

Utilização de Água Deuterada e Paracetamol no Estudo do Metabolismo da Glicose em Jejum e no Estado Pós-prandial

Use of Deuterated Water and Paracetamol in the Study of Glucose Metabolism in Fasting and Postprandial Status

C. Barosa¹, J. Jones^{1,2}

1 - Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Coimbra, Portugal.

2 - Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal, Lisboa, Portugal.

Resumo

O fígado desempenha um papel chave na regulação homeostática da glicose através de uma rede metabólica que converte a glicose e outros precursores em glicogénio no estado pós-prandial, enquanto durante o jejum assegura as necessidades fisiológicas de glicose pela via neoglicogénica e glicogenolítica.

O metabolismo hepático da glicose pode ser caracterizado de uma forma não invasiva em humanos, com o recurso a água deuterada e análise da incorporação de deutério na glicose circulante e na UDP-glicose hepática obtida via "biópsia química" com medicação habitualmente usada, como o paracetamol. Nesta revisão, as bases bioquímicas do método da água deuterada serão explicadas, as técnicas analíticas para medir o enriquecimento em deutério na glicose e na UDP-glicose serão descritas e a aplicação deste método no estudo do metabolismo da glicose em diferentes cenários da Diabetes serão discutidos.

Palavras-chave: metabolismo hepático da glicose; água deuterada

Abstract

The liver plays a key role in glucose homeostasis through a metabolic network that converts glucose and other precursors to glycogen during feeding and sustains whole body glucose demands via gluconeogenesis and glycogenolysis during fasting.

Hepatic glucose metabolism in human subjects can be noninvasively characterized with deuterated water and analysis of deuterium incorporation into circulating glucose and hepatic UDP-glucose via "chemical biopsy" with commonly used medications such as paracetamol. In this review, the biochemical basis of the deuterated water method will be explained, the analytical techniques for measuring deuterium enrichment of glucose and UDP-glucose will be described, and the application of this method to study glucose metabolism in different settings of Diabetes will be discussed.

Keywords: hepatic glucose metabolism; deuterated water

> 1. O METABOLISMO DA GLICOSE E DO GLICOGÉNIO NA DIABETES. AS BASES DA HIPERGLICÉMIA E HIPOGLICÉMIA EM TERMOS DE FLUXOS METABÓLICOS

O fígado é o órgão chave da regulação do metabolismo da glicose, mantendo os níveis da concentração da glicose plasmática dentro dos níveis fisiológicos, produzindo ou armazenando glicose, consoante o estado nutricional.

Durante o período de jejum, a concentração da glicose plasmática diminui, o glicogénio hepático é hidrolisado com formação de G6P (glicose-6-fosfato) que é convertida em glicose e libertada na circulação sanguínea. Esta

CORRESPONDÊNCIA

John G. Jones
Grupo de Controlo Metabólico
Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra (CNC)
UC-Biotech | Biocant Park | Núcleo 04 Lote 8
3060-197 Cantanhede
Portugal
Telef./Phone: + 351 231 249 170
E-mail: john.griffithjones@gmail.com

via de produção de glicose designada por glicogenólise é suplementada pela neoglicogénese que sintetiza glicose *de novo* a partir de precursores não glicosídicos. As contribuições da neoglicogénese e da glicogenólise na produção endógena de glicose após uma noite em jejum num adulto saudável são aproximadamente iguais ⁽¹⁾. Durante um período de jejum prolongado, a quantidade de glicogénio armazenado diminui e a contribuição da neoglicogénese na produção hepática de glicose aumenta relativamente à da glicogenólise ⁽²⁻⁴⁾. Após uma refeição, a hidrólise do glicogénio é inibida e a síntese de glicogénio é ativada. Assim, o fígado deixa de ter um papel de produtor de glicose (que ocorre durante o período de jejum) para passar a ter um papel de armazenador de glicose repondo os níveis de glicogénio. O glicogénio hepático pode ser sintetizado diretamente a partir da molécula intacta de glicose, pela designada via direta, ou pela via indireta, onde a glicose é primeiro metabolizada em trioses e seguidamente metabolizada em G6P pela via neoglicogénica ⁽⁵⁾. A via indireta permite que precursores neoglicogénicos como por exemplo o glicerol, também contribuam para sintetizar glicogénio. Quando a glicose foi ingerida como parte de uma refeição por pessoas saudáveis, a contribuição da via direta aumenta com o tempo: a contribuição desta via determinada num intervalo de 2-4 horas após a refeição foi de aproximadamente 46%, aumentando para aproximadamente 68% no intervalo de 4-6 horas ⁽⁶⁾. Após a ingestão de uma sobrecarga de glicose depois de um período de jejum noturno, a contribuição da via direta aumenta com a dose ingerida. Enquanto a contribuição da via direta foi de aproximadamente 50% ^(7,8) depois da ingestão de uma dose de 75 gramas de glicose, que corresponde à quantidade *standard* de uma prova de tolerância oral à glicose, a contribuição desta via foi de aproximadamente 64% com a ingestão de uma dose de 98 gramas ⁽⁹⁾. Os elevados valores iniciais da contribuição da via indireta poderão refletir a atividade neoglicogénica precedente à ingestão da refeição. Estes valores também demonstram que a atividade neoglicogénica persiste em pessoas saudáveis mesmo após uma refeição ^(3, 10, 11).

Alterações do Metabolismo Hepático da Glicose na Diabetes Tipo 1

As pessoas com Diabetes tipo 1 (DT1) com baixo controlo glicémico apresentam uma deficiente supressão da produção endógena de glicose após as refeições, insuficiente armazenamento de glicogénio hepático ao longo do dia e uma elevada produção endógena de glicose

durante o jejum noturno. A glicogenólise hepática é o mecanismo que rapidamente é mobilizado para aumentar a produção endógena de glicose numa situação de hipoglicémia. Um conteúdo baixo de glicogénio hepático e glicogenólise diminuída resultam numa insuficiente produção endógena de glicose para repor os níveis glicémicos ⁽¹²⁾. A homeostasia da glicose torna-se assim mais dependente da neoglicogénese em DT1 relativamente às pessoas saudáveis ⁽¹⁾. Um grupo DT1 com baixo controlo glicémico embora possuindo um conteúdo de glicogénio hepático em jejum semelhante ao do grupo controlo, mostrou que ao final do dia, após uma rotina diária normal com três refeições, sintetizou apenas 30% do que foi sintetizado pelo grupo controlo. Neste estudo, a contribuição da via indireta de síntese de glicogénio medida durante as primeiras 5 horas após o pequeno almoço foi superior à contribuição da via direta no grupo com DT1. Embora a contribuição da via direta tenha aumentado ao longo desse intervalo de tempo em ambos os grupos, o incremento desta contribuição foi menor nas pessoas com DT1 ⁽¹³⁾. Na DT1 algumas das deficiências dos fluxos do glicogénio hepático podem ser normalizadas com dieta e com terapia intensiva de insulina. Depois de estabelecido um bom controlo metabólico a longo prazo resultante de múltiplas injeções de insulina, as pessoas com DT1 são capazes de converter os hidratos de carbono da dieta em glicogénio numa taxa de fluxo semelhante à das pessoas saudáveis e os fluxos de produção endógena de glicose também podem ser normalizados. Embora esta terapia tenha mostrado que aqueles fluxos podem ser restabelecidos a níveis comparáveis aos do grupo controlo, a contribuição da via indireta manteve-se elevada em DT1, refletindo a atividade neoglicogénica aumentada nestes pacientes ⁽¹²⁾.

Alterações do Metabolismo Hepático da Glicose na Diabetes Tipo 2

Na diabetes tipo 2 (DT2) existe um estado de resistência à insulina onde o controlo do metabolismo insulino-dependente da glicose é pouco eficiente. A absorção da glicose está significativamente diminuída nos tecidos sensíveis à insulina resultando num aumento da concentração da glicose plasmática e a nível do fígado há uma produção elevada de glicose endógena durante o jejum e no estado pós-prandial e também uma capacidade reduzida de sintetizar glicogénio ⁽¹⁴⁾. A hiperglicémia em jejum está estritamente relacionada com o aumento da produção endógena de glicose nestes pacientes ^(15, 16). A neoglicogénese é elevada em DT2 con-

tando com a contribuição da maior disponibilidade de glicerol, um precursor neoglicogénico resultante do aumento da lipólise e da maior disponibilidade de aminoácidos neoglicogénicos⁽¹⁷⁾. Em DT2 com controlo moderado, a autorregulação hepática contribui para a regulação da produção endógena de glicose. O processo de autorregulação atua primeiramente no metabolismo do glicogénio⁽¹⁸⁾. Níveis elevados de G6P provenientes de níveis altos de glicose plasmática ativam a glicogénio sintetase de um modo independente da insulina resultando numa diminuição da glicogenólise e da produção endógena de glicose. O estímulo da síntese de glicogénio simultaneamente com o fluxo glicogenolítico, promove um ciclo entre a G6P e o glicogénio designado por “ciclo do glicogénio”, que previne a formação e libertação de glicose na corrente sanguínea. Após a ingestão de uma refeição, o armazenamento da glicose no fígado sob a forma de glicogénio é menor em DT2 do que em pessoas saudáveis^(15, 19). A resistência hepática à insulina resulta num fluxo de síntese de glicogénio lento, em níveis baixos de glicogénio armazenado e também numa deficiente supressão da produção endógena de glicose no estado pós absorptivo, com uma contribuição neoglicogénica elevada^(16, 20). A contribuição da via direta na síntese de glicogénio em T2D foi reportada como sendo semelhante à dos controlos⁽¹⁶⁾ no entanto outros estudos mostraram uma contribuição diminuída^(20, 21). Esta discrepância pode ser devido a diferenças das características metabólicas dos grupos de pacientes estudados, nomeadamente IMC e HbA_{1c}.

O Metabolismo Hepático da Glicose em Diabetes Tipo MODY 2 (*Maturity-Onset 2 of the Young*)

A diabetes tipo MODY é um subtipo da diabetes e existe em vários subgrupos. No subgrupo MODY 2, os pacientes apresentam hiperglicémia pós-prandial moderada devido a mutações autossómicas nas regiões codificadoras das isoformas hepática e pancreática do gene da glicoquinase. O conteúdo de glicogénio hepático nestes pacientes aumenta ao longo do dia, durante uma rotina diária que inclui três refeições. No entanto, no final do dia, este conteúdo é aproximadamente 70% inferior ao de um grupo controlo. Embora a contribuição da via direta na síntese de glicogénio aumente ao longo do dia, a contribuição da via indireta prevalece sobre a da via direta nestes pacientes⁽²²⁾. Estas alterações na síntese do glicogénio hepático podem ser devidas a uma baixa atividade da glicoquinase mutante, que resulta numa deficiente fosforilação da glicose em G6P, diminuindo a capacidade de sintetizar glicogénio pela via direta e

contribuindo para a ligeira hiperglicémia pós-prandial. A contribuição elevada da via indireta poderá ajudar a atenuar o efeito da mutação na síntese de glicogénio.

> 2. APLICAÇÃO DO MÉTODO DA ÁGUA DEUTERADA NO ESTUDO DA DIABETES

O método da água deuterada tem sido utilizado no estudo da Diabetes com o objectivo de determinar as alterações das contribuições fracionais dos fluxos neoglicogénicos e glicogenolíticos na produção endógena de glicose e as alterações das contribuições fracionais das vias de síntese de glicogénio nestes pacientes. Quando associado a um método de determinação do fluxo da produção endógena de glicose, os valores das contribuições fracionais da neoglicogénese e glicogenólise podem ser convertidos em valores absolutos. Os valores absolutos são obtidos por multiplicação dos valores fracionais pelo fluxo de produção de glicose⁽²³⁾. O método da água deuterada também pode ser utilizado para estudar o efeito de terapias que visam a normalização destes fluxos metabólicos.

O Quadro I mostra um resumo dos objetivos principais e conclusões de estudos do metabolismo da glicose em DT1 e DT2 em que foi utilizado o método da água deuterada.

> 3. COMO OS FLUXOS METABÓLICOS PODEM SER INTERPRETADOS PELA ANÁLISE DA MARCAÇÃO DA GLICOSE E DA UDP-GLICOSE APÓS A INGESTÃO DE ÁGUA DEUTERADA

a. Explicação Bioquímica – Importância da Quantificação dos Enriquecimentos Posicionais

Surgiu a necessidade de desenvolver um método para determinar a contribuição da neoglicogénese na produção endógena de glicose em humanos e que esse método pudesse ser utilizado em condições fisiológicas, como durante o período de jejum e em condições patológicas tal como na Diabetes. Landau *et al.* no desenvolvimento de um método que utiliza a água deuterada como marcador e que pode ser aplicado com segurança em estudos humanos^(3, 24).

O método da água deuterada foi desenvolvido com base num protocolo simples aplicado em estudos animais em que a água tritiada, um composto radioativo, foi usada como marcador. A quantificação da neoglicogénese baseou-se nas incorporações de tritium na posição 6 da glicose sintetizada a partir do piruvato e na posição 2 da glicose formada pela glicogenólise e neoglicogénese⁽²⁵⁾.

Quadro I - Método da água deuterada aplicada a estudos do metabolismo da glicose em DT1 e DT2. Resumo dos principais objetivos e resultados obtidos.

Jornal	Caraterísticas dos pacientes	Objetivo do estudo	Resultados principais
Hundal <i>et al.</i> Diabetes, 2000 ⁽⁴¹⁾	DT2, baixo controlo glicémico (n=7)	Quantificação das fontes de glicose endógena em jejum em associação com a taxa de produção endógena de glicose antes e depois de tratamento com metformina	A contribuição fracional da neoglicogénese foi semelhante antes e depois do tratamento com metformina. A taxa de fluxo neoglicogénico obtida por multiplicação da neoglicogénese fracional pela a taxa de produção endógena diminuiu com o tratamento
Boden <i>et al.</i> AJP, 2000 ⁽²³⁾	DT2, moderado (n=14) e baixo controlo (n=13) glicémico	Quantificação das fontes glicose endógena em jejum em associação com a taxa de produção endógena de glicose	A contribuição fracional da gliconeogénese em DT2 com controlo glicémico moderado foi semelhante à do controlo enquanto que em DT2 com baixo controlo foi superior. A taxa de fluxo neoglicogénico foi superior em DT2 com baixo controlo relativamente aos DT2 com controlo moderado e controlos saudáveis
Gastaldelli <i>et al.</i> Diabetes, 2000 ⁽⁴²⁾	DT2, obesos (n=28) e não obesos (n=9) Controlos obesos (n=12) e não obesos (n=6)	Quantificação fracional da neoglicogénese em jejum em associação com a taxa de produção endógena de glicose	Nos controlos não obesos, a contribuição fracional da neoglicogénese no período de jejum, foi significativamente inferior do que em DT2 e foi significativamente mais elevada quando associada com a obesidade e diabetes. A taxa de fluxo neoglicogénico foi mais elevada quando relacionada com obesidade e marcadamente mais elevada em DT2
Kunert <i>et al.</i> Diabetes, 2003 ⁽³⁵⁾	DT2, bom controlo glicémico (n=7)	Quantificação das fontes glicose endógena medidas ao longo do período de jejum.	DT2 contribuição da neoglicogénese aumentou ao longo do período de jejum e em valor superior aos controlos. A contribuição média da neoglicogénese foi superior em DT2
Gastaldelli <i>et al.</i> JCEM, 2004 ⁽⁴³⁾	DT2, controlo glicémico moderado (obesos (n=7) e não obesos (n=14)) e T2D baixo controlo glicémico (obesos (n=9) e não obesos (n=14))	Quantificação fracional da neoglicogénese em jejum em associação com a taxa de produção endógena de glicose	Em ambos os grupos de DT2 não obesos, a percentagem da neoglicogénese e o fluxo neoglicogenolítico foram mais elevados do que nos controlos não obesos mas semelhantes aos controlos obesos. A percentagem da neoglicogénese e o fluxo neoglicogenolítico foram mais elevados em DT2 associados com a obesidade comparando com os controlos obesos e não obesos
Jones <i>et al.</i> Diabetes, 2006 ⁽¹⁾	DT1, controlo glicémico moderado (n=8)	Quantificação das fontes glicose endógena em jejum e da síntese de glicogénio antes e depois do pequeno almoço	DT1 apresentaram menor contribuição da glicogenólise na produção endógena de glicose durante o período de jejum e menor contribuição da via direta na síntese de glicogenio após a refeição quando comparadas com controlos saudáveis
Kacerovsky <i>et al.</i> Diabetes, 2011 ⁽⁴⁴⁾	DT1, bom controlo glicémico com bomba subcutânea de insulina (n=10)	Quantificação das fontes glicose endógena em jejum em associação com a taxa de produção endógena de glicose	DT1 redução substancial da contribuição fracional e do fluxo da neoglicogénese, aproximando-se dos valores dos controlos saudáveis
Hernández <i>et al.</i> JCI, 2017 ⁽⁴⁵⁾	Insulino resistência temporariamente induzida em pessoas saudáveis (n=14)	Quantificação das fontes glicose endógena em jejum e após ingestão de óleo de palma, em associação com a taxa de produção endógena de glicose	A taxa da neoglicogénese hepática aumentou aproximadamente 70% após a ingestão de óleo de palma

Este protocolo não era indicado para ser usado em estudos humanos devido à elevada quantidade do composto radioativo necessária para atingir uma incorporação de marcação adequada para analisar as posições de interesse das moléculas de glicose. Nos primeiros estudos humanos que envolveram a ingestão de água deuterada, a fração da neoglicogénese na produção endógena de glicose foi determinada após jejum noturno e jejum prolongado em pessoas saudáveis e os enriquecimentos em deutério das posições da molécula de glicose foram analisados por espetrometria de massa.

A água deuterada é um marcador pouco dispendioso e pode ser administrado oralmente com segurança em humanos. A água deuterada equilibra-se rapidamente com a água corporal (BW) ou seja, com a água total existente no corpo. Os metabolitos cujos hidrogénios sejam provenientes da água corporal seja por troca ou adição, ficam enriquecidos com deutério. O enriquecimento em deutério da água corporal pode ser facilmente determinado numa pequena amostra de urina ou de plasma ⁽²⁶⁾. Uma vez em equilíbrio com a água corporal, o enriquecimento em deutério torna-se uniforme em todos os tecidos e não é afetado pela compartimentação metabólica do fígado.

Os níveis do enriquecimento em deutério da água corporal utilizados em estudos humanos variam de 0.3% a 0.5% e estes níveis são atingidos entre 3-4 horas depois da ingestão de uma dose inicial de 200-300 mililitros de água enriquecida com 99% de deutério. Durante um estudo em curso, o nível de enriquecimento da água corporal é mantido com a ingestão de água com 0.3-0.5% de deutério. Esta água de manutenção obtém-se por adição de 3-5,1 gramas de água deuterada a 99% a

aproximadamente um litro de água engarrafada. O esquema do protocolo utilizado na determinação das fontes de glicose plasmática em jejum e das fontes de síntese do glicogénio no estado pós-prandial está representado na Figura 1.

A G6P (G6P) hepática situa-se na interseção do metabolismo hepático da glicose e do glicogénio. Na presença de água deuterada, a incorporação de deutério numa dada posição da G6P assume-se que seja inteiramente dependente da adição ou da troca entre o hidrogénio da água corporal e o precursor metabólico que lhe dá origem. A informação sobre as fontes de produção da glicose plasmática pode ser obtida após a análise o enriquecimento em deutério de posições específicas na molécula de glicose isolada de uma amostra de sangue. As vias de produção endógena de glicose durante o jejum em presença de água deuterada e paracetamol estão representadas esquematicamente na Figura 2.

Durante o período de jejum e na presença de água deuterada, todas as moléculas de glicose plasmática produzidas por via endógena são marcadas na posição 2, devido ao equilíbrio G6P-F6P que é rápido e extenso e independentemente da sua fonte de produção ser o glicogénio ou a via neoglicogénica. Quando equilíbrio isotópico é atingido, isto é, quando já não há alteração da marcação dos metabolitos em estudo por troca/adição com a água corporal, a marcação da posição 2 da glicose plasmática é igual à da água corporal ⁽³⁾. Isto indica que a hidrólise da G6P é a única fonte de glicose plasmática. As moléculas de G6P provenientes da neoglicogénese além de serem marcadas na posição 2 também adquirem marcação na posição 5, devido a reações específicas a nível da triose-fosfato isomerase e da con-

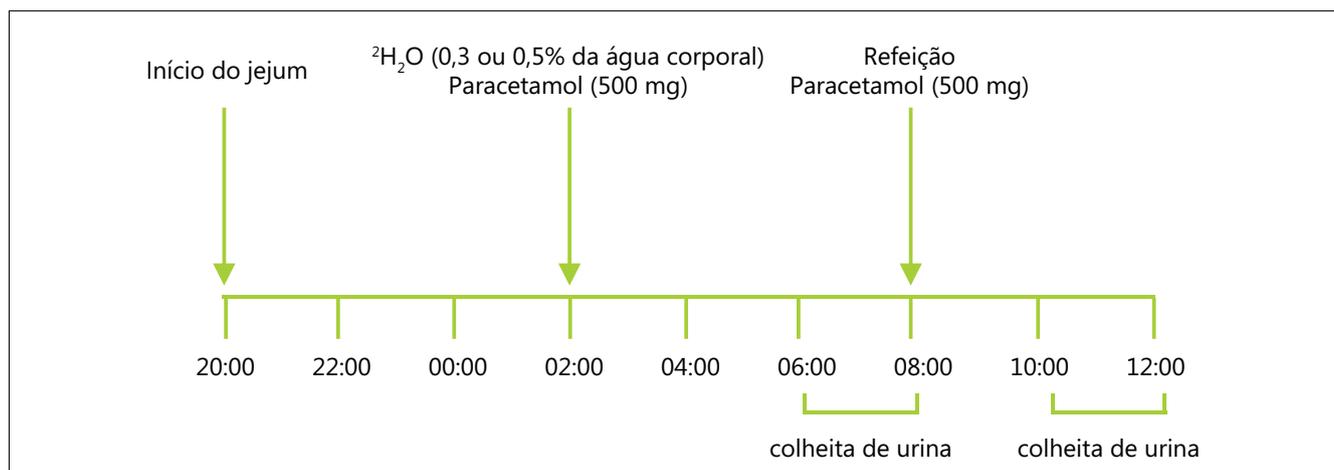


Figura 1 - Esquema do protocolo da ingestão de água deuterada e paracetamol para determinação das contribuições da neoglicogénese e glicogenólise na produção endógena de glicose durante o jejum e as contribuições das vias de síntese do glicogénio no estado pós-prandial.

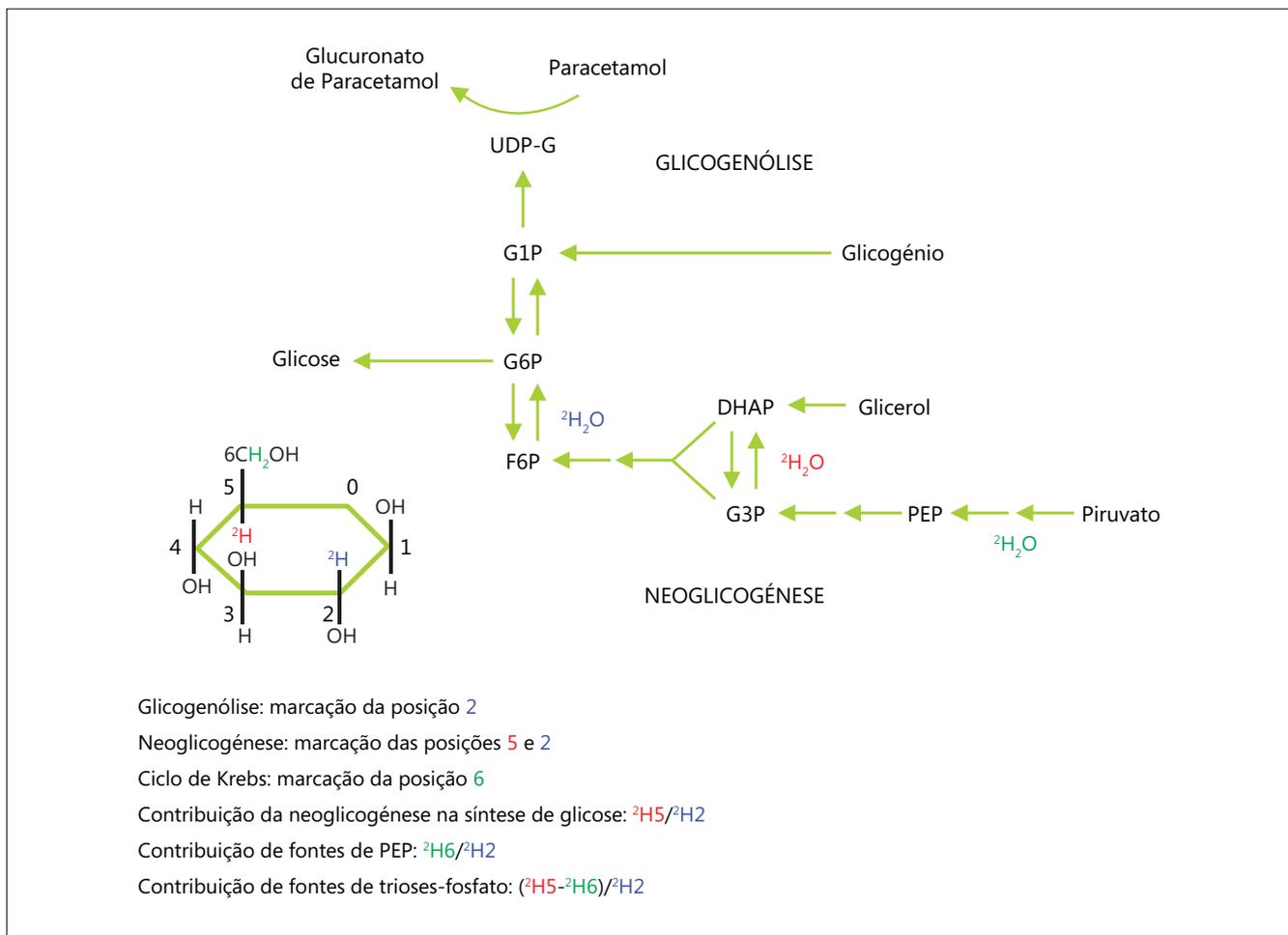


Figura 2 - Esquema das vias metabólicas de produção de glicose endógena durante o jejum, após a ingestão de água deuterada e paracetamol. Abreviaturas: G1P (glicose-1-fosfato); G6P (glicose-6-fosfato); F6P (frutose-6-fosfato); DHAP (dihidroxiacetona fosfato); PEP (fosfoenolpiruvato); G3P (gliceraldeído-3-fosfato) UDP-glicose (uridina difosfato-glicose); alguns metabolitos intermédios foram omitidos para simplificar a leitura.

versão do fosfoenol piruvato (PEP) em gliceraldeído-3-fosfato (G3P). Esta marcação é adquirida independentemente da fonte neoglicogénica ser o PEP ou fontes de trioses-fosfato tal como o glicerol. O PEP transforma-se em 2-fosfoglicerato que por sua vez se transforma em G3P com incorporação de deutério na posição 2 que vai corresponder à posição 5 da G6P formada pela via neoglicogénica. O G3P formado a partir da dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) por ação da triose fosfato isomerase também adquire marcação na sua posição 2 e consequentemente também contribui para a marcação da posição 5 da G6P. Sendo posição 5 da G6P marcada com deutério independentemente da sua fonte de produção ser o glicerol ou o PEP, representa a atividade neoglicogénica total e é calculada pela razão da marcação da posição 5 relativamente à da posição 2 (H5/H2) medida na glicose plasmática⁽³⁾. A contribuição da glicogenólise na produção de glicose endógena é cal-

culada por pelo valor ponderal relativamente à neoglicogénese (1-H5/H2).

A contribuição da neoglicogénese total pode ser subdividida na contribuição do PEP e do glicerol. As moléculas de G6P derivadas do PEP adquirem marcação com deutério nas duas posições 6 (6R e 6S) provenientes dos hidrogénios 3R e 3S do oxaloacetato enquanto que as moléculas de G6P provenientes do glicerol não adquirem marcação em nenhum dos hidrogénios 6. Assim, contribuição do PEP na neoglicogénese total é calculada pela razão H6/H2. Subtraindo a contribuição do PEP à contribuição da neoglicogénese total pode determinar-se a contribuição das fontes de trioses-fosfato (H5-H6)/H2⁽¹¹⁾. No período pós-prandial é sintetizado glicogénio. Após uma refeição e na presença de água deuterada todas as moléculas de G6P formadas pela via direta adquirem enriquecimento em deutério na posição 2 devido à reação G6P-F6P. A G6P formada pela via

indireta adquire marcação na posição 2 e também na posição 5 devido ao facto desta via ter uma contribuição neoglicogénica ⁽¹⁾.

b. Biópsia Química

A abordagem clássica na avaliação do metabolismo hepático incluía técnicas invasivas como a biópsia hepática e cateterização da veia hepática. Em humanos, o estudo direto dos enriquecimentos do glicogénio hepático não é um método viável porque envolve procedimentos invasivos podem ter um risco/benefício negativo.

O uso de marcadores providencia um meio para estudar os fluxos metabólicos hepáticos de forma não invasiva. No entanto estes estudos basearam-se no estudo da marcação da glicose plasmática em substituição de uma análise direta da glicose hepática. Uma vez que outros órgãos, nomeadamente o rim, podem contribuir para a formação da glicose plasmática, a análise do seu enriquecimento pode não representar o metabolismo hepático. Esta questão foi contornada com o uso de xenobióticos que se conjugam com metabolitos intermédios específicos do metabolismo hepático da glicose formando glucuronatos solúveis que são excretados na urina, funcionando assim, como uma "biópsia química" ^(27, 28). O paracetamol e o mentol são xenobióticos que se conjugam diretamente com a uridinadifosfato-glicose (UDP-G) com formação de glucuronato de paracetamol e glucuronato de mentol, respetivamente ^(28, 29). Estes agentes de "biópsia química" combinados com marcadores, providenciam um meio não invasivo de estudar o metabolismo hepático da glicose em humanos ⁽³⁰⁾ e determinar as contribuições das vias direta e indireta na síntese de glicogénio hepático ⁽¹⁾.

A parte glicosídica do glucuronato é derivada da parte glicosídica da UDP-G formada a partir da G6P e que é o precursor imediato do glicogénio. O padrão de marcação da G6P é refletido na UDP-G sendo a informação sobre a contribuição das vias direta e indireta obtida pela análise das posições 2 e 5 do glucuronato urinário.

O paracetamol tem sido o xenobiótico mais utilizado nestes estudos uma vez que uma dose terapêutica (500-1000 mg) é suficiente para obter na urina uma quantidade de glucuronato adequada para analisar a marcação em deutério das posições específicas.

Durante o jejum, o glicogénio é hidrolisado com formação de glicose mas persiste um fluxo residual no sentido da síntese de glicogénio, via G6P-G1P-UDP-G. O padrão de marcação da G6P é refletido na UDP-G e nos moléculas de glicose que formam o glicogénio. Após a ingestão de água deuterada e paracetamol, a análise da mar-

cação das posições 2 e 5 do glucuronato de paracetamol urinário informa sobre as contribuições da neoglicogénese e da glicogenólise na produção de glicose plasmática. No entanto, a análise do glucuronato não permite distinguir entre a neoglicogénese derivada do PEP ou do glicerol devido à perda dos hidrogénios 6 decorrente da sua formação ⁽²⁹⁾. As contribuições da glicogenólise e da neoglicogénese medidas na glicose plasmática e no glucuronato de paracetamol num grupo de voluntários saudáveis em jejum revelaram valores equivalentes ⁽²⁷⁾.

A equivalência da marcação da posição 2 do glucuronato e a da água corporal não se verifica no período pós-prandial ^(1, 31). Poderá ser devido a um recrutamento preferencial de G6P derivada da glicoquinase para sintetizar glicogénio, ou seja, uma preferência da glicose proveniente da dieta. Este recrutamento poderá ocorrer antes da G6P ter a oportunidade de ser convertida em F6P e de novo em G6Pisomerase. Este equilíbrio poderá ser mais lento relativamente à utilização na síntese de glicogénio da G6P derivada da fosforilação da glicose não marcada proveniente da dieta ⁽³²⁾. Estes mecanismos resultam numa redução do enriquecimento da posição 2 relativamente ao da BW. A contribuição da via indireta é calculada pela razão do enriquecimento em deutério da posição 5 relativamente ao da água corporal (H5/BW), uma vez que a razão H5/H2 subestima esta contribuição. A contribuição da via direta é calculada por (1-H5)/BW. A informação sobre as contribuições do PEP e do glicerol na via indireta não podem ser determinadas no glucuronato urinário.

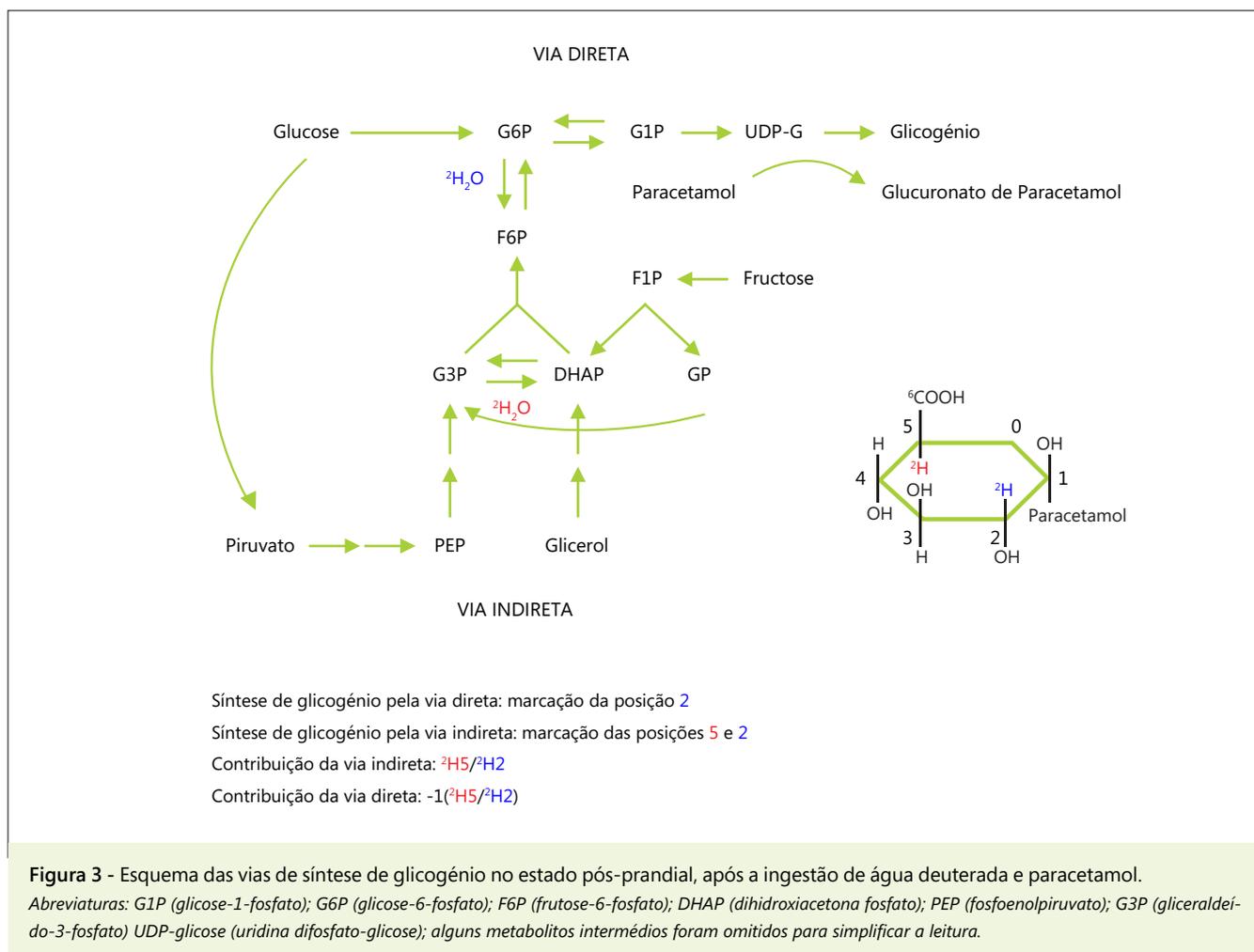
No período pós-prandial as vias glicogenolítica e neoglicogénica mantêm uma atividade residual e as suas contribuições na formação da glicose plasmática podem ser determinadas. Neste caso pode diferenciar-se a contribuição do PEP e do glicerol.

As vias de síntese de glicose plasmática durante o jejum após a ingestão de água deuterada e paracetamol estão representadas esquematicamente na Figura 2.

As vias de síntese do glicogénio hepático após uma refeição e ingestão de água deuterada e paracetamol estão representadas esquematicamente na Figura 3.

c. Métodos Analíticos para Quantificação dos Enriquecimentos Posicionais. Espectroscopia de Ressonância Magnética de Deutério e Espectrometria de Massa

Landau *et al.* determinaram pela primeira vez a neoglicogénese fracional em humanos após a ingestão de água deuterada analisando os enriquecimentos em deutério por espectrometria de massa. No primeiro estu-



do realizado, a neoglicogénese fracional foi determinada pela razão dos enriquecimentos das posições 6 e 2 da glicose plasmática⁽²⁴⁾. Se todas as moléculas de glicose plasmática formadas pela via neoglicogénica fossem formadas a partir do piruvato, o enriquecimento em deutério da posição 6 deveria igualar o da água corporal, o que não se verificou. Assim, razão H6/H2 substituiria a neoglicogénese fracional além de não incluir a contribuição neoglicogénica do glicerol. Landau et al. desenvolveram outro protocolo baseado no facto do hidrogénio ligado ao carbono 5 da glicose proveniente do metabolismo neoglicogénico do PEP e também do glicerol. Durante a glicogenólise, a glicose formada não adquire enriquecimento com deutério no carbono 5. Assim, a neoglicogénese fracional foi determinada pela razão do enriquecimento do hidrogénio do carbono 5 da glicose relativamente ao do carbono 2, ou da água corporal, no período de jejum⁽³⁾. Os marcadores isotópicos são mais pesados do que os seus homólogos encontrados na Natureza e a espetrome-

tria de massa deteta e quantifica a sua presença distinguindo as moléculas marcadas que são mais pesadas das moléculas não marcadas que são mais leves, no entanto, não é possível determinar diretamente a posição do isótopo na molécula. O conhecimento do enriquecimento isotópico de uma determinada posição apenas poderá ser determinada após a fragmentação da molécula em estudo. No entanto, esta fragmentação depende da estrutura química dessa molécula e pode não isolar a marcação desejada sendo necessário proceder a sínteses químicas. Os primeiros estudos dos enriquecimentos posicionais na determinação fracional da neoglicogénese desenvolvidos por Landau, embora baseados em conceitos simples, envolviam sínteses químicas muito demoradas e complexas para isolar o enriquecimento das posições pretendidas. Além da desvantagem destes procedimentos complexos serem de difícil implementação como análise de rotina em laboratórios clínicos, estes protocolos requerem um mínimo de 0,5 ml de plasma por amostra, tornando-os pouco aconselhados para estudos com crianças.

Chacko *et al.* desenvolveram um método para espectrometria de massa-cromatografia gasosa cujo procedimento laboratorial e analítico era mais simples do que os desenvolvidos por Landau. A glicose plasmática foi derivatizada de modo a obter um composto que depois fragmentado contivesse todas as posições marcadas da molécula de glicose, excepto a posição 2. O cálculo da contribuição da neoglicogénese baseia-se na média dos enriquecimentos em deutério das posições 1, 3, 4, 5, 6R e 6S da glicose relativamente ao enriquecimento da água corporal, considerado equivalente ao da posição 2. Além disso, é requerido um volume mais pequeno de amostra (25 µL de plasma) que o torna indicado para estudos em crianças pequenas. Este método é reproduzível mesmo quando a fração da neoglicogénese é baixa ⁽³³⁾. Em pessoas saudáveis após uma noite em jejum e jejum prolongado a neoglicogénese determinada por este método foi semelhante à obtida pela razão H5/H2 determinada por Landau *et al.* ⁽³⁾. No entanto, este método não é muito preciso, uma vez que considera semelhante o enriquecimento das várias posições da glicose, excepto o da posição 2, enquanto que Jones *et al.* reportou diferentes enriquecimentos em deutério nas várias posições da molécula de glicose por RMN de deutério ⁽³⁴⁾. O RMN de deutério foi desenvolvido e aplicado a diversos estudos do metabolismo da glicose em pessoas saudáveis e com T2D e T1D. A molécula de glicose apresenta um espectro de RMN de deutério complexo e com sinais sobrepostos pelo que é necessário proceder uma derivatização química para obter um composto que reflita a marcação das posições da glicose mas cujos sinais estejam bem separados para obter uma correta análise do espectro. Foi desenvolvido um composto para RMN de deutério mas os sinais das posições 5 e 6R apresentam-se sobrepostos. A análise baseia-se no pressuposto de que as marcações das posições 6R e 6S são equivalentes e assim, por subtração, é obtida a marcação da posição 5 ⁽³⁵⁾.

A derivatização de glicose em monoacetona glicose (MAG) é um procedimento muito mais simples de obter o enriquecimento em deutério das várias posições da glicose por RMN ⁽³⁶⁻³⁸⁾. Embora a análise por RMN seja menos sensível do que a espectrometria de massa, o que requer uma maior quantidade de amostra (aproximadamente 20 ml de sangue total) a informação completa sobre os enriquecimentos em deutério de todas as posições da glicose plasmática pode ser obtida da análise num único espectro de deutério após uma derivatização química simples ⁽³⁴⁾. No espectro de RMN de deutério de MAG, a intensidade de cada sinal medida relativamente a uma referência interna, é uma medição direta do nível de enriquecimento de uma dada posição ⁽³⁹⁾. A neogli-

cogénese fracional medida pela razão H5/H2 pode assim ser determinada após uma derivatização química simples e num só espectro de RMN de deutério. Foi observado que as intensidades dos vários sinais correspondentes às várias posições da MAG eram de aproximadamente 40-60% relativamente à da posição 2, refletindo a diluição destas posições devido à atividade glicogenolítica ⁽¹¹⁾. Esta metodologia é relativamente simples de implementar numa rotina hospitalar e pode ter uma potencial aplicação na identificação precoce de alterações da produção endógena de glicose. A determinação da contribuição das vias de síntese do glicogénio hepático a partir da análise por RMN dos enriquecimentos posicionais do glucuronato urinário também envolve a derivatização deste com formação de monoacetona glucuronolactona acetilada na posição 5 (MAGLA), um composto que reflete os enriquecimentos posicionais do glucuronato e que permite obter a informação num único espectro de RMN de deutério ⁽⁴⁰⁾. <

Conflito de interesses:

Os autores declaram que não existem conflitos de interesses

Fontes de Financiamento:

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT): Cristina Barosa (SFRH / BPD / 108526 / 2015) e por POCI-01-0145-FEDER-028147.

BIBLIOGRAFIA

1. Jones JG, Fagulha A, Barosa C, Bastos M, Barros L, Baptista C, *et al.* Noninvasive analysis of hepatic glycogen kinetics before and after breakfast with deuterated water and acetaminophen. *Diabetes*. 2006; 55: 2294-300.
2. Rothman DL, Magnusson I, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science*. 1991; 254: 573-6.
3. Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC. Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest*. 1996; 98: 378-85.
4. Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H, *et al.* Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*. 1999; 48: 292-8.
5. Newgard CB, Hirsch LJ, Foster DW, McGarry JD. Hepatic Glycogen-Synthesis in the Rat - a Direct or an Indirect Pathway. *Fed Proc*. 1983; 42: 2166.
6. Taylor R, Magnusson I, Rothman DL, Cline GW, Caumo A, Cobelli C, *et al.* Direct assessment of liver glycogen storage by C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects. *J Clin Invest*. 1996; 97: 126-32.

7. Napoli R, Capaldo B, Picardi A, Piscione F, Bigazzi MC, Dascia C, and Sacca L. Indirect pathway of liver glycogen synthesis in humans is predominant and independent of b-adrenergic mechanisms. *Clin Physiol*. 1992; 12: 641-52.
8. Delgado TC, Silva C, Fernandes I, Caldeira M, Bastos M, Baptista C, et al. Sources of hepatic glycogen synthesis during an oral glucose tolerance test: effect of transaldolase exchange on flux estimates. *Mag Reson Med*. 2009; 62: 1120-8.
9. Petersen KF, Cline GW, Gerard DP, Magnusson I, Rothman DL, Shuman GI. Contribution of net hepatic glycogen synthesis to disposal of an oral glucose load in humans. *Metab-Clin Exp*. 2001; 50: 598-601.
10. Chandramouli V, Ekberg K, Schumann WC, Kalhan SC, Wahren J, Landau BR. Quantifying gluconeogenesis during fasting. *Am J Physiol*. 1997; 273: E1209-E15.
11. Perdigoto R, Furtado AL, Porto A, Rodrigues TB, Geraldine C, Jones JG. Sources of glucose production in cirrhosis by (H₂O)-H-2 ingestion and H-2 NMR analysis of plasma glucose. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis*. 2003; 1637: 156-63.
12. Bischof MG, Bernroider E, Krssak M, Krebs M, Stingl H, Nowotny P, et al. Hepatic glycogen metabolism in type 1 diabetes after long-term near normoglycemia. *Diabetes*. 2002; 51: 49-54.
13. Hwang JH, Perseghin G, Rothman DL, Cline GW, Magnusson I, Petersen KF, et al. Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic subjects during mixed meal ingestion. A 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Invest*. 1995; 95: 783-7.
14. Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002; 5: 545-9.
15. Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A 13C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest*. 1992; 90: 1323-7.
16. Krssak M, Brehm A, Bernroider E, Anderwald C, Nowotny P, Man CD, et al. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53: 3048-56.
17. Chevalier S, Burgess SC, Malloy CR, Gougeon R, Marliss EB, Morais JA. The greater contribution of gluconeogenesis to glucose production in obesity is related to increased whole-body protein catabolism. *Diabetes*. 2006; 55: 675-81.
18. Gastaldelli A, Toschi E, Pettiti M, Frascerra S, Quinones-Galvan A, Sironi AM, et al. Effect of physiological hyperinsulinemia on gluconeogenesis in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001; 50: 1807-12.
19. Woerle HJ, Szoke E, Meyer C, Dostou JM, Wittlin SD, Gosmanov NR, et al. Mechanisms for abnormal postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290: E67-E77.
20. Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Johnson CM, Nair KS, et al. Effects of type 2 diabetes on the ability of insulin and glucose to regulate splanchnic and muscle glucose metabolism - Evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes*. 2000; 49: 272-83.
21. Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Johnson CM, Jensen M, et al. Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding - Additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes*. 2001; 50: 1351-62.
22. Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, et al. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest*. 1996; 98: 1755-61.
23. Boden G, Chen X, Stein TP. Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280: E23-30.
24. Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC. Use of 2H₂O for estimating rates of gluconeogenesis. Application to the fasted state. *J Clin Invest*. 1995; 95: 172-8.
25. Kuwajima M, Golden S, Katz J, Unger RH, Foster DW, McGarry JD. Active Hepatic Glycogen-Synthesis from Gluconeogenic Precursors Despite High Tissue-Levels of Fructose 2,6-Bisphosphate. *J Biol Chem*. 1986; 261: 2632-7.
26. Jones JG, Merritt M, and Malloy C.R. Quantifying tracer levels of 2H₂O enrichment from microliter amounts of plasma and urine by 2H NMR. *Mag Reson Med*. 2001; 45: 156-8.
27. Barosa C, Jones JG, Rizza R, Basu A, Basu R. Acetaminophen glucuronide and plasma glucose report identical estimates of gluconeogenesis and glycogenolysis for healthy and prediabetic subjects using the deuterated water method. *Mag Reson Med*. 2013; 70: 315-9.
28. Ribeiro A, Caldeira MM, Carvalheiro M, Bastos M, Baptista C, Fagulha A, et al. Simple measurement of gluconeogenesis by direct 2H NMR analysis of menthol glucuronide enrichment from 2H₂O. *Mag Reson Med*. 2005; 54: 429-34.
29. Burgess SC, Weis B, Jones JG, Smith E, Merritt ME, Margolis D, et al. Noninvasive evaluation of liver metabolism by H-2 and C-13 NMR isotopomer analysis of human urine. *Anal Biochem*. 2003; 312: 228-34.
30. Delgado TC, Barosa C, Castro MMCA, Geraldine CFGC, Bastos M, Baptista C, et al. Sources of hepatic glucose production by 2H₂O ingestion and Bayesian analysis of 2H glucuronide enrichment. *Mag Reson Med*. 2008; 60: 517-23.
31. Barosa C, Silva C, Fagulha A, Barros L, Caldeira MM, Carvalheiro M, et al. Sources of hepatic glycogen synthesis following a milk-containing breakfast meal in healthy subjects. *Metabolism*. 2012; 61: 250-4.
32. Martins FO, Delgado TC, Viegas J, Gaspar JM, Scott DK, O'Doherty RM, et al. Mechanisms by which the thiazolidinedione troglitazone protects against sucrose-induced hepatic fat accumulation and hyperinsulinaemia. *Br J Pharmacol*. 2016; 173: 267-78.
33. Chacko SK, Sunehag AL, Sharma S, Sauer PJJ, Haymond MW. Measurement of gluconeogenesis using glucose fragments

- and mass spectrometry after ingestion of deuterium oxide. *J Appl Physiol*. 2008; 104: 944-51.
34. Jones JG, Perdigoto R, Rodrigues TB, Geraldes C. Quantitation of absolute H-2 enrichment of plasma glucose by H-2 NMR analysis of its monoacetone derivative. *Mag Reson Med*. 2002; 48: 535-9.
35. Kunert O, Stingl H, Rosian E, Krssak M, Bernroider E, Seebacher W, et al. Measurement of fractional whole-body gluconeogenesis in humans from blood samples using H-2 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Diabetes*. 2003; 52: 2475-82.
36. Schleucher J, Vanderveer P, Markley J. L. and Sharkey, T. D. Intramolecular deuterium distributions reveal disequilibrium of chloroplast phosphoglucose isomerase. *Plant Cell Env*. 1999; 22: 525-33.
37. Schleucher J, Vanderveer PJ, Sharkey TD. Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant Physiol*. 1998; 118: 1439-45.
38. Jones JG, Sherry AD, Malloy CR. Analysis of 2H enrichment in all positions of plasma glucose by 2H NMR spectroscopy following infusion of 2H2O (Abstract). *Proc Intl Soc Magn Res Med*. 2000; 8:876.
39. Jones J, Barosa C, Gomes F, Carina Mendes A, Delgado T, Diogo L, et al. NMR Derivatives for quantification of 2H and 13C-enrichment of human glucuronide from metabolic tracers. *J Carbohydr Chem*. 2006; 25: 203-17.
40. Jones J, Kahl S, Carvalho F, Barosa C, Roden M. Simplified analysis of acetaminophen glucuronide for quantifying gluconeogenesis and glycogenolysis using deuterated water. *Anal Biochem*. 2015; 479: 37-9.
41. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000; 49: 2063-9.
42. Gastaldelli A, Baldi S, Pettiti M, Toschi E, Camastra S, Natali A, et al. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes*. 2000; 49: 1367-73.
43. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Buzzigoli E, Mahankali S, Ferrannini E, et al. Separate contribution of diabetes, total fat mass, and fat topography to glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 3914-21.
44. Kaceroovsky M, Jones J, Schmid AI, Barosa C, Lettner A, Kaceroovsky-Bielez G, et al. Postprandial and fasting hepatic glucose fluxes in long-standing type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60: 1752-8.
45. Hernandez EA, Kahl S, Seelig A, Begovatz P, Irmeler M, Kupriyanova Y, et al. Acute dietary fat intake initiates alterations in energy metabolism and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2017; 127: 695-708.