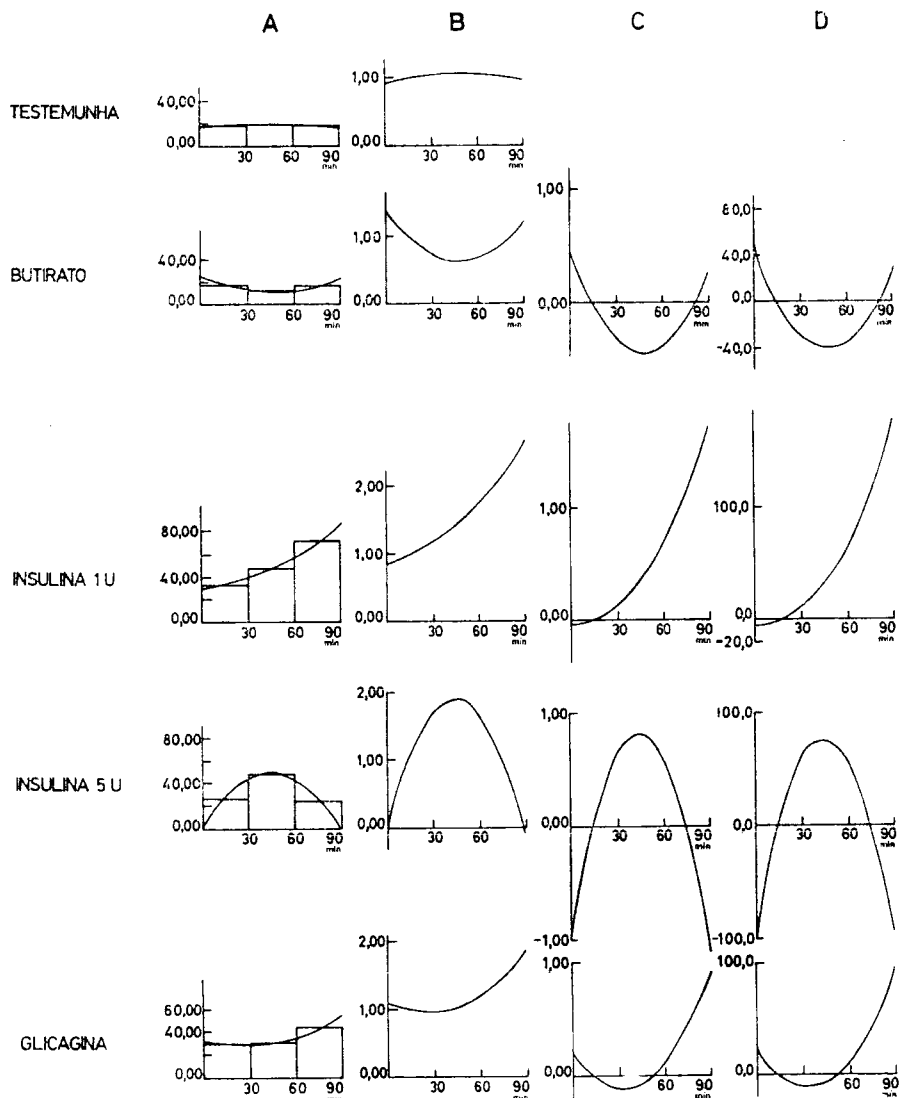


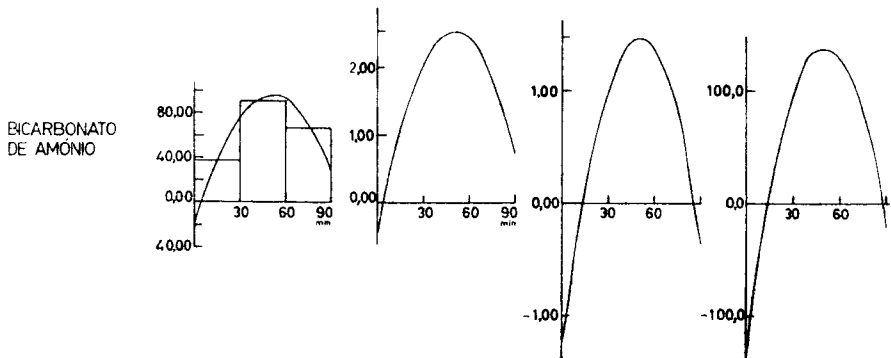
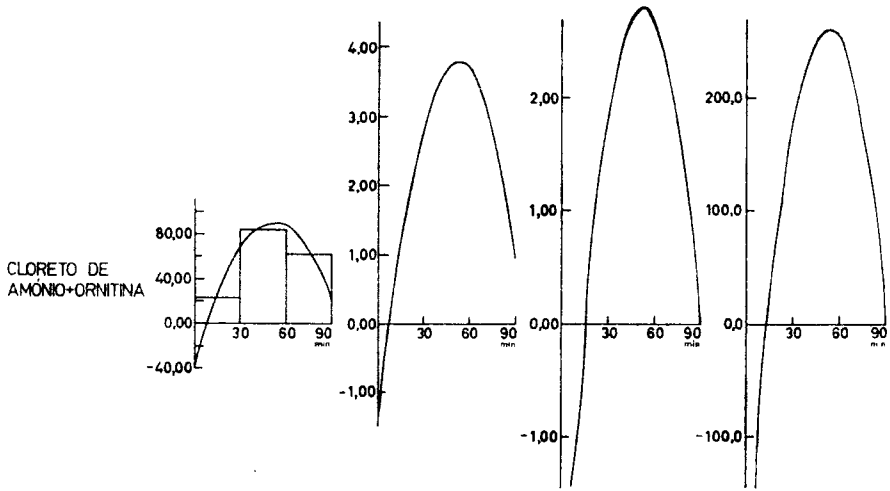
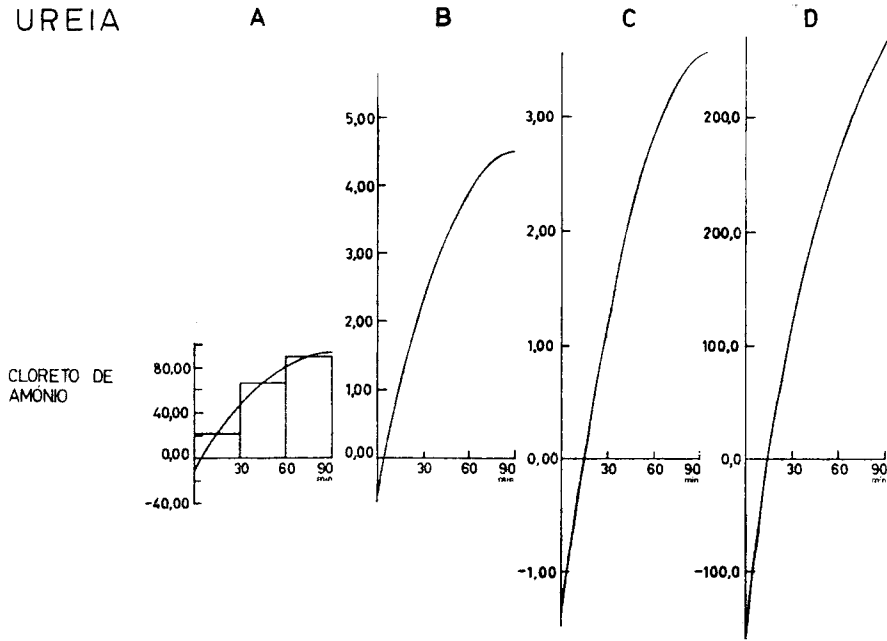
Fig. 29 — Estudos com a perfusão do fígado isolado. Produção de ureia.

Efeitos do butirato, da insulina (1U e 5U), da glicagina, do cloreto de amônio, do cloreto de amônio e ornitina e do bicarbonato de amônio.

Ver Quadros XXXIII e XXXIV e, no texto, para o significado das colunas A, B, C e D, «Tratamento estatístico dos resultados».



UREIA



GLICOSE

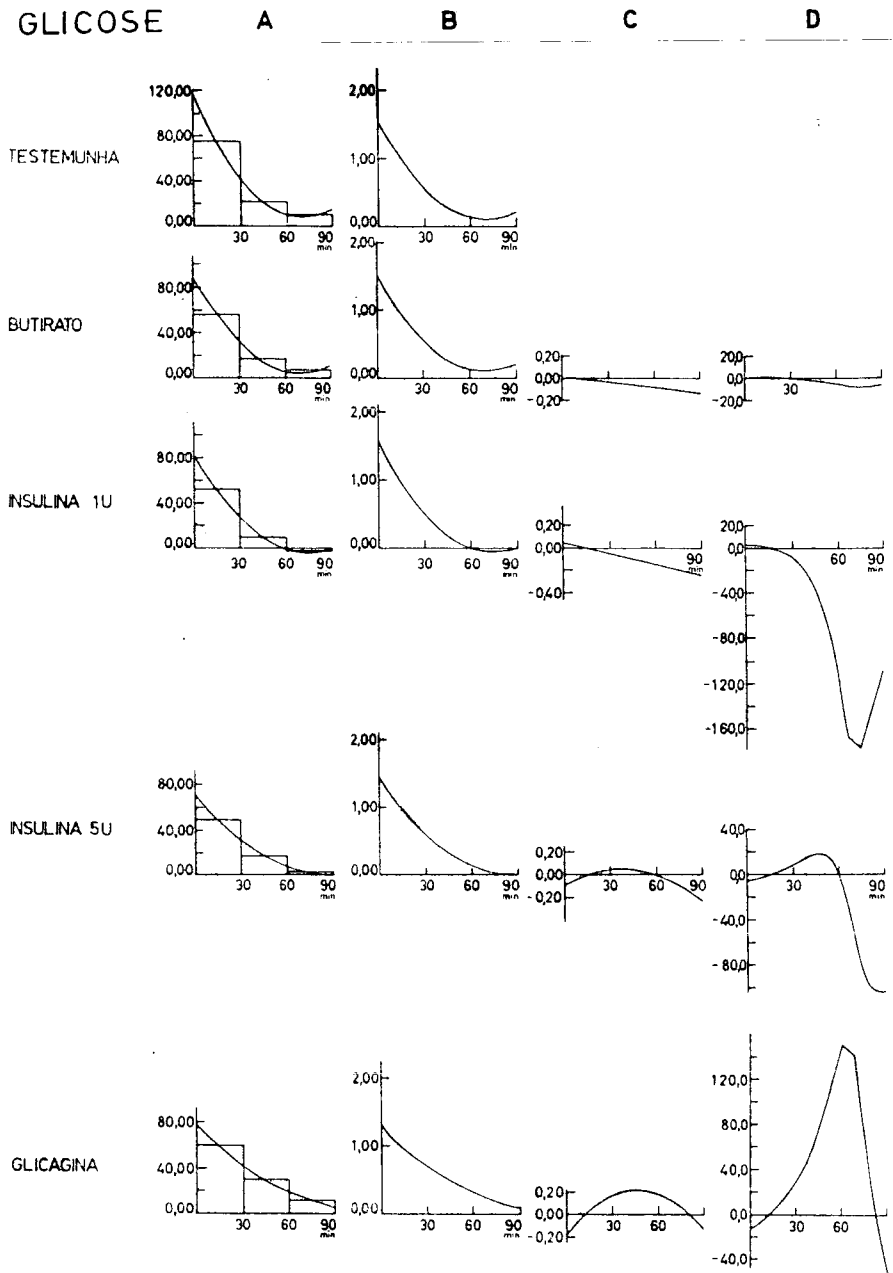
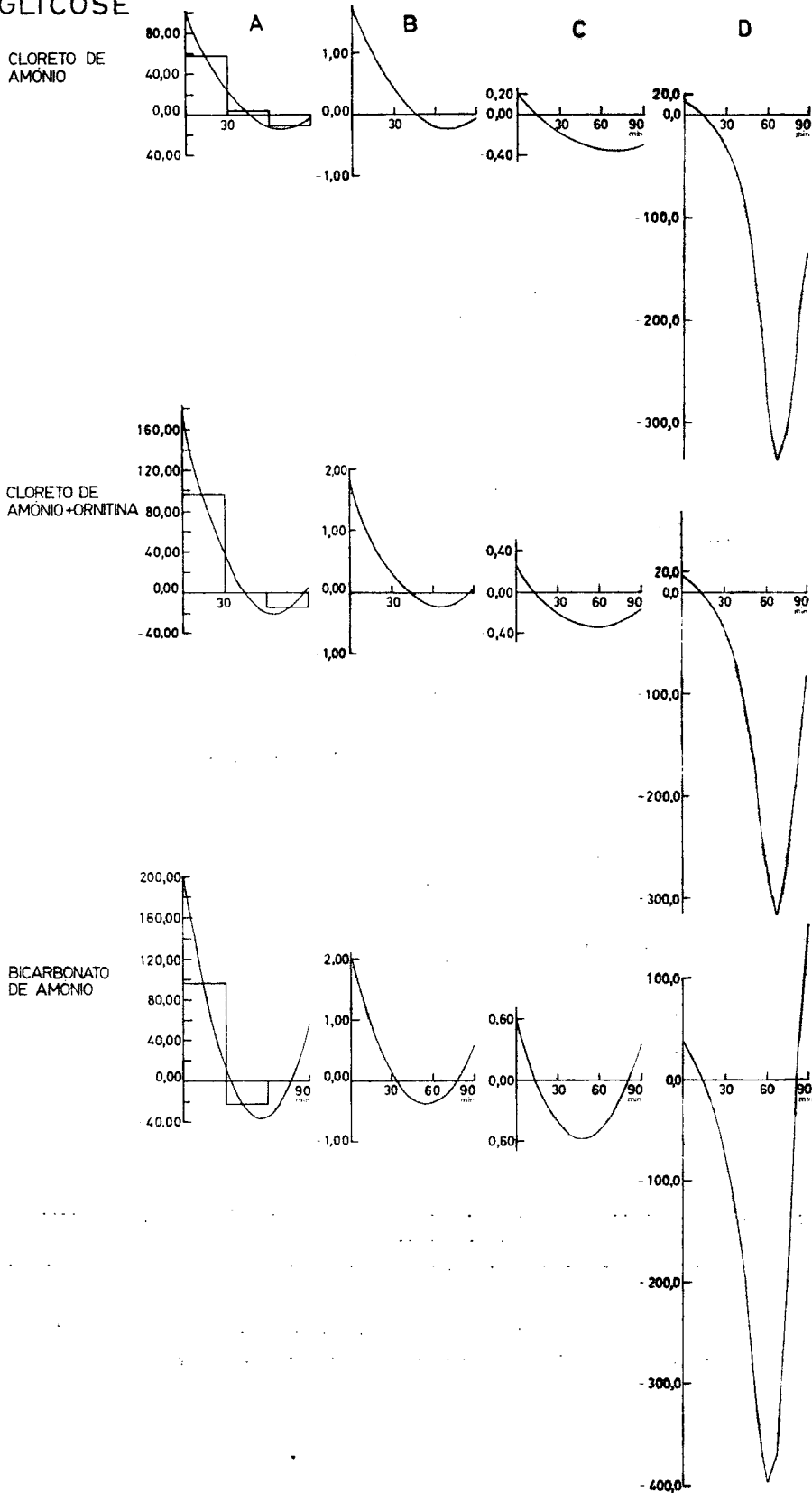


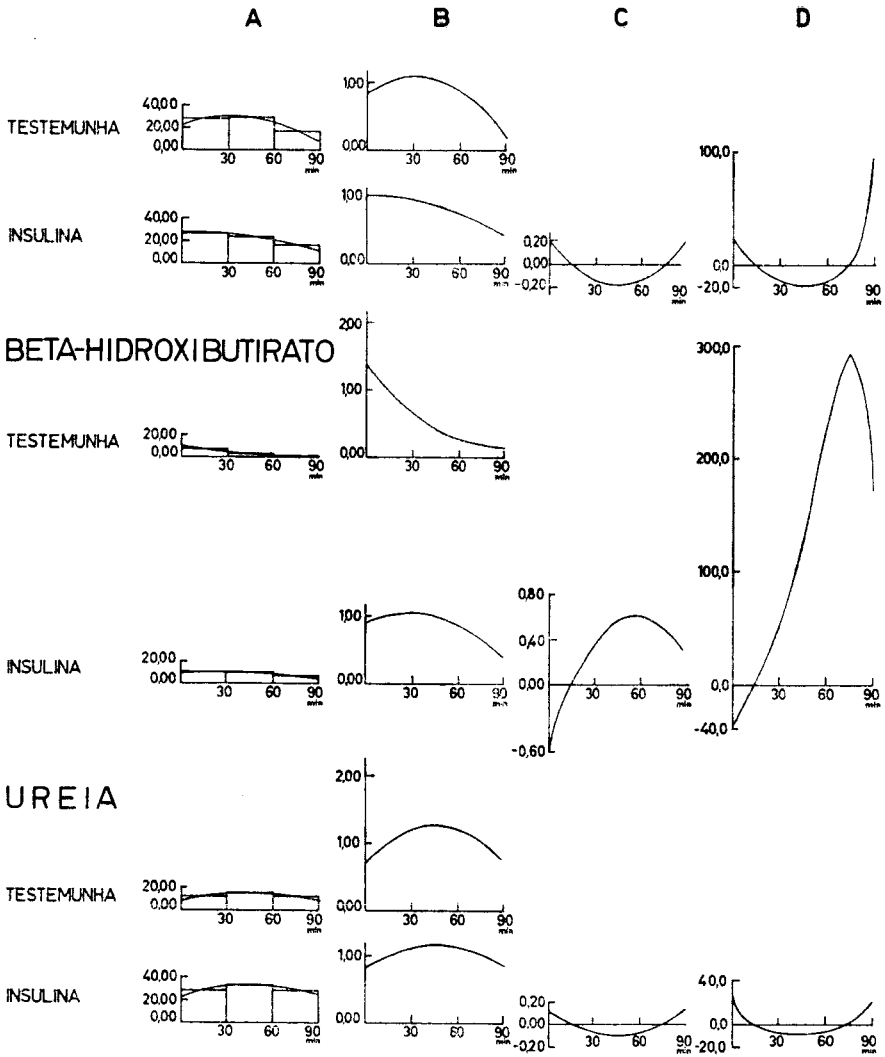
Fig. 30 — Estudos com a perfusão do fígado isolado. Produção de glicose. Efeitos do butirato, da insulina (1U e 5U), da glicagina, do cloreto de amônio, do cloreto de amônio e ornitina e do bicarbonato de amônio.

Ver Quadros XXXIII e XXXIV e, no texto, para o significado das colunas A, B, C e D, «Tratamento estatístico dos resultados».

# GLICOSE



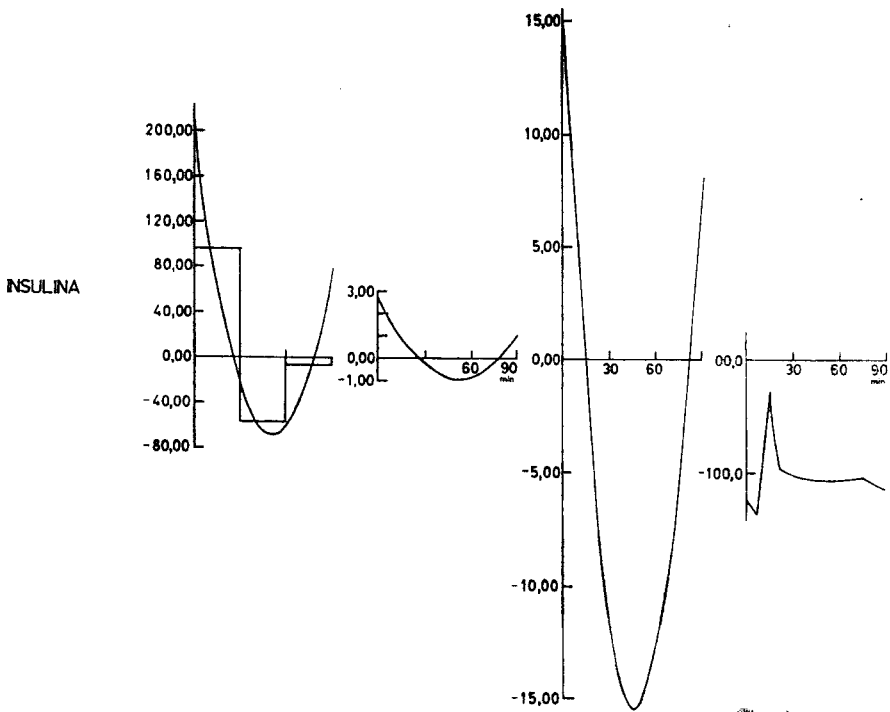
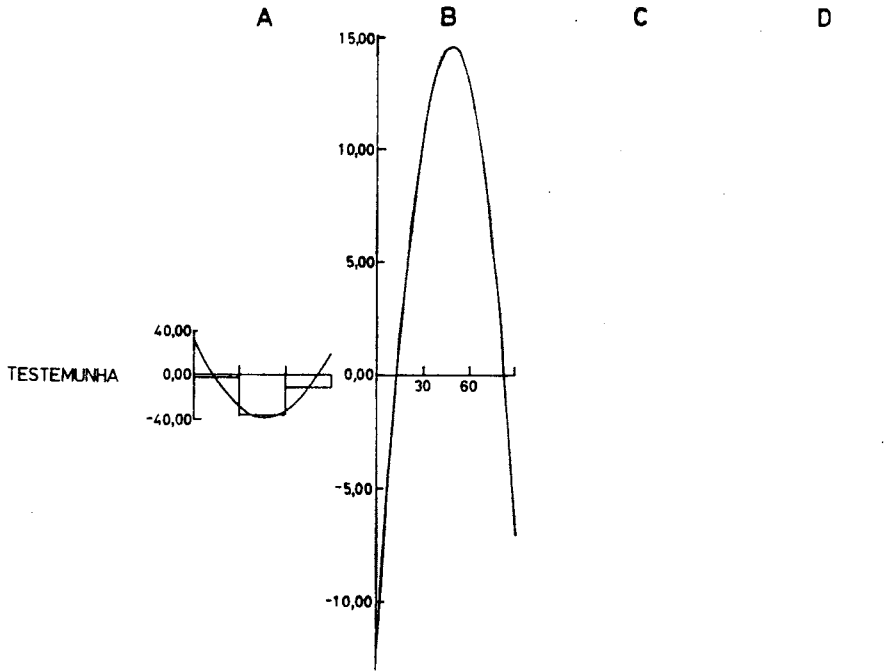
# ACETACETATO



**Fig. 31 — Estudos com a perfusão do fígado isolado.** O meio de incubação foi enriquecido inicialmente com glicose (10 mM). Produção de acetacetato, beta-hidroxibutirato, ureia e glicose; efeito da insulina.

Ver Quadros XXXIII e XXXIV e, no texto, para o significado das colunas A, B, C e D. \*Tratamento estatístico dos resultados\*.

# GLICOSE



Uma vez que não verificámos as concentrações de glicogénio aos 30 min, não é possível relacionar as variações glicogénicas com as substâncias adicionadas.

7.º — Verificamos, tomando o conjunto dos resultados, que, relativamente à *demonstração* da nossa hipótese de trabalho, tal como aconteceu com as experiências de incubação de fatias, estas não nos fornecem as indicações positivas que nos dão experiências de outro tipo realizadas também com a perfusão do fígado isolado e referidas na literatura. As nossas experiências que, como veremos, não são a repetição das alheias, fornecem-nos, no entanto, preciosas indicações relativas ao caminho de estudo a seguir ulteriormente; e a consideração dos aspectos aparentemente contraditórios dará uma amplitude maior à nossa própria tese, como na terceira parte desta dissertação se reconhecerá, ao fazermos a discussão dos aspectos mais relevantes dos resultados que obtivemos e acabamos de apresentar e comentar.

### III

## ENSAIO DE INTERPRETAÇÃO

*Ces longues chaînes de raisons, toutes simples et faciles, dont les géomètres ont coutume de se servir, pour parvenir à leurs plus difficiles démonstrations, m'avaient donné occasion de m'imaginer que toutes les choses, qui peuvent tomber sous la connaissance des hommes, s'entre-suivent en même façon, et que, pourvu seulement qu'on s'abstienne d'en recevoir aucune pour vraie qui ne le soit, et qu'on garde toujours l'ordre qu'il faut, pour les déduire les unes des autres, il n'y en peut avoir de si éloignées, auxquelles enfin on ne parvienne, ni de si cachées qu'on ne découvre.*

DESCARTES <sup>87</sup>

## ENSAIO DE INTERPRETAÇÃO

Na revisão crítica com que iniciámos esta dissertação concluímos que não é aceitável nenhuma das teorias que têm sido propostas para explicar a cetose, dado que, por mais sugestivas que pareçam, todas mostram inadequações notórias em face desta realidade surpreendente e intrigante que é a cetose. A situação é tanto mais insólita quanto, como pudemos ver, o problema tem constituído motivo de interesse desde os alvares da Bioquímica e tem sido exaustiva e constantemente estudado; foi mesmo sob a pressão da problemática decorrente que a própria Bioquímica moderna se organizou, tomando, à volta dos postulados básicos em que assentou, a conformação que hoje tem.

A documentar estas afirmações, apenas desejamos deixar referido que KREBS tem estudos dedicados aos corpos cetónicos e à cetose desde 1937<sup>246</sup> e continua a ser o mais entusiasta investigador destes problemas e o chefe da mais fecunda escola dedicada ao seu estudo, como as referências feitas através desta dissertação podem corroborar.

Pela nossa parte pensamos também que neste assunto se mantêm encobertos problemas básicos da Química Fisiológica, cuja resolução, como também já dissemos, poderá contribuir para colocar os estudos desta matéria numa perspectiva muitíssimo mais ampla.

A juntar a todas as razões que apresentámos, há ainda à volta deste problema razões práticas de considerável interesse: a cetose aparece em Medicina Humana a centrar ou a complicar situações que se repartem por toda a Patologia, e em Medicina Veterinária adquire a importância de um problema económico de certa gravidade.

Apesar de todos estes motivos — vimos também —, não é possível agrupar os resultados da investigação num conjunto unificado de postulados, como dizem JOHNSON, PASSMORE & SARGENT<sup>223</sup>.

No ponto em que nos encontramos, parece-nos ser altura de retomar o que para tanto deixámos apontado nas duas partes anteriores desta dissertação, tentando agora dar forma ao que nos parece possível



formular. Como também já dissemos, pensamos que a nossa contribuição experimental permitirá o trânsito de uma hipótese para uma tese que têm, em ampliantes motivações, todo o interesse de um dinamismo de que na verdade apenas conhecemos, para já, as primeiras manifestações.

A experiência que temos da investigação neste campo permite-nos compreender na profundidade o que KREBS diz num escrito dedicado a estes problemas: *The hypotheses are usefull because they bring some order and coherence to a field full of a bewildering mass of detailed and uncoordinated information. More usefull still is perhaps the working hypotheses value of the new concepts. They suggest many experiments some of which are now under way* <sup>255</sup>.

A mesma experiência permite-nos também a aventura de perseguir o que, embora claramente visto, constantemente se nos escapa.

Este é o espírito que nos anima ao ensaiar agora uma interpretação dos nossos próprios resultados e dos alheios.

Procuraremos, para não deixarmos encoberto o caminho do raciocínio, abreviar o mais possível este ensaio, pressupondo presente tudo quanto foi já largamente referido, para evitar a sua análise nesta altura.

Como vimos, embora o nosso próprio trabalho tivesse mostrado que não é legítimo considerar o postulado como absoluto, definitivo ou exclusivo (ver comentários às experiências sobre a actividade muscular e sobre os efeitos da exposição ao frio), é conveniente, por agora, centrar as investigações sobre a cetose no problema da cetogénese. Trata-se de *centrar* e não de *confinar*, pois, quanto a nós, na perspectiva da Química Fisiológica só é possível descobrir o interesse, o significado e o papel dos corpos cetónicos quando se considera cada uma destas substâncias no caminho da síntese e da utilização, ou melhor, da formação e da transformação.

Este assento há-de estar presente no planeamento e na interpretação das experiências e dos resultados experimentais obtidos *in vitro*.

As preparações até hoje utilizadas pelos diversos autores têm possibilidade de explorar um dos dois aspectos enquanto que o problema respeita à sua simultaneidade, patenteada nas situações de cetose. Tais preparações não nos permitem, por isso, estudar o problema da regulação metabólica desta situação. Esta é a razão por que, embora tivéssemos planeado desde há muito experiências *in vitro* com preparações adequadas, pensámos que seria melhor começar pelo estudo da situação *in vivo*.

Ao analisar-se a evolução dos estudos sobre os problemas dos corpos cetónicos, poderá parecer estranho que KREBS, depois de os ter começado e continuado com fatias de fígado <sup>108, 250</sup>, com homogeneizados <sup>264, 280</sup> e com mitocôndrias <sup>188</sup>, venha a prosseguir com o estudo

no fígado isolado <sup>259</sup> e, já em 1969, investigue os efeitos da injeção intramuscular de glicose em ratos intactos <sup>570</sup>.

Parece-nos, na verdade, que este último tipo de experiências é insubstituível quando queiramos estudar os problemas da cetose tal como os encontramos nas páginas iniciais desta dissertação. Justifica-se, no entanto (pelo que ficou dito), que a nossa atenção (não o problema) se centre sobre o fenómeno da cetogénese implicado na cetose.

É nesta orientação geral que surgem igualmente as experiências *in vitro* que relatámos, nas quais procurámos investigar alguns dos aspectos decorrentes da nossa hipótese, num plano de conjunto que, como veremos, não tem sido abarcado pelos estudos que a literatura regista.

Ora, como vimos, relativamente à cetogénese não há qualquer teoria que seja aceitável.

Analisámos as teorias que se fundamentam na inibição da lipogénese, na inibição do ciclo de Krebs, na superprodução de acetil-CoA, na pleora de ácidos gordos não esterificados, em determinantes hormonais e nas relações com a gliconeogénese, e todas elas mostram inadequações de tomo. No entanto, com excepção da primeira que, consignando em si mesma uma coincidência, se reduz nos seus aspectos válidos à da superprodução da acetil-CoA e com isso deixa de ser de considerar, todas elas apresentam pontos válidos que interessará ter em conta. O que acontece é que têm sido tomadas de ângulos muito limitados das situações, com prejuízo da visão global dos fenómenos. A passagem precoce dos postulados aos corolários com observações muito limitadas explica o fundo polémico da maioria dos trabalhos sobre a cetose; a transigência perante os pontos não explicáveis justifica, conjuntamente, que em relação à cetose se esteja a passar o que se passou com o magno problema da oxidação em beta.

Parece-nos que um dos aspectos mais válidos da nossa contribuição experimental é exactamente o de termos ampliado a panorâmica dos fenómenos nas situações e no tempo, o que só com perseverança pôde ser feito, dadas as aparentes discordâncias encontradas com os dados da literatura.

Os resultados das nossas observações na situação de jejum são disso exemplares. Em séries diferentes de animais, tomando cada uma em separado, nós pudemos correlacionar favoravelmente a concentração dos corpos cetónicos no sangue, de umas vezes com a queda da glicemia, de outras com a concentração dos ácidos gordos, e do mesmo modo pudemos correlacionar nuns casos a subida da acidemia com a queda da glicemia enquanto que noutros não.

A discussão que parcelarmente fomos fazendo dos dados das nossas experiências à luz do conceito amplo de homeostasia calórica <sup>136, 256</sup>, 245

em que explicitamente considerámos o sistema de substratos respiratórios como trino, mostrou-se-nos útil como meio de abarcar simplificada-mente a situação em globo.

A consideração do sistema justifica-se pelos dados de GORDON & CHERKS <sup>170</sup>, DOLE <sup>99</sup>, RANDLE, GARLAND, HALES & NEWSHOLM <sup>401</sup>, KREBS <sup>256</sup>, WILLIAMSON & KREBS <sup>577</sup>, CAHILL & OWEN <sup>59</sup>, CAHILL, HERRERA, MORGAN, SOELDNER, STEINKE, LEVY, REICHARD & KIPNIS <sup>58</sup>, entre outros.

O sistema, ao permitir apreciar em globo o movimento dos substratos respiratórios, tem implícita a participação do tecido adiposo, fígado e rins e dos outros tecidos, também na dinâmica da produção-utilização. Daí que tenha implícitos, para além dos fenómenos de captação e respiratórios, os de gliconeogénese e de libertação de ácidos gordos (mais do que lipólise). Permite, por isso, num quadro geral, colher sugestões, mais do que indicações, sobre a possível relação da cetogénese com os fenómenos responsabilizados nas diferentes teorias.

A evidência da grande escala tem de estar presente na teorese da pequena escala, para possibilitar o caminho de regresso — o que interessa à Química Fisiológica.

Juntando às observações da situação de jejum as feitas com outras experiências *in vivo*, concluímos que as correlações que são propostas e defendidas por uns e contestadas e negadas por outros podem ser igualmente verdadeiras.

Não queremos deixar de lembrar e salientar que, relativamente a tal sistema, as nossas experiências da exposição ao frio e da alimentação intermitente fornecem exemplos brilhantes de correlações estreitíssimas.

Em qualquer dos casos é, no entanto, evidente a influência do estímulo externo; trata-se de efeitos mediados.

A resolubilidade de alguns dos esquemas em que a *triamcinolona* é utilizada mostra-nos, com evidência, como a teoria da correlação da cetogénese com a gliconeogénese tem de ser vista com as maiores reservas. O grupo de experiências em que explorámos os efeitos da actividade muscular fornece-nos sugestões valiosas, especialmente no que respeita à utilização dos corpos cetónicos e à mediação dos estímulos. Quando conjuntamente utilizámos a dieta gorda e a *triamcinolona*, dissociámos muito claramente todas essas possibilidades.

Este conjunto de dados é, em nosso entender, a demonstração de que as correlações não são causais e de que o nexo de causalidade deve então ser procurado fora do próprio sistema.

Ao sobressair na análise conjunta dos resultados a importância do estímulo que afecta o equilíbrio do sistema, sobressai, outrossim, o mecanismo da mediação. Neste aspecto reconhecemos e delimitámos

Encarada como resolução universal dos problemas da cetogénese, a chave insulínica de ENGEL & AMATRUDA <sup>114</sup> mostra-se pequena e inadequada para resolver o problema, mas o valor deste, no conjunto dos outros agentes mediadores, mostra-se-nos de muito relevante importância e necessita, efectivamente, de consideração detida e pormenorizada (ver adiante).

Na perspectiva em que estamos a encarar o problema, faz sentido realçar as considerações de WINEGRAD <sup>581</sup>, cuja perplexidade está notoriamente patente:

*It is difficult to assign a specific role to insulin in the regulation of ketogenesis at the present time. The conditions in which hyperketonemia is found are almost invariably associated with increased fatty acid utilization, a relative deficiency of carbohydrate, and increased gluconeogenesis. The best-documented effect of insulin is that on the mobilization of unesterified fatty acid from adipose tissue stores. Insulin does not appear to affect directly the synthetic processes concerned with ketone body production in the liver, but insulin deficiency may well contribute to increased ketogenesis aside from increasing the flow of unesterified fatty acid to this organ. The altered carbohydrate metabolism of this tissue may limit the capacity of the hepatic cell to dispose of the large loads of unesterified fatty acid with which it is presented. In addition, the effects of insulin deficiency on sensitive peripheral tissues may signal the release of substances which specifically so alter mitochondrial function as to favor the synthesis of ketone bodies.*

Este texto é exemplar. Trata-se de uma acumulação de hipóteses, todas as quais, com excepção da última, que é uma saída sem a mínima evidência que a suporte (embora seja de considerar), já foram analisadas, e mostrada foi a sua insuficiência. O problema é, assim, tanto mais complexo quanto se verifica que com os conhecimentos actuais não é possível reconhecer o mecanismo de acção da insulina. Mas se ela pode impedir o desenvolvimento da cetose ou revertê-la, quando presente no sangue, de origem endógena <sup>61, 63</sup> ou por ser ministrada <sup>114, 135</sup>, então é preciso não perder o facto de vista.

Dado que estamos a considerar o condicionamento do fenómeno e não o próprio fenómeno, digamos desde já que o que ressalta destas considerações como possibilidade, que adiante será afirmado como conclusão, é o carácter multifactorial da cetogénese.

Pela preocupação constante em toda a literatura de encontrar *uma* causa, sabemos que esta formulação não será do agrado da maioria dos autores. Cremos, no entanto, que só aparentemente se quebra a unidade de um possível sistema de postulados e que a fecundidade da formulação se revela nos múltiplos caminhos de investigação que abre.

Da consideração de um quadro do conjunto das actividades enzimáticas conhecidas, relacionadas com o metabolismo dos corpos cetónicos, tal como o que apresentámos na Fig. 1, ressaltam também motivos para considerarmos a formulação que deixámos exarada.

Sejam quais forem as vias operacionais da cetogénese, com o desconhecimento que há neste campo, e que ficou patente na revisão que fizemos, não devemos deixar de ter presentes as várias possibilidades.

Perante os aspectos já referidos das nossas experiências *in vivo* ressaltam:

- a imprecisão dos dados da literatura relativamente ao mecanismo effector da cetogénese;
- a necessidade, já apontada, de considerarmos a natureza e o mecanismo dos estímulos que afectam o equilíbrio do sistema dos substratos respiratórios.

Como ficou patente na revisão inicial, os conhecimentos mais profundos e pormenorizados com possibilidade de serem invocados na regulação não nos permitem adiantar nada sobre a mesma regulação (\*) e os factos aparecem e desaparecem em sucessivas situações e experiências sem ter sido possível ainda fixá-los em base de interpretação estável.

Neste aspecto, é notório o que se passa em relação com o problema da disponibilidade de oxalacetato, como notório é o que se passa com as relações da gliconeogénese com a cetogénese.

Os resultados das nossas experiências com a *triamcinolona* são relevantes e juntam-se aos resultados muito poucas vezes referidos, mas de fundamental importância, de UETE & ASHMORE <sup>519</sup> pelos quais se conclui que a medida da gliconeogénese não é apenas a da quantidade absoluta de glicose e glicogénio que se evidencia. Além disso, temos realmente a noção de que a maior parte das situações de cetose são situações em que se verifica concomitantemente uma actualização intensiva da gliconeogénese. Aparentemente trata-se de uma relação que não é válida *inversio experimenti*.

---

(\*) É neste aspecto notável a afirmação, já apontada, de WILLIAMSON, VELOSO, ELLINGTON & KREBS <sup>570</sup>, em 1969, de que a cetogénese hepática é rapidamente diminuída em ratos em jejum pela injeção intramuscular de glicose, de glicerol ou de di-hidroxiacetona, sem qualquer alteração significativa das concentrações dos ácidos gordos plasmáticos nem das concentrações hepáticas de acetil-CoA, dos produtos de conjugação da CoA com ácidos gordos de cadeia longa, da CoA livre, do ATP e também do estado redox. O carácter inconcludente de tudo quanto apontámos na revisão, a propósito das relações da cetogénese com a glicogénese, permite-nos reforçar esta afirmação.

Este é um aspecto que não pode ser esquecido; pelo contrário, terá de ser esclarecido ou pelo menos lembrado, tanto mais que a nossa hipótese lhe reconhece nexos de natureza efectiva com o outro aspecto anteriormente apontado.

Como dissemos já, o amadurecimento do problema da utilização de substratos respiratórios, no conceito amplo da homeostasia calórica <sup>136, 256</sup>, levou-nos a concluir que a maioria dos estudos feitos sobre a cetogénese peca por uma omissão relativamente à origem e qualidade de tais substratos. Isto foi por nós admitido como hipótese, dado que nunca o víamos clara e conseqüentemente tratado. E no plano das experiências em que investigámos os efeitos da exposição ao frio, para comprovação, introduzimos, como meio de ajuizar da mobilização proteica global, o estudo dos seguintes parâmetros: ureia e azoto total eliminados na urina. Verificámos então que, nestas condições, o desenvolvimento da cetose se acompanha também do aumento da eliminação do azoto total, mantendo-se a relação do azoto ureico para o azoto total.

Num esquema subsequente observámos os mesmos factos naquela condição de cetose experimental em que a cetogénese está mais intensificada <sup>2</sup>, isto é, na intoxicação pela *floridzina*.

*Poderíamos então estabelecer também um nexo entre a cetogénese e a ureogénese. Eis a hipótese com que pretendemos transitar para a tese.*

*Para tanto, seria necessário encontrar a base material, metabólica e enzimática, que a pudesse garantir e depois confrontar a sua adequação nas diversas situações.*

Todas essas tentativas se nos mostraram bem sucedidas e os dados dispersos da literatura, obtidos por diversos investigadores com finalidades e orientações diferentes, vieram a juntar-se num corpo com unidade e coerência que originalmente nos propomos provar e defender.

Em princípio, os dados da literatura poderiam ou fornecer uma base material conveniente ou sugerir investigações especiais ou, pelo contrário, poderiam levar a reconhecer que se tratava apenas de mais uma coincidência e aconselhar o abandono da hipótese.

Na pesquisa bibliográfica a que procedemos, encontrámos razões *suficientes* para sustentar o que pela motivação exposta admitimos. Para certos factos, à primeira vista intrigantes, encontrámos também razões que mais relevam o valor da própria hipótese e que, como adiante veremos, esclarecem a amplitude do seu alcance na formulação da tese.

- 1.º — Um primeiro ponto que se nos apresenta é o da coincidente localização no espaço dos fenómenos da cetogénese (ver revisão inicial) e das reacções que levam à formação da amónia ureificável, proveniente das proteínas. Já registámos 249

a referência de KREBS <sup>260</sup> a este facto e juntar-lhe-emos a referência mais antiga de HOGEBOM & SCHNEIDER <sup>206</sup> a indicar-nos que a maior parte da amónia resultante das proteínas é formada nas mitocôndrias. Este facto em particular é em micro-escala o que se verifica mais em geral: o fígado é o único órgão, em todos os mamíferos, com excepção dos Ruminantes, em que se efectivam, com grandes velocidades, os processos de cetogénese e de ureogénese.

2.º — A distribuição das enzimas da ureogénese na estrutura celular compartimentada permite-nos encontrar a possibilidade da relação deste processo com o da cetogénese, da mesma maneira que nos fornece a possibilidade de o relacionarmos com a gliconeogénese e com a entrada da acetil-CoA no ciclo de Krebs. As referências a esta localização, na sua maioria, são fragmentárias. Podemos, no entanto, registar que a actividade de síntese do fosfato de carbamilo e a ornitincarbamiltransférase são mitocôndricas <sup>181</sup>; a de síntese do argininosuccinato e a argininosuccinase encontram-se na fracção celular solúvel <sup>51, 438</sup>, tal como acontece com a arginase <sup>419</sup>.

Encontrámos, no entanto, na literatura um estudo muito recente que bastaria por si mesmo para nos dispensar mais pesquisas bibliográficas, dado que constitui inteiramente a base de que necessitávamos para fundamentar a nossa hipótese. O trabalho de MORA, MARTUSCELLI, ORTIZ-PINEDA & SOBERON <sup>346</sup> é um valiosíssimo estudo de sistematização que, na linha lógica do nosso pensamento, necessitaríamos de fazer, mas que nos é oferecido com toda a oportunidade. Dele extraímos os dados constantes no *Quadro XXXV*, no qual figura, em percentagem da totalidade celular hepática, a distribuição das actividades enzimáticas do ciclo da ureia pelas diversas fracções obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizados de fígado de Rato.

Para além destes dados que são de muito interesse, embora admitamos que os valores possam variar, com afastamentos relativamente pequenos, de «raça» para «raça» de ratos, a exemplo de outras actividades <sup>109, 361</sup>, o artigo contém reflexões, relativamente ao próprio facto da compartimentação deste processo, que devemos ter em consideração.

Podemos então reconhecer, com as reservas há pouco apontadas, **250** que a arginina será sintetizada exclusivamente na fracção sobrenadante

QUADRO XXXV

Distribuição das actividades enzimáticas do ciclo da ureia no fígado de Rato, em percentagem do total, segundo MORA, MARTUSCELLI, ORTIZ-PINEDA & SOBERON <sup>346</sup>.

FRACÇÕES	Actividades (p. 100 do total)			
	Sintétase do fosfato de carbamilo	Ornitinacarbamil-transferase	Sistema sintetásico da arginina	Arginase
Núcleos	34	41	0	40
Mitocôndrias	66	53	0	19
Microssomas	0	2	0	37
Sobrenadante	0	4	100	4

e que o fenómeno condicionará a passagem, para essa fracção, do fosfato de carbamilo incorporado na citrulina, cuja formação é mitocôndrica na maior parte e, naturalmente, do aspartato necessário no sistema sintetásico do argininossuccinato.

Embora o aspartato seja dos constituintes mais abundantes das proteínas <sup>318</sup>, a participação desta substância no processo reflectir-se-á necessariamente sobre a concentração de oxalacetato, pelo fenómeno de transaminação. Neste aspecto são de considerar, naturalmente, as variações de actividade da própria transaminase <sup>438</sup>. Os dados de que dispomos indicam-nos, efectivamente, a diminuição da concentração do aspartato e da alanina no fígado de ratos diabéticos <sup>240</sup>. São no mesmo sentido as indicações de WILLIAMSON, LOPES-VIEIRA & WALKER <sup>567</sup>.

Deve dizer-se, porém, que este estudo se encontra no seu início e que não tem sido orientado de modo a que possa fornecer muitos dados <sup>127, 373</sup>.

Na cetose bovina, pelo menos em certas formas e pelos estudos de BAIRD <sup>10</sup> e de BAIRD, HIBBITT, HUNTER, LUND, STUBBS & KREBS <sup>11</sup>, é o próprio oxalacetato que apresenta uma concentração diminuída no fígado, relativamente aos animais normais. Nestes estudos são referidos também abaixamentos das concentrações hepáticas de glutamato, glutamina, alanina, beta-oxoglutarato e piruvato.

Dado que o oxalacetato, segundo a generalidade dos autores (ver pág. 82), não atravessa livremente a membrana mitocôndrica, nós postulamos, com fundamento nos resultados finais da observação experimental e experiencial, a sua menor utilização no passo inicial do ciclo de Krebs, quando a utilização do aspartato no processo de ureogénese está intensificada. Este postulado não é incompatível com o achado de concentrações variáveis de oxalacetato no fígado em condições de cetose, pois será suficiente que este seja utilizado de modo preferencial pelo ciclo da ureia ou desviado eficazmente para o caminho da gliconeogénese. Isto



é possível, dado que, pelo menos em algumas das situações de cetose, está averiguado que as enzimas do ciclo da ureia têm uma actividade muitíssimo aumentada <sup>437, 438, 439</sup> e que, de modo genérico, esta actividade é induzida, variando como resposta à quantidade de azoto a eliminar <sup>226, 376, 437, 438, 439</sup>.

A utilização do aspartato no ciclo da ureia (Fig. 32) será, assim, uma forma de transferência de oxalacetato de dentro para fora da mitocôndria. É certo que, no passo seguinte da ureogénese, o esqueleto carbonado reaparece, no mesmo espaço exomitocôndrico, mas na forma de fumarato. Este não transpõe as paredes da mitocôndria <sup>67, 69</sup> e os dados da investigação <sup>403</sup> indicam a sua passagem a malato; a actividade fumarásica é, reconhecidamente, intensa no espaço exomitocôndrico <sup>107, 279, 378, 461, 462, 465</sup>. Por outro lado, como KREBS, GASCOYNE & NOTTON <sup>266</sup> também salientam, a reacção catalisada pela «enzima málica» (EC 1.1.1.40.) desloca-se, em condições fisiológicas, no sentido da formação de piruvato <sup>524</sup> e, além disso, a sua actividade é relativamente baixa em condições de gliconeogénese e de cetogénese <sup>133</sup>. Verifica-se, então, que, neste aspecto, no espaço exomitocôndrico se não fecha um ciclo catalítico. Também os dados experimentais de SHRAGO & LARDY <sup>465</sup> e as considerações relativas ao potencial energético endomitocôndrico, adiante expendidas, permitem pensar que, em condições de cetose, o destino desse esqueleto carbonado seja a entrada no caminho da gliconeogénese.

*Assim, a utilização do aspartato no ciclo da ureia será uma forma efectiva de transferência de oxalacetato de dentro para fora da mitocôndria.*

O efeito final será semelhante ao do bloqueio do ciclo de Krebs com acumulação de acetil-CoA, substrato para a formação de acetacetil-CoA que, com a tiólase catalisante, entrará no processo de formação de acetacetato.

Na Fig. 32 esquematizamos este mecanismo que propomos.

Um dos pontos que achamos dever salientar, por constituir efectivamente um motivo da nossa reflexão neste campo, é o da utilização de um substrato por diversos caminhos metabólicos simultaneamente operantes. O problema tem aqui uma dupla incidência: no que respeita à utilização do aspartato cuja concentração poderá até ser elevada, pela razão que apontámos, e também no que respeita à utilização preferencial do oxalacetato na reacção de transaminação, mesmo no caso de a sua concentração se encontrar, do mesmo modo, aumentada.

Comentando as experiências de ARNSTEIN & NEUBERGER <sup>5</sup> sobre a «diluição» da glicocola e as de LOFTFIELD & HARRIS <sup>301</sup> sobre a «diluição» da valina nos pressupostos pools, CHRISTENSEN <sup>74</sup> diz: *Such incompleteness of mixing of two supposedly equivalent forms of a metabolite does not necessarily arise only from physical barriers, but may also arise from kinetic*

relationships. Undetected chemical difference between the two forms may also exist. Such sources of «functional compartmentalization» should not be confused with simple physical compartmentalization, and the word «transport» should not be applied indiscriminately to include all access between «functional compartments».

Registamos, também aqui, o que GREEN & BAUM <sup>174</sup> dizem, a propósito da oxidação do piruvato: *Exactly how the product of one enzymic complex is transferred to the next enzyme or complex in the sequence is still unknown. But, the probability is high that random molecular movements are minimized and that there are forces and devices which compel an orderly and directed progression of the constantly changing substrate from enzyme to enzyme and from complex to complex.*

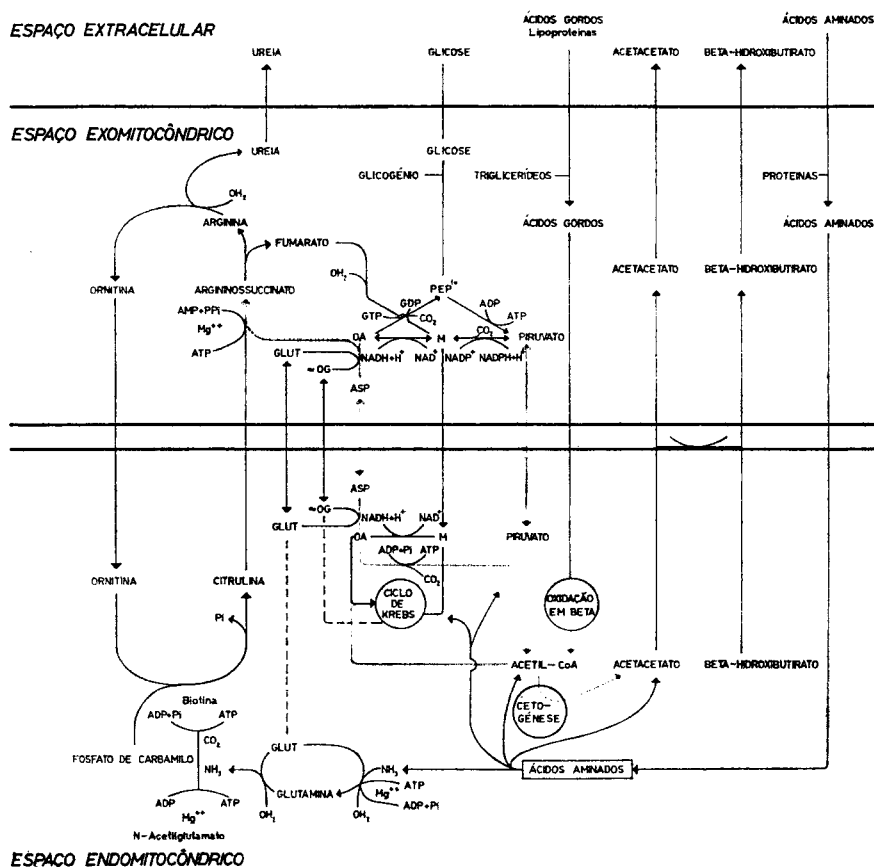


Fig. 32 — Relações da ureogênese, gliconeogênese e cetogênese. A seqüência de que falamos no texto está representada a vermelho. As abreviaturas utilizadas são as mesmas da Fig. 7, onde se apresentam mais desenvolvidamente alguns passos intermediários da gliconeogênese.

Os caminhos metabólicos da cetogênese estão representados na Fig. 1.

A tais palavras, cujo possível aspecto profético, em ambos os casos é apenas aparente, dado que o dinamismo da ideia é exactamente o inverso do da profecia, parece-nos que se deve dar, neste contexto, o devido relevo, uma vez que tratamos de interpretar os resultados que a experiência e a experimentação nos proporcionam.

De seguida põe-se-nos então o problema de apreciar a importância do mecanismo proposto. — É este um mecanismo exclusivo? — É este um mecanismo entre muitos?

Com os dados de que dispomos, a resposta que nos parece correcta é a seguinte: *o mecanismo proposto é de grande importância em muitas situações, e em algumas é mesmo o principal, mas não pode ser encarado como exclusivo.*

Expliquemos:

1.º — Há outros mecanismos que em certas situações podem convergir para uma menor utilização do oxalacetato na introdução da acetil-CoA no ciclo de Krebs, com conseqüente acumulação de corpos cetónicos. Citamos a gliconeogénese pela transformação do oxalacetato em fosfo-enolpiruvato e a redução do oxalacetato pelo aumento da concentração do NADH.

Todas as actividades que levam à diminuição do oxalacetato e que foram inventariadas por LEHNINGER<sup>293</sup> ficam assim abrangidas, com excepção da descarboxilação, que não nos parece de considerar neste contexto.

2.º — Admitimos também que o aumento efectivo do fornecimento de acetil-CoA possa constituir por si uma causa de aumento da cetogénese e de cetose.

Aqui, a diminuição da concentração do oxalacetato, que obviamente existirá, será relativa e não absoluta.

Vejamos agora alguns dos aspectos subjacentes nestas conclusões e que são motivantes da nossa resposta.

— A gliconeogénese é um fenómeno habitualmente concomitante com a cetogénese nas condições de cetose; com estes é também concomitante o fenómeno da ureogénese. As razões fundamentais, que em princípio levam a atribuir importância à primeira, são as que deverão ser consideradas também relativamente à terceira. Nas concepções correntes, o que deve ser atribuído a dois fenómenos ou apenas a um

(e o principal dos dois parece ser sempre a ureogénese) é atribuído apenas à gliconeogénese, e isto vem a reflectir-se em inadequações notórias. Na Fig. 33 procuramos mostrar a concomitância dos três processos.

KREBS <sup>255</sup> refere os trabalhos de HUNTER & MILLSON <sup>219</sup> que estudam a participação dos ácidos aminados como factores da cetose nos Ruminantes e discute a possibilidade de a gliconeogénese tornar realmente inevitável a cetogénese. Como já dissemos, a conclusão é pela negativa, dado que só uma pequena parte dos ácidos aminados é estritamente cetogénica. O problema fica com indecisões que, a nosso ver, deixariam de existir se fosse pensado também que a totalidade dos ácidos aminados é ureogénica.

— A gliconeogénese não é um fenómeno que pareça poder explicar só por si a cetogénese. As experiências *in vitro* permitem relevar este aspecto do problema. Comparando entre si as três Séries de estudos em que fizemos a incubação de fatias de fígado, a conclusão é inevitável. O mesmo se diz dos resultados das nossas experiências com o fígado perfundido. Note-se que das suas experiências planeadas no sentido de estudar a correlação da cetogénese com a gliconeogénese, com o fígado isolado e perfundido, EXTON, CORBIN & PARK <sup>121</sup> tiram essa mesma conclusão explícita e muito claramente. Verifica-se, no entanto, nas experiências destes autores que a ureogénese, essa sim, acompanha a cetogénese, e este facto, para que não chamam sequer a atenção, tem um altíssimo interesse no desenvolvimento da nossa tese.

O mesmo se pode verificar num trabalho de HEIMBERG, DUNKERLEY & BROWN <sup>193</sup> sem que também os autores chamem a atenção para o facto e sem que a mínima valorização sequer lhe seja dada. Conjugando os dados, por exemplo, de GREEN & MILLER <sup>176</sup>, entre outros, que não estudam a cetogénese, mas apenas a ureogénese (e o catabolismo proteico) em ratos diabéticos e normais, com os de quaisquer outros autores que estudam a cetogénese nas mesmas condições, por exemplo, KREBS *et al.* <sup>271</sup> e KREBS <sup>259</sup>, chegaríamos à mesma conclusão.

— O fenómeno da gliconeogénese por si não pode explicar o fenómeno da cetogénese, como está claramente patente na acção antice-togénica dos glicocorticóides e nas nossas experiências notoriamente verificado com a ministração de *triamcinolona*. Ora aqui também se verifica notável aumento da eliminação do azoto, como pudemos verificar pelas nossas experiências com a *triamcinolona*, do mesmo modo que se verifica aumento da ureogénese <sup>439</sup>.

Como compatibilizar então o nosso modo de ver com a evidência dos factos?

Em devido tempo chamámos a atenção para o facto de a condição criada pelos glicocorticóides e pela *triamcinolona* não ser uma condição diabética. Assentámos fundamentalmente este ponto nos resultados dos doseamentos da insulina <sup>61, 63</sup>, e o problema será retomado adiante, neste ensaio.

Notemos, no entanto, desde já, que o que se verifica nestas condições é um aumento notavelmente excessivo da mobilização de ácidos aminados da periferia (principalmente dos músculos, como é óbvio) para o fígado. Por isso, este facto não contende com a nossa concepção, adoptada de outros <sup>114, 223</sup>, de que a cetose é um processo catabólico. Sendo a condição criada pela ministração de glicocorticóides um processo efectivamente catabólico quando se considera o organismo inteiro, já ao considerarmos apenas o fígado, que é a sede da formação dos corpos cetónicos, o significado não é o mesmo, mas exactamente o inverso, pelo menos em muitos aspectos.

Deste modo parece que fica englobado na nossa formulação o problema que foi magistralmente posto por PETERS & VAN SLYKE <sup>380</sup> quando dizem: *Ketosis is regularly associated with accelerated destruction of protein; nevertheless, mere acceleration of protein catabolism does not cause ketosis.*

Tenhamos presente que aquilo que do nosso ponto de vista devemos salientar na ureogénese é o mecanismo pelo qual este processo se torna de uma importância sempre grande e muitas vezes fundamental na maioria das situações de cetose. Ao considerarmos os efeitos dos esteróides gliconeogénicos, reconhecemos, entre eles, a chegada ao fígado de uma quantidade excessiva de ácidos aminados, material que é em grande parte gliconeogénico e formador de oxalacetato. Por isso, independentemente de um possível efeito diferencial sobre as actividades enzimáticas, os esteróides gliconeogénicos podem conduzir a uma situação em que a disponibilidade de material seja excessiva para os fenómenos que se passam no fígado e em cujos processos se produz (e pode utilizar) o oxalacetato.

Interpretamos deste modo o facto de a *triamcinolona* ser anticetogénica nas nossas experiências e de os glicocorticóides poderem ser mortalmente cetogénicos noutras, como por exemplo nas de SCOW <sup>444, 445</sup>. As experiências deste autor são feitas em animais diabéticos cujo estado orgânico será, pelo que refere WIELAND <sup>560</sup>, de profunda pobreza de substratos, inclusivamente no respeitante a ácidos aminados mobilizáveis.

Em situação de profunda deficiência de substratos, a estimulação dos caminhos metabólicos que levam a uma utilização preferencial do

oxalacetato mitocôndrico, tais como o da gliconeogénese e o da ureogénese, por indução enzimática ou outro mecanismo, será obviamente propícia à estimulação da cetogénese e ao desenvolvimento da cetose.

— Relativamente ao problema do fornecimento excessivo de ácidos gordos ao fígado, parece-nos que o mecanismo que propomos pode esclarecer muitas situações que têm sido diversamente evocadas mas sobre cujo conjunto se verifica uma notória confusão. As nossas experiências demonstram que, quer com a incubação de fatias quer com o fígado isolado e perfundido, o butirato é fortemente cetogénico. A literatura fornece-nos também neste campo abundante material <sup>259, 271</sup>.

Note-se que o facto, algumas vezes invocado <sup>282</sup>, de que a capacidade de esterificação para este e certos outros ácidos será menor do que, por exemplo, para o palmítico, esteárico e oleico leva a não considerar em discussão a teoria da inibição da lipogénese. Apontaremos, no entanto, que tal problema pode ter uma importância muito grande nos Ruminantes <sup>257</sup>.

O ponto fundamental neste aspecto pode ser o de o butirato constituir apenas um instrumento que permita atingir o mesmo efeito mais rapidamente do que com os outros, embora não seja de excluir a possibilidade de, inclusivamente pela sua solubilidade, este e os outros terem efeitos específicos.

Seja como for, o que verificámos é um efeito cetogénico.

O problema, com as reservas que acabamos de expender, merece-nos duas considerações especiais:

a) Por um lado, nós podemos agrupar este e os outros ácidos gordos num mecanismo geral de aumento da cetogénese. A oxidação dos ácidos gordos levará a um aumento da concentração do NADH (postulado, por exemplo, por J. R. WILLIAMSON <sup>574, 578, 579</sup>, para explicar o aumento da gliconeogénese). Este aumento terá, sobre a concentração de oxalacetato, o mesmo efeito que a intensificação do processo de síntese da ureia, como representamos na Fig. 33.

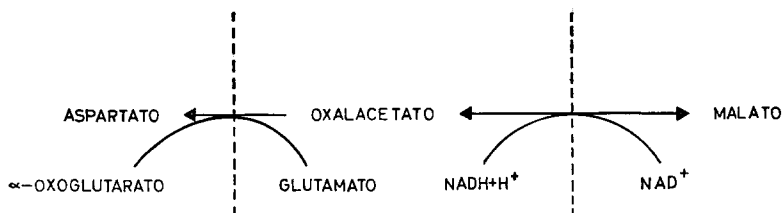


Fig. 33 — Transformações do oxalacetato em malato e em aspartato.

Tal aspecto, que foi estudado por BALLARD *et al.* <sup>15</sup> e apontado por WINEGRAD <sup>581</sup>, necessita, efectivamente, de ser considerado.

Para além do fornecimento de abundantes unidades de acetil-CoA, este poderá ser um mecanismo fundamental; por ele se pode compreender, inclusivamente, o efeito que os ácidos gordos têm sobre a síntese da ureia, que HEIMBERG, DUNKERLEY & BROWN <sup>193</sup> apontam como uma sugestão e nós amplamente documentámos nas nossas experiências *in vitro* quer pela incubação de fatias quer utilizando o fígado isolado e perfundido.

O aumento da potencialidade de redução na mitocôndria contribuirá também, pelo motivo exposto, para que se não feche simplesmente no espaço mitocôndrico, um ciclo catalítico, aquando da possível restituição do esqueleto carbonado do aspartato que participa na ureogénese e que é libertado na forma de fumarato e ulteriormente transformado em malato ainda no espaço exomitocôndrico.

b) Por outro lado, compreender-se-á, neste contexto, o diferente efeito da ministração dos próprios intermediários do ciclo de Krebs sobre o fenómeno da cetose e sobre a cetogénese em particular. Parece-nos dever esperar-se, à luz do mecanismo que propomos, que a ministração de oxalacetato ou de outros intermediários conduza a resultados diferentes quando a solicitação fundamental do oxalacetato (diminuído, normal ou até aumentado na sua concentração) se faz para outros caminhos que não o ciclo de Krebs ou exactamente para este ciclo. Se o mecanismo responsável pela cetose é, como nós propomos, o emprego preferencial do oxalacetato na via da ureogénese, compreender-se-á que, inclusivamente, a sua ministração possa aumentar a intensidade deste processo sem afectar o rendimento do ciclo de Krebs nem a cetogénese. Se o que se passa *in vivo* é a sobreposição da experiência de LEHNINGER <sup>290</sup>, de 1946, já referida (ver pág. 61), então deveremos esperar também o mesmo resultado.

Assim será interpretável, também, como aliás o tem sido, o mecanismo cetogénico de certas intoxicações, como com o malonato ou com o fluoracetato <sup>114</sup>.

Parecem-nos perfeitamente explicáveis na nossa perspectiva as diferenças entre os resultados obtidos por FASELA *et al.* <sup>126</sup> e BEATTY & WEST <sup>22</sup> que, com oxalacetato ou com os seus precursores, revertem a cetose alimentar induzida pela ministração de butirato, e os obtidos por aqueles que, como DIBOLD, FREY & LAPP <sup>94</sup>, LAWRENCE <sup>288</sup>, DUNLOP & ARNOTT <sup>104</sup>, MACKAY, SHERRILL & BARNES <sup>312</sup>, não conseguem a reversão nem no caso da diabetes humana nem no da diabetes

Estas reflexões ajudam-nos a concluir que a cetogénese, primariamente, e com ela a cetose não terão sempre o mesmo factor causal. Por isso expressões genéricas muitas vezes registadas na literatura como, por exemplo, «a etiologia da cetose», parecem-nos expressões pouco correctas.

Trata-se de um fenómeno e de uma situação de *origem multifactorial*.

Note-se que concedemos aos determinantes factoriais uma posição externa relativamente ao fenómeno e à situação. O problema do mecanismo, esse é que se situa num campo, por oposição, interno. Fica assim delimitado e explicitado o que há de fundamental na nossa interpretação da cetose e da cetogénese, como explicitado desejamos que fique que é da consideração experimental e experiencial da primeira que partimos para a necessidade de encontrar o mecanismo da segunda, cuja problemática está necessariamente contida na da primeira sem que o inverso se verifique.

Esta consequente formulação permite-nos abranger outros aspectos cuja sistematização, na sua ausência, se tornaria muito difícil, senão impossível. Com força de escólio surge-nos, na verdade, este juízo que resulta da consideração do problema *inversio experimenti: nas condições em que é de esperar uma diminuição da participação proteica na homeostasia respiratória, será de esperar a diminuição da cetogénese*. Podemos interpretar assim amplamente alguns dos nossos resultados e alguns dos resultados dispersos de outros, designadamente:

1.º — A diminuição da cetogénese pela adição de substratos, no caso das experiências com a incubação de fatias. Quando a cetogénese varia noutro sentido, caso da adição de butirato e, num dos casos, de piruvato, admitimos a predominância de um segundo factor que possa ser anulado, por exemplo, pela frutose.

Note-se, marginalmente, que estas experiências nos permitem verificar, dos ensaios sem incubação para os ensaios simples com incubação sem adição de substratos, que há variações constantemente do mesmo sentido da cetogénese e da ureogénese, o que não acontece quando se considera a gliconeogénese.

2.º — Na mesma linha colocamos os dados das experiências de MAYES <sup>323</sup>: a cetose induzida por quantidades alimentares de gordura insuficientes para cobrirem a despesa calórica pode ser revertida pela ministração de quantidades maiores capazes de cobrir essa deficiência.



Esta hipótese de MAYES foi contestada por FREUND <sup>141, 142</sup>, em 1965 e em 1966, em alguns dos seus aspectos, mas não em todos, com estudos feitos no Homem. No entanto, CASTILLO, GALLI, ROLDAN, RIETTI & HOUSSAY <sup>65</sup>, em 1965, descrevem também, em cães pancreatectomizados, a diminuição da cetonomia como efeito de uma infusão de lipídeos.

Uma possibilidade que não tem sido aduzida para a explicação destes curiosos factos diz respeito à estimulação insulino-génica, que está descrita para os ácidos gordos <sup>434</sup>. A insulina poderá, pelas razões adiante inventariadas, tomar parte nessa reversão. Pensamos que assim ficam abrangidas as observações referidas por FOSTER <sup>135</sup> com a insulina e com a glicose e ainda as do grupo de KREBS <sup>570</sup> com a di-hidroxiacetona, o glicerol e a glicose.

Digamos ainda que está perfeitamente assinalado e razoavelmente documentado o efeito de poupança que os glicídeos exercem relativamente aos protídeos <sup>350</sup>.

Sob um outro aspecto, este conjunto de factos levantaria o problema da própria regulação respiratória que abordaremos também mais adiante.

Embora já tivessem sido tratados no discurso de todo este nosso ensaio, devemos fazer agora uma referência explícita a dois pontos que logo de início nos pareceu deveriam ser tratados com especial relevo, pela sua aparente discordância com o mecanismo que propomos. Referimo-nos à situação de jejum e à ministração de esteróides gliconeogénicos.

No que respeita à acção dos esteróides gliconeogénicos, já desenvolvidamente apresentámos os pontos em que se apoiam os nossos raciocínios.

Relativamente ao problema do jejum, não há qualquer discordância real entre os dados da experiência e o mecanismo que propomos, pois na verdade a produção de ureia é maior na situação de jejum do que na situação de consumo de uma dieta equilibrada <sup>438</sup>, e ainda maior relativamente ao consumo de uma dieta desequilibrada pela substituição dos proteicos por glicídeos <sup>438</sup>.

Notemos que, na verdade, as comparações neste aspecto devem ser feitas entre os resultados obtidos com três grupos de animais: um a comer uma dieta equilibrada, outro a comer uma dieta sem proteínas e outro em jejum. Um magnífico trabalho de SCHIMKE <sup>438</sup> fornece-nos documentação valiosa para este ponto. Pelos seus resultados podemos

260 verificar que, em ratos, durante o jejum (em períodos de 4 ou 7 dias),

a excreção de ureia aumenta cerca de 5 vezes em relação ao consumo de uma dieta equilibrada que contenha 15 p. 100 de caseína, mas nos animais que consumam uma dieta que difira desta pela substituição da caseína por dextrinas, a quantidade de ureia produzida será apenas da ordem de 25 p. 100 da produzida pelos animais alimentados com a dieta equilibrada.

Aqui voltamos a encontrar também o problema do efeito de poupança que os glicídeos exercem relativamente aos protídeos e que anteriormente considerámos.

No que respeita às actividades enzimáticas do ciclo da ureia <sup>438'</sup> verifica-se que, nos ratos alimentados com dieta sem proteínas, as actividades e as quantidades absolutas diminuem, enquanto que nos animais em jejum as actividades e quantidades absolutas da síntese do fosfato de carbamilo, da ornitina-carbamiltransferase, da síntese do argininosuccinato e da argininosuccinase estão já aumentadas aos 4 dias e atingem aos 7 dias valores de 250 a 300 p. 100 dos encontrados nas testemunhas com a dieta equilibrada. Só a arginase tem variações menores, embora do mesmo sentido; aliás o tipo de regulação da disponibilidade desta enzima parece ser diferente do das outras. Acrescentemos que, quer no jejum quer na carência protídica, o conteúdo de proteínas do fígado diminui 30 a 40 p. 100 relativamente aos animais com dieta equilibrada, com muito ligeira acentuação dos 4 para os 7 dias.

Estes resultados de SCHIMKE respondem eloquentemente à questão que do princípio se nos pôs.

Nesta perspectiva, ao falarmos das actividades enzimáticas do ciclo da ureia, tem interesse registar alguns dados recentes da literatura sobre a fumarase exomitocôndrica, pelo que vimos já da sua posição no contexto da nossa tese. PENNER & COHEN <sup>378</sup>, em 1969, descrevem o estudo da inibição desta actividade enzimática pelo ATP e salientam que o seu possível papel regulador constitui uma incógnita, embora a sua importância seja sugerida.

SHRAGO & LARDY <sup>465</sup>, em 1966, referem aumentos desta actividade hepática na diabetes aloxânica e no jejum, com reversões pela ministração de insulina e pela realimentação, respectivamente; referem, também, ausência de respostas à adrenalectomia — e à ministração de hidrocortisona nesta condição experimental. Embora os resultados destes autores exprimam a actividade por grama de fígado e, por isso, seja desejável a reinvestigação do problema, o nosso esquema permite integrar completamente estes dados, o que não acontece com o deles.

Outro ponto que devemos considerar diz respeito ao modo de compreender o condicionamento hormonal, designadamente pela insulina, cuja importância ressaltou na revisão crítica feita, mas de que a acção permanece, em muito, encoberta.

A insulina tem, como se sabe hoje, múltiplos efeitos (\*). Designadamente nos aspectos que mais interessam ao fenómeno que estamos a estudar devemos reconhecer-lhe:

- um efeito lipídico, que se traduz por uma inibição da mobilização de ácidos gordos;
- efeitos glicídicos, que se traduzem por estimulação da glicólise e por inibição da gliconeogénese <sup>548, 549</sup>;
- efeitos protídicos complexos, que se traduzem por estimulação da síntese proteica e diminuição da libertação dos ácidos aminados. Tais aspectos estão hoje muito bem documentados e é possível que não haja exagero quando WOOL *et al.* <sup>584</sup> referem que são estes os fundamentais e que todos os outros não passam de epifenómenos.

A juntar a todos estes, que fazem com que se reconheça na insulina o *anabolizante universal*, devemos referir e salientar os efeitos sobre as propriedades das membranas, entre os quais se situam os efeitos sobre o transporte da glicose, dos ácidos aminados, do potássio e do rubídio, os efeitos de alteração do potencial de membrana e os efeitos sobre a tumefacção mitocôndrica.

Uma das características que nos interessa salientar em algumas destas acções é a sua rapidez de instalação <sup>135</sup>.

O facto de algumas das substâncias, cuja consideração nos interessa no contexto da cetose e da cetogénese, despertarem a insulínogénese (\*\*\*) faz com que a consideração dos efeitos insulínicos tenha, ou possa ter, uma extensão de que ainda há muito pouco tempo não se suspeitava. Daí que seja necessário considerar a possibilidade de acções mediadas cujo mecanismo pode não ser tão simples como à primeira vista parece.

Ao interpretar, por exemplo, os resultados da experiência já algumas vezes referida, em que KREBS e col. <sup>570</sup> fazem a injeccção intramuscular de glicose e em que é evidenciada uma diminuição muito rápida da

---

(\*) Para uma inventariação desses efeitos ver, entre outros trabalhos, os de KRALL <sup>247</sup>, RIESER <sup>414</sup>, RANDLE *et al.* <sup>402</sup>, e WOOL *et al.* <sup>584</sup>.

(\*\*) Lembramos que estão neste caso a glicose, certos ácidos aminados, os ácidos gordos e os próprios corpos cetónicos.

cetose, nós podemos pensar que a acção se deva, secundariamente, à insulina libertada e que esta incida sobre a lipólise, sobre a disponibilidade de alguma forma de energia na célula hepática ou sobre os ácidos aminados, diminuindo a sua disponibilidade e, por isso, a quota-parte destas substâncias como substratos respiratórios.

Relativamente aos efeitos da alimentação, os fenómenos podem ser ainda muito mais complexos. Tal é o caso do efeito anticetogénico da alimentação fornecida aos animais durante um período limitado, no nosso segundo grupo de experiências. Aquando do seu comentário, referimos as sugestivas indicações de que os efeitos observados tenham todos uma mesma motivação — externa em relação ao sistema considerado. Tenhamos presente a variada qualidade de substâncias simples que entram na dieta, o efeito da glicose *per os* (mais complexo do que por outra via), e o dos ácidos aminados, fazendo intervir a série de hormonas intestinais e pancreáticas.

O amplo conceito de uma interferência multifactorial permite conceber, numa larga perspectiva, o mecanismo de acção de tais estímulos.

Relativamente à insulina, interessa-nos considerar e consignar que, pelos seus múltiplos efeitos, ela pode interferir nas situações de cetose e no fenómeno da cetogénese e que, no âmbito do mecanismo que propomos, há razões para pensar na possibilidade de a sua interferência relevar a importância da participação da ureogénese. Este efeito pode efectivar-se pela intervenção da insulina ao nível das formas de energia, poupando os ácidos aminados, ou sobre as estruturas periféricas (musculares por exemplo) e hepática, possibilitando a utilização de substratos não proteicos na homeostasia respiratória, ou ainda sobre a própria fixação dos ácidos aminados, impedindo a sua degradação.

Lembremos que, quando se ministra glicose a um animal em situação de cetose, a glicose não tem como efeito apenas a queda brusca dos corpos cetónicos. Pode causar também uma libertação de insulina<sup>34</sup>, que será tanto menor quanto menor a insulinemia prévia e mais longa a sua duração, mas o que tem sempre, também, é uma diminuição de participação proteica na homeostasia calórica e, notoriamente, uma diminuição da ureogénese.

No comentário aos resultados obtidos nas experiências com a *tiamcinolona* e com a dieta gorda considerámos estas possibilidades. Acrescentaremos que a base metabólica para as considerações que exaramos se encontra já hoje bem documentada<sup>204, 423, 424, 584, 585</sup>, quanto aos ribossomas musculares, renais e cardíacos e aos microsomas hepáticos.

A propósito de outras hormonas, além das consideradas já neste ensaio, o nosso comentário será breve.

Relativamente à glicagina, os resultados das nossas experiências confirmam plenamente os dados da literatura <sup>572, 575, 576</sup> e permitem-nos pensar no papel predominante que o mecanismo que propomos tenha sobre a cetogénese. O que tem sido atribuído à gliconeogénese pode ser atribuído também e principalmente à estimulação da ureogénese.

O nosso conceito admite a possibilidade de acções hormonais mais estreitamente relacionadas com a cetogénese e designadamente de um centro nervoso que possibilite a regulação do metabolismo dos corpos cetónicos em geral.

Não nos parece necessário fazer intervir a acção de hipotéticas substâncias que se libertem aquando da diminuição insulinémica, como propõe WINEGRAD <sup>581</sup>, mas a sua possibilidade não fica deslocada.

Antes, porém, de prosseguirmos no nosso caminho parece-nos conveniente responder à seguinte questão:

— Haverá razões que justifiquem que a tese que aqui apresentamos não tivesse sido ainda formulada?

Creemos que sim e que as principais serão duas — a existência de pressupostos impeditivos e a existência de um estudo realizado já há muito tempo e cujas conclusões parecem também impeditivas — como seguidamente passaremos a expor.

1.º — Na generalidade das situações em que a cetose, como situação clínica em Medicina Humana ou Veterinária e não apenas experimental, acompanha a gliconeogénese, esta processa-se fundamentalmente a partir de substratos proteicos. A possibilidade recentemente exarada de existir uma participação dos ácidos gordos não saturados como substratos gliconeogénicos <sup>105, 362</sup>, a verificar-se, embora conduza necessariamente à revisão de muitos problemas aparentemente resolvidos, não retirará o carácter fundamental à participação proteica no processo, como se pode também calcular pelas verificações feitas nas nossas experiências sobre os efeitos da temperatura ambiente. Ora, existe o pressuposto teleológico de que a produção de glicose a partir de protídeos se destina a cobrir as necessidades energéticas do tecido nervoso e das células do sangue e de que essas são necessidades *limitadas* e *constantes* ou até progressivamente menores por adaptação a um regime de cetose <sup>59, 582</sup>. Por outro lado, como vimos, ao papel energético dos ácidos gordos não esterificados do plasma, depois dos trabalhos de GORDON & CHERKS <sup>170</sup>, LAUREL <sup>287</sup> e DOLE <sup>97, 98, 99, 100</sup>, foi dada a atenção especial que, vencida a surpresa, se dedica a todas as verdades contundentes e inesperadas.

264 O prestígio da formulação do chamado ciclo de Randle <sup>401</sup>, como sistema-

tização lógica, juntou-se também. Estes factos fizeram com que o problema da participação e origem da glicose deixasse de ter acuidade e fosse esquecido, quando na verdade já havia sido feita uma notável aproximação (\*).

Já depois de formulada a nossa hipótese, obtidos os dados da experiência sobre os efeitos do frio e levantada e respondida esta questão como o fazemos, tivemos oportunidade de ver que H. A. LARDY <sup>284</sup>, ao discutir, entre outros, o problema da *Generation and utilization of reducing power*, numa mesa redonda sobre *The energy level and metabolic control in mitochondria*, lembrou que no processo de gliconeogénese (que havia sido discutido), fora esquecida a participação das proteínas. Nessa mesma intervenção H. A. LARDY fornece-nos argumentos já conhecidos sobre a formação concomitante de ureia nessas condições de gliconeogénese (jejum, diabetes, alimentação rica em proteínas, tratamento pela cortisona, etc.) mas não faz qualquer referência ao problema da cetogénese. É natural que o problema se não tivesse levantado, por não ser criticada cada uma das situações conjuntamente referidas, havendo-as cetogénicas e anticetogénicas, como é sabido da literatura e vimos pelas nossas experiências.

Por outro lado, a intervenção de H. A. LARDY <sup>284</sup> não explicita a possibilidade sequer da variação quantitativa com situações de diferentes gastos respiratórios.

Ora, pelas nossas experiências, pudemos verificar que quando as disponibilidades glicídicas de um organismo diminuem a mobilização de substratos não é efectivamente apenas lipídica, mas também protídica e, sobretudo, que esta não é constante mas variável.

A variação da mobilização protídica acompanha a gravidade do deficit calórico criado pela variação da despesa. Isto parece-nos de uma importância fundamental e, contudo, não o vemos equacionado nas teorias recentes, como convém na amplitude que uma perspectiva dos problemas da cetose forçosamente há-de ter (ver também a nota do pé desta página).

---

(\*) Pudemos ler, em escrito já de 1932, de PETERS & VAN SLYKE <sup>379</sup>, que a pancreatectomia e a ministração da *floridzina* aumentam o metabolismo e excreção do azoto *presumably because, by interfering with the combustion of carbohydrate, they force the body to burn protein as it does in starvation. In this case the administration of insulin rapidly diminishes protein catabolism. The nitrogen excretion, in these circumstances, depends on the energy requirements of the individual and the degree of impairment of the mechanism for carbohydrate utilization.*

Por outro lado, a propósito dos efeitos secundários da cetose, os mesmos autores dizem: *Increased protein catabolism is consistently observed in conditions of ketosis*, embora interpretem o facto como um sacrifício que o organismo faz para conseguir material anticetogénico suficiente para evitar a cetose grave. Ora, a interpretação do facto não deve diminuir a relevância do próprio facto.

No assentamento desta conclusão e no movimento das suas consequências descobrimos, como já dissemos, a magnífica fecundidade de um juízo de PETERS & VAN SLYKE <sup>380</sup>, de 1946, a exarar uma possível intuição que os conhecimentos da época não permitiriam adiantar e de que os sucessores, talvez pelos motivos já apontados, não colheram as consequências.

Notemos, no entanto, agora que tratamos de discutir o problema, que a força sugestiva do juízo de PETERS & VAN SLYKE <sup>380</sup>: *When the evidence is all summed up it seems to indicate that ketogenesis increases when protein assumes the functions of carbohydrate, including the formation of hepatic glycogen* é aumentada pelo recorte que dele fazem VAN ITALLIE & BERGEN <sup>529</sup> e KREBS <sup>254, 256</sup> ao apresentarem a teoria da relação da cetogénese com a gliconeogénese, pois ele tem consigo, realmente, todo o peso de uma tradição já expressa anteriormente pelos seus autores, em 1932, na primeira edição da sua obra <sup>279</sup>, quando dizem:

*In adults there is an appreciable interval between the inception of a fast and the appearance of ketonuria and the latter does not reach its height until a period of three to five days has elapsed. During this interval, apparently, ketones are burned with the aid of the glycogen stored in the liver. Only when the latter has been exhausted is the body forced to subsist entirely on protein and fat.*

Para deixarmos apuradas as verdadeiras proporções do juízo de PETERS & VAN SLYKE que nos ocupa e que nos parece conter, como dissemos, uma intuição notável, devemos ainda fazer uma anotação mais.

Este juízo aparece pela primeira vez em 1946, na segunda edição da obra, que se nos apresenta completamente refundida em relação à primeira, de 1932.

Imediatamente a seguir, no desenvolvimento da ideia, os autores tratam do problema, que até agora não foi solucionado, da participação do metabolismo protídico na cetose, que nós apontamos também nos comentários feitos aos resultados das nossas experiências, e resumem-no de forma lapidar:

*So long as the tissues can utilize the carbohydrate formed from protein, protein seems to have an antiketogenic action; protein catabolism and ketosis are inversely related. Body proteins are not extravagantly consumed. Therefore, when exogenous protein is not supplied protein catabolism proceeds at a comparatively slow rate and ketogenesis rises proportionally. When the oxidation of carbohydrate by the tissues is impaired by phlorizin or by removal of the pancreas, destruction of protein increases rapidly in an apparent effort to meet the demands of the tissues for carbohydrate. At the same time ketosis also increases, perhaps, as has been suggested, to supply the tissues with a substitute for the intermediary products of carbohydrate metabolism.*

*Under these circumstances ketogenesis and protein catabolism are directly related* <sup>380</sup>.

O parágrafo que PETERS & VAN SLYKE iniciam com a sua discutida frase termina de maneira a não oferecer dúvidas sobre o valor real da afirmação — inclusivamente pelo apelo para os caminhos que podem levar à solução do problema. Imediatamente a seguir ao que deixamos transcrito, dizem: *The connection of ketogenesis to liver glycogen per se, if this hypothesis is correct, would not be altogether adventitious, but would be somewhat indirect. If carbohydrate is forming liver glycogen, provision of carbohydrate becomes a minor function of protein. The details of ketogenesis and the exact chemical reactions by which it is conditioned will be more completely elucidated when more is known of the enzyme systems concerned with  $\beta$ -oxidation, deamination and formation of carbohydrate from protein* <sup>380</sup>.

2.º — Na revisão bibliográfica que fizemos, orientados já pela nossa hipótese, verificámos que EDSON <sup>108</sup>, em 1935, a tinha admitido, mas do mesmo passo, a rejeitara. No primeiro artigo da sua série dedicada à cetogénese-anticetogénese, sugerido, ajudado e criticado por KREBS, em Manchester, EDSON <sup>108</sup> estuda o facto já descrito um ano antes por ANNAU <sup>3</sup> de que os sais de amónio na presença do ácido pirúvico causam um aumento de 4 a 5 vezes na produção de acetato por fragmentos de fígado de Coelho. O estudo é justificado na sua introdução pela probabilidade que se lhes figurou de o efeito da amónia ter importância sobre a cetogénese a partir de ácidos aminados e de outras substâncias.

No capítulo intitulado *Interrelation of urea synthesis and acetoacetic acid formation*, diz: *Since a relation was possible between urea synthesis and ketogenesis, the formation of ketone-bodies was studied under conditions in which the rate of urea synthesis was artificially raised by ornithine, with and without further addition of lactate. The ammonium chloride ketogenesis was diminished when the rate of urea synthesis was increased. The diminution may be caused by removal of ammonia* <sup>108</sup>.

E com estas palavras, perfeitamente inconclusivas, porquanto o próprio facto deveria ser criticado, fechou-se em 1935 uma porta que se entreabriria. Nessa altura já PETERS & VAN SLYKE <sup>379</sup>, como vimos, haviam falado do consumo de proteínas nas condições de cetose e da relação da cetose com o consumo. É natural que KREBS, apesar de ter voltado múltiplas vezes e ainda recentemente ao assunto, tenha presente a conclusão de EDSON.

O problema do efeito dos sais de amónio sobre a síntese do acetato continua, no entanto, a apresentar-se tão misterioso como há trinta e cinco anos. Por isso, e pelas implicações que presentíramos, 267



dedicámos-lhe atenção nas experiências que realizámos com o fígado isolado e perfundido.

Podemos resumir o que se sabia sobre os insólitos efeitos do cloreto de amónio do seguinte modo:

- a) Só tem efeitos cetogénicos sobre fatias de fígado de animais alimentados e não os apresenta sobre fatias obtidas de animais em jejum <sup>108</sup>.
- b) O efeito do cloreto de amónio é o de alterar o metabolismo do fígado dos animais alimentados de tal maneira que o aproxima do metabolismo do mesmo órgão dos animais em jejum <sup>108</sup>.
- c) O efeito do cloreto de amónio não se verifica *in vivo*, mas só *in vitro*, apesar de a sua concentração num caso e noutro ser semelhante <sup>568</sup>.

Nós referimos também na nossa contribuição experimental os resultados obtidos com a ministração de cloreto de amónio *in vivo*, com e sem ornitina concomitantemente e com e sem a possível indução da ureogénese pelo tratamento prévio. Verificámos que efectivamente se não obtém um efeito cetogénico, mesmo em animais alimentados. No caso da simultânea ministração de ornitina, há razões para admitir que o fenómeno não seja aparente: a ornitina é um ácido aminado anticetogénico cujo esqueleto carbonado, assim como obviamente o dos restantes ácidos aminados do ciclo da ureia, é transformado em alfa-oxoglutarato. Ora é sabido, da literatura, o efeito contrário ao do cloreto de amónio que o oxoglutarato tem, como foi referido por RECKNAGEL & POTTER <sup>405</sup>. Por outro lado, como já dissemos, é possível que estes ácidos aminados, como outros, desempenhem um papel insulínogénico <sup>125</sup>. A primeira destas reflexões, para além de outras possíveis, deve fazer-se ao apreciar os resultados e a conclusão do trabalho de EDSON <sup>108</sup> sobre as possíveis relações da cetogénese com a ureogénese. A ornitina funcionará neste aspecto como todas as substâncias susceptíveis de aumentar a respiração celular através do ciclo de Krebs; a sua acção sobre o metabolismo da célula hepática não é apenas a de acelerar a ureogénese. Do equilíbrio dos sistemas de utilização resultará a acção final.

Não há, por isso, razões para fechar a porta entreaberta.

Ao reflectirmos no conjunto das acções do cloreto de amónio sobre a síntese de acetato, afigura-se-nos que, com o seu carácter vago, a palavra *lesão* pode ser aplicada a este efeito.

Os resultados que obtivemos nas nossas experiências com o fígado isolado, apesar de serem realizadas, como se disse, com fígados de animais em jejum há 24 h, são surpreendentes.

Nestas condições o efeito do cloreto de amónio sobre o metabolismo dos corpos cetónicos não é tão importante sobre a síntese do acetacetato como o é na possível diminuição da formação de beta-hidroxibutirato, com possível aumento de «consumo» numa primeira fase e com notório aumento do «consumo» numa fase ulterior.

Note-se também que o efeito sobre o consumo de glicose é do mesmo sentido. Estes factos, juntamente com a ideia expendida por EDSON <sup>108</sup> de que o cloreto de amónio faz criar nos fígados dos animais alimentados condições metabólicas semelhantes às que têm os fígados dos animais em jejum, fazem-nos pensar num aumento efectivo da respiração celular hepática considerada do ponto de vista das concentrações dos seus substratos carbonados.

Haverá factos apontados na literatura que ajudem a sustentar esta hipótese? Cremos que sim.

Quando se lêem trabalhos, como o de SLATER, QUAGLIARIELLO, PAPA & TAGER <sup>473</sup>, em que é pretendida uma visão de conjunto sobre os problemas de permeabilidade mitocôndrica, pode ficar-se com uma ideia errada de simplicidade a propósito da passagem dos iões amónio que *penetram na mitocôndria espontâneamente*, mas cuja captação representa *some form of energy*.

Os trabalhos de CHAPPELL <sup>67, 68, 70</sup> são da mais relevante importância neste campo.

Segundo CHAPPELL e col. <sup>68, 70</sup>, as mitocôndrias comportam-se como osmómetros perfeitos, mesmo face a iões muito pequenos, quando suspensas em soluções de concentração variável de substâncias não penetrantes, e mostram-se impermeáveis ao  $K^+$  e ao  $Cl^-$ , mesmo a  $30^\circ C$ , e permeáveis ao fosfato, acetato e amónio. O mecanismo postulado para a passagem através da membrana é o que representamos na Fig. 34.

Segundo os mesmos autores <sup>68, 69</sup>, as propriedades de dissociação do ião amónio explicariam que a sua adição às mitocôndrias que sofrem tumefacção dependente do ATP, induzida pela gramicidina na presença de  $K^+$  e fosfato, resulte na contração rápida que se observa, tal como na tumefacção dependente da respiração, e que a estimulação da respiração mitocôndrica verificada na sua presença não necessite da adição de fosfato, contrariamente ao que se passa com os iões metálicos alcalinos.

Os autores crêem que o facto seja devido a que o ião amónio desempenhe um duplo papel, como na Fig. 35 está representado.

Haveria uma troca de  $NH_3$ , que passaria facilmente para fora, por  $NH_4^+$ , que entraria pelo poro da gramicidina, e de  $H^+$  também por  $NH_4^+$ .

Como consequência, estabelecer-se-ia assim no sistema uma necessidade constante de energia e, conseqüentemente, uma estimulação da respiração que não requeria fosfato ou arsenato, CO<sub>2</sub> ou acetato.

EDSON <sup>108</sup>, em 1935, refere a inibição de 20 p. 100 ou mais da respiração como um dos efeitos do cloreto de amónio sobre as fatias durante a incubação. Este efeito diz respeito à captação de oxigénio.

Compreendemos assim, à luz das concepções de CHAPPELL e col., que possa haver autêntica estimulação da respiração, inclusivamente com uma diminuição da captação de oxigénio. Esta hipótese requer uma revalorização das formas reduzidas dos nucleotídeos como acumuladores de energia, dos hipotéticos intermediários na fosforilação (X e I), em que SLATER <sup>471, 472, 473</sup>, RACKER <sup>399, 400</sup>, LEHNINGER <sup>292, 293</sup> e GRIFFITHS <sup>180</sup>, por exemplo, perseverantemente insistem, da teoria de MITCHEL <sup>344, 345</sup> ou da teoria de GREEN <sup>174</sup> em que a energia conformacional e electrostática caracteriza o *energized state*.

As nossas experiências permitem-nos apenas concluir que existe na presença do ião amónio um «consumo» excessivo de glicose e de beta-hidroxibutirato e um aumento da produção de ureia; o fenómeno necessita de ser reinvestigado no sentido de sabermos, pela determinação de consumo de oxigénio e pelo doseamento de substâncias do meio, se este é efectivamente uma réplica do efeito de Crabtree.

Outras possibilidades a considerar na discussão dos dados da nossa experiência são:

- a) uma inibição da actividade da desidrogenase do beta-hidroxibutirato, que não explicará todos os factos;
- b) a existência de diferenças qualitativas nos efeitos das diferentes concentrações do ião amónio, o que é possível e torna realmente desejável a reinvestigação dos dados de EDSON <sup>108</sup> relativos ao consumo de oxigénio;
- c) a indução de alterações das propriedades das membranas com as concentrações do ião amónio que permitam modificações dos fenómenos e dissociações dos mesmos.

Este último aspecto deve de facto ser considerado, inclusivamente no âmbito da cetogénese, mas por agora só em abstrato se pode fazê-lo, tal como WINEGRAD <sup>581</sup> o fazia já em 1964: *since the membrane mechanisms participating in water uptake and extrusion by isolated mitochondria are reflections of the activity of the intermediate enzymes of electron transport and oxidative phosphorylation, it will be necessary to explore this effect of insulin*

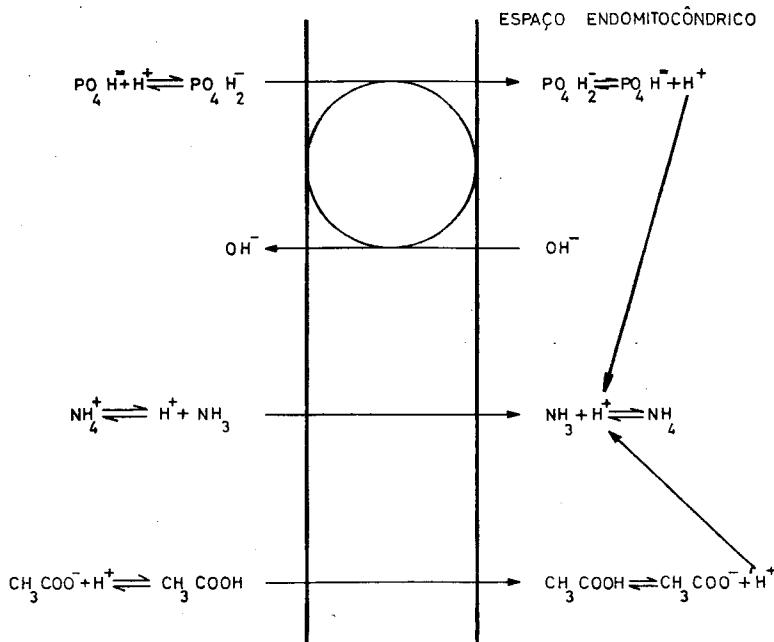


Fig. 34 — Alguns aspectos da permeabilidade das paredes mitocôndricas, segundo CHAPPELL e col. (ver o texto).

*with regard to the manner in which insulin influences glucose phosphorylation and ketone body synthesis in the liver.*

Não queremos encerrar estas reflexões a que nos levou a consideração dos efeitos do ião amônio nas nossas experiências e nas alheias, incluindo a ausência de efeitos da sua ministração *in vivo*, sem um apontamento que nos parece perfeitamente adequado e que diz respeito

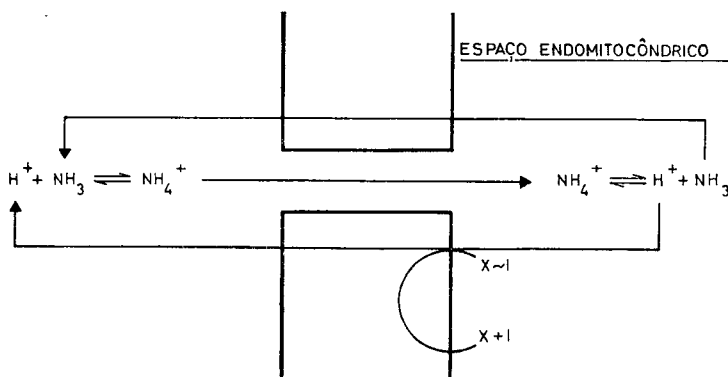


Fig. 35 — Permeabilidade das paredes mitocôndricas ao ião  $NH_4^+$  e efeitos deste ião, segundo CHAPPELL e col. (ver o texto).

ao papel do cloreto de amônio nos sistemas empregados para o estudo da síntese da ureia. Em face de tudo quanto parece descobrir-se, afigura-se-nos que o ter-se considerado o cloreto de amônio apenas como substrato, na ureogênese, foi simplismo que resultou, pelos trabalhos de KREBS, em notável avanço de conhecimentos, mas parece-nos, também, que o continuar a considerar-se o cloreto de amônio apenas por esse papel é, desde há algum tempo e, talvez, desde as experiências de EDSON <sup>108</sup>, simplismo insustentável.

A reflexão sobre os dados de COHEN & HAYANO <sup>78</sup>, comparando o que se passa relativamente à velocidade da síntese da ureia por homogeneizados e por fatias de fígado, poder-nos-ia também ter oferecido mais cedo esta perspectiva.

KREBS <sup>260</sup>, em 1970, salienta que *A striking phenomenon in this field is the difference between the rates of ketogenesis in the isolated perfused liver and in slices.*

As reflexões de KREBS sobre este problema, várias vezes expendidas nos últimos anos, já há muito que nos comunicaram também o interesse pelo assunto. Afigura-se-nos, no entanto, que o problema aparece limitado nesta última publicação a que fazemos referência, ao dizer-se:

*It is remarkable that about one-quarter of the total adenine nucleotides of liver tissue is stable on incubation in saline media. Dr. Estabrook (personal communication) suggests that the stable fraction might be that located in the mitochondrial matrix. This might explain why ketogenesis and gluconeogenesis are decreased in slices whilst the synthesis of urea from ammonia is not decreased: the ATP dependent reaction initiating ketogenesis (activation of fatty acids) occurs in the cytoplasm and two-thirds of the ATP requiring reactions of gluconeogenesis (the 3-phosphoglycerate kinase and phosphopyruvate carboxylase reactions) occur in the cytoplasm. In the case of the synthesis of urea only half the ATP requirements are in the cytoplasm (synthesis of argininosuccinate). The first three steps of urea synthesis (two of which require ATP) take place in the mitochondria <sup>260</sup>.*

Parece-nos que o papel do ião nesta conjuntura pode ser muito diferente do de simples substrato, conferindo, por alterações de membrana, características próprias à preparação, que possibilitem o ciclo da ureia e influenciem de modo diferente os dois outros fenómenos.

Uma outra questão, que desejamos deixar respondida neste ensaio, é a seguinte:

— Regista a literatura alguma formulação do condicionamento da cetose pelo metabolismo protídico, além da já apresentada de PETERS & VAN SLYKE?

Parece-nos que a questão se deve pôr, uma vez que, neste condicionamento, reconhecemos nós, pelo menos em algumas situações, a determinante principal da cetose.

Em resposta, diremos que, do nosso conhecimento, apesar da importância do problema, apenas uma se regista e mesmo essa limitada, nos seus termos, à cetose bovina e, quanto a nós, assente em bases muitíssimo precárias. Trata-se da proposição de McCARTHY <sup>329</sup>, assim formulada em 1969:

*In our view, decreased enzyme levels, increased cell permeability, altered lipoprotein structure and fatty livers are consistent with a problem of amino acid and protein metabolism as being the primary event in bovine ketosis.*

O autor expende-a no comentário a um trabalho de revisão em que a cetose bovina é atribuída primariamente ao desvio do oxalacetato para a gliconeogénese e fundamenta-a:

1.º — No estudo de KRONFELD & KLEIBER <sup>276</sup>, em que é referida uma diminuição da lipogénese e um aumento da cetogénese, a partir do acetato, pela glândula mamária de vacas com cetose. Esta é a amplitude do atributo *decreased enzyme levels* da sua proposição. Na revisão crítica que fizemos inicialmente e nos comentários aos resultados obtidos com as nossas experiências sobre o fornecimento intermitente da alimentação, abordámos já, na generalidade, este ponto de vista, que se demonstra insuficiente.

2.º — Nos estudos de KRONFELD, TOMBROPOULOS & KLEIBER <sup>278</sup> e KRONFELD & RAGGI <sup>277</sup>, em que é descrito um aumento do espaço da glicose nas vacas em cetose; o facto levanta o problema de haver no animal, não uma deficiência absoluta de glicose, mas uma alteração da permeabilidade das membranas. Assim justifica McCARTHY o atributo *increased cell permeability* daquela sua proposição.

Noutros pontos deste nosso trabalho abordámos já os problemas da participação das alterações das membranas no desenvolvimento da cetose. O facto de os glicocorticóides, juntamente com a insulina, constituírem, pela reversão da cetose que condicionam, objectos de uma prova terapêutica aduzida por McCARTHY para esta teoria é ilação não fundamentada, uma vez que os efeitos de tais substâncias, como vimos e as nossas experiências demonstram plenamente, não são simples.

O problema que devemos pôr ainda, na base da teoria que estamos a criticar, é o de estes efeitos serem ou não primários, relativamente ao desenvolvimento da cetose.

- 3.º — E nos próprios trabalhos do grupo de McCARTHY <sup>330, 331</sup> no que respeita aos atributos *altered lipoprotein structure e fatty livers*.

A esteatose é hoje interpretada em relação com uma alteração da síntese dos lipoproteínas <sup>407</sup> e só nesta medida se justifica, no contexto do seu comentário, que McCARTHY aluda ao problema na conclusão. Os resultados que obtivemos nas nossas experiências, quando estudámos o efeito da temperatura ambiente, bem como os comentários feitos aos pontos de vista de SCOW <sup>444, 445</sup>, levam-nos a concluir que falta fundamento para a afirmação de McCARTHY.

Relativamente à invocada alteração da estrutura das lipoproteínas, que constituiria a parte original da afirmação do autor, a leitura dos seus trabalhos mostra claramente tratar-se de um *postulado* e não de *uma conclusão*.

O papel central da metionina na teoria de McCARTHY é também, apenas, um postulado, colhido da informação sobre as necessidades em metionina durante a lactação e do seu papel na síntese dos fosfolipídeos e na síntese, estrutura e função das lipoproteínas <sup>331</sup>. Os dois argumentos utilizados com esta finalidade pelo autor não são na verdade valorizáveis:

- a) Refere que a etionina, a que atribui a qualidade de antagonista da metionina, produziu alterações bioquímicas semelhantes às observadas na condição que chama cetose primária. Estas experiências foram realizadas apenas em um animal e os dados experimentais não são apresentados nem discutidos. A nossa experiência ensina-nos <sup>199, 200</sup> que as lesões produzidas pela etionina não podem ser interpretadas com simplismo; adiante aludiremos ainda a este problema, a propósito das observações de RECANT <sup>404</sup>.
- b) A prova terapêutica que aduz também não constitui de modo nenhum um apoio para a sua teoria. McCARTHY refere a reversão dos sinais de doença com uma ou várias

infusões intravenosas de 20 gramas de metionina-L e a ministração oral diária de 30 gramas de  $\alpha$ -hidroxi- $\gamma$ -metilmercaptobutirato de cálcio durante um a três dias. Ora o autor não faz qualquer referência ao próprio destino metabólico das substâncias ministradas nem critica a possibilidade de terem também acções diversas da que é postulada, tal como, por exemplo, a que podem exercer sobre a libertação de insulina <sup>125</sup>.

Nenhum dos estudos referidos permite também concluir que, mesmo a existir uma alteração das lipoproteínas na cetose, ela seja primária e, pelo contrário, não seja secundária, em relação à própria cetose.

Verificamos, assim, como o simples recorte da proposição de McCARTHY nos poderia induzir em erros.

Voltando agora ao problema da relação da ureogénese com a cetogénese, devemos concluir que a falta de variações no mesmo sentido, que EDSON <sup>108</sup> encontrou e com que encerrou até agora o problema, tem, como se viu com os dados de que actualmente dispomos, condicionamentos próprios cuja natureza faz com que tomemos o caso particularmente.

Variações em sentidos paralelos, com relações fenomenológicas que permitem a sua inclusão nesta argumentação e com notável valor demonstrativo, estão hoje perfeitamente documentadas em múltiplos trabalhos.

HEIMBERG, DUNKERLEY & BROWN <sup>193</sup> determinam simultâneamente a ureia e os corpos cetónicos no meio de perfusão do fígado isolado. Esse trabalho tem para nós, pela coincidência de dados obtidos, uma importância muito grande. Permite-nos, inclusivamente, valorizar melhor os nossos resultados obtidos com fatias.

Os autores verificam que as concentrações da ureia e dos corpos cetónicos variam no mesmo sentido. No entanto, não fazem a mínima alusão à importância dessa relação nem mesmo na discussão formal do artigo, de tal modo a orientação no seu quadro mental está dirigida para o metabolismo lipídico e para os problemas da esteatose. Limitam-se a dizer na descrição dos resultados que *The formation of urea by the perfused liver, as reported previously by other workers, was increased by diabetes, and was restored to control levels by the administration of insulin to the diabetic rats* <sup>193</sup>.



Como interpretam os seus resultados no ponto em que nos interessam? Dizem: *These observations, if correct, would presume ketogenesis to result primarily from metabolic alterations induced by alloxan diabetes — a block in the tricarboxylic acid cycle, for example, rather than to arise solely from increased nonesterified fatty acid substrate availability* <sup>193</sup>.

Do nosso ponto de vista, a derivação do oxalacetato para o ciclo da ureia terá efeitos semelhantes aos de um possível bloqueio e será a principal razão do aumento da cetogénese nestas condições.

Muitos outros autores estudam também apenas dois dos parâmetros que nós estudamos e, orientados o mais das vezes no sentido da gliconeogénese, determinam as concentrações da ureia e da glicose do meio. Estão nesse caso, entre outros, os estudos de MORTIMORE <sup>347</sup>, GARCIA, WILLIAMSON & CAHILL <sup>150</sup>, HEMS, ROSS, BERRY & KREBS <sup>195</sup> e EXTON & PARK <sup>122</sup>.

Com estudo de um dos parâmetros, a fornecer informação que pode ser integrada no mesmo sentido, estão inúmeros estudos de que salientamos o de KREBS, WALLACE, HEMS & FREEDLAND <sup>271</sup>, relativamente à produção de corpos cetónicos, e o de GREEN & MILLER <sup>176</sup>, relativamente à ureia.

Estes são outros tantos dados que apoiam a nossa tese e a que a nossa tese fornece um laço de integração.

Parecem-nos também de grande relevância os resultados obtidos por WILLIAMSON *et al.* <sup>573</sup> com a mesma preparação de fígado isolado e figurados pelo método de *crossover plot*. Este autor encontra que na sequência de oxalacetato para fosfo-enolpiruvato os intermediários apresentam, como efeito do ácido oleico, concentrações diminuídas, quando a alanina é o substrato, e aumentadas, quando o lactato ou o piruvato são os substratos. O autor necessita de postular pontos de regulação, quando a derivação do oxalacetato para a síntese da ureia, no caso da alanina, pode explicar as diferenças entre as concentrações dos metabolitos.

Estes dados servem também de apoio à nossa tese e têm através dela um esclarecimento que não tinham.

Outros problemas, ainda, encontram pelo mecanismo que propomos vias de esclarecimento que nos parecem fecundas. Passaremos a apontar muito rapidamente alguns deles.

— Em que consiste, do ponto de vista bioquímico, a descompensação clínica da diabetes?

Aqui o juízo de PETERS & VAN SLYKE <sup>380</sup>, já comentado, adquire 276 verdadeiramente sentido; e em apoio do nosso conceito citamos apenas

um comentário de GREEN & MILLER <sup>176</sup>: *Profound changes in protein metabolism noted in diabetes mellitus are grossly reflected in a negative nitrogen balance.* Estes autores, que consideram e discutem a possibilidade de aumento do catabolismo e a possibilidade de diminuição do anabolismo, concluem pela conjunção dos dois termos.

Quando KREBS e col. <sup>271</sup> procuram razões para explicar que, na presença de concentrações semelhantes de substratos, o comportamento dos fígados normais e diabéticos seja diferente, e não as encontram suficientes pela verificação das actividades enzimáticas do metabolismo dos corpos cetónicos, nós pensamos, pelos motivos que desenvolvemos, que as diferenças possam estar nas actividades enzimáticas de um processo aparentemente não relacionado com a cetogénese mas profundamente integrado com ele, que é a ureogénese, ou, pelo menos, nos resultados finais deste processo.

— Em 1893, MINKOWSKI <sup>343</sup> salientou a importância do conhecimento do chamado *quociente D/N* — relação entre os valores da glicose (dextrose) e do azoto (nitrogénio) eliminados na urina — na compreensão das alterações metabólicas criadas experimentalmente no Cão pela pancreatemia. O problema foi muito discutido durante cerca de cinco décadas, como se poderá verificar, por exemplo, por trabalhos de SOSKIN <sup>486</sup> e da escola de JIMÉNEZ DÍAZ <sup>151</sup>, e acabou por ser praticamente esquecido.

A estreiteza de tal conjunto de dois parâmetros justificará, certamente, o esquecimento em que o problema caiu e com ele, por arrastamento, a exploração do «azoto eliminado». A nossa tese torna necessária a revalorização deste parâmetro num conjunto mais amplo que o de MINKOWSKI e, do mesmo passo, a revisão de muitos problemas que, tendo sido já aflorados mas quase sempre também mal equacionados, não puderam ser resolvidos.

— Pensamos que, embora no quadro da intoxicação pela aloxana as lesões renais sejam de importância fundamental, possa ser, no entanto, compreendida também neste contexto a verificação feita por STEINER *et al.* <sup>493</sup> de que, depois da injeção de aloxana, a gravidade da azotemia e da diabetes têm um curso paralelo.

— ENGEL & ENGEL <sup>116</sup> verificaram que o colapso circulatório faz reverter a cetose e interpretam por esse mecanismo a diminuição da cetose que se verifica após a ablação das glândulas supra-renais. O mecanismo desta acção ficou, no entanto, por esclarecer, pois o que os autores apontam não passa de uma coincidência de factos.

Ora, o mesmo grupo de investigadores tinha-se interessado profundamente pelos problemas do *shock* e tinha observado que o colapso no Rato se acompanha de aumento plasmático da concentração do azoto aminado <sup>118</sup> e de uma diminuição da formação de ureia <sup>115</sup>. Qual a possível relação destes factos?

Segundo a nossa interpretação, é possível relacionar estes factos desde que se atente na informação, que também é largamente fornecida por SHOEMAKER <sup>464</sup>, de que no *shock* a ureogénese está prejudicada e a quantidade de ureia formada se encontra realmente diminuída.

As causas do aumento do azoto aminado podem ser várias. Entre elas encontrar-se-á a diminuição das actividades oxidativas e a diminuição da ureogénese. Esta diminuição pode estabelecer, segundo a nossa tese, o laço de união com a diminuição da cetogénese.

— Do mesmo passo podemos relacionar a informação dada por RECANT <sup>404</sup> de que a cetogénese está diminuída em fígados de animais intoxicados pela etionina e também nos casos humanos de cirrose. Quanto a nós, parece-nos que, se os resultados obtidos no caso da intoxicação pela etionina são difíceis de valorizar, já o que diz respeito à cirrose hepática será de compreender na mesma linha de interpretação em que incluímos os problemas do *shock*.

— No caso da hiperglicinemia <sup>73, 363, 364, 365</sup>, uma das poucas condições em que a cetose aparece nos recém-nascidos <sup>365</sup>, está estabelecido que a cetose e a acidose estão directamente relacionadas com a quantidade de proteínas da dieta e que a restrição proteica é benéfica <sup>73, 363, 364</sup>. Está também estabelecido que nesta doença a cetose pode ser produzida pela ministração de ácidos aminados (leucina, isoleucina, treonina, valina ou metionina) em quantidades equivalentes às habituais da dieta <sup>73, 363, 364</sup>.

Devemos dizer que esta é uma doença muito rara e que uma entidade com algumas semelhanças foi já descrita também entre nós <sup>163</sup>. Uma vez que a bioquímica da situação é mal conhecida, como seria de esperar pela sua raridade, e considerada a vantagem, como sempre acontece em condições semelhantes, de ter planos de estudo estabelecidos para a sua exploração quando a verificarmos, pensamos ser conveniente considerar esta situação como um possível modelo espontâneo para o estudo das correlações implícitas no mecanismo que propomos.

Chegámos finalmente ao ponto de terminar este nosso ensaio e com ele chegamos também ao fim desta nossa dissertação.

Em resumo, parece-nos que, por tudo quanto ficou exposto e os nossos resultados experimentais parecem apoiar, poderemos dizer, para concluir em forma de tese:

- 1 — Não é aceitável nenhuma das teorias que foram propostas até hoje para explicar a cetose e a regulação da cetogénese.
- 2 — Na perspectiva da Química Fisiológica só é possível descobrir o interesse, o significado e o papel dos corpos cetónicos quando se consideram estas substâncias nos caminhos da sua formação e transformação.
- 3 — É legítimo, no estado actual dos conhecimentos, centrar as investigações sobre a cetose no problema da cetogénese, mas a perspectiva geral só é possível pelo estudo das situações *in vivo*.
- 4 — Na cetose e na cetogénese convergem ou podem convergir múltiplas determinantes factoriais.
- 5 — Uma determinante da cetogénese, de grande importância em muitas situações e algumas vezes mesmo a principal, é a concomitância da ureogénese.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — ADLER, J. H., WERTHEIMER, E., BARTANA, U. & FLESH, J.: Free fatty acids (FFA) and the origin of ketone bodies in cows. *Veterinary Record*, **75**: 304, 1963.
- 2 — AMATRUDA, JR., T. T. & ENGEL, F. L.: The role of the endocrine glands in ketosis. I. The ketosis of fasting. *Yale J. Biol. Med.*, **31**: 303, 1959.
- 3 — ANNAU, E.: Über die chemische Verlauf und die physiologische Bedingungen der Acetonkörperbildungens Brenztraubensäure. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **224**: 141, 1934.
- 4 — ARMSTRONG, D. T., STEELE, R., ALTSZULER, N., DUNN, A., BISHOP, J. S. & DE BODO, R. C.: Regulation of plasma free fatty acid turnover. *Amer. J. Physiol.*, **201**: 9, 1961.
- 5 — ARNSTEIN, H. R. V. & NEUBERGER, A.: Hippuric acid synthesis in the rat. *Biochem. J.*, **50**: 154, 1951.
- 6 — ASHMORE, J.: In «Lipid Metabolism in Diabetes Mellitus» — Round Table Discussion. 4.<sup>e</sup> Congrès de la Fédération Internationale du Diabète. Genève, 1961. Proceedings. Pág. 137. Éditions Médecine et Hygiène. Genève. 1961.
- 7 — ATKINSON, D. E.: Biological feedback control at the molecular level. *Science*, **150**: 851, 1965.
- 8 — ATKINSON, D. E.: Regulation of enzyme activity. *A. Rev. Biochem.*, **35**: 85, 1966.
- 9 — ATKINSON, D. E.: Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism. *Biochemical Society Simposia*, **27**: 23, 1968.
- 10 — BAIRD, G. D.: Metabolite and enzyme levels in healthy and ketotic bovine liver. *Biochem. J.*, **106**: 10 P, 1968.
- 11 — BAIRD, G. D., HIBBITT, K. G., HUNTER, G. D., LUND, P., STUBBS, M. & KREBS, H. A.: Biochemical aspects of bovine ketosis. *Biochem. J.*, **107**: 683, 1968.
- 12 — BALASSE, E.: Rôle du métabolisme glucidique dans la régulation des acides gras libres plasmatiques. Étude dans l'obésité, le diabète et le jeûne. *Journées Annuelles de Diabétologie de l'Hôtel-Dieu*. 7.<sup>e</sup> année. Pág. 13. Éditions Médicales Flammarion. Paris. 1966.
- 13 — BALASSE, E., COUTURIER, E. & FRANCKSON, J. R. M.: Influence of sodium  $\beta$ -hydroxybutyrate on glucose and free fatty acid metabolism in normal dogs. *Diabetologia*, **3**: 488, 1967.
- 14 — BALASSE, E. O. & HAVEL, R. J.: Turnover rate and oxidation of ketone bodies in normal and diabetic dogs. *Diabetologia*, **6**: 36, 1970.

- 15 — BALLARD, F. J., HANSON, R. W., KRONFELD, D. S. & RAGGI, F.: Metabolic changes in liver associated with spontaneous ketosis and starvation in cows. *J. Nutrition*, **95**: 160, 1968.
- 16 — BANTING, F. G. & BEST, C. H.: The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. clin. Med.*, **7**: 251, 1922.
- 17 — BANTING, F. G. & BEST, C. H.: Pancreatic extracts. *J. Lab. clin. Med.*, **7**: 464, 1922.
- 18 — BARNES, C. D. & ELTHERINGTON, L. G.: Drug Dosage in Laboratory Animals. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. 1966.
- 19 — BARTLEY, W., BIRT, L. M. & BANKS, P.: The Biochemistry of the Tissues. John Wiley & Sons Ltd. London. 1968.
- 20 — BATES, M. W., KREBS, H. A. & WILLIAMSON, D. H.: Turnover rates of ketone bodies in normal, starved and alloxan-diabetic rats. *Biochem. J.*, **110**: 655, 1968.
- 21 — BEATTY, C. E., PETERSON, R. D., BOCEK, R. H. & WEST, E. S.: Acetoacetate and glucose uptake by diaphragm and skeletal muscle from control and diabetic rats. *J. biol. Chem.* **234**: 11, 1959.
- 22 — BEATTY, C. H. & WEST, E. S.: The effect of substances related to the tricarboxylic acid cycle upon ketosis. *J. biol. Chem.*, **190**: 603, 1951.
- 23 — BEATTY, C. H. & WEST, E. S.: Effect of succinic and malic acids and fructose on ketosis in alloxan-diabetic rats. *J. biol. Chem.* **215**: 661, 1955.
- 24 — BEATTY, C. H., WEST, E. S. & BOCEK, R. M.: Effect of succinate, fumarate and oxalacetate on ketone body production by liver slices from non-diabetic and diabetic rats. *J. biol. Chem.*, **230**: 725, 1958.
- 25 — BEHRE, J. A.: A rapid quantitative method for the determination of acetone and diacetic acid in urine. *J. Lab. clin. Med.*, **13**: 1155, 1928.
- 26 — BEHRE, J. A.: A modified salicylaldehyde method for the determination of acetone bodies in blood and urine. *J. biol. Chem.*, **136**: 25, 1940.
- 27 — BEHRE, J. A. & BENEDICT, S. R.: A colorimetric method for the determination of acetone bodies in blood and urine. *J. biol. Chem.*, **70**: 487, 1926.
- 28 — BERGAMINI, E., GAGLIARDI, C. & PELLEGRINO, C.: Dependence on insulin of the hydrocortisone effect on muscle glycogen content. *FEBS Lett.*, **4**: 1, 1969.
- 29 — BERGMAN, E. N. & KON, K.: Acetoacetate turnover and oxidation rates in ovine pregnancy ketosis. *Amer. J. Physiol.* **206**: 449, 1964.
- 30 — BERGMAYER, H.-U.: Experimental techniques. In «Methods of Enzymatic Analysis». Ed. por H.-U. Bergmeyer. 2nd Printing. Pág. 14. Academic Press. New York. 1965.
- 31 — BERGMAYER, H.-U., GAWEHN, K., KLOTZSCH, H., KREBS, H. A. & WILLIAMSON, D. A.: Purification and properties of crystalline 3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochem. J.*, **102**: 423, 1967.
- 32 — BERNT, E. & BERGMAYER, H.-U.: Urea. In «Methods in Enzymatic Analysis». Ed. por H.-U. Bergmeyer. 2nd Printing. Pág. 401. Academic Press. New York. 1965.
- 33 — BERRY, M. N., WILLIAMSON, D. A. & WILSON, M. B.: Concentrations of acetoacetate and D-(-)-3-hydroxybutyrate in rat liver and blood. *Biochem. J.*, **94**: 17 C, 1965.
- 34 — BERSON, S. A. & YALOW, R. S.: Some current controversies in diabetes research. *Diabetes*, **14**: 549, 1965.

- 35 — BESSMAN, S. P.: A molecular basis for the mechanism of insulin action. *Amer. J. Med.*, **40**: 740, 1966.
- 36 — BEST, C. H.: Epochs in the history of diabetes. In «Diabetes». Pág. 1. Ed. por R. H. Williams. Hoeber Medical Division. Harper & Row, Publishers. New York. 1965.
- 37 — BIERMAN, E. L., DOLE, V. P. & ROBERTS, T. N.: An abnormality of nonesterified fatty acid metabolism in diabetes mellitus. *Diabetes*, **6**: 475, 1957.
- 38 — BJÖRNTORP, P.: Effect of ketone bodies on lipolysis in adipose tissue in vitro. *J. Lipid Res.*, **7**: 621, 1966.
- 39 — BJÖRNTORP, P.: The effect of beta-hydroxybutyric acid on glycerol outflow from adipose tissue in vitro. *Metabolism*, **15**: 191, 1966.
- 40 — BJÖRNTORP, P. & SCHERSTÉN, T.: Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate on lipid mobilization. *Amer. J. Physiol.*, **212**: 683, 1967.
- 41 — BLACKARD, W. G. & OMORI, Y.: Blood ketone response to norepinephrine-induced free fatty acid elevation in diabetes. *Diabetes*, **13**: 518, 1964.
- 42 — BLÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, E.: Modificaciones de la glucosa e insulina en ratas como respuesta a la ingestión de dietas específicas. Tesis. Madrid. 1967.
- 43 — BLÁZQUEZ, E. & LÓPEZ-QUIJADA, C.: «The effect of high-fat diet on glucose, insulin sensitivity and plasma insulin in rats». *J. Endocr.*, **42**: 489, 1968.
- 44 — BLIXENKRONE-MOLLER, N.: Über den Abbau von Ketonkörpern. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **253**: 261, 1938.
- 45 — BOGDONOFF, M. D., ESTES, JR., E. H., FRIEDBERG, S. J. & KLEIN, R. F.: Fat mobilization in man. *Arch. intern. Med.*, **55**: 328, 1961.
- 46 — BORST, P. — In «Funktionelle und Morphologische Organisation der Zelle». Ed. por P. Karlson. Pág. 137. Springer-Verlag. Berlin. 1963.
- 47 — BORTZ, W. & LYNEN, F. — ref. «in press», in WIELAND, O. & WEISS, L.: Inhibition of citrate-synthase by palmitil-coenzyme A. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **13**: 26, 1963.
- 48 — BOXER, G. E. & DEVLIN, T. M.: Pathways of intracellular hydrogen transport. *Science*, **134**: 1, 1961.
- 49 — BREMER, J.: Comparison of acylcarnitines and pyruvate as substrates for rat-liver mitochondria. *Biochim. biophys. Acta*, **116**: 1, 1966.
- 50 — BRESSLER, R.: The biochemistry of ketosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **104**: 735, 1963.
- 51 — BRONK, J. R. & FISHER, R. B.: The role of ornithine and citrulline in urea synthesis. *Biochem. J.*, **60**: XXIX P, 1955.
- 52 — BUCHANAN, J. M., HASTINGS, A. B. & NESBETT, F. B.: The effect of the ionic environment on the synthesis of glycogen from glucose in rat liver slices. *J. biol. Chem.*, **180**: 435, 1949.
- 53 — BUCHANAN, J. M., SAKAMI, W., GURIN, S. & WILSON, D. W.: A study of the intermediates of acetate and acetoacetate oxidation with isotopic carbon. *J. biol. Chem.*, **159**: 695, 1945.
- 54 — BÜCHER, T. & KLINGENBERG, M.: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. *Angew. Chem.*, **70**: 552, 1958.
- 55 — BUCHNER, N., OVERATH, P. & LYNEN, F.:  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A reductase' cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver' *Biochim. biophys. Acta*, **40**: 491, 1960.



- 56 — BURCH, R. E. & TRIANTAFILLOU, D.: Acetoacetyl coenzyme A deacylase activity in liver mitochondria from fed and fasted rats. *Biochemistry*, **7**: 1009, 1968.
- 57 — BUTLER, JR., W. M., MALING, H. M., HORNING, M. G. & BRODIE, B. B.: The direct determination of liver triglycerides. *J. Lipid. Res.*, **2**: 95, 1961.
- 58 — CAHILL, JR., G. F., HERRERA, M. G., MORGAN, A. P., SOELDNER, J. S., STEINKE, J. LEVY, P. L., REICHARD, JR., G. A. & KIPNIS, D. M.: Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J. clin. Invest.* **45**: 1751, 1966.
- 59 — CAHILL, JR., G. F. & OWEN, O. E.: Some observations on carbohydrate metabolism in man. In «Carbohydrate Metabolism and its Disorders». Ed. por F. Dickens, P. J. Randle & W. J. Whelan. Vol. 1, pág. 497. Academic Press. London. 1968.
- 60 — CAMPBELL, J. & GREEN, G. R.: Free fatty acid metabolism in chinese hamsters. *Canad. J. Physiol. Pharm.*, **44**: 47, 1966.
- 61 — CAMPBELL, J. & RASTOGI, K. S.: Growth hormone-induced diabetes and high levels of serum insulin in dogs. *Diabetes*, **15**: 30, 1966.
- 62 — CAMPBELL, J. & RASTOGI, K. S.: Actions of growth hormone: enhancement of insulin utilization with inhibition of insulin effect on blood glucose in dogs. *Metabolism*, **18**: 930, 1969.
- 63 — CAMPBELL, J., RASTOGI, K. S. & HAUSLER, H. R.: Hyperinsulinemia with diabetes induced by cortisone, and the influence of growth hormone in the chinese hamster. *Endocrinology*, **79**: 749, 1966.
- 64 — CARLSON, L. A.: Inhibition of the mobilization of free fatty acids from adipose tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **131**: 119, 1965.
- 65 — DEL CASTILLO, E. J., GALLI, M. E., ROLDÁN, A., RIETTI, C. T. & HOUSSAY, B. A.: Decrease in ketonemia due to infusion of lipids in pancreatectomized dogs. *Diabetes*, **14**: 33, 1965.
- 66 — CHALMERS, T. M., PAWAN, G. L. S. & KEKWICK, A.: Fat-mobilizing and ketogenic activity of urine extracts. *Lancet*, **II**: 6, 1960.
- 67 — CHAPPELL, J. B.: Systems used for the transport of substrates into mitochondria. *Br. med. Bull.*, **24**: 150, 1968.
- 68 — CHAPPELL, J. B. & CROFTS, A. R.: Ion transport and reversible volume changes of isolated mitochondria. In «Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria». Pág. 293. Ed. por J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello & E. C. Slater. B. B. A. Library. Vol. 7. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966.
- 69 — CHAPPELL, J. B. & HAARHOFF, K. N.: The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations. In «Biochemistry of Mitochondria». Ed. por E. C. Slater, Z. Kaniuga e L. Wojtczak. Pág. 75. Academic Press, London, e PWN—Polish Scientific Publishers, Warszawa. Warszawa. 1967.
- 70 — CHAPPELL, J. B. & ROBINSON, B. H.: Penetration of the mitochondrial membrane by tricarboxylic acid anions. *Biochemical Society Symposia*, **27**: 123, 1968.
- 71 — CHARI, A. & WERTHEIMER, E.: The effect of ketone bodies on the carbohydrate metabolism of rat diaphragm. *Biochem. J.*, **57**: 443, 1954.
- 72 — CHENG, A. L. S. & ZILVERSMIT, D. B.: Determination of cholesterol and triglycerides in the rat plasma. *J. Lipid Res.*, **1**: 190, 1960.

- 73 — CHILDS, B., NYHAN, W. L., BORDEN, M., BARD, L. & COOKE, R. E.: Idiopathic hyperglycemia: a new disorder of amino acid metabolism. I. *Pediatrics*, **27**: 522, 1961.
- 74 — CHRISTENSEN, H. N.: Free amino acids and peptides in tissues. In «Mammalian Protein Metabolism». Vol. I, pág. 105. Ed. por H. N. Munro & J. B. Allison. Academic Press. New York. 1964.
- 75 — CHUNG, L. H. & DUPONT, J.: Acetoacetate metabolism of rats fed high fat or restricted caloric diets. *Lipids*, **3**: 545, 1968.
- 76 — COHEN, J. J., BERGLUND, F. & LOTSPEICH, W. D.: Renal tubular reabsorption of acetoacetate, inorganic sulphate and inorganic phosphate in the dog as affected by glucose and phlorizin. *Amer. J. Physiol.*, **184**: 91, 1956.
- 77 — COHEN, J. J., BERGLUND, F. & LOTSPEICH, W. D.: Interrelations during renal tubular reabsorption in the dog among several anions showing a sensitivity to glucose and phlorizin. *Amer. J. Physiol.*, **189**: 331, 1957.
- 78 — COHEN, P. P. & HAYANO, M.: Urea synthesis by liver homogenates. *J. biol. Chem.*, **166**: 251, 1946.
- 79 — COHN, C.: Feeding patterns and some aspects of cholesterol metabolism. *Fed. Proc.*, **23**: 76, 1964.
- 80 — COHN, C. & JOSEPH, D.: Role of rate of ingestion of diet on regulation of intermediary metabolism («meal eating» vs. «nibbling»). *Metabolism*, **9**: 492, 1960.
- 81 — CORNFORTH, J. W.: Biosynthesis of fatty acids and cholesterol considered as chemical processes. *J. Lipid Res.*, **1**: 3, 1959.
- 82 — COULOMBE, J. J. & FAVREAU, L.: A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea. *Clin. Chem.*, **9**: 102, 1963.
- 83 — COURTICE, F. C. & DOUGLAS, C. G.: The effects of prolonged muscular exercise in the metabolism. *Proc. R. Soc. B.*, **119**: 381, 1936.
- 84 — DAWSON, R. M. C.: Physiological Media. In «Data for Biochemical Research». 2nd Ed. Pág. 507. Ed. por R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott & K. M. Jones. Oxford University Press. Oxford. 1969.
- 85 — DENIGÈS, G.: Sur les fonctions organiques pouvant se combiner au sulfate mercurique. Cas des acétones. *Compt. rend. Acad. Sci.*, **126**: 1868, 1898.
- 86 — DENIGÈS, G.: Combinaison, recherche, et dosage de l'acétone ordinaire avec le sulfate mercurique. *Compt. rend. Acad. Sci.*, **127**: 963, 1898.
- 87 — DESCARTES, R.: Discours de la Méthode. Pág. 71. Librairie Philosophique J. Vrin. Paris. 1966.
- 88 — DEUEL, JR., H. J. e col. — BUTTS, J. S., CUTLER, C. H., HALLMAN, L. & DEUEL, JR., H. J.: Studies on ketosis. VI. Quantitative studies on  $\beta$  oxidation. *J. biol. Chem.*, **109**: 597, 1935.
- 89 — DEUEL, JR., H. J. HALLMAN, L. F., BUTTS, J. S. & MURRAY, S.: Studies on ketosis. VIII. Quantitative studies on the oxidation of the ethyl esters of the fatty acids. *J. biol. Chem.*, **116**: 621, 1936.
- 90 — DEUTSCH, W.: An improvement of Warburg's method for cutting tissue slices for respiratory experiments. *J. Physiol., Lond.*, **87**: 56 P, 1936.

- 91 — DEVECKERSKI, M., PIERCE, C. E. & FRAWLEY, T. F.: Effect of ketone acids on glucose and fat metabolism in adipose tissue of the rat. *Metabolism*, **17**: 877, 1968.
- 92 — DEVLIN, T. M. & BEDELL, B. H.: Effect of acetoacetate on the oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide by intact rat liver mitochondria. *J. biol. Chem.*, **235**: 2134, 1960.
- 93 — DEVLIN, T. M. & LEHNINGER, A. L.: Oxidative phosphorylation by an enzyme complex from extracts of mitochondria. II. The span  $\beta$ -hydroxybutyrate to cytochrome c. *J. biol. Chem.*, **219**: 507, 1956.
- 94 — DIBOLD, H., FREY, L. & LAPP, F.W.: Bemerkungen zur Bernsteinsäuretherapie diabetischer Azidosen. *Dtsch-med. Wchnschr.*, **63**: 1505, 1937.
- 95 — DICKERSON, V. C., TEPPERMAN, J. & LONG, C. N. H.: The role of liver in the synthesis of fatty acids from carbohydrate. *Yale J. Biol. Med.*, **15**: 875, 1943.
- 96 — DIXON, M.: *Manometric Methods*. 3rd Ed. Cambridge University Press. Cambridge. 1952.
- 97 — DOLE, V. P.: A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. clin. Invest.*, **35**: 150, 1956.
- 98 — DOLE, V. P.: Fat metabolism in diabetes. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **34**: 21, 1958.
- 99 — DOLE, V. P.: Fat as an energy source. In «Fat as a Tissue». Ed. por K. Rodahl & B. Issekutz. Pág. 250. The Blakiston Division. McGraw-Hill Book Company. New York. 1964.
- 100 — DOLE, V. P., GORDIE, E. & BIERMAN, E. L.: Current concepts in therapy, hyperlipemia and arteriosclerosis. *New Eng. J. Med.*, **269**: 686, 1963.
- 101 — DOLE, V. P. & MEINERTZ, H.: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. biol. Chem.*, **235**: 2595, 1960.
- 102 — DRUMMOND, G. I. & STERN, J. R.: Enzymes of ketone body metabolism: II Properties of an acetoacetate synthesizing enzyme prepared from ox liver. *J. biol. Chem.*, **235**: 318, 1960.
- 103 — DRYSDALE, G. R. & LARDY, H. A.: Fatty acid oxidation by a soluble enzyme system from mitochondria. *J. biol. Chem.*, **202**: 119, 1953.
- 104 — DUNLOP, D. M. & ARNOTT, W. M.: Effect of succinic acid on diabetic ketosis. *Lancet*, **II**: 738, 1937.
- 105 — DUPONT, J. & MATHIAS, M. M.: Bio-oxidation of linoleic acid via methylmalonyl-CoA. *Lipids*, **4**: 478, 1969.
- 106 — DURR, I. F. & RUDNEY, H.: The reduction of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A to mevalonic acid. *J. biol. Chem.*, **235**: 2572, 1960.
- 107 — De DUVE, C., PRESSMAN, B. C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F.: Tissues fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, **60**: 604, 1955.
- 108 — EDSON, N. L.: Ketogenesis-antiketogenesis. I. The influence of ammonium chloride on ketone-body formation in liver. *Biochem. J.*, **29**: 2082, 1935.
- 109 — EGGLESTON, L. V. & KREBS, H. A.: Strain differences in the activities of rat liver enzymes. *Biochem. J.*, **114**: 877, 1969.

- 110 — ELLIS, S.: The effects of sympathomimetic amines and adrenergic blocking agents on metabolism. *Physiol. Pharmac.*, **4**: 179, 1967.
- 111 — ELRICH, H., STIMMLER, L., HLAD, JR., C. J. & ARAI, Y.: Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J. clin. Endocr.*, **24**: 1076, 1964.
- 112 — EMBDEN, G. & MARX, A.: Über Acetonbildung in der Leber. *Beitr. chem. Physiol. Path.*, **11**: 318, 1908.
- 113 — ENGEL, F. L.: The influence of the endocrine glands on fatty acid and ketone body metabolism. *Arch. intern Med.*, **100**: 19, 1957.
- 114 — ENGEL, F. L. & AMATRUDA, JR., T. T.: Hormonal aspects of ketosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **104**: 753, 1963.
- 115 — ENGEL, F. L. & ENGEL, M. G.: Urea synthesis from amino acids during hemorrhagic shock in the nephrectomized rat. *Amer. J. Physiol.*, **147**: 165, 1946.
- 116 — ENGEL, M. G. & ENGEL, F. L.: Fasting ketosis in the adrenalectomized and cortisone-treated rat. *Endocrinology*, **55**: 593, 1954.
- 117 — ENGEL, F. L. & ENGEL, M. G.: The ketogenic activity of corticotropin, a presumed extra-adrenal action. *Endocrinology*, **62**: 150, 1958.
- 118 — ENGEL, F. L., WINTON, M. G. & LONG, C. N. H.: Biochemical studies on shock. I. The metabolism of amino acids and carbohydrate during hemorrhagic shock in the rat. *J. exp. Med.*, **77**: 397, 1943.
- 119 — ERNSTER, L. & KUYLENSTIERNA, B.: Structure, composition and function of mitochondrial membranes. In «Mitochondria — Structure and Function». FEBS Symposium. Vol. 17. Pág. 5. Academic Press. London. 1969.
- 120 — ERNSTER, L. & KUYLENSTIERNA, B.: Outer membrane of mitochondria. In «Membranes of mitochondria and chloroplasts». ACS Monograph 165. Ed. por E. Racker. Van Nostrand Reinhold Company. New York. 1970.
- 121 — EXTON, J. H., CORBIN, J. G. & PARK, C. R.: Control of gluconeogenesis in liver. IV. Differential effects of fatty acids and glucagon on ketogenesis and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *J. biol. Chem.*, **244**: 4095, 1969.
- 122 — EXTON, J. H. & PARK, C. R.: Control of gluconeogenesis in liver. I. General features of gluconeogenesis in the perfused livers of rats. *J. biol. Chem.*, **242**: 2622, 1967.
- 123 — FABRYCANT, M., JACKSON, R. S. & ASHE, B. I.: Cushing's syndrome: failure to demonstrate diminished peripheral glucose uptake and insulin resistance. *Metabolism*, **6**: 116, 1957.
- 124 — FAIN, J. N., SCOW, R. O. & CHERNICK, S. S.: Effects of glucocorticoids on metabolism of adipose tissue in vitro. *J. biol. Chem.*, **238**: 54, 1963.
- 125 — FAJANS, S. S., FLOYD, JR., J. C., KNOPF, R. F. & CONN, J. W.: Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **23**: 617, 1967.
- 126 — FASELLA, P., BAGLIONI, C., TURANO, C. & SILIPRANDI, N.: Action of citrate and oxalacetate on dietary and diabetic ketosis. *Lancet*, **I**: 1097, 1958.
- 127 — FELIG, P., OWEN, O. E., WAHREN, J. & CAHILL, JR., G. F.: Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J. clin. Invest.*, **48**: 584, 1969.
- 128 — FELLER, D. D. & FEIST, E.: The conversion of leucine carbon into CO<sub>2</sub>, fatty acids and other products by adipose tissue. *Biochim. biophys. Acta*, **62**: 40, 1962.

- 129 — FINE, M. B. & WILLIAMS, R. H.: Effect of fasting, epinephrine and glucose and insulin on hepatic uptake of nonesterified fatty acids. *Amer. J. Physiol.*, **199**: 403, 1960.
- 130 — FISHER, G. L. & RECENT, L.: A mechanism for diminished ketogenesis in experimental liver injury. II. *J. Lab. clin. Med.*, **48**: 171, 1956.
- 131 — FISHER, M. M. & KERLY, M.: Amino acid metabolism in the perfused rat liver. *J. Physiol., Lond.*, **174**: 273, 1964.
- 132 — FISHER, R. A.: *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver & Boyd. Edinburgh. 1950.
- 133 — FITCH, W. M. & CHAIKOFF, I. L.: Extent and patterns of adaptation of enzyme activities in livers of normal rats fed diets high in glucose and fructose. *J. biol. Chem.*, **235**: 554, 1960.
- 134 — FORD, C. R., STEVENS, R., BOLINGER, R. E. & MORRIS, J. H.: Turnover of palm itate C-14 in diabetics and normals. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **113**: 177, 1963.
- 135 — FOSTER, D. W.: Studies in the ketosis of fasting. *J. clin. Invest.*, **46**: 1283, 1967.
- 136 — FREDRICKSON, D. S. & GORDON, JR. R. S.: Transport of fatty acids. *Physiol. Rev.*, **38**: 585, 1958.
- 137 — FREEDLAND, R. A., MURAD, S. & HURVITZ, A. I.: Relationship of nutrition and hormonal influences of liver enzyme activity. *Fed. Proc.*, **27**: 1217, 1968.
- 138 — FREEDMAN, A. C. & KOHN, L.: Pyruvate metabolism and control: factors affecting pyruvic carboxylase activity. *Science*, **145**: 58, 1964.
- 139 — FREEDMAN, A. D., RUMSEY, P. & GRAFF, S.: The metabolism of pyruvate in the tricarboxylic acid cycle. *J. biol. Chem.*, **235**: 1854, 1960.
- 140 — FREINKEL, N.: Aspects of the endocrine regulation of lipid metabolism. In «Metabolism and Physiological Significance of Lipids». Pág. 455. Ed. por R. M. C. Dawson & D. N. Rhodes. John Wiley & Sons Ltd. London. 1964.
- 141 — FREUND, G.: The calorie deficiency hypothesis of ketogenesis tested in man. *Metabolism*, **14**: 985, 1965.
- 142 — FREUND, G. & WEINSTER, R. L.: Standardized ketosis in man following medium chain triglyceride ingestion. *Metabolism*, **15**: 980, 1966.
- 143 — FRIEDMANN, B., GOODMAN, JR., E. H., & WEINHOUSE, S.: Liver glycogen synthesis in intact alloxan diabetic rats. *J. biol. Chem.*, **238**: 2899, 1963.
- 144 — FRITZ, I. B.: Effects of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. *Acta physiol. Scandinav.*, **34**: 367, 1955.
- 145 — FRITZ, I. B.: Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver. *Amer. J. Physiol.*, **197**: 297, 1959.
- 146 — FRITZ, I. B.: Factors influencing the rates of long-chain fatty acid oxidation and synthesis in mammalian systems. *Physiol. Rev.*, **41**: 52, 1961.
- 147 — FRITZ, I. B.: The metabolic consequences of the effects of carnitine on long-chain fatty acid oxidation. In «Cellular compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism». Pág. 39. FEBS Symposium. Ed. por F. C. Gran. Universitetsforlaget, Oslo, e Academic Press, London. Oslo. 1968.

- 148 — GAMBLE, J. L.: Companionship of water and electrolytes in the organization of body fluids. Lane Medical Lectures. Vol. 5. Pág. 71. Stanford University Press. Stanford. Calif. 1951.
- 149 — GAMMELTOFT, A.: The ratio  $\beta$ -hydroxybutyric acid/acetoacetic acid in the blood under various experimental conditions. *Acta physiol. Scand.*, **24**: 35, 1951.
- 150 — GARCIA, A., WILLIAMSON, J. R. & CAHILL, JR., G. F.: Studies on the perfused rat liver. II. Effect of glucagon on gluconeogenesis. *Diabetes*, **15**: 188, 1966.
- 151 — GARCIA PUENTE, L. M., GRANDE, F. & OYA, J. C.: Un estudio preliminar del cociente D:N en los perros diabéticos aloxánicos. *Rev. clin. Esp.*, **32**: 18, 1949.
- 152 — GARLAND, P. B.: Control of citrate synthesis in mitochondria. *Biochemical Society Simposia*, **27**: 41, 1968.
- 153 — GARLAND, P., NEWSHOLM, E. A. & RANDLE, P. J.: Regulation of glucose uptake by muscle. 9. Effects of fatty acids and ketone bodies and diabetes and starvation on pyruvate metabolism and lactate to pyruvate and L-glycerol 3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate rations in rat heart and rat diaphragm muscles. *Biochem. J.*, **93**: 665, 1964.
- 154 — GARLAND, P. B. & RANDLE, P. J.: Regulation of glucose uptake by muscle. 10. Effects of diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy and fatty acids, ketone bodies and pyruvate on glycerol output and concentration of free fatty acids, long chain fatty acil-CoA, glycerol phosphate and citrate cycle intermediates in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J.*, **93**: 678, 1964.
- 155 — GARLEPP, H. J., SÖLING, H. D. & CREUTZFELDT, W.: Beziehungen zwischen Glucose — und Ketonkörperstoffwechsel bei eviscerierten, nephrektomierten Ratten und der Effekt von Oxalacetat, Citrat und Pyruvat auf die periphere Ketonkörperaufnahme. *Biochem. biophys. Acta*, **100**: 544, 1965.
- 156 — GEELMUYDEN, H.: Ueber Aceton als Stoffwechselprodukt. *Z. physiol. Chem.*, **23**: 431, 1897.
- 157 — GEELMUYDEN, H.: Ueber den Acetongehalt der Organe am Coma diabeticum Verstorbener nebst Beiträgen zur Theorie des Acetonstoffwechsels. *Z. physiol. Chem.*, **41**: 128, 1904.
- 158 — GERHARDT, C. A. C. J.: Ueber Diabetes Mellitus und Aceton. *Wien. Med. Presse*, **6**: 672 1865.
- 159 — GILBERT, C., GILLMAN, J. & SAVAGE, N.: Lipaemic but non-ketogenic effects of hydrocortisone and cortisone and the non-lipaemic effect of desoxycorticosterone in depancreatized-adrenalectomized baboons (*Papio ursinus*). *South African J. Med. Sci.*, **25**: 133, 1960.
- 160 — GILLMAN, J., GILBERT, C., EPSTEIN, E. & ALLAN, J. C.: Endocrine control of blood sugar, lipaemia, and ketonaemia in diabetic baboons. *Br. Med. J.*, **2**: 1260, 1958.
- 161 — GILLMAN, J., GILBERT, C. & SAVAGE, N.: Endocrine control of the fatty liver and serum lipids in baboons with special reference to the disorder of lipid metabolism in kwashiorkor. *Metabolism*, **11**: 800, 1962.
- 162 — GOLDSTEIN, M. S.: Muscular exercise and subsequent glucose utilization. In «On the nature and treatment of diabetes». *Excerpta Med. Int. Cong. Serv.*, **84**: 308, 1965.
- 163 — GOMES DA COSTA, S. F., MENANO, H. P., RELVAS, M. E. S. A. & HALPERN, M. J.: Um novo erro metabólico hereditário encontrado em Portugal. Ensaio sobre a patogenia de uma nova aminoacidúria característica. *Gazeta Médica Portuguesa*, **13**: 545, 1960.

- 164 — GOMORI, G.: Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology*, **1**: 138, 1955.
- 165 — GOOD, C. A., KRAMER, H. & SOMOGYI, M.: The determination of glycogen. *J. biol. Chem.*, **100**: 485, 1933.
- 166 — GOODMAN, H. M.: Permissive effects of hormones on lipolysis. *Endocrinology*, **86**: 1064, 1970.
- 167 — GOODMAN, H. M. & KNOBIL, E.: The effects of fasting and of growth hormone administration on plasma fatty acid concentration in normal and hypophysectomized rhesus monkeys. *Endocrinology*, **65**: 451, 1959.
- 168 — GOODMAN, H. M. & KNOBIL, E.: The role of some endocrine factors in the regulation of fatty acid mobilization during fasting. *Amer. J. Physiol.*, **201**: 1, 1961.
- 169 — GOODNER, C. J. & TUSTISON, W. A.: Autonomic mediation of the effect of raised arterial glucose upon free fatty acids. *Science*, **146**: 770, 1964.
- 170 — GORDON, JR., R. S. & CHERKES, A.: Unesterified fatty acid in human blood plasma. *J. clin. Invest.*, **35**: 206, 1956.
- 171 — GORDON, JR., R. S., CHERKES, A. & GATES, H.: Unesterified fatty acid in human blood plasma. II. The transport function of unesterified fatty acid. *J. clin. Invest.*, **36**: 810, 1957.
- 172 — GORDON, R., SPECTOR, S., SJOERDSMA, A. & UDENFRIEND, S.: Increased synthesis of norepinephrine and epinephrine in the intact rat during exercise and exposure to cold. *J. Pharmac. exp. Ther.*, **153**: 440, 1966.
- 173 — GRANT, J. K.: Actions of steroid hormones at cellular and molecular levels. *Essays in Biochemistry*, **5**: 1, 1969.
- 174 — GREEN, D. E. & BAUM, H.: Energy and the mitochondrion. Academic Press. New York. 1970.
- 175 — GREEN, D. E., DEWAN, J. G. & LELOIR, L. F.: The  $\beta$ -hydroxybutyric dehydrogenase of animal tissues. *Biochem. J.*, **31**: 934, 1937.
- 176 — GREEN, M. & MILLER, L. L.: Protein catabolism and protein synthesis in perfused livers of normal and alloxan-diabetic rats. *J. biol. Chem.*, **235**: 3202, 1960.
- 177 — GREENBERG, L. A. & LESTER, D.: A micromethod for the determination of acetone and ketone bodies. *J. biol. Chem.*, **154**: 177, 1944.
- 178 — GREVILLE, G. D.: Factors affecting the utilization of substrates by mitochondria. In «Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria». Pág. 86. Ed. por J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello & E. C. Slater. B. B. A. Library. Vol. 7. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966.
- 179 — GREVILLE, G. D. & TUBBS, P. K.: The catabolism of long chain fatty acids in mammalian tissues. *Essays in Biochemistry*, **4**: 155, 1968.
- 180 — GRIFFITHS, D. E.: Oxidative phosphorylation. *Essays in Biochemistry*, **1**: 91, 1965.
- 181 — GRISOLIA, S. & COHEN, P. P.: Catalytic role of glutamate derivatives in citrulline biosynthesis. *J. biol. Chem.*, **204**: 753, 1953.
- 182 — HAGEN, J. H. & HAGEN, P. B.: Actions of adrenalin and noradrenalin on metabolic systems. In «Actions of hormones on molecular processes». Ed. por G. Litwack & D. Kritchevsky. Pág. 268. John Wiley & Sons, Inc.. New York. 1964.

- 183 — HALES, C. N.: Some actions of hormones in the regulation of glucose metabolism. *Essays Biochemistry*, **3**: 73, 1967.
- 184 — HALLERVORDEN, E. — *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.*, **10**: 125, 1879. — Ver 560.
- 185 — HAMPRECHT, B., NÜSSLER, C. & LYNEN, F.: Rhythmic changes of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity in livers of fed and fasted rats. *FEBS Lett.*, **4**: 117, 1969.
- 186 — HANSON, R. W.: Interrelationship of ketone body metabolism and glucose utilization by adipose tissue *in vitro*. *Archs Biochem. Biophys.*, **109**: 98, 1965.
- 187 — HANSON, R. W. & ZIPORIN, Z. Z.: Factors influencing the utilization of ketone bodies by mouse adipose tissue. *J. Lipid. Res.*, **7**: 56, 1966.
- 188 — HASLAM, J. M. & KREBS, H. A.: The permeability of mitochondria to oxaloacetate and malate. *Biochem. J.*, **107**: 659, 1968.
- 189 — HASTINGS, A. B., TENG, C.-T., NESBETT, F. B. & SINEX, F. M.: Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. I. The effect of cations in the media. *J. biol. Chem.* **194**: 69, 1952.
- 190 — HATHAWAY, J. A. & ATKINSON, D. E.: Kinetics of regulatory enzymes: effect of adenosine triphosphate on yeast citrate synthase. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **20**: 661, 1965.
- 191 — HAVEL, R. J. & FREDRICKSON, D. S.: The metabolism of chylomicra. *J. clin. Invest.*, **35**: 1025, 1956.
- 192 — HAYNES, R. C., JR.: The fixation of carbon dioxide by rat liver mitochondria and its relation to gluconeogenesis. *J. biol. Chem.*, **240**: 4103, 1965.
- 193 — HEIMBERG, M., DUNKERLEY, A. & BROWN, T. O.: Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes I. Release and uptake of triglycerides by perfused livers from normal and alloxan-diabetic rats. *Biochim. biophys. Acta*, **125**: 252, 1966.
- 194 — HELLMAN, D. E., SENIOR, B. & GOODMAN, H. M.: Anti-lipolytic effects of  $\beta$ -hydroxybutyrate. *Metabolism*, **18**: 906, 1969.
- 195 — HEMS, R., ROSS, B. D., BERRY, M. N. & KREBS, H. A.: Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem. J.*, **101**: 284, 1966.
- 196 — HEMS, R. STUBBS, M. & KREBS, H. A.: Restricted permeability of rat liver for glutamate and succinate. *Biochem. J.*, **107**: 807, 1968.
- 197 — HENNING, H. V., SEIFFERT, I. & SEUBERT, W.: Cortisol induzierter Anstieg der Pyruvatcarboxylaseaktivität in der Rattenleber. *Biochim. biophys. Acta*, **77**: 345, 1963.
- 198 — HENNING, H. V. & SEUBERT, W.: Zum Mechanismus der Gluconeogenese und ihrer Steuerung. I. Quantitative Bestimmung der Pyruvatcarboxylase in Rattenleber. *Biochem. Z.*, **340**: 160, 1964.
- 199 — HIPÓLITO-REIS, C.: Lesões hepáticas. Ensaio de interpretação patogénica. Dissertação de licenciatura. Porto, 1960.
- 200 — HIPÓLITO-REIS, C., DANIEL-SERRÃO & SOBRINHO-SIMÕES, M.: Estudo das fracções proteídicas férricas na intoxicação experimental pela etionina. *Arq. Port. Bioq.*, **10**: 496, 1967/1968.
- 201 — HIPÓLITO-REIS, C. & SOBRINHO-SIMÕES, M.: Estado nutricional e resposta glicémica à administração parenteral de ácidos gordos de cadeia curta no Cão. *Arq. Port. Bioq.*, **10**: 516, 1967/1968.



- 202 — HIPÓLITO-REIS, C. & SOBRINHO-SIMÕES, M.: Jejum e miniração de leucina: reacções glicémicas. *Arq. Port. Bioq.*, **11**: 167, 1968.
- 203 — HIRD, F. J. R. & SYMONS, R. H.: The mode of formation of ketone bodies from butyrate by tissue from the rumen and omasum of the sheep. *Biochem. biophys. Acta*, **46**: 457, 1961.
- 204 — HIRSCH, C. A. & HLATT, H. H.: Ribosomal turnover in tissues of fed, fasted and tumor-bearing rats. *J. clin. Invest.*, **45**: 1022, 1966.
- 205 — HIRCHFELD, F.: Beobachtungen über die Acetonurie und das Coma diabeticum. *Z. klin. Med.*, **28**: 176, 1895.
- 206 — HOGEBOOM, G. H. & SCHNEIDER, W. C.: Intracellular distribution of enzymes. XI. Glutamic dehydrogenase. *J. biol. Chem.*, **204**: 233, 1953.
- 207 — HOHORST, H. J.: L-(+)-lactate. In «Methods of Enzymatic Analysis». Ed. por H.-U. Bergmeyer. 2nd Printing. Pág. 266. Academic Press. New York, 1965.
- 208 — HOHORST, H. J., ARESE, P., BARTELS, H., STRATMANN, D. & TALKE, H.: L (+) Lactic acid and the steady state of cellular red/ox-systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **119**: 974, 1965.
- 209 — HOLLIFIELD, G. & PARSON, W.: Metabolic adaptations to a «stuff and starve» feeding program. I. Studies of adipose tissue and liver glycogen in rats limited to a short daily feeding period. *J. clin. Invest.*, **41**: 245, 1962.
- 210 — HOLTEN, D. D. & NORDLIE, R. C.: Comparative studies of catalytic properties of Guinea Pig liver intra-and extramitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinases. *Biochemistry*, **4**: 723, 1965.
- 211 — HORECKER, B. L. & KORNBERG, A.: The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. biol. Chem.*, **175**: 385, 1948.
- 212 — HOUSSAY, B. A.: Hormonal factors of diabetic ketosis. *Diabetes*, **12**: 481, 1963.
- 213 — HOUSSAY, B. A.: Others hormones. In «Diabetes». Pág. 232. Ed. por R. H. Williams. Hoeber Medical Division. Harper & Row Publishers. New York. 1965.
- 214 — HOUSSAY, B. A. & BIASOTTI, A.: Hipofisectomia y diabetes pancreática en el sapo. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **6**: 8, 1930.
- 215 — HOUSSAY, B. A. & BIASOTTI, A.: La diabetes pancreática de los perros hipofisoprivos. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **6**: 251, 1930.
- 216 — HOUSSAY, B. A. & BIASOTTI, A.: La diabetes floridzínica de los perros hipofisoprivos. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **6**: 326, 1930.
- 217 — HUBBELL, R. B., MENDEL, L. B. & WAKEMAN, A. J.: A new salt mixture for use in experimental diets. *J. Nutrition*, **14**: 273, 1937.
- 218 — HUNTER, F. E. & LOLOIR, L. F.: Citric acid formation from acetoacetic and oxalacetic acids. *J. biol. Chem.*, **159**: 295, 1945.
- 219 — HUNTER, G. D. & MILLSON, G. C. — *Res. veter. Sci.*, **5**: 1, 1964 — Ver 255.
- 220 — HURTLEY, W. H.: The four carbon atom acids of diabetic urine. *Quart. J. Med.*, **9**: 301, 1916.
- 221 — JAENICKE, L. & LYNEN, F.: Coenzyme A. In «The Enzymes», 2nd ed. Vol. 3, pág. 3. Ed. por P. D. Boyer, H. Lardy & K. Myrbäck. Academic Press. New York. 1960.
- 222 — JEANRENAUD, B.: Aspects récents de l'activité métabolique du tissu adipeux. *Journées Annuelles de Diabétologie de l'Hôtel-Dieu*. Septième année. Pág. 7. Éditions Médicales Flammarion. Paris. 1966.

- 223 — JOHNSON, R. E., PASSMORE, R. & SARGENT, F.: Multiple factors in experimental human ketosis. *Arch. intern Med.*, **107**: 111, 1961.
- 224 — JOHNSON, R. H., WALTON, J. L., KREBS, H. A. & WILLIAMSON, D. H.: Metabolic fuels during and after severe exercise in athletes and non-athletes. *Lancet*, **II**: 452, 1969.
- 225 — JOHNSON, R. H., WALTON, J. L., KREBS, H. A. & WILLIAMSON, D. H.: Post-exercise ketosis. *Lancet*, **II**: 1383, 1969.
- 226 — JONES, M. E.: Amino acid metabolism. *An. Rev. Biochem.*, **34**: 381, 1965.
- 227 — JOSLIN, E. P., ROOT, H. F., WHITE, P., MARBLE, A.: The treatment of Diabetes Mellitus. 10th ed. Pág. 290. H. Kimpton. London. 1959.
- 228 — JOWETT, M. & QUASTEL, J. H.: Studies in fat metabolism. II. The oxidation of normal saturated fatty acids in the presence of liver slices. *Biochem. J.*, **29**: 2159, 1935.
- 229 — JORTSHUK, JR., P., SEKUZU, I., GREEN, D. E.: The interaction of the D (—)  $\beta$ -hydroxybutyric apoenzyme with lecithin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **6**: 76, 1961.
- 230 — KALNITSKY, G. & TAPLEY, D. F.: A sensitive method for estimation of oxaloacetate. *Biochem. J.*, **70**: 28, 1958.
- 231 — KAYE, R., DAVIDSON, M. H., WILLIAMS, M. L., KUMAGAI, M. & PICOU, D. M.: The response of blood glucose, ketones, and plasma nonesterified fatty acids to fasting and epinephrine injection in infants and children. *J. Pediatrics*, **59**: 836, 1961.
- 232 — KEECH, D. B. & UTTER, M. F.: Pyruvate carboxylase. II. Properties. *J. biol. Chem.* **238**: 2609, 1963.
- 233 — KELLER, D. M. & LOTSPEICH, W. D.: Some effects of phlorizin on the metabolism of mitochondria. *J. biol. Chem.*, **234**: 987, 1959.
- 234 — KELLER, D. M. & LOTSPEICH, W. D.: Effect of phlorizin on the osmotic behavior of mitochondria in isotonic sucrose. *J. biol. Chem.*, **234**: 991, 1959.
- 235 — KELLER, D. M. & LOTSPEICH, W. D.: Phlorizin inhibition of the insulin expansion of the galactose space in the eviscerate rat. *J. biol. Chem.*, **234**: 995, 1959.
- 236 — KENNEDY, B. L. & ELLIS, S.: Dissociation of catecholamine-induced calorogenesis from lipolysis and glycogenolysis in intact animals. *J. Pharmac. exp. Ther.*, **168**: 137, 1969.
- 237 — KENNEDY, B. L. & ELLIS, S.: Interactions of sympathomimetic amines and adrenergic blocking agents at receptor sites mediating lipolysis in the rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **130**: 1223, 1969.
- 238 — KESTENS, P. J.: La perfusion du foie isolé. Editions Arscia S. A. Bruxelles. 1964.
- 239 — KING, E. J.: Microanálisis Bioquímicos en Medicina. Pág. 16. Editorial Científico-Médica. Barcelona. 1948.
- 240 — KIRSTEN, E., KIRSTEN, R., HOHORST, H. J. & BÜCHER, T.: Free amino acids in alloxan diabetic rat livers. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **4**: 169, 1961.
- 241 — KNOOP, F.: Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. *Beitr. Z. Chem. Phys. Path.*, **6**: 150, 1904.
- 242 — KOEPPE, R. E., MOURKIDES, G. A. & HILL, R. J.: Some factors affecting routes of pyruvate metabolism in rats. *J. biol. Chem.*, **234**: 2219, 1959.
- 243 — KORANYI, A. & SZENT-GYÖRGYI, A.: Über die Bernsteinsäurebehandlung diabetischer Azidose. *Dtsch. med. Wchnschr.*, **63**: 1029, 1937.

- 244 — KORNACKER, M. S. & LOWENSTEIN, J. M.: Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. The activities of citrate-cleavage enzyme and acetate thiokinase in livers of starved and re-fed rats. *Biochem. J.*, **94**: 209, 1965.
- 245 — KORNBERG, H. L.: Anaplerotic sequences and their role in metabolism. *Essays Biochemistry*, **2**: 1, 1966.
- 246 — KORNBERG, H. L.: H. A. Krebs: a pathway in metabolism. *Biochemical Society Symposia*, **27**: 3, 1968.
- 247 — KRAHL, M. E.: The action of insulin on cells. Academic Press. New York, 1961.
- 248 — KREBS, H. A.: The intermediary stages in the biological oxidation of carbohydrate. *Adv. Enzymol.*, **3**: 191, 1943.
- 249 — KREBS, H. A.: Aspects biochimiques de l'accumulation des corps cétoniques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **41**: 1573, 1959.
- 250 — KREBS, H. A.: The physiological role of the ketone bodies. *Biochem. J.*, **80**: 225, 1961.
- 251 — KREBS, H. A.: The biochemical lesion in ketosis. *Archs. intern. Med.*, **107**: 119, 1961.
- 252 — KREBS, H. A.: Gluconeogenesis. *Proc. R. Soc. B.*, **159**: 545, 1964.
- 253 — KREBS, H. A.: La gluconéogénèse. *Exposés annuels de Biochimie Médicale*, **26**: 13, 1965.
- 254 — KREBS, H. A.: The regulation of the release of ketone bodies by the liver. *Lecture held during the Eighth Latin Biochemical Meeting*, Lisbon, September, 1965.
- 255 — KREBS, H. A.: Some aspects of gluconeogenesis (the relations between gluconeogenesis and ketogenesis). In «Energy Metabolism — Proceeding of the 3rd Symposium». Ed. por K. L. Blaxter. Pág. 1. Academic Press. London. 1965.
- 256 — KREBS, H. A.: The regulation of the release of ketone bodies by the liver. *Adv. Enz. Reg.*, **4**: 339, 1966.
- 257 — KREBS, H. A.: Bovine ketosis. *Veterinary Record*, **78**: 187, 1966.
- 258 — KREBS, H. A.: Mitochondrial generation of reducing power. In «Biochemistry of Mitochondria». Ed. por E. C. Slater, Z. Kaniuga & L. Wojtczak. Pág. 105. Academic Press, London and New York, e PWN — Polish Scientific Publishers, Warszawa. Warszawa. 1967.
- 259 — KREBS, H. A.: Formation of ketone bodies in the perfused rat liver. 3. Konferenz der Gesellschaft für Biologische Chemie vom 27-29 April 1967 in Oestrich/Rheingau. Pág. 129.
- 260 — KREBS, H. A.: Rate control of the tricarboxylic acid cycle. *Adv. Enz. Reg.*, **8**: 335, 1970.
- 261 — KREBS, H. A., BENNETT, D. A. H., GASQUET, P., GASCOYNE, T. & YOSHIDA, T.: Renal gluconeogenesis. The effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat-kidney-cortex slices. *Biochem. J.*, **86**: 22, 1963.
- 262 — KREBS, H. A., DIERKS, C. & GASCOYNE, T.: Carbohydrate synthesis from lactate in pigeon-liver homogenate. *Biochem. J.*, **93**: 112, 1964.
- 263 — KREBS, H. A. & EGGLESTON, L. V.: Metabolism of acetoacetate in animal tissues. 1. *Biochem. J.*, **39**: 408, 1945.
- 264 — KREBS, H. A. & EGGLESTON, L. V.: The effect of dinitrophenol and amytal on the reduction of acetoacetate in the presence of succinate. *Biochem. J.*, **82**: 134, 1962.

- 265 — KREBS, H. A., EGGLESTON, L. V. & D'ALLESSANDRO, A.: The effect of succinate and amytal on the reduction of acetoacetate in animal tissues. *Biochem. J.*, **79**: 537, 1961.
- 266 — KREBS, H. A., GASCOYNE, T. & NOTTON, B. M.: Generation of extramitochondrial reducing power in gluconeogenesis. *Biochem. J.*, **102**: 275, 1967.
- 267 — KREBS, H. A., HEMS, R. & GASCOYNE, T.: Renal gluconeogenesis. IV. Gluconeogenesis from substrate combinations. *Acta biol. Med. Germ.*, **11**: 607, 1963.
- 268 — KREBS, H. A., MELLANBY, J. & WILLIAMSON, D. H.: The equilibrium constante of the  $\beta$ -hydroxybutyric-dehydrogenase system. *Biochem. J.*, **82**: 96, 1962.
- 269 — KREBS, H. A., NOTTON, B. M. & HEMS, R.: Gluconeogenesis in mouse-liver slices. *Biochem. J.*, **101**: 607, 1966.
- 270 — KREBS, H. A., SPEAKE, R. N. & HEMS, R.: Acceleration of renal gluconeogenesis by ketone bodies and fatty acids. *Biochem. J.*, **94**: 712, 1965.
- 271 — KREBS, H. A., WALLACE, P. G., HEMS, R. & FREEDLAND, R. A.: Rates of ketone-body formation in the perfused rat liver. *Biochem. J.*, **112**: 595, 1969.
- 272 — KREBS, H. A. & YOSHIDA, T.: Muscular exercise and gluconeogenesis. *Biochem. Z.*, **338**: 241, 1963.
- 273 — KREUTNER, W. & GOLDBERG, N. D.: Dependence on insulin of the apparent hydrocortisone activation of hepatic glycogen synthetase. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, **58**: 1515, 1967.
- 274 — KRONFELD, D. S.: Ruminant ketosis: a speculative approach. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **104**: 799, 1963.
- 275 — KRONFELD, D. S.: Excessive gluconeogenesis and oxaloacetate depletion in bovine ketosis. *Nutrition Reviews*, **27**: 131, 1969.
- 276 — KRONFELD, D. S. & KLEIBER, M.: Mammary ketogenesis in the cow. *J. appl. Physiol.*, **14**: 1033, 1959.
- 277 — KRONFELD, D. S. & RAGGI, F.: Glucose kinetics in normal, fasting, and insulin-treated cows. *Amer. J. Physiol.*, **206**: 109, 1964.
- 278 — KRONFELD, D. S., TOMBROPOULOS, E. G. & KLEIBER, M.: Glucose biokinetics in normal and ketotic cows. *J. appl. Physiol.*, **14**: 1029, 1959.
- 279 — KUFF, E. L.: The distribution of fumarase activity in mouse liver homogenates. *J. biol. Chem.*, **207**: 361, 1954.
- 280 — KULKA, R. G., KREBS, H. A. & EGGLESTON, L. V.: The reduction of acetoacetate to  $\beta$ -hydroxybutyrate in animal tissues. *Biochem. J.*, **78**: 95, 1961.
- 281 — KULZ, E.: Ueber eine neue linksdrehende Säure (Pseudo oxybuttersäure). Ein Beitrag zur Kenntniss der Zuckerruhr. *Z. Biol.*, **20**: 165, 1884.
- 282 — LANGDON, R. G.: Hormonal regulation of fatty acid metabolism. In «Lipid Metabolism». Pág. 238. Ed. por K. Bloch. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1960.
- 283 — LARDY, H. A.: Gluconeogenesis: pathways and hormonal regulation. *Harvey Lectures*, **60**: 261, 1965.
- 284 — LARDY, H. A.: In «The energy level and metabolic control in mitochondria». Pág. 434. Ed. por S. Papa, J. M. Tager, E. Quagliariello e E. C. Slater. Adriatica Editrice. Bari. 1969.

- 285 — LARDY, H. A., FOSTER, D. O., SHRAGO, E. & RAY, P. D.: Metabolic and hormonal regulation of phosphopyruvate synthesis. *Adv. Enz. Reg.*, **2**: 49, 1964.
- 286 — LARDY, H. A., PAETKAU, V. & WALTER, P.: Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. The role of mitochondria in supplying precursors of phosphoenolpyruvate. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**: 1410, 1965.
- 287 — LAURELL, S.: Plasma free fatty acids in diabetic acidosis and starvation. *Scandinav. J. clin. lab. Investigation*, **8**: 81, 1956.
- 288 — LAWRENCE, R. D.: Diabetic ketosis and succinic acid. *Lancet* **II**: 286, 1937.
- 289 — LEHNINGER, A. L.: On the activation of fatty acid oxidation. *J. biol. Chem.*, **161**: 437, 1945.
- 290 — LEHNINGER, A. L.: A quantitative study of the products of fatty acid oxidation in liver suspensions. *J. biol. Chem.*, **164**: 291, 1946.
- 291 — LEHNINGER, A. L.: Colorimetric determination of acetoacetate. *Methods in Enzymology*, **3**: 283, 1957.
- 292 — LEHNINGER, A. L.: The transfer of energy in oxidative phosphorylation. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **46**: 1555, 1964.
- 293 — LEHNINGER, A. L.: The Mitochondrion. 2nd Printing. W. A. Benjamin, Inc. New York. 1965.
- 294 — LEHNINGER, A. L. & GREVILLE, G. D.: The enzymic oxidation of d- and l- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Biochim. biophys. Acta*, **12**: 188, 1953.
- 295 — LEHNINGER, A. L. & KENNEDY, E. P.: Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J. biol. Chem.*, **179**: 957, 1949.
- 296 — LEHNINGER, A. L., SUDDUTH, H. C. & WISE, J. B.: D- $\beta$ -hydroxybutyric dehydrogenase of mitochondria. *J. biol. Chem.*, **235**: 2450, 1960.
- 297 — LEONARD, R. H.: Quantitative range of Nessler's reaction with ammonia. *Clin. Chem.*, **9**: 417, 1963.
- 298 — LEVEILLE, G. A. & HANSON, R. W.: Adaptive changes in enzyme activity and metabolic pathways in adipose tissue from meal-fed rats. *J. Lipid Res.*, **7**: 46, 1966.
- 299 — LI, C. C.: Population Genetics. The University of Chicago Press. Chicago. 1955.
- 300 — LINDSAY, D. B. & BROWN, R. E.: Acetone metabolism in sheep. *Biochem. J.*, **100**: 589, 1966.
- 301 — LOFTFIELD, R. & HARRIS, A.: Participation of free amino acids in protein synthesis. *J. biol. Chem.*, **219**: 151, 1956.
- 302 — LONG, C. N. H. & LUKENS, F. D. W.: The effects of adrenalectomy and hypophysectomy upon experimental diabetes in the rat. *J. exp. Med.*, **63**: 465, 1936.
- 303 — DELUCA, H. F. & COHEN, P. P.: Methods for preparation and study of tissues and enzymes. In «Manometric Techniques». 4th ed. Ed. por W. W. Umbreit, R. H. Burris e J. F. Stauffer. Pág. 114. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minesota. 1964.
- 304 — LYNEN, F.: Functional group of coenzyme A and its metabolic relations, especially in the fatty acid cycle. *Fed. Proc.*, **12**: 683, 1953.
- 298 305 — LYNEN, F.: Lipide metabolism. *An. Rev. Biochem.*, **24**: 653, 1955.

- 306 — LYNEN, F.: Biosynthesis of saturated fatty acids. *Fed Proc.*, **20**: 941, 1961.
- 307 — LYNEN, F., HENNING, U., BUBLITZ, C., SÖRBO, B. & KRÖPLIN-RUEFF, L.: Der chemische Mechanismus der Acetessigsäurebildung in der Leber. *Biochem. Z.*, **330**: 269, 1958.
- 308 — LYNEN, F., MATSUHASHI, M., NUMA, S. & SCHWEIZER, E.: The cellular control of fatty acid synthesis at the enzymatic level. *Biochemical Society Symposia*, **24**: 43, 1963.
- 309 — LYNEN, F. & OCHOA, S.: Enzymes of fatty acid metabolism. *Biochim. biophys. Acta*, **12**: 299, 1953.
- 310 — MACKAY, E. M.: The significance of ketosis. *J. clin. Endocrinology*, **3**: 101, 1943.
- 311 — MACKAY, E. M., BARNES, R. H., CARNE, H. C. & WICK, A. N.: Ketogenic activity of acetic acid. *J. biol. Chem.*, **135**: 157, 1940.
- 312 — MACKAY, E. M., SHERRILL, J.W. & BARNES, R. H.: The antiketogenic activity of succinic acid. *J. clin. Invest.*, **18**: 301, 1939.
- 313 — MADISON, L. L., MEBANE, D. & LOCHNER, A.: Evidence for a stimulatory feedback of ketone acids on pancreatic beta cells. *J. clin. Invest.*, **42**: 955, 1963.
- 314 — MADISON, L. L., MEBANE, D., UNGER, R. H. & LOCHNER, A.: The hypoglycemic action of ketone on the pancreatic beta cells. *J. clin. Invest.*, **43**: 408, 1964.
- 315 — MADISON, L. L., MEBANE, D., UNGER, R. & LOCHNER, A.: Evidence for and physiologic significance of a stimulatory feedback of ketone bodies on the B-cells. In «The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets» Ed. por S. E. Brolin, B. Hellman & H. Knutson. Pág. 457. Pergamon Press. Oxford. 1964.
- 316 — MAGNUS-LEVY, A.: Die Oxybuttersäure und ihre Beziehung zum Coma diabeticum. *Arch. exper. Path. Pharmacol.*, **42**: 149, 1899.
- 317 — MAGNUS-LEVY, A.: Untersuchungen über die Acidosis im Diabetes melitus und die Säureintoxication in Coma diabeticum. *Arch. exper. Path. Pharmacol.*, **45**: 389, 1901.
- 318 — MAHLER, H. R. & CORDES, E. H.: Biological Chemistry. Harper & Row, New York, & John Weatherhill, Inc., Tokio. Tokio. 1966.
- 319 — MAICKEL, R. P. & YAMADA, K.: Dynamic biochemical processes involved in the production of a fatty liver. *Adv. Enz. Reg.*, **1**: 235, 1963.
- 320 — MARTIN, H. E., WICK, A. N.: Quantitative relationships between blood and urine ketone levels in diabetic ketosis. *J. clin. Invest.*, **22**: 235, 1943.
- 321 — MATSCHINSKY, F. & WIELAWD, O. 1961. Não publicado. Ver 560.
- 322 — MAYES, P. A.: Absence of a relation between lipogenesis *in vivo*. *Nature*, **183**: 540, 1959.
- 323 — MAYES, P. A.: A calorie deficiency hypothesis of ketogenesis. *Metabolism*, **11**: 781, 1962.
- 324 — MAYES, P. A. & FELTS, J. M.: Determination of <sup>14</sup>C-labelled ketone bodies by liquid-scintillation counting. *Biochem. J.*, **102**: 230, 1967.
- 325 — MAYES, P. A. & FELTS, J. M.: Regulation of fat metabolism in the liver. *Nature*, **215**: 716, 1967.
- 326 — MAYES, P. A. & ROBSON, W.: The determination of ketone bodies. *Biochem. J.*, **67**: 11, 1957.
- 327 — MAYOR, F., VELOSO, D. & WILLIAMSON, D. H.: Effects of nicotinic acid on the acetoacetate and 3-hydroxybutyrate concentrations of rat blood and liver. *Biochem. J.*, **104**: 57 P, 1967.

- 328 — McCANN, W. P.: The oxidation of ketone bodies by mitochondria from liver and peripheral tissues. *J. biol. Chem.*, **226**: 15, 1957.
- 329 — McCARTHY, R. D.: Bovine ketosis. *Nutrition Reviews*, **27**: 31, 1969.
- 330 — McCARTHY, R. D., CHANDLER, P. T., GRIEL, JR., L. C. & PORTER, G. A.: Fatty acid composition of blood serum lipoproteins from normal and ketotic cows. *J. Dairy Sci.*, **51**: 392, 1968.
- 331 — McCARTHY, R. D., PORTER, G. A. & GRIEL, JR., L. C.: Bovine ketosis and depressed fat test in milk: a problem of methionine metabolism and serum lipoprotein aberration. *J. Dairy Sci.*, **51**: 459, 1968.
- 332 — McELROY, JR., W. T., SIEFERT, W. L. & SPITZER, J. J.: Relationship of hepatic uptake of free fatty acids to plasma concentration. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **104**: 20, 1960.
- 333 — McLENNAN, H.: Synaptic Transmission. 2nd ed.. W. B. Saunders Company. Philadelphia. 1970.
- 334 — MEBANE, D. & MADISON, L. L.: Hypoglycemic action of ketones. I. Effects of ketones on hepatic glucose output and peripheral glucose utilization. *J. Lab. clin. Med.*, **63**: 177, 1964.
- 335 — MELLANBY, J. & WILLIAMSON, D. H.: The effect of calcium ions on ketone-body production by rat-liver slices. *Biochem. J.*, **88**: 440, 1963.
- 336 — MELLANBY, J. & WILLIAMSON, D. H.: Acetoacetate. In «Methods of Enzymatic Analysis». Ed. por H.-U. Bergmeyer. 2nd Printing. Pág. 454. Academic Press. New York 1965.
- 337 — MEYER, F.: Étude sur le mode d'action des biguanides hypoglycémiantes. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, **251**: 1928, 1960.
- 338 — MEYER, F.: A propos du mode d'action hypoglycémiante de certains dérivés guanidiques. *Réunion commune de la Biochemical Society et de la Société de Chimie Biologique du 27 Mai 1960 (separata)*.
- 339 — MEYER, F., IPAKTCHI, M. & CLAUSER, H.: Données nouvelles sur le mécanisme d'action des biguanides hypoglycémiantes. *Journées Annuelles de Diabétologie de l'Hôtel-Dieu*. 8.<sup>e</sup> année. Pág. 341. Éditions Médicales Flammarion. Paris. 1967.
- 340 — MEYER, V. — Ber. dtsch. Chem. Ges., **10**: 2075, 1877. Ver 544.
- 341 — MICHAELS, G. D., MARGEN, S., LIEBERT, G. & KINSELL, L.W.: Studies in fat metabolism. I. The colorimetric determination of ketone bodies in biological fluids. *J. clin. Invest.*, **30**: 1483, 1951.
- 342 — MILHEIRO, E.: O papel do rim na acidose. *Portugal Médico*, **12**: (ano 20): 323, 1982.
- 343 — MINKOWSKI, O.: Untersuchungen ueber den Diabetes melitus nach Pancreas-extirpation. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **31**: 85, 1893.
- 344 — MITCHELL, P.: Metabolic flow in the mitochondrial multiphase system: an appraisal of the chemi-osmotic theory of oxidative phosphorylation. In «Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria». Pág. 65. Ed. por J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello & E. C. Slater. B. B. A. Library. Vol. 7. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966.
- 345 — MITCHELL, P.: The chemical and electrical components of the electrochemical potential of H<sup>+</sup> ions across the mitochondrial cristae membrane. In «Mitochondria — Structure and Function». FEBS Symposium. Vol. 17. Pág. 219. Ed. por L. Ernster & Z. Drahota. Academic Press. London. 1969.

- 346 — MORA, J., MARTUSCELLI, J., ORTIZ-PINEDA, J. & SOBERÓN, G.: The regulation of urea-biosynthesis enzymes in vertebrates. *Biochem. J.*, **96**: 28, 1965.
- 347 — MORTIMORE, G. E.: Effect of insulin on release of glucose and urea by isolated rat liver. *Amer. J. Physiol.*, **204**: 699, 1963.
- 348 — MOURKIDES, G. A., HOBBS, D. C. & KOEPE, R. E.: The metabolism of acetone-2-C<sup>14</sup> by intact rats. *J. biol. Chem.*, **234**: 27, 1959.
- 349 — MUNK, A.: The effects of hormones at the cellular level. In «Recent Advances in Endocrinology». 8th ed. Ed. by U. H. T. James. J. & A. Churchill Ltd. Pág. 139. London, 1968.
- 350 — MUNRO, H. N.: Carbohydrate and fat as factors in protein utilization and metabolism. *Physiol. Rev.*, **31**: 449, 1951.
- 351 — NATH, M. C., BRAHMACHARI, H. D. & GOPALKRISHNA, A.: Pancreatic changes after injection of intermediary fat metabolites. *Science*, **112**: 92, 1950.
- 352 — NAUNYN, B.: Der Diabetes melitus. In «Specielle Pathologie und Therapie». Ed. H. Nothnagel., Pág. 1. Hölder. Wien. 1900.
- 353 — NELSON, E., GRAYMAN, I. & MIRSKY, I. A.: The utilization of acetone bodies. III. The influence of adrenalectomy. *J. biol. Chem.*, **132**: 711, 1940.
- 354 — NELSON, N., GRAYMAN, I. & MIRSKY, I. A.: The utilization of acetone bodies. IV. The relation between concentration and the rate of beta-hydroxybutyric acid utilization by the rat. *J. biol. Chem.*, **140**: 361, 1941.
- 355 — NEPTUNE, JR., E. M., SUDDUTH, H. C., FASH, F. J. & FOREMAN, D. R.: Quantitative participation of fatty acid and glucose substrates in oxidative metabolism of excised rat diaphragm. *Amer. J. Physiol.*, **196**: 269, 1959.
- 356 — NEPTUNE, JR., E. M., SUDDUTH, H. C., FASH, F. J., REISH, JR., J. J.: Metabolism of  $\beta$ -hydroxybutyrate and acetoacetate by excised rat diaphragm and diaphragm homogenate. *Amer. J. Physiol.*, **201**: 235, 1961.
- 357 — NEUFELD, E. F. & GINSBURG, V.: Carbohydrate metabolism. *An. Rev. Biochem.*, **34**: 297, 1965.
- 358 — NEWSHOLME, E. A. & GEVERS, W.: Control of glycolysis and gluconeogenesis in liver and kidney cortex. *Vitamins and Hormones*, **25**: 1. 1967.
- 359 — NORDLIE, R. C. & LARDY, H. A.: Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *J. biol. Chem.*, **238**: 2259, 1963.
- 360 — NUTRITION REVIEWS: Gluconeogenesis and bovine ketosis. *Nutrition Reviews*, **26**: 313, 1968.
- 361 — NUTRITION REVIEWS: Strain differences in enzyme activities in rats. *Nutrition Reviews*, **28**: 111, 1970.
- 362 — NUTRITION REVIEWS: Oxidation of unsaturated fatty acids. *Nutrition Reviews*, **28**: 165, 1970.
- 363 — NYHAN, W. L., BORDEN, M. & CHILDS, B.: Idiopathic hyperglycinemia: a new disorder of amino acid metabolism. II. The concentrations of other amino acids in the plasma and their modification by the administration of leucine. *Pediatrics*, **27**: 539, 1961.
- 364 — NYHAN, W. L., CHISOLM, JR., J. J. & EDWARDS, JR., R. O.: Idiopathic hyperglycinuria. III. Report of a second case. *J. Pediatrics*, **62**: 540, 1963.



- 365 — NYHAN, W. L. & TOCCI, P.: Amino aciduria. *An. Rev. Med.*, **17**: 133, 1966.
- 366 — OASTLER, E. G. & ANDERSON, A. B.: Ketosis in the hypophysectomized rat. *Biochem. J.*, **33**: 1094, 1939.
- 367 — OLSON, G. F.: Optimal conditions for the enzymatic determination of L-lactic acid. *Clin. Chem.*, **8**: 1, 1962.
- 368 — ONTKO, J. A.: On the biochemical etiology of ketosis. *Life Sci.*, **3**: 573, 1964.
- 369 — ONTKO, J. A. & JACKSON, D.: Factors affecting the rate of oxidation of fatty acids in animal tissues. Effect of substrate concentration, pH, and coenzyme A in rat liver preparations. *J. biol. Chem.*, **239**: 3674, 1964.
- 370 — ONTKO, J. A. & ZILVERSMIT, D. B.: Correlation between concentrations of circulating free fatty acids and ketone bodies. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **121**: 319, 1966.
- 371 — OPPENSHAW, H. & BORTZ, W. M.: Oxidation of glucose, acetoacetate, and palmitate in brain mince of normal and ketotic rats. *Diabetes*, **17**: 90, 1968.
- 372 — ORTEGA Y GASSET, J.: Prólogo para Franceses. In «La Rebelión de las masas». 13.<sup>a</sup> ed. Colección Austral. Pág. 11. Espasa-Calpe, S. A. Madrid. 1956.
- 373 — PALEOLOGOS, G. E., MUNTWYLER, E. & KESNER, L.: Free amino acids of rat tissues under altered conditions of gluconeogenesis. *Fed. Proc.*, **27**: 763, 1968.
- 374 — PANDE, S. V. & MEAD, J. F.: Inhibition of enzyme activities by free fatty acids. *J. biol. Chem.*, **243**: 6180, 1968.
- 375 — PASSMORE, R. & JOHNSON, R. E.: The modification of post-exercise ketosis (the Courtice-Douglas effect) by environmental temperature and water balance. *Quart. J. exp. Physiol.* **43**: 352, 1968.
- 376 — PAYNE, E. & MORRIS, J. C.: The effect of protein content of the diet on rate of urea formation in sheep liver. *Biochem. J.*, **113**: 659, 1969.
- 377 — PEETERS, G. & LAURYSSENS, M.: Biosynthesis of milk lipids. In «Metabolism and Physiological Significance of Lipids». Pág. 351. Ed. por R. M. C. Dawson & D. N. Rhodes. John Wiley & Sons Ltd. London. 1964.
- 378 — PENNER, P. E. & COHEN, L. H.: Effects of adenosine triphosphate and magnesium ions on the fumarase reaction. *J. biol. Chem.*, **244**: 1070, 1969.
- 379 — PETERS, J. P. & VAN SLYKE, D. D.: Quantitative Clinical Chemistry. Vol. I. Interpretations. Baillière, Tindall & Cox. London. 1932.
- 380 — PETERS, J. P. & VAN SLYKE, D. D.: Quantitative Clinical Chemistry. Interpretations. Vol. I. 2nd ed.. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. 1946.
- 381 — PETTERS, W.: Untersuchungen über die Honigharnruhr. *Vrtljschr. prakt. Heilk.*, **14**: 81, 1857.
- 382 — PFLEIDERER, G.: Glycogen. In «Methods of Enzymatic Analysis». Ed. por H.-U. Bergmeyer. 2nd Printing. Pág. 59. Academic Press. New York. 1965.
- 383 — PLATÃO — Tradução da Prof.<sup>a</sup> Doutora D. Maria Helena da Rocha Pereira.
- 384 — PLATON: Mènon. In «Oeuvres complètes». Tome III. 2.<sup>e</sup> Partie. Pág. 86-a. Collection des Universités de France. Texte établi et traduit par Alfred Croiset. 5.<sup>e</sup> éd.. Paris. 1945.
- 385 — PLAUT, G. W. E. & LARDY, H. A.: Incorporation of the carbons of acetone, formate, and carbonate into acetoacetato. *J. biol. Chem.*, **186**: 705, 1950.

- 386 — POINCARÉ, H.: El valor de la Ciencia. Trad. espanhola. Colección Austral. N.º 628. 2.ª ed. Pág. 13. Buenos Aires. 1947.
- 387 — POLONOVSKI, M., VALDIGUIÉ, P. & TEYCHENNÉ, J.: Métabolisme de l'acétone dans la glande surrénale et ses extraits. I. Réactions non enzymatiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**: 461, 1951.
- 388 — POLONOVSKI, M., VALDIGUIÉ, P. & TEYCHENNÉ, J.: Métabolisme de l'acétone dans la glande surrénale et ses extraits. II. Les processus enzymatiques oxydatifs. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**: 475, 1951.
- 389 — POLONOVSKI, M., VALDIGUIÉ, P. & TEYCHENNÉ, J.: Métabolisme de l'acétone dans la glande surrénale et ses extraits. III. Formation d'acide citrique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**: 725, 1951.
- 390 — POLONOVSKI, M., VALDIGUIÉ, P. & TEYCHENNÉ, J.: Métabolisme de l'acétone dans la glande surrénale et ses extraits. IV. Transformation anabolique en acides céto-carboxyliques et tricarboxyliques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**: 743, 1951.
- 391 — PONTREMOLI, S. & GRAZI, E.: Gluconeogenesis. In «Carbohydrate Metabolism and its Disorders». Ed. por F. Dickens, P. J. Randle & W. J. Whelan. Pág. 259. Academic Press. London. 1968.
- 392 — PRESSMAN, B. C. & LARDY, H. A.: Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria. *Biochem. biophys. Acta*, **21**: 458, 1956.
- 393 — PRESSMAN, B. C. & LARDY, H. A.: Influence of potassium and other alkali cations on respiration of mitochondria. *J. biol. Chem.*, **197**: 547, 1952.
- 394 — PRICE, T. D. & RITTENBERG, D.: The metabolism of acetone. I. Gross aspects of catabolism and excretion. *J. biol. Chem.*, **185**: 449, 1950.
- 395 — PROCOS, J.: Modification of the spectrophotometric determination of ketone bodies in blood enabling the total recovery of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Clin. Chem.*, **7**: 97, 1961.
- 396 — R.-CANDELA, J. L., R.-CANDELA, R., MARTIN-HERNANDEZ, D. & CASTILLA-CORTAZAR, T.:  $\beta$ -hydroxybutyrate and sodium citrate as stimuli of the *in vitro* secretion of insulin. *Nature*, **195**: 711, 1962.
- 397 — R.-CANDELA, R. & R.-CANDELA, J. L.: Possible factor produced during muscular contraction which influences the passage of glucose. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **110**: 803, 1962.
- 398 — RAABO, E. & TERKILDSEN, T. C.: On the enzymatic determination of blood glucose. *Scandinav. J. clin. lab. Invest.*, **12**: 402, 1960.
- 399 — RACKER, E.: Mechanisms in Bioenergetics. Pág. 101. Academic Press. New York. 1965.
- 400 — RACKER, E.: Function and structure of the inner membrane of mitochondria and chloroplasts. In «Membranes of Mitochondria and Chloroplasts». Ed. por E. Racker. ACS Monograph 165. Van Nostrand Reinhold Company. New York. 1970.
- 401 — RANDLE, P. J., GARLAND, P. B., HALES, C. N. & NEWSHOLME, E. A.: The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, **I**: 785, 1963.
- 402 — RANDLE, P. J., GARLAND, P. B., HALES, C. N., NEWSHOLME, E. A., DENTON, R. M. & POGSON, C. I.: Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **22**: 1, 1966.

- 403 — RATNER, S.: Urea synthesis and metabolism of arginine and citrulline. *Adv. Enzymol.*, **15**: 319, 1954.
- 404 — RECANI, L.: Diminished ketogenesis in liver injury. I. *J. Lab. clin. Med.*, **48**: 165, 1956.
- 405 — RECKNAGEL, R. O. & POTTER, V. R.: Mechanism of the ketogenic effect of ammonium chloride. *J. biol. Chem.*, **191**: 263, 1951.
- 406 — REED, L. J. & COX, D. J.: Macromolecular organization of enzyme systems. *An. Rev. Biochem.*, **35**: 57, 1966.
- 407 — REES, K. R.: Fatty liver induction by toxic agents. In «Metabolism and Physiological Significance of Lipids». Pág. 443. Ed. por R. M. C. Dawson & D. N. Rhodes. John Wiley & Sons Ltd. London. 1964.
- 408 — REID, R. L.: Studies on the carbohydrate metabolism of sheep. X. Further studies on hypoglycaemia and hyperketonaemia in undernourished pregnant ewes and in ewes with pregnancy toxæmia. *Australian J. Agr. Res.*, **11**: 346, 1960.
- 409 — RENOLD, A. E. & ASHMORE, J.: Metabolic effects of adrenal corticosteroids. In «Diabetes», Ed. por R. H. Williams. 3th Printing. Pág. 194. Hoeber Medical Division. Harper & Row Publishers. New York. 1965.
- 410 — RENOLD, A. E. & CAHILL, JR., G. F.: Diabetes mellitus. In «The Metabolic Basis of Inherited Disease». Ed. por J. B. Stanbury, J. B. Wingaarden & D. S. Fredrickson. 1st ed. Pág. 65. The Blakiston Division — Mc-Graw-Hill Company, Inc. New York. 1960.
- 411 — RENOLD, A. E. & CAHILL, JR., G. F.: Diabetes Mellitus. In «The Metabolic Basis of Inherited Disease». Ed. por J. B. Stanbury, J. B. Wingaarden & D. S. Fredrickson. 2nd ed. Pág. 98. The Blakiston Division — Mc-Graw-Hill Company, Inc.. New York. 1966.
- 412 — RIBEIRO, E., SOBRINHO-SIMÕES, M. & MESQUITA, A. M.: Sobre a repercussão metabólica do divertículo experimental do jejuno. *Cadernos Científicos*, **5**: 417, 1959.
- 413 — RICHTER, C. P.: On the phenomenon of sudden death in animals and man. *Psychosom. Med.*, **19**: 191, 1957.
- 414 — RIESER, P.: Insulin, membranes and metabolism. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. 1967.
- 415 — RIETTI, C. T.: Cetosis en la diabetes pancreática de los perros hipofisoprivos. *Act. Congr. int. Biol.*, Montevideo, 1930. *Arch. Soc. Biol.* Montevideo, 1931, Supp. 332.
- 416 — RIETTI, C. T.: Ketosis in the pancreatic and phlorhizin diabetes of hypophysectomized dogs. *J. Physiol., Lond.*, **77**: 92, 1932.
- 417 — ROSEN, F., ROBERTS, N. R. & NICHOL, C. A.: Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamic-pyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. *J. biol. Chem.*, **234**: 476, 1959.
- 418 — ROSENTHAL, S. M.: A colorimetric method for the estimation of acetoacetic acid in the blood. *J. biol. Chem.*, **179**: 1235, 1949.
- 419 — ROSENTHAL, O., GOTTLIEB, B., GORRY, J. D. & VARS, H. M.: Influence of cations on the intracellular distribution of rat liver arginase. *J. biol. Chem.*, **223**: 469, 1956.
- 420 — ROSS, B. D., HEMS, R. & KREBS, H. A.: The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. *Biochem. J.*, **102**: 942, 1967.

- 421 — ROSSI, A.: Azione *in vitro* del sangue sull'ac. acetacetico e  $\beta$ -ossibutirico. *Arch. Sci. Biol. (Bologna)*, **24**: 73, 1938.
- 422 — ROSSI, C. R., DRAHOTA, Z., ALEXANDRE, A. & SILIFRANDI, N.: On the presence of two acetoacetate thiokinases, GTP- and ATP-specific, in brown adipose tissue mitochondria. *Abstr. Nr. 215, VII th Meeting of the Fed. Europ. Biochem. Soc. Madrid. 1969.*
- 423 — ROTHSCHILD, M. A., ORATZ, M., MONGELLI, J. & SCHREIBER, S. S.: Effects of a short-term fast on albumin synthesis studied *in vivo*, in the perfused liver, and on amino acid incorporation by hepatic microsomes. *J. clin. Invest.*, **47**: 2591, 1968.
- 424 — ROTHSCHILD, M. A., ORATZ, M., MONGELLI, J. & SCHREIBER, S. S.: Albumin synthesis dependent on tryptophan and isoleucine. *J. clin. Invest.*, **48**: 70-a, 1969.
- 425 — ROUS, S. & FAVARGER, P.: Le rôle du jeûne dans la synthèse des acides gras. In «Jornadas Bioquímicas Latinas. Relatórios e comunicações científicas». Pág. 34. Lisboa. 1965.
- 426 — RUDNEY, H.: Propanediol phosphate as a possible intermediate in the metabolism of acetone. *J. biol. Chem.*, **210**: 361, 1954.
- 427 — RUDNEY, H. & FERGUSON, J. J.: The biosynthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl-glutaryl coenzyme A. *J. Amer. chem. Soc.*, **79**: 5680, 1957.
- 428 — RULL, J. A., CONN, J. W., FLOYD, JR., J. C. & FAJANS, S. S.: Levels of plasma insulin during cortisone glucose tolerance tests in «non diabetic» relatives of diabetic patients. Implications of diminished insulin secretory reserve in subclinical diabetes. *Diabetes*, **19**: 1, 1970.
- 429 — RUTMAN, J. Z., RUTMAN, R. J. & GEORGE, P.: The influence of metal ions on the *de novo* synthesis of glucose by rat kidney cortex slices. *Life Sci.*, **3**: 617, 1964.
- 430 — SACKS, J. & SMITH, G. F.: Effects of insulin and activity on pentose transport into muscle. *Amer. J. Physiol.*, **192**: 287, 1958.
- 431 — SAKAMI, W.: Formation of formate and labile methyl groups from acetone in the intact rat. *J. biol. Chem.*, **187**: 369, 1950.
- 432 — SAKAMI, W. & LAFAYE, J. M.: The metabolism of acetone in the intact rat. *J. biol. Chem.*, **193**: 199, 1951.
- 433 — SAMOLS, E. & MARKS, V.: Nouvelles conceptions sur la signification fonctionnelle du glucagon (pancréatique et extrapancréatique). *Journées Annuelles de Diabétologie de L'Hôtel-Dieu. 8.<sup>e</sup> année. Pág. 43. Editions Médicales Flammarion. Paris. 1967.*
- 434 — SANBAR, S. S. & MARTIN, J. M.: Stimulation by octanoate of insulin release from isolated rat pancreas. *Metabolism*, **16**: 482, 1967.
- 435 — SANDERS, C. A., LEVINSON, G. E., ABELMAN, W. M. & FREINKEL, W.: Effect of exercise on the peripheral utilization of glucose in man. *New Eng. J. Med.*, **271**: 220, 1964.
- 436 — SAUER, F. & ERFLE, J. D.: On the mechanism of acetoacetate synthesis by Guinea pig liver fractions. *J. biol. Chem.*, **241**: 30, 1966.
- 437 — SCHIMKE, R. T.: Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. biol. Chem.*, **237**: 459, 1962.
- 438 — SCHIMKE, R. T.: Differential effects of fasting and protein-free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. biol. Chem.*, **237**: 1921, 1962.

- 439 — SCHIMKE, R. T.: Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. biol. Chem.*, **238**: 1012, 1963.
- 440 — SCHOLZ, R. & BÜCHER, T.: Hemoglobin-free perfusion of rat liver. In «Control of Energy Metabolism» Ed. por B. Chance, R.W. Estabrook & J. R. Williamson. Pág. 393. Academic Press. New York. 1965.
- 441 — SCHWAB, L. & LOTSPEICH, W. D.: Renal tubular reabsorption of acetoacetate in the dog. *Amer. J. Physiol.*, **176**: 195, 1954.
- 442 — SCOTT, J. L. & ENGEL, F. L.: The influence of the adrenal cortex and cold stress on fasting ketosis in the rat. *Endocrinology*, **53**: 410, 1953.
- 443 — SCOW, R. O.: «Total» pancreatectomy in the rat: operation, effect, and posoperative care. *Endocrinology*, **60**: 359, 1957.
- 444 — SCOW, R. O. & CHERNICK, S. S.: Hormonal control of protein and fat metabolism in the pancreatectomized rat. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **16**: 497, 1960.
- 445 — SCOW, R. O., CHERNICK, S. S. & GUARCO, B. A.: Ketogenic action of cortisone in the diabetic rat. *Fed. Proc.*, **17**: 144, 1958.
- 446 — SCOW, R. O., CHERNICK, S. S. & GUARCO, B. A.: Ketogenic action of pituitary and adrenal hormones in pancreatectomized rats. *Diabetes*, **8**: 132, 1959.
- 447 — SCRUTTON, M. C. & UTTER, M. F.: Pyruvate carboxylase. V. Interaction of the enzyme with adenosine triphosphate. *J. biol. Chem.*, **240**: 3714, 1965.
- 448 — SCRUTTON, M. C. & UTTER, M. F.: The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *An. Rev. Biochem.*, **37**: 249, 1968.
- 449 — SEGAL, H. L. & MENON, G. K. K.: Evidence for the formation of acetoacetate by direct deacylation of acetoacetyl CoA in liver mitochondria. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **3**: 406, 1960.
- 450 — SEGAL, H. L. & MENON, G. K. K.: Acetoacetate formation from acetoacetyl coenzyme A in rat liver mitochondria. Effects of endocrine state and nature of the system. *J. biol. Chem.*, **236**: 2872, 1961.
- 451 — SEGAL, S., BLAIR, A. E. & WYNGAARDEN, J. B.: An enzymatic spectrophotometric method for the determination of pyruvic acid in blood. *J. Lab. clin. Med.*, **48**: 137, 1956.
- 452 — SEIFERT, P.: Quantitative Bestimmung der Ketonkörper in 0,2 ccm Blut. *Klin. Wschr.*, **26**: 471, 1948.
- 453 — SENIOR, B. & LORIDAN, L.: Direct regulatory effect of ketones on lipolysis and on glucose concentrations in man. *Nature*, **219**: 83, 1968.
- 454 — SERRANO-RÍOS, M., RODRIGUEZ-MIÑÓN, J. L., RAMOS, F. & VIVANCO, F.: Studies in prediabetes. Fifth annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Montpellier, France, September 16-18, 1969. *Diabetologia*, **6**: 64, 1970.
- 455 — SHAFFER, P. A. & MARRIOTT, W. M. — *J. biol. Chem.*, **16**: 265, 1915. Ver 512.
- 456 — SHAFRIR, E., SUSSMAN, K. E. & STEINBERG, D.: Role of the pituitary and the adrenal in the mobilization of free fatty acids and lipoproteins. *J. Lipid Res.*, **1**: 459, 1960.
- 457 — SHAW, J. C.: Ketosis in dairy cattle. A review. *J. Dairy Sci.*, **39**: 402, 1956.
- 458 — SHAW, W. V. & TAPLEY, D. F.: Oxaloacetate in the livers of alloxan-diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**: 426, 1958.

- 459 — SHEPHERD, D. & GARLAND, P. B.: ATP controlled acetoacetate and citrate synthesis by rat liver mitochondria oxidizing palmitoyl-carnitine, and the inhibition of citrate synthase by ATP. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **22**: 89, 1966.
- 460 — SHEPHERD, D. A. L. & JEACOCK, M. K.: Insulin-like action of 3-hydroxybutyrate in the ewe. *Biochem. J.*, **113**: 15 P, 1969.
- 461 — SHEPHERD, J. A. & KALNITSKY, G.: Intracellular distribution of fumarase, aconitase, and isocitric dehydrogenase in rabbit cerebral cortex. *J. biol. Chem.*, **207**: 605, 1954.
- 462 — SHEPHERD, J. A., LI, Y.W., MASON, E. E. & ZIFFREN, S. E.: The distribution of aconitase and fumarase in homogenates of human liver. *J. biol. Chem.*, **213**: 405, 1955.
- 463 — SHIPLEY, R. A. & LONG, C. N. H.: Studies on the ketogenic activity of the anterior pituitary. II. A method for the assay of the ketogenic activity. *Biochem. J.*, **32**: 2242, 1938.
- 464 — SHOEMAKER, W. C.: Schock — Chemistry, Physiology and Therapy. Charles C. Thomas, Publisher. Springfield. Illinois. 1967.
- 465 — SHRAGO, E. & LARDY, H. A.: Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. II. Conversion of precursors to phosphoenolpyruvate in liver cytosol. *J. biol. Chem.*, **241**: 663, 1966.
- 466 — SHRAGO, E., LARDY, H. A., NORDLIE, R. C. & FOSTER, D. O.: Metabolic and hormonal control of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in rat liver. *J. biol. Chem.*, **238**: 3188, 1963.
- 467 — SHRAGO, E. & YOUNG, J.W.: The pathway and control of phosphoenolpyruvate (PEP) formation in rat liver. *Fed. Proc.*, **24**: 536, 1965.
- 468 — SINGH, I. & SRIVASTAVA, M. C.: Hyperglycemia, keto-acidosis and coma in a nondiabetic hyperthyroid patient. *Metabolism*, **17**: 893, 1968.
- 469 — SIPERSTEIN, M. D.: Inter-relationship of glucose and lipid metabolism. *Amer. J. Med.*, **26**: 685, 1959.
- 470 — SIPERSTEIN, M. D. & FAGAN, V. M.: Studies on the relationship between glucose oxidation and intermediary metabolism. II. The role of glucose oxidation in lipogenesis in diabetic rat liver *J. clin. Invest.*, **37**: 1196, 1958.
- 471 — SLATER, E. C.: Oxidative phosphorylation. In «Comprehensive Biochemistry». Vol. 14. Biological Oxidations. Ed. por M. Florkin & E. H. Stotz. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966.
- 472 — SLATER, E. C.: Mechanism of energy conservation in mitochondrial oxido-reductions. In «Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria». Pág. 166. Ed. por J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello & E. C. Slater. B. B. A. Library, Vol. 7. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. 1966.
- 473 — SLATER, E. C., QUAGLIARIELLO, E., PAPA, S. & TAGER, J. M.: In «The energy level and Metabolic Control in Mitochondria». Pág. 1. Ed. por S. Papa, S. M. Tager, E. Quagliariello e E. C. Slater. Adriatica Editrice. Bari. 1969.
- 474 — SOBERÓN, G. & SÁNCHEZ, E.: Changes in effective enzyme concentration in the growing rat liver. I. Effects of fasting followed by repletion. *J. biol. Chem.*, **236**: 1602, 1961.
- 475 — SOBRINHO-SIMÕES, M.: Da mobilização lipídica na diabetes aloxânica. Tese. Porto. 1951.
- 476 — SOBRINHO-SIMÕES, M. & HIPÓLITO-REIS, C.: Leucine-induced hyperglycemia in the goat. *Med. Pharmacol. exp.*, **17**: 397, 1967.

- 477 — SOBRINHO-SIMÕES, M., PINTO DE BARROS, J. & HIPÓLITO-REIS, C.: Tióis celulares e condições metabólicas. *Arq. Port. Bioq.*, **11**: 168, 1968.
- 478 — SÖLING, H. D.: Zur Autonomie des Ketonkörperstoffwechsels. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.*, **72**: 791, 1967.
- 479 — SÖLING, H. D., GARLEPP, H. J. & CREUTZFELDT, W.: Die Wirkung von Insulin und Glucose auf die Ketonkörperaufnahme total eviscerierter, normaler, hungernder und alloxandiabetischer Ratten. *Biochem. biophys. Acta*, **100**: 530, 1965.
- 480 — SÖLING, H. D., KATTERMANN, R., SCHMIDT, H. & KNEER, P.: The redox state of NAD<sup>+</sup>-NADH systems in rat liver during ketosis, and the so-called «triosephosphate block». *Biochem. biophys. Acta*, **115**: 1, 1966.
- 481 — SÖLING, H. D., KOSCHEL, R., DRÄGERT, W., KNEER, P. & CREUTZFELDT, W.: Die Wirkung von Insulin auf den stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber normaler und alloxandiabetischer Ratten. Teil I. *Diabetologia*, **2**: 20, 1966.
- 482 — SÖLING, H. D., ZAHLTEN, R., REIMOLD, W. V. & WILLMS, B.: Utilization of ketone bodies by adipose tissue and its regulation by carbohydrate metabolism. *Horm. Met. Res.*, **2**: 56, 1970.
- 483 — SÖMOGYI, M.: Determination of blood sugar. *J. biol. Chem.*, **160**: 69, 1945.
- 484 — SÖMOGYI, M. & WEICHELBAUM, T. R.: Ketone-sparing effect of glucose. *J. biol. Chem.*, **145**: 567, 1942.
- 485 — SOODAK, M.: An enzymatic micromethod for the determination of acetate. *Methods in Enzymology*, **3**: 269, 1957.
- 486 — SOSKIN, S.: The blood sugar: its origin, regulation and utilization. *Physiol. Rev.* **21**: 140, 1941.
- 487 — SOSKIN, S. & LEVINE, R.: Carbohydrate Metabolism. 2nd ed. Pág. 123. Univ. Chicago Press. 1952.
- 488 — STADIE, W. C.: Ketogenesis. *Diabetes*, **7**: 173, 1958.
- 489 — STADIE, W. C., ZAPP, JR., J. A. & LUKENS, F. D. W.: The effect of insulin upon the ketone metabolism of normal and diabetic cats. *J. biol. Chem.*, **132**: 423, 1940.
- 490 — START, C. & NEWSHOLME, E. A.: The effects of starvation and alloxan-diabetes on the contents of citrate and other metabolic intermediates in rat liver. *Biochem. J.*, **107**: 411, 1968.
- 491 — START, C. & NEWSHOLME, E. A.: Blood concentrations of ketone bodies and non-esterified fatty acids in starved re-fed rats. *Biochem. J.*, **109**: 37 P, 1968.
- 492 — STEINBERG, D.: Fatty acid mobilization — Mechanism of regulation and metabolic consequences. *Biochemical Society Symposia*, **24**: 111, 1963.
- 493 — STEINER, D. F., RAUDA, V. & WILLIAMS, R. H.: Severe ketoacidosis in the alloxan diabetic rat. *Endocrinology*, **68**: 809, 1961.
- 494 — STERN, J. R.: Partial resolution of  $\beta$ -hydroxybutyryl CoA racemase and  $\beta$ -hydroxybutyryl dehydrogenase. *Biochim. biophys. Acta*, **26**: 661, 1957.
- 495 — STERN, J. R., DEL CAMPILLO, A. & LEHNINGER, A. L.: Enzymatic racemization of  $\beta$ -hydroxybutyryl-S-CoA and the stereospecificity of enzymes of the fatty acid cycle. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**: 1073, 1955.

- 496 — STERN, J. R., COON, M. J. & DEL CAMPILLO, A.: Enzymatic breakdown and synthesis of acetoacetate. *Nature*, **171**: 28, 1953.
- 497 — STERN, J. R., COON, M. J., DEL CAMPILLO, A. & SCHNEIDER, M. C.: Enzymes of fatty acid metabolism. IV. Preparation and properties of coenzyme A transferase. *J. biol. Chem.*, **221**: 15, 1956.
- 498 — STERN, J. R. & MILLER, G. E.: On the enzymatic mechanism of acetoacetate synthesis. *Biochem. biophys. Acta*, **35**: 576, 1959.
- 499 — STERNE, J.: Mécanisme d'action des biguanides antidiabétiques. *Presse Med.*, **72**: 17, 1964.
- 500 — STERNE, J.: The present state of knowledge on the mode of action of the antidiabetic diguanides. *Metabolism*, **13**: 791. 1964.
- 501 — STERNE, J.: Pharmacology and mode of action of the hypoglycaemic guanidine derivatives. In «Oral Hypoglycaemic Agents — Pharmacology and Therapeutics». Medical Chemistry, Vol. IX. Pág. 193. Ed. por G. D. Campbell. Academic Press. London. 1969.
- 502 — STEVENSON, J. A. F., FELEKI, V., SZLAVKO, A. & BEATON, J. R.: Food restriction and lipogenesis in the rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **116**: 178, 1964.
- 503 — STEWART, R. D. & BOETTNER, E. A.: Expired-air acetone in diabetes mellitus. *New England. J. Med.*, **270**: 1035, 1964.
- 504 — SUKUZU, I., JURTSU, JR. P. & GREEN, D. E.: On the isolation and properties of the D (—)  $\beta$ -hydroxybutyric dehydrogenase of beef heart mitochondria. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **6**: 71, 1961.
- 505 — TAGAKI, W. & WESTHEIMER, F. H.: Acetoacetate decarboxylase. Reassociation of sub units. *Biochemistry*, **7**: 891, 1968. Ver también no mesmo volume os artigos das págs. 895, 901, 905, 913.
- 506 — TAKETA, K. & POGELL, B. M.: The effect of palmityl coenzymes A on glucose 6-phosphate dehydrogenase and other enzymes. *J. biol. Chem.*, **241**: 720, 1966.
- 507 — TANAYAMA, S. & UI, M.: Decrease in the concentrations of ketone bodies and free fatty acids in rat blood in response to a glucose load: its possible relation to endogenous insulin activity. *Endocrinology*, **76**: 910, 1965.
- 508 — TAYLOR, J. A. & JACKSON, H. D.: Formation of ketone bodies from ( $^{14}$ C) palmitate and ( $^{14}$ C) glycerol by tissues from ketotic sheep. *Biochem. J.*, **106**: 289, 1968.
- 509 — TEPPERMAN, J., BROBECK, J. R. & LONG, C. N. H.: The effects of hypothalamic hyperphagia and of alterations in feeding habits on the metabolism of the albino rat. *Yale J. Biol. Med.*, **15**: 855, 1943.
- 510 — TEPPERMAN, J. & TEPPERMAN, H. M.: Effects of antecedent food intake pattern on hepatic lipogenesis. *Amer. J. Physiol.*, **193**: 55, 1958.
- 511 — TEPPERMAN, H. M. & TEPPERMAN, J.: The hexosemonophosphate shunt and adaptative lipogenesis. *Diabetes*, **7**: 478, 1958.
- 512 — THIN, C. & ROBERTSON, A.: The estimation of acetone bodies. *Biochem. J.*, **51**: 218, 1952.
- 513 — THORP, J. M.: Effects of seasonal variation on lipid metabolism in animals and man. *Biochem. Society Simposia*, **24**: 163, 1963.



- 514 — TOENNIESSEN, E. & BRINKMANN, E.: Über den Abbau der niederen Fettsauren insbesondere der Essigsäure und Ameisensäure im Säugetier und über die Frage der Zuckerbildung aus Fett. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **252**: 169, 1938.
- 515 — TORRES, C. S.: Glomerulonefrite aguda. Dissertação de licenciatura. Porto. 1960.
- 516 — TRAMS, E. G., BROWN, E. A. & LAUTER, C. J.: Lipoprotein synthesis. I. Rat plasma lipoprotein composition and synthesis from radioactive precursors. *Lipids*, **1**: 309, 1966.
- 517 — TROUT, D. L., ESTES, JR., E. H. & FRIEDBERG, S. J.: Titration of free fatty acids of plasma: a study of current methods and a new modification. *J. Lipid Res.* **1**: 199, 1960.
- 518 — TYBERGHEIN, J. M. & WILLIAMS, R. H.: Metabolic effects of phenethylidguanide, a new hypoglycemic compound. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **96**: 29, 1957.
- 519 — UETE, T. & ASHMORE, J.: Effects of triamcinolone on carbohydrate synthesis by rat liver slices. *J. biol. Chem.*, **238**: 2906, 1963.
- 520 — UMBREIT, W. W.: The Warburg constant volume respirometer. In «Manometric Technics». 4th ed. Pág. 1. Ed. por W. W. Umbreit, R. H. Burris e J. F. Stauffer. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 1964.
- 521 — URGOITI, E. J., HOUSSAY, B. A. & RIETTI, C. T.: Hypophyseal and adrenal factors essential for ketoacidosis of pancreatectomized dogs. *Diabetes*, **12**: 301, 1963.
- 522 — UTTER, M. F.: The role of CO<sub>2</sub> fixation in carbohydrate utilization and synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **72**: 451, 1959.
- 523 — UTTER, M. F. & KEECH, D. B.: Formation of oxaloacetate from pyruvate and CO<sub>2</sub>. *J. biol. Chem.*, **235**: PC 17, 1960.
- 524 — UTTER, M. F., KEECH, D. B. & SCRUTTON, M. C.: A possible role for acetyl CoA in the control of gluconeogenesis. *Adv. Enz. Reg.*, **2**: 49, 1964.
- 525 — UTTER, M. F. & KURAHASHI, K.: Mechanism of action of oxalacetic carboxylase. *J. biol. Chem.*, **207**: 821, 1954.
- 526 — VAN DE KAMER, J. H., HUININK, H. B. & WEYERS, H. A.: Rapid method for the determination of fat in feces. *J. biol. Chem.*, **177**: 347, 1949.
- 527 — VAN HANDEL, E.: Suggested modifications of the micro determination of triglycerides. *Clin. Chem.*, **7**: 249, 1961.
- 528 — VAN HANDEL, E. & ZILVERSMIT, D. B.: Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. *J. Lab. clin. Med.*, **50**: 152, 1957.
- 529 — VAN ITALLIE, T. B. & BERGEN, JR., S. S.: Ketogenesis and hyperketonemia. *Amer. J. Med.*, **31**: 909, 1961.
- 530 — VAN SLYKE, D. D.: Studies of acidosis. VII. The detamination of  $\beta$ -hydroxybutyric acid, acetoacetic acid, and acetone in urine. *J. biol. Chem.*, **32**: 455, 1917.
- 531 — VAN SLYKE, D. D.: Studies of acidosis. VIII. The determination of  $\beta$ -hydroxybutyric acid, acetoacetic acid, and acetone in blood. *J. biol. Chem.*, **32**: 495, 1917.
- 532 — VARLEY, H.: Practical Clinical Biochemistry. 4th ed. William Heinemann Medical Books Ltd. London. 1967.
- 533 — VIEIRA DE SÁ, L. & PEREIRA BAPTISTA, J. S. N. S.: Doseamento de acetona em produtos biológicos. *Rev. Port. Farmácia*, **15**: 407, 1965.

- 534 — VILLAR-PALASI, C., GOLDBERG, N. D., BISHOP, J. S., NUTTALL, F. Q. & LARNER, J.: Hormonal control of glycogen synthetase interconversions. In «Metabolic Regulations and Enzyme Action». Ed. por A. Sols e S. Grisolia. FEBS Symposium. Vol. 19. Pág. 149. Academic Press. London. 1970.
- 535 — VISSCHER, F. E.: Renal clearance of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in a dog. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **60**: 296, 1945.
- 536 — WAGLE, S. R.: Studies on pyruvate carboxylase activity in alloxan diabetic and normal animals. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **14**: 533, 1964.
- 537 — WAGLE, S. R. & ASHMORE, J.: Studies on experimental diabetes. II. Carbon dioxide fixation. *J. biol. Chem.*, **238**: 17, 1963.
- 538 — WAGLE, S. R. & ASHMORE, J.: Studies on carbon dioxide fixation in normal and alloxan-diabetic animals. *Biochem. biophys. Acta*, **74**: 564, 1963.
- 539 — WAKIL, S. J.: D (—)  $\beta$ -hydroxybutyryl CoA dehydrogenase. *Biochem. biophys. Acta*, **18**: 314, 1955.
- 540 — WAKIL, S. J.:  $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenases. In «The Enzymes». 2nd ed.. Vol. 7. Pág. 97. Ed. por P. D. Boyer, H. Lardy & K. Myrbäck. Academic Press. New York. 1963.
- 541 — WAKIL, S. J. & BRESSLER, R.: Fatty acid metabolism and ketone body formation. *Metabolism.*, **11**: 742, 1962.
- 542 — WAKIL, S. J. & BRESSLER, R.: Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. X. Reduced triphosphopyridine nucleotide-acetoacetyl coenzyme A reductase. *J. biol. Chem.*, **237**: 687, 1962.
- 543 — WAKIL, S. J., GREEN, D. E., MIU, S. & MAHLER, H. R.: Studies on the fatty acid oxidizing system of animal tissues. VI.  $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase. *J. biol. Chem.*, **207**: 631, 1954.
- 544 — WALKER, P. G.: A colorimetric method for the estimation of acetoacetate. *Biochem. J.*, **58**: 699, 1954.
- 545 — WATSON, G. M., CAMERON, D. G. & WITTS, L. J.: Experimental macrocytic anaemia in the rat. *Lancet*, **II**: 404, 1948.
- 546 — WEBB, J. L.: *Enzyme and metabolic inhibitors*. Vol. 2. Pág. 210. Academic Press. New York and London. 1966.
- 547 — WEBER, G., CONVERY, H. J. H., LEA, M. A. & STAMM, N. B.: Feedback inhibition of key glycolytic enzymes in liver: action of free fatty acids. *Science*, **154**: 1357, 1966.
- 548 — WEBER, G., SINGHAL, R. L., STAMM, N. B., FISHER, E. A. & MENTENDIEK, M. A.: Regulation of enzymes involved in gluconeogenesis. *Adv. Enz. Reg.*, **2**: 1, 1964.
- 549 — WEBER, G., SINGHAL, R. L., STAMM, N. B., LEA, M. A., & FISHER, E. A.: Synchronous behavior pattern of key glycolytic enzymes: glucokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. *Adv. Enz. Reg.*, **4**: 59, 1966.
- 550 — WEICHELBAUM, T. E. & SOMOGYI, M.: A method for the determination of small amounts of ketone bodies. *J. biol. Chem.*, **140**: 5, 1941.
- 551 — WEIDEMANN, M. J. & KREBS, H. A.: The fuel of respiration of rat kidney cortex. *Biochem. J.*, **112**: 149, 1969.

- 552 —WEINHOUSE, S., MEDES, G. & FLOYD, N. F.: The mechanism of fatty acid oxidation. *J. biol. Chem.*, **153**: 689, 1944.
- 553 —WEINHOUSE, S., MEDES, G. & FLOYD, N. F.: Fatty acid metabolism. The mechanism of ketone body synthesis from fatty acids, with isotopic carbon as tracer. *J. biol. Chem.*, **155**: 143, 1944.
- 554 —WERCH, S. C.: A microdiffusion method for the estimation of acetone. *J. Lab. clin. Med.*, **25**: 414, 1940.
- 555 —WERCH, S. C.: Clinical application of the microdiffusion method for the estimation of acetone. *J. Lab. clin. Med.*, **26**: 878, 1941.
- 556 —WERK, JR., E. E. & KNOWLES, JR., H. C.: The blood ketone and plasma free fatty acid concentration in diabetic and normal subjects. *Diabetes*, **10**: 22, 1961.
- 557 —WESSON, JR., L. G.: Physiology of the human kidney. Págs. 221, 222, 223 e 411. Grune & Stratton. New York. 1969.
- 558 —WHICHELOW, M. J., BUTTERFIELD, W. J. H., ABRAMS, M. E., STERKY, G. & GARRATT, C. J.: The effect of mild exercise on glucose uptake in human forearm tissues in the fasting state and after oral glucose administration. *Metabolism*, **17**: 84, 1968.
- 559 —WICK, A. N.: Ketogenic action of branched chain fatty acids. *J. biol. Chem.*, **141**: 897, 1941.
- 560 —WIELAND, O.: Ketogenesis and its regulation. *Adv. Metabolic Disorders*, **3**: 1, 1968.
- 561 —WIELAND, O., LOFFLER, G. & NEUFELDT, I.: Zur Acetessigsäure und cholesterinbildung bei experimenteller ketose. *Biochem. Z.*, **333**: 10, 1960.
- 562 —WIELAND, O. & WEISS, L.: Increase in liver acetyl-coenzyme A during ketosis. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **10**: 33, 1963.
- 563 —WIELAND, O. & WEISS, L.: Inhibition of citrate-synthase by palmityl-coenzyme A. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **13**: 26, 1963.
- 564 —WIELAND, O., WEISS, L. EGER-NEUFELDT, I. & MÜLLER, U.: Ketone formation and inhibition of liver lipid synthesis by chylomicrons. *Life Sci.*, **7**: 441, 1963.
- 565 —WILLIAMSON, D. H.: The metabolism of ketone bodies. Thesis. Oxford. 1967.
- 566 —WILLIAMSON, D. H., BATES, M. W. & KREBS, H. Q.: Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone body metabolism in rat liver. *Biochem. J.*, **108**: 353, 1968.
- 567 —WILLIAMSON, D. H., LOPES-VIEIRA, O. & WALKER, B.: Concentrations of free glucogenic amino acids in livers of rats subjected to various metabolic stresses. *Biochem. J.*, **104**: 497, 1967.
- 568 —WILLIAMSON, D. H., LUND, P. & KREBS, H. A.: The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem. J.*, **103**: 514, 1967.
- 569 —WILLIAMSON, D. H., MELLANBY, J. & KREBS, H. A.: Enzymic determination of D (—)- $\beta$ -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem. J.*, **82**: 90, 1962.
- 570 —WILLIAMSON, D. H., VELOSO, D., ELLINGTON, E. V. & KREBS, H. A.: Changes in the concentrations of hepatic metabolites on administration of dihydroxyacetone or glycerol to starved rats and their relationship to the control of ketogenesis. *Biochem. J.*, **114**: 575, 1969.

- 571 —WILLIAMSON, D. H. & WILSON, M. B.: The effects of cyclopropane derivatives on ketone-body metabolism *in vivo*. *Biochem. J.*, **94**: 19 C, 1965.
- 572 —WILLIAMSON, J. R.: Mechanism for the stimulation *in vivo* of hepatic gluconeogenesis by glucagon. *Biochem. J.*, **101**: 11 C, 1966.
- 573 —WILLIAMSON, J. R., BROWNING, E. T. & OLSON, M. S.: Interrelations between fatty acid oxidation and the control of gluconeogenesis in perfused rat liver. *Adv. Enz. Reg.*, **6**: 67, 1968.
- 574 —WILLIAMSON, J. R., BROWNING, E. T. & SCHOLZ, R.: Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. Effects of oleate on gluconeogenesis in perfused rat liver. *J. biol. Chem.*, **244**: 4607, 1969.
- 575 —WILLIAMSON, J. R., GARCIA, A., RENOLD, A. E. & CAHILL, G. F.: Studies on the perfused rat liver. I. Effects of glucagon and insulin on glucose metabolism. *Diabetes*, **15**: 183, 1966.
- 576 —WILLIAMSON, J. R., HERCZEG, B., COLES, H. & DANISH, R.: Studies on the ketogenic effect of glucagon in intact rat liver. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **24**: 437, 1966.
- 577 —WILLIAMSON, J. R. & KREBS, H. A.: Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart. *Biochem. J.*, **80**: 540, 1961.
- 578 —WILLIAMSON, J. R., KREISBERG, R. A. & FELTS, P. W.: Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, **56**: 247, 1966.
- 579 —WILLIAMSON, J. R., SCHOLZ, R. & BROWNING, E. T.: Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. II. Interactions between fatty acid oxidation and the citric acid cycle in perfused rat liver. *J. biol. Chem.*, **244**: 4617, 1969.
- 580 —WILLMS, B., BÖTTCHER, M., WOLTERS, V., SAKAMOTO, N. & SÖLING, H.-D.: Relationship between fat and ketone body metabolism in obese and nonobese diabetics and nondiabetics during norepinephrine infusion. *Diabetologia*, **5**: 88, 1969.
- 581 —WINEGRAD, A. I.: Insulin and lipid metabolism. In «Actions of hormones on molecular processes». Ed. por G. Litwack & D. Kritchevsky. Pág. 382. JohnWiley & Sons. Inc. New York. 1964.
- 582 —WOOD, F. C., DOMENGE, L., BALLY, P. R., RENOLD, A. E. & THORN, G. W.: Studies on the metabolic response to prolonged fasting. *Med. clin. North Amer.*, **44**: 1371, 1960.
- 583 —WOOD, H. G. & UTTER, M. F.: The role of CO<sub>2</sub> fixation in metabolism. *Essays in Biochemistry*, **1**: 1, 1965.
- 584 —WOOL, I. G., STIREWALT, W. S., KURIHARA, K., LOW, R. B., BAILEY, P. & OYER, D.: Mode of action of insulin in the regulation of protein biosynthesis in muscle. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **24**: 139, 1968.
- 585 —YOUNG, V. R., CHEN, S. C. & MACDONALD, J.: The sedimentation of rat skeletal-muscle ribosomes. Effect of hydrocortisone, insulin and diet. *Biochem. J.*, **106**: 913, 1968.
- 586 —ZABIN, I. & BLOCH, K.: The utilization of isovaleric acid for the synthesis of cholesterol. *J. biol. Chem.*, **185**: 131, 1950.

**RESUMO**  
**SUMMARY**

## RESUMO

O método seguido em geral neste trabalho foi o de considerar globalmente, logo de início, os problemas da cetose e da cetogênese, renovando-se ao longo do seu percurso a tendência, constante, para criticamente integrar, em sucessão renovadora, todas as possibilidades encontradas e desenvolvidas.

Distinguimos, nas suas diferentes ordens categóricas próprias, como motivações desta atitude, em que o movimento analítico continuamente se reflecte em síntese, as seguintes que documentámos tanto como pensámos permitir e requerer uma dissertação:

1. Necessidade de um esforço de reflexão para abranger simples e claramente os problemas da cetose e da cetogênese, ponto cuja dificuldade é muitas vezes salientada na literatura e que se torna maior e mais insólita perante a multiplicidade de situações em que a cetose aparece, perante a multiplicidade de caminhos metabólicos que confluem na formação e utilização dos corpos cetónicos, perante a multiplicidade de atitudes compartimentadas que a literatura regista, tomadas pelos investigadores que se têm dedicado a este assunto, e ainda perante a multiplicidade de trabalhos de grande importância que lhe têm sido dedicados.
2. Conveniência de estabelecimento, para fundamentação do nosso próprio programa pessoal de investigação, de uma plataforma com valor futurível, que possa permitir, para além da própria definição do campo, a possibilidade assegurada de regresso — em termos heurísticos.
3. Realidade da importância dos problemas vertentes, não só na ordem prática — da cetose dos Ruminantes à acidose diabética —, mas também, e para nós principalmente, na ordem

teórica — de problema não resolvido que, tendo propiciado já no seu caminho a formulação de múltiplos outros, hoje independentes e resolvidos, mantém ainda a fecundidade prometedora que advém de manter implícitos conceitos básicos de Química Fisiológica que importa externar.

Este trabalho divide-se em três partes.

**I.** Na *primeira parte* abordámos em linhas gerais a história dos problemas, não numa tentativa historiográfica mas sempre na atitude de uma reinvenção temática para descoberta do dinamismo dos problemas.

Apontámos as interrogações mais vezes formuladas perante tais problemas:

- Causas da acumulação dos corpos cetónicos?
- Razões da variabilidade da concentração dos corpos cetónicos de organismo para organismo e de situação para situação?
- Significado da génese e da acumulação dos corpos cetónicos?

No mesmo sentido, esboçámos, sucessivamente, o quadro geral dos conhecimentos actuais sobre a *enzimologia e metabolismo dos corpos cetónicos*, apondo-lhe uma resenha dos *pontos controversos*; de seguida, deixámos em evidência os problemas da *produção e utilização dos corpos cetónicos na dinâmica da cetose* e, a propósito, apontámos um quadro de *funções dos corpos cetónicos*.

Abordámos seguidamente as diversas teorias que têm sido propostas na tentativa de explicar a *cetogénese e sua regulação*; designadamente, focámos os seguintes aspectos:

- *Teoria da inibição da lipogénese*
- *Teoria da inibição do ciclo de Krebs*
- *Teoria da superprodução de acetil-coenzima A*
- *Teoria da pletoira de ácidos gordos não esterificados*
- *Condicionamento hormonal da cetose*
- *Relações da cetogénese com a gliconeogénese*

Deixámos conclusivamente demonstrado que não é aceitável nenhuma destas teorias até hoje propostas.

**II.** Na *segunda parte* apresentámos a contribuição pessoal com que tentámos obter a experiência que nos permitisse responder, pelo menos em parte, às perguntas feitas ou, se necessário, reformulá-las.

Inicialmente apontamos o itinerário que seguimos na experimentação. Depois de referirmos as condições experimentais gerais e os métodos analíticos utilizados, e de indicarmos a proveniência das substâncias utilizadas na experimentação e nos reagentes e o estudo estatístico, apresentamos, sucessivamente, as experiências realizadas quer *in vivo* quer *in vitro*.

A. *In vivo*

1. *Cetose do jejum*
2. *Cetose em ratos com alimentação intermitente*
3. *Estudos com esteróides gliconeogénicos e com a metformina*
4. *Estudos de efeitos da actividade muscular*
5. *Estudo de efeitos da ministração de uma dieta gorda e de triamcinolona*
6. *Estudo de efeitos da temperatura ambiente*
7. *Relação do azoto ureico para o azoto total na urina, na intoxicação pela floridzina*
8. *Estudo de efeitos da ministração de cloreto de amónio e cloreto de amónio e ornitina*

B. *In vitro*

1. *Estudos com a incubação de fatias de figado*
2. *Estudos com a perfusão de figado isolado*

A propósito de cada tipo de experiências referimos o esquema experimental e as precisas condições da experimentação, apresentamos os resultados e fazemos-lhes um comentário na generalidade.

Em linhas muitíssimo gerais, o nosso itinerário é como segue.

— Começamos pelo estudo de uma situação que habitualmente é tomada por paradigmática — a situação de jejum — que tem, de múltiplos pontos de vista, interesse notório.

Os resultados destas experiências realizadas em ratos de proveniências diferentes e em diferentes épocas do ano, bem como os das seguintes, enquadrados no conceito de *homeostasia calórica* que se amplia para abarcar a *cetogénese* como um dos tipos de *respiração*, permitiram-nos concluir que a existência e a não existência de *correlações* dos substratos respiratórios, tantas vezes defendidas e negadas neste contexto, são fortuitas e, por isso, podem ser igualmente verdadeiras. Pudemos concluir que os resultados finais observados nas experiências não serão dependentes



das oscilações internas de um sistema constituído pelos corpos cetónicos, pelos ácidos gordos e pela glicose e que tanto a cetose como o seu grau serão uma resultante de múltiplos factores.

— À exploração da cetose do jejum, e com as indicações colhidas, seguiram-se experiências realizadas na perspectiva dinâmica da *contra-prova*:

- 1) No tocante à teoria da inibição da lipogénese, explorámos um esquema experimental que propicia um aumento induzido da lipogénese — são as experiências em que estudámos a cetose em ratos com *alimentação intermitente*.
- 2) No respeitante às relações da cetogénese com a gliconeogénese, tentámos, em diferentes séries experimentais, por um lado intensificar e por outro relentar este último fenómeno. Trata-se dos nossos estudos com *esteróides gliconeogénicos e com a metformina* que foram bem sucedidos no primeiro caso e não conseguiram o *desideratum* proposto no segundo.
- 3) Enquadram-se também no mesmo sentido os estudos de efeitos da *actividade muscular*, uma vez que esta condiciona uma intensificação do caminho da gliconeogénese.

— De entre os múltiplos problemas da cetose, desde há muito que se nos havia destacado, particularmente, um núcleo em que salientamos os seguintes aspectos:

- 1) Os glicocorticóides revertem a cetose do jejum e, está dito, são cetogénicos em condições de diabetes, apesar de ser conhecido e bem documentado que existem certas semelhanças metabólicas entre as duas situações.
- 2) Há também certas semelhanças entre tais condições e a situação criada pela ministração de uma dieta gorda que é cetogénica e conduz a um aumento da concentração hepática de acetyl-CoA.
- 3) Está apontada por uns uma correlação positiva e por outros uma correlação negativa entre a concentração de triglicérides hepáticos e o grau de cetonemia.

Procurámos investigar este conjunto de problemas com dois esquemas experimentais em que fizemos o estudo de efeitos da ministração de uma dieta gorda e de triamcinolona e o estudo de efeitos da temperatura

Neste último grupo experimental estudámos, para além dos parâmetros explorados em todas as outras experiências, as eliminações azotada e ureica renais e o índice de ureificação. Os resultados obtidos levantaram-nos o problema da participação da ureogénese na cetogénese, e esta foi uma relação que, como hipótese, orientou todo o nosso trabalho ulterior — de modo a explorarmos e a limitarmos a própria tese que defendemos nesta dissertação.

O estudo da *relação do azoto ureico para o azoto total na intoxicação pela floridzina* mostrou-nos que o índice de ureificação se mantém nesta situação experimental, em que se encontram um grau de cetose elevadíssimo e uma eliminação maciça de azoto.

As experiências *in vivo* em que fizemos o estudo de efeitos da *ministração de cloreto de amónio e de cloreto de amónio e ornitina* constituem uma tentativa para esclarecimento de um problema complexo que aparece no trânsito da nossa tese — o do efeito cetogénico *in vitro* do cloreto de amónio — que, apesar de conhecido desde há muito, permanece sem explicação conveniente, quer quanto ao seu próprio mecanismo nas condições em que se verifica quer no significado, e aqui tanto no tocante ao carácter heurístico como à dimensão fisiológica, uma vez que não tem contrapartida experimental *in vivo*.

Em ambos os tipos de experiências que realizámos *in vitro*, nas suas variantes, são sempre explorados os problemas das relações da cetogénese com a gliconeogénese e a ureogénese — problemas que se encontram no mesmo caminho.

**III.** Na *terceira parte* apresentámos um *ensaio de interpretação* em que são retomados os dados discutidos na *primeira* e os resultados apresentados na *segunda* que agora são discutidos numa perspectiva de tese em trânsito. Na sua proposição reconhece-se um laço fenomenologicamente efectivo entre a cetogénese e a ureogénese. Para testificar a sua adequação:

- 1) mostrámos a efectividade de uma base material adequada, em termos de caminho metabólico e enzimático;
- 2) descobrimos os limites da própria tese;

- 3) submetemos à prova de integração os aspectos válidos em que se fundamentam as teorias que têm sido propostas para explicar a cetose e a sua regulação e que foram discutidas;
- 4) reexaminámos os dados da nossa experimentação, que todos devem caber numa mesma unidade integrada para que a visão proposta seja satisfatória;
- 5) aduzimos e discutimos os dados da literatura que a própria hipótese dinamiza no mesmo sentido, e que não têm sido considerados nem valorizados, devido às limitações próprias das premissas em que se baseiam as teorias vigentes.

Todos estes aspectos são considerados e comprovam a adequação da tese.

Neste ensaio considerámos e analisámos também duas questões que a nossa proposição releva e a que importaria responder para demonstrar a sua originalidade:

- Uma respeito à estranheza que pode causar não a vermos formulada já na literatura, e neste sentido são analisados e discutidos o alcance e as limitações dos conceitos de PETERS & VAN SLYKE (1946) e da interpretação dada por EDSON (1935) aos seus próprios resultados experimentais.
- Outra, na mesma linha, refere-se à possibilidade da existência na literatura de interpretações aproximadas, e a propósito considerámos que com carácter formal apenas uma existe — a de McCARTHY (1969) — que depois de discutida é por nós rejeitada, com razões suficientes, embora a proximidade fique patente, porque propõe a relação da cetogénese com o metabolismo protídico. Este autor atribui a uma postulada carência de metionina o que nós atribuímos à concomitância e efectividade da ureogénese.

Damos assim conta de termos procurado, desde certo ponto, encontrar no desenvolvimento da cetose o laço de união dos dois ciclos 322 que KREBS descobriu e descreveu — e pensamos tê-lo demonstrado assaz.

O nosso ensaio e a nossa dissertação terminam com a formulação de cinco conclusões. A primeira, que tem carácter de lema, com as duas seguintes, que têm carácter de escólio, preparam as duas últimas que exprimem a tese. E são como seguem:

- 1) Não é aceitável nenhuma das teorias que foram propostas até hoje para explicar a cetose e a regulação da cetogénese.
- 2) Na perspectiva da Química Fisiológica só é possível descobrir o interesse, o significado e o papel dos corpos cetónicos quando se consideram estas substâncias nos caminhos da sua formação e transformação.
- 3) É legítimo, no estado actual dos conhecimentos, centrar as investigações sobre a cetose no problema da cetogénese, mas a perspectiva geral só é possível pelo estudo das situações *in vivo*.
- 4) Na cetose e na cetogénese convergem ou podem convergir múltiplas determinantes factoriais.
- 5) Uma determinante da cetogénese, de grande importância em muitas situações e algumas vezes mesmo a principal, é a concomitância da ureogénese.

## SUMMARY

Our general method consisted, from the very beginning, in considering all the problems of ketosis and ketogenesis as a whole, with a constant concern to analyse all the possibilities disclosed in the course of our investigation and combine them into new schemes, thus continually revising our ideas.

In choosing this attitude, in which analysis is continuously reflected in synthesis, we were moved by several reasons. These can be graded according to their relative importance in the following manner:

- 1) The need for deep reflexion to understand the problems of ketosis and ketogenesis in a simple and clear way. As often stressed in the literature it is a complex undertaking, rendered unusually difficult by the multiplicity of situations in which ketosis is present, the multiplicity of metabolic pathways converging on the formation and utilization of ketone bodies, the multiplicity of partial approaches of many of the investigators on record in this field, and, further, the multiplicity of works of great importance dedicated to the subject.
- 2) The advantage of formulating grounds on which to base our personal programme of investigation with good prospects for the future. These grounds, besides enabling us to establish what the field of action is, should also serve as points of reference to guide our investigation along a heuristically justified path.
- 3) The true importance of these problems, not only from a practical point of view — from Ruminant ketosis to diabetic acidosis — but also, and especially for us, from a theoretical one. As a matter of fact, during the development of this as yet unsolved question, many different problems have

been raised, some of which are now settled and constitute fields autonomous from the main point at issue. The so far encouraging results in this extremely interesting field of investigation stem from the fact that it involves some basic biochemical concepts that must be brought into the light.

The above items were developed and discussed to the extent we believe is feasible and suitable in a dissertation of this kind.

This work is divided into three parts:

I. In the *first part* we generally presented the history of the problems, not in an attempt to write history, but always with a view to shedding new light on the subject, thus revealing its dynamic nature.

We have pointed out the questions most frequently asked with regard to such problems:

- What are the reasons for the accumulation of ketone bodies?
- Why does ketone body concentration have an irregular behaviour in different organisms and situations?
- What is the significance of the production and accumulation of ketone bodies?

In the same way, we gave a general outline of the information extant concerning *ketone body enzymology and metabolism*, inserting a list of the disputed points; we have then thrown into high relief the problems of *production and utilization of ketone bodies in the dynamics of ketosis*, in connexion with which, a *ketone body functions synopsis* was added.

Our work proceeded with an appraisal of the several theories propounded to explain *ketogenesis and its regulation*, viz.:

- *Lipogenesis inhibition theory*
- *Krebs cycle inhibition theory*
- *Acetyl-coenzyme A hiperproduction theory*
- *Theory of the plethora of non-sterified fatty acids*
- *Hormonal conditioning of ketosis*
- *Connexions between ketogenesis and gluconeogenesis*

We have conclusively shown that none of these theories can be  
326 accepted.

II. The *second part* of this dissertation deals with our personal contribution, by which we tried to obtain enough experimental evidence to enable us to answer at least some of the questions raised, or to restate them if necessary.

We initially pointed out the lines of our experimentation. After a reference to the general conditions and the analytical methods, we indicated the source of the substances utilized in the experimentation and reagents, and what statistical techniques were used; the actual experiments, carried out both *in vivo* and *in vitro* were then presented in due succession.

A. *In vivo*

1. *Fasting ketosis*
2. *Ketosis in rats with intermittent feeding (meal-fed rats)*
3. *Studies with gluconeogenic steroids and metformine*
4. *Studies of muscular activity effects*
5. *Study of effects of the administration of triamcinolone during fat-rich diet*
6. *Study of temperature effects*
7. *Relation of ureic nitrogen to total nitrogen in the urine, during phloridizin intoxication*
8. *Study of the effects of administration of ammonium chloride both alone and with ornithine*

B. *In vitro*

1. *Studies with liver slices*
2. *Studies with perfused isolated liver*

Referring to each type of experiment, after describing the experimental scheme and the precise conditions of experimentation, we presented the results and made a general comment on them.

Our procedure was very generally as follows:

—We set to work by studying the situation of fasting, which is usually considered paradigmatical and is remarkably interesting from many points of view.

These experiments were carried out at different times of the year using rats of two different strains of the same breed (Wistar). Their results and the results of the following ones were interpreted according

to the *caloric homeostasis* concept, that can be extended to consider *ketogenesis as one of the types of respiration*. These results enabled us to conclude that the existence or nonexistence of metabolic connexions between energetic substrates in fasting and in the other experimental conditions we used, depend on many variable factors. Thus each of the different opinions about this disputed matter may be correct in certain situations. We have therefore concluded that the final results observed in the experiments are not solely dependent on the internal fluctuations of a system made up of ketone bodies, fatty acids and glucose, for both ketosis itself and its degree depend on multiple factors.

— After studying the ketosis of fasting, we carried out new experiments checking whether those factors thought to affect ketosis when modified in a certain way had the opposite effect when their modification was reversed.

- 1) As regards the lipogenesis inhibition theory, we have an experimental scheme providing an induced increase of lipogenesis — such were our experiments on *ketosis in rats with intermitent feeding*.
- 2) In order to investigate the connexions between ketogenesis and gluconeogenesis, we have organized different *series* of experiments, using gluconeogenic steroids on the one hand, thus expecting to enhance gluconeogenesis, and *metformine* on the other, in an attempt to arrest that phenomenon. We were successfull with the steroids, but unable to achieve the desired objective with *metformine*.
- 3) Our *studies on the effects of muscular activity*, since the gluconeogenic pathway is intensified in this situation, were treated in the same general way.

— Amongst the multiple problems of ketosis, we had long been particularly interested in a certain group, in which the following aspects are conspicuous:

- 1) In spite of the well demonstrated similarities between fasting ketosis and diabetic ketosis, glucocorticoids revert the former condition and intensify the latter.



- 2) These same conditions are also in a way similar to the situation brought about by the administration of a fat-rich diet, by which ketosis is also induced and an increase of hepatic acetyl-CoA concentration occurs.
- 3) Some investigators say that there is a positive correlation, and others that there is a negative one, between hepatic triglyceride concentration and the degree of ketonemia.

We tried to investigate this group of problems, with two experimental schemes: studying the *effects of a fat-rich diet and triamcinolone administration* in one; and the *effects of temperature* in the other.

In the latter group of experiments, besides measuring the parameters investigated in all the previous experiments, we have further studied total nitrogen and urea excretion by the kidney, and the ureification ratio (urea nitrogen/total nitrogen) in the urine. These parameters have pointed to the possible participation of ureogenesis in ketogenesis. The assumption of this connexion has guided our further work and led us to develop the very thesis we are defending in this dissertation and establish its limits.

— Our study of urea nitrogen and total nitrogen during phloridizin intoxication, has shown that the ureification ratio is maintained in this experimental situation, when a very high degree of ketosis and a massive elimination of nitrogen are present.

— The ketogenic effect of ammonium chloride *in vitro*, is a complex problem which had to be considered during our investigation. Although this is a by no means recently discovered phenomenon, we still lack a satisfactory explanation of its mechanism and its significance needs clarifying, both in order to guide the investigation and with a view to understanding the physiological dimension of this effect, which has no *in vivo* counterpart. In an attempt to throw light on this question, we have carried out *in vivo* experiments to study the effects of the administration of ammonium chloride both alone and with ornithine.

— In both types of our *in vitro* experiments, we have always studied the problem of ketogenesis relation to gluconeogenesis and ureogenesis.

**III.** The *third part* of this dissertation is an interpretative essay in which all the data discussed in the *first* and the results presented in the *second* are summed up and discussed in the perspective of a thesis under examination.

We started from the idea that ketogenesis and ureogenesis are metabolically interconnected. In order to demonstrate the adequacy of this assumption, the following steps were taken:

- 1) We have shown the existence of adequate grounds, in terms of metabolic and enzymatic pathways, on which to base this thesis.
- 2) We set the limits of the actual thesis.
- 3) We examined all the valid aspects on which the theories so far propounded to explain ketosis and its regulation are based, and saw whether they were consistent with our point of view.
- 4) We have reexamined the data obtained from our experimentation which must all agree with this new vision of the problem, if it is to be satisfactory.
- 5) We have presented and discussed those significant data recorded in the literature, consistent with our hypothesis, that had been underestimated because of the limitations of the premises on which the theories so far propounded are based.

All the above aspects once considered agree on the adequacy of our thesis.

In this essay are also considered and analysed two questions brought up by our proposition, to which an answer is important, in order to demonstrate the originality of the thesis:

— One may wonder why this thesis had not yet been expressed in the literature. In this context, the far reaching consequences and limitations of the concepts of PETERS & VAN SLYKE (1946) were analysed and discussed, as well as EDSON's (1935) interpretation of his own experimental results.

— Along the same lines, regarding the possible existence of approximate interpretations in the literature, we considered that only one such interpretation exists formally expressed: McCARTHY's (1969). During the discussion of McCARTHY's theory, enough evidence was presented to reject it, although we recognized an evident proximity to our own since in both views a connexion between ketogenesis and protein metabolism is admitted. But what this author explains by postulating a lack of methionine, we attribute to the simultaneous occurrence of ureogenesis.

We believe we have sufficiently demonstrated in this dissertation that the development of ketosis is to a certain extent, the link between the two cycles discovered and described by KREBS.

Our essay and our dissertation finish with the formulation of five conclusions. The first one, intended to be a lemma and the next two, which should act as scholia, are the preparation of the final two, which express the thesis. The conclusions are as follows:

- 1) None of the theories propounded so far to explain ketosis and ketogenesis regulation can be accepted.
- 2) From a biochemical point of view, the interest, significance and role of the ketone bodies can only be discovered if these substances are considered in the pathways of their formation and transformation.
- 3) In the present state of knowledge on the subject of ketosis, it is still legitimate to focus attention on the problem of ketogenesis, but the general picture can only be grasped from the study of *in vivo* situations.
- 4) Ketosis and ketogenesis are or may be the resultant of multiple factors.
- 5) One of the determinants of ketogenesis, of great importance in many situations, and often the chief one, is the simultaneous occurrence of ureogenesis.

# CORRIGENDA

PÁG.	LINHA	ONDE SE LÊ	DEVE LER-SE
37	11	Eis categorias	Eis as categorias
»	16	<i>int he</i>	<i>in the</i>
38	3	ópticas	óptimas
»	20	suscita em primeiro lugar,	suscita, em primeiro lugar,
40	10	com isótopos radioactivos.	com isótopos — inicialmente não radioactivos e depois tam- bém com isótopos radioactivos.
44	13	carbonil	acetilo
46	33	$\text{CO}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \sim \text{SCoA}$	$\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \sim \text{SCoA}$
47	16	$\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \sim \text{SCoA}$	$\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \sim \text{SCoA}$
49	16	[D (+)]	[L (+)]
50	6	acetato <sup>185</sup> ,	acetato <sup>185</sup> ;
66	última	Cão	Cão
75	3	HOUSSAY <sup>312</sup>	HOUSSAY <sup>212</sup>
77	33	RENOLD & CAHILL <sup>510, 511</sup>	RENOLD & CAHILL <sup>410, 411</sup>
82	3	mitocôndrias	mitocôndrias
87	19	glicídica	de utilização glicídica
88	32	antictetogénicas	antictetogénicos
99	7	anima	animal
105	38	de	do
110	23	GOOD KRAMER & SOMOGYI	GOOD, KRAMER & SOMOGYI
»	24	PLÜGER	PFLÜGER
119	29	descreveu	descrevem
		$\frac{\text{Acetacetato}}{\text{Acetacetato}} \times 100$	$\frac{\beta\text{-hidroxibutirato}}{\beta\text{-hidroxibutirato}} \times 100$
136	7. <sup>a</sup> coluna do Quadro	+ $\beta$ -hidroxi- butirato médias	+ $\beta$ -hidroxi- butirato médias das somas
138	4		
150	2. <sup>a</sup> coluna do Quadro	naimais	animais
151	13. <sup>a</sup> e 14. <sup>a</sup> colu- nas do Quadro	$\frac{\text{Água} \cdot \text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100$	$\frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso do rato}} \times 100 \text{ Água}$

153		3 últimas colunas do Quadro	Glicogé- Água Azoto nio	Água Azoto Glicogé- nio
161	26		quatro	quarto
162		6. <sup>a</sup> coluna do Quadro	Acetacetato	Acetacetato
		4. <sup>a</sup> linha da legenda	+ $\beta$ -droxi-butirato	+ $\beta$ -hidroxi-butirato
163			4	4 ou 5 (ver o texto)
165	penúltima		porporção	proporção
168	7		lenta	pequena
170	1		dosistem a	do sistema
171	33		HONHORST <i>et al.</i> <sup>207</sup>	HONHORST <i>et al.</i> <sup>208</sup>
»	35		jejum	de jejum
172	17		fumada durante	fumada, durante
178	25		aqui	no primeiro caso
			Grupo 4	Grupo 4
184		1. <sup>a</sup> coluna do Quadro	24 h de jejum	24 h de jejum
			4 °C	22 °C
			$\beta$ -hidroxi- Acetacetato	Acetacetato
»	!	4. <sup>a</sup> e 5. <sup>a</sup> colunas do Quadro	buritato +	+ $\beta$ -hidroxi-butirato
			Acetacetato $\beta$ -hidroxi-	butirato Acetacetato
»		5. <sup>a</sup> coluna do Quadro	04,6	4,6
			Grupo 4	Grupo 4
		1. <sup>a</sup> coluna do Quadro	24 h de jejum	24 h de jejum
185			4 °C	22 °C
194	penúltima		carbónico,	carbónico),
222	27		alterada	aumentada
223	antepenúltima		«(Hoechst)»	(«Hoechst»)
244	19		referido, para	referido para
271	4		NH <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> +
274	8		dos	das
276	25		fosfo-enolpiruvato	fosfato de glicerato-3
»	35		apon-tar	apontar
299	ref. 314		bela	beta
300	ref. 342		1982	1928
301	ref. 360		Nutrition	Nutrition
310	ref. 530		detamination	determination

# ÍNDICE

	Pág.
Prefácio . . . . .	17
<b>I — REVISÃO CRÍTICA DE CONCEITOS . . . . .</b>	<b>31</b>
A. <b>Introdução . . . . .</b>	<b>33</b>
B. <b>Enzimologia e metabolismo dos corpos cetônicos . . . . .</b>	<b>39</b>
C. <b>Produção e utilização dos corpos cetônicos na dinâmica da cetose — Funções dos corpos cetônicos . . . . .</b>	<b>57</b>
D. <b>Cetogênese e sua regulação . . . . .</b>	<b>59</b>
1. Teoria da inibição da lipogênese . . . . .	60
2. Teoria da inibição do ciclo de Krebs . . . . .	61
3. Teoria da superprodução de acetil-CoA . . . . .	63
4. Teoria da pletora de ácidos gordos não esterificados . . . . .	65
5. Condicionamento hormonal da cetose . . . . .	68
6. Relações da cetogênese com a gliconeogênese . . . . .	76
E. <b>Conclusão . . . . .</b>	<b>90</b>
<b>II — CONTRIBUIÇÃO EXPERIMENTAL . . . . .</b>	<b>91</b>
A. <b>Introdução . . . . .</b>	<b>83</b>
B. <b>Condições experimentais gerais. Métodos analíticos. Proveniência das substâncias utilizadas na experimentação e nos reagentes. Estudo estatístico . . . . .</b>	<b>99</b>
C. <b>Estudos <i>in vivo</i> . . . . .</b>	<b>123</b>
Esquemas experimentais e apresentação de resultados. . . . .	123
1. Cetose do jejum . . . . .	123
2. Cetose em ratos com alimentação intermitente . . . . .	143
3. Estudos com esteróides gliconeogénicos e com <i>metformina</i> . . . . .	149
4. Estudo de efeitos da actividade muscular . . . . .	160
5. Estudo de efeitos da ministração de uma dieta gorda e de <i>triamcinolona</i> . . . . .	172
6. Estudo de efeitos da temperatura ambiente . . . . .	181
7. Relação do azoto ureico para o azoto total da urina na intoxicação pela <i>floridzina</i> . . . . .	188
8. Estudo de efeitos da ministração de cloreto de amónio e cloreto de amónio e ornitina. . . . .	189
D. <b>Estudos <i>in vitro</i> . . . . .</b>	<b>193</b>
Condições experimentais . . . . .	194
1. Estudos com a incubação de fatias de fígado . . . . .	194
2. Estudos com a perfusão de fígado isolado . . . . .	195
Apresentação de resultados . . . . .	199
1. Estudos com a incubação de fatias de fígado . . . . .	199
2. Estudos com a perfusão de fígado isolado . . . . .	218
<b>III — ENSAIO DE INTERPRETAÇÃO . . . . .</b>	<b>241</b>
— BIBLIOGRAFIA . . . . .	281
— RESUMO . . . . .	317
— SUMMARY . . . . .	325