

Filipa Vanessa Carvalho Simões

**Análise não Invasiva da
Acetil-CoA Hepática por Biópsia Química**

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Filipa Vanessa Carvalho Simões

Análise não Invasiva da Acetil-CoA Hepática por Biópsia Química

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, área de
especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente**

Orientadores

Professora Dr^a Madalena Caldeira

Professor Dr John Jones

Setembro de 2011

Universidade de Coimbra

*“Live as if you were to die tomorrow,
Learn as if you were to live forever”*

Mahatma Gandhi

Agradecimentos/ Acknowledgements

Quero expressar aqui a minha gratidão para com todos aqueles que em algum momento se cruzaram comigo neste percurso.

À *Professora Doutora Madalena Caldeira* os conhecimentos que me transmitiu e as palavras de incentivo na superação dos obstáculos. Acima de tudo estou grata pelo carinho, simpatia e palavras amigas com que sempre me recebeu!

To *Doctor John Jones* I would like to express my gratitude for your scientific guidance and constant support throughout these years. Thank you for your willingness and help in all scientific questions.

Às minhas *colegas de laboratório*, Joana Barra, Rita Gonçalves, Cristina Barosa e Francisca Soares quero agradecer o espírito de inter-ajuda, a excelente companhia nas longas horas de trabalho no laboratório e os momentos convívio.

Gostaria ainda de deixar algumas palavras a todos aqueles que foram meus colegas e companheiros na Universidade de Coimbra nalgum momento. Aos meus *colegas de curso*, companheiros de “Queimas” e parceiros de trabalho, obrigado por todos os momentos!

A todos os meus *amigos* agradeço a constante presença e a força que vem dos momentos e das alegrias que partilhamos juntos!

Ao *Carlos*, ouvinte atento das minhas inquietações, desânimos e sucessos! Obrigado pelo apoio e valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho e por estares sempre ao meu lado quando mais precisei! Obrigado por me fazeres rir quando só me apetecia chorar!

A toda a *minha família*, pela força que me inculiram e a motivação que sempre me deram!

Aos *meus Pais*, e ao *meu irmão*, um grande e especial obrigado, pelo permanente e incondicional apoio, por terem cuidado de me dar as melhores condições ao seu alcance, me inculirem o gosto pelo estudo e realização profissional, e me incentivarem sempre perante os desafios...quero partilhar convosco a alegria de os conseguir vencer continuamente!

Sem o vosso apoio nada disto seria possível! Obrigado!

Filipa

Índice

Agradecimentos/Acknowledgements	<i>i</i>
Índice	<i>iii</i>
Lista de Siglas e Abreviaturas	<i>v</i>
Resumo	<i>vi</i>
Abstract	<i>ix</i>
Capítulo 1. Introdução	2
1. Introdução	2
1.1. Diabetes <i>mellitus</i>	3
1.2. Metabolismo	4
1.2.1. Metabolismo dos hidratos de carbono: glucose e frutose	6
1.2.2. Metabolismo dos lípidos e a “ <i>de novo lipogénese</i> ”	11
1.3. A Acetil-CoA no Metabolismo	14
1.4. Acetilação de Xenobióticos	16
1.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear	17
1.5.1. Utilização de xenobióticos para análise e quantificação da acetil-CoA hepática a partir de marcadores isotópicos	22
1.5.1.1. Quantificação do enriquecimento em ^2H da acetil-CoA hepática administrando $^2\text{H}_2\text{O}$	24
1.5.1.2. Quantificação da acetil-CoA hepática utilizando marcadores metabólicos de ^{13}C	25
1.6. Principais objectivos do estudo	27
Capítulo 2. Materiais e Métodos	28
2.1. Materiais	29
2.2. Métodos	30
2.2.1. Tratamento dos animais	30
	<i>iii</i>

2.2.1.1. Condições de alojamento	30
2.2.1.2. Protocolos experimentais desenvolvidos	30
2.2.2. Isolamento e purificação do N-Ac-PABA eliminado na urina	33
2.2.2.1. Análise das amostras de N-Ac-PABA por HPLC	36
2.2.3. Análise e caracterização das amostras por espectroscopia de ^1H e ^2H RMN	36
2.2.3.1. Análise e caracterização das BW por espectroscopia de ^2H RMN	37
2.2.3.2. Análise do N-Ac-PABA por espectroscopia de ^1H e ^2H RMN	39
2.2.3.3. Análise do N-Ac-PABA por espectroscopia de ^1H e ^{13}C RMN	40
Capítulo 3. Resultados e Discussão	42
3.1. Estudo de várias soluções padrão para quantificação do enriquecimento em ^2H do N-Ac-PABA	42
3.2. Recolha do N-Ac-PABA presente em urina de ratos <i>Wistar</i> e ratinhos C57/Bl6: rendimento da reacção e períodos de recolha das amostras	43
3.3. Purificação do N-Ac-PABA presente nas amostras de urina por HPLC	44
3.4. Análise e quantificação do enriquecimento em ^2H e ^{13}C do N-Ac-PABA presente nas amostras de urina	46
Capítulo 4. Conclusão	59
Trabalho Futuro	61
Capítulo 5. Referências Bibliográficas	62

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ac-PABA	Ácido Acetil p-aminobenzóico
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
Ácido Trifluoracético	TFA
ALA	Alanina
AN	Abundância Natural
BW	<i>Body Water</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMSO	Dimetil-Sufóxido
DNL	<i>De Novo Lipogenese</i>
GTT	Glucose Tolerance Test
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
² H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Deutério
² H ₂ O	Água Deuterada
PABA	Ácido p-aminobenzóico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Solid-Phase Extraction
TLC	Thin Layer Chromatography
TMS	Tetrametilsilano
[U- ¹³ C]glucose	Glucose marcada com ¹³ C em todos os carbonos
[1- ¹³ C]glucose	Glucose marcada com ¹³ C no carbono 1
[U- ¹³ C]frutose	Frutose marcada com ¹³ C em todos os carbonos

Resumo

Nas últimas décadas a incidência de resistência à insulina e de diabetes tipo 2 têm aumentado a nível mundial, principalmente devido a alterações nos estilos de vida e na dieta. As acções da insulina no metabolismo hepático são fundamentais para promover o armazenamento de glucose e de lípidos. A diabetes é caracterizada em parte por defeito e/ou insuficiência na acção da insulina hepática, que se reflectem em níveis anormais de glucose e de lípidos no sangue.

O fígado desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase corporal da glucose e dos lipídios e na forma como estes são utilizados na gestão energética. Como tal, alterações hepáticas do metabolismo da glucose e dos lipídios poderão ocupar um papel central no desenvolvimento de patologias como a diabetes *mellitus*. Em particular estas condições são caracterizadas por níveis elevados de triglicerídeos hepáticos. O aumento na síntese de TG no fígado, ou “*de novo lipogénese*” (DNL) tem sido apontado como um factor que contribui para o aumento dos TG hepáticos, e por isso, há um grande interesse no desenvolvimento de métodos para caracterizar a DNL.

A acetil-CoA hepática é um produto comum do metabolismo de muitos nutrientes, tais como hidratos de carbono, ácidos gordos e alguns aminoácidos, e é o substrato inicial para a DNL. O enriquecimento da acetil-CoA em ^{13}C a partir de nutrientes específicos permite retirar informação acerca da sua contribuição para a DNL. O enriquecimento da acetil-CoA em ^2H , obtido a partir da $^2\text{H}_2\text{O}$, em relação ao dos triglicerídeos, informa relativamente à contribuição total da DNL para a formação de triglicerídeos hepáticos. Assim, a quantificação dos enriquecimentos em ^2H e ^{13}C da acetil-CoA fornece informações fundamentais relativamente às contribuições de diferentes metabolitos para a DNL, bem como acerca da contribuição total da DNL para os níveis de triglicerídeos hepáticos.

A acetil-CoA está presente no organismo em concentrações micromolares, sendo difícil de isolar dos tecidos do fígado e, portanto, relativamente inacessível para análise do enriquecimento a partir de marcadores metabólicos. No entanto, considerando o papel do fígado na desintoxicação e depuração de moléculas não-naturais (xenobióticos), a acetil-CoA é utilizada como dador do grupo acetil para a acetilação destes compostos na etapa inicial de desintoxicação e remoção. O ácido p-aminobenzóico (PABA) é um xenobiótico que é rapidamente acetilado seguido de

eliminação do produto ácido acetil p-aminobenzóico (N-Ac-PABA) na urina. Assim, o enriquecimento da acetil-CoA hepática pode ser determinado a partir da análise não invasiva do N-Ac-PABA presente na urina. Os principais objectivos deste trabalho foram desenvolver procedimentos de recolha e purificação do N-Ac-PABA em roedores, seguido do desenvolvimento da análise por espectroscopia de RMN de ^2H e de ^{13}C da porção acetil da molécula.

A farmacocinética da eliminação do N-Ac-PABA na urina em ratos e ratinhos foi determinada a fim de otimizar a dosagem de PABA a ser administrada a cada uma das espécies e a desenvolver protocolos para determinação do enriquecimento da acetil-CoA durante diferentes estados nutricionais. Em estudos onde foi administrada $^2\text{H}_2\text{O}$ a roedores mantidos em jejum ou em condições normais de alimentação foram desenvolvidos métodos de RMN para quantificação do enriquecimento em ^2H do grupo acetil do N-Ac-PABA. Pela análise do N-Ac-PABA eliminado na urina por ^2H RMN demonstrou-se que o enriquecimento da acetil-CoA é aproximadamente igual ao da *body water* e que em diferentes estados nutricionais é constante.

Em ratinhos foi demonstrada a equivalência entre o enriquecimento da acetil-CoA e da BW e, assim, verifica-se que o enriquecimento em ^2H da BW pode utilizado como substituto para o da acetil-CoA hepática simplificando a análise da DNL com $^2\text{H}_2\text{O}$.

Para o desenvolvimento de métodos para a determinação da contribuição de vários substratos para formação de acetil-CoA hepática diferentes espécies de roedores foram injectadas com marcadores metabólicos de ^{13}C na presença de PABA, e foi determinado o enriquecimento em ^{13}C do N-Ac-PABA eliminado. Foi realizado em ratinhos um teste de tolerância à glucose, com [U- ^{13}C]glucose e o enriquecimento em ^{13}C da acetil-CoA hepática foi determinado pela análise por ^{13}C RMN do N-Ac-PABA eliminado em diferentes intervalos após injeção. Apesar de dose injectada de glucose ser relativamente alta a sua contribuição para a acetil-CoA formada nas condições do estudo foi surpreendentemente baixa (~2.0%). Este resultado pode estar relacionado com a fraca indução na via glicolítica hepática provocada por uma única dose de glucose em animais em jejum, porém os dados demonstram os limites de detecção e sensibilidade do método de ^{13}C RMN, desde que seja recuperada uma quantidade suficiente de N-Ac-PABA na urina. Num estudo piloto final, administrando uma dose constituída por uma mistura de 50/50 de [U- ^{13}C]frutose e [1- ^{13}C]glucose foi possível determinar, ainda que baixos, o enriquecimento em ^{13}C da acetil-CoA formada a partir

dos diferentes substratos. Estes dados podem reflectir uma combinação da baixa indução enzimática da via glicolítica e uma depressão aguda nos níveis de ATP hepático pela fosforilação da frutose.

Pode concluir-se, mesmo nesta fase inicial, que o estudo do enriquecimento da acetil-CoA hepática a partir de nutrientes específicos, como a glucose e a frutose, pode ser mais eficaz através na incorporação de marcadores metabólicos de ^{13}C na comida dos animais durante um período prolongado, em vez de serem administrados numa dose individual.

Abstract

In recent years incidences of insulin resistance and type 2 diabetes disease have increased worldwide, due in large part to lifestyles changes and diet.

The actions of insulin on liver metabolism are essential to promote glucose and lipids storage. Diabetes is characterized in part by defective and/or insufficient hepatic insulin actions and this is reflected in abnormal hepatic glucose and lipid metabolism.

The liver plays a key role in whole-body glucose and lipid homeostasis and how these fuels are utilized for energy. As such changes, in hepatic glucose and lipid metabolism play a central role in the development of diseases such as diabetes *mellitus*. In particular, these conditions are characterized by elevated hepatic triglyceride levels. Increased synthesis of triglycerides within the liver, or “*de novo lipogenesis*” (DNL) has been implicated as a contributing factor to elevated hepatic triglycerides hence there is high interest in developing more informative methods for characterizing DNL.

Hepatic acetyl-CoA is a common metabolic product of many nutrients including carbohydrates, short-chain fatty acids, and certain amino acids, and is the initial substrate for “*de novo lipogenesis*” (DNL). Acetyl-CoA ^{13}C -enrichment from specific nutrient precursors inform their contributions to DNL. Acetyl-CoA ^2H -enrichment from deuterated water ($^2\text{H}_2\text{O}$) in relation to that of the triglyceride product informs the total DNL contribution to hepatic triglyceride. Hence, quantification of acetyl-CoA ^{13}C and ^2H -enrichments provide key information on the contributions of different metabolites to DNL as well as informing the total DNL contribution to hepatic triglyceride levels.

Acetyl-CoA is present in micromolar concentrations and is difficult to isolate from liver tissue and is therefore relatively inaccessible for analysis of enrichment from metabolic tracers. However, as part of the liver’s role in detoxification and clearance of non-natural (xenobiotic) molecules, it is utilized as an acetyl donor for the acetylation of these compounds, an initial step in their detoxification and removal. *P*-aminobenzoic acid (PABA) is a xenobiotic that is rapidly acetylated followed by clearance of the N-acetyl-PABA product into urine. Thus, the enrichment of hepatic acetyl-CoA can be noninvasively inferred from analysis of urinary N-acetyl PABA. The principal aims of this work were to develop procedures for N-acetyl PABA harvesting and purification from rodents, followed by development of ^2H and ^{13}C NMR analysis of ^2H and ^{13}C -enrichment of the acetyl moiety.

The pharmacokinetics of urinary N-Ac-PABA elimination in rats and mice were determined in order to optimize the dosage of PABA and to develop protocols for interrogating acetyl-CoA enrichment during different nutritional states. In studies where fed and fasted rodents were administered with $^2\text{H}_2\text{O}$ (deuterated water), NMR methods were developed for quantifying the acetyl ^2H -enrichment levels of N-Ac-PABA. Analysis of the urinary N-Ac-PABA by ^2H NMR it was demonstrated that acetyl-CoA enrichment approached that of body water and was constant over different nutritional states. In mice, the equivalence of acetyl-CoA and urine water enrichments was demonstrated thereby verifying that urine water ^2H -enrichment can be used as a surrogate for that of hepatic acetyl-CoA and considerably simplifying the assay of DNL in mice with $^2\text{H}_2\text{O}$.

To develop methods to determine the contributions of various substrates to hepatic acetyl-CoA, rodents were administered with ^{13}C metabolic tracers in the presence of PABA and ^{13}C -enrichment of N-acetyl PABA was determined. A glucose tolerance test conducted with $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glucose was performed in mice and hepatic acetyl-CoA ^{13}C -enrichment was sampled via ^{13}C NMR analysis of urinary N-Ac-PABA at intervals following the load. Despite the relatively high glucose load, its contribution to hepatic acetyl-CoA under the study conditions was surprisingly low, (~2.0%). This may be related to poor induction of hepatic glycolytic pathway expression by a single glucose load in fasted animals but the data demonstrates the sensitivity and detection limits of the ^{13}C NMR method - provided that sufficient N-Ac-PABA is recovered. A final pilot study with a load consisting of a 50/50 mixture of $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ fructose and $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ glucose revealed even lower acetyl-CoA enrichments from both substrates. This may reflect a combination of poor glycolytic enzyme induction and an initial acute depression of hepatic ATP levels by the phosphorylation of fructose. It may be concluded even at this early stage that the study of hepatic acetyl-CoA enrichment from specific nutrients such as glucose or fructose may be more effective by incorporating the ^{13}C -tracers into the animal's food over a prolonged period rather than presenting them as single loads.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Todas as formas de vida dependem do fluxo de matéria e energia através das vias metabólicas celulares e durante estes processos a ingestão de nutrientes e a libertação de produtos excretados deve ocorrer de forma a manter um estado de equilíbrio dinâmico. Quando este equilíbrio sofre algum tipo de perturbação podem surgir diversas doenças metabólicas associadas. Para o seu conhecimento e efeitos de diagnóstico é fundamental conhecer os princípios básicos inerentes ao conjunto de reacções químicas, que ocorrem simultaneamente em qualquer célula viva num processo denominado *metabolismo*.

O fígado é um órgão central no contexto do equilíbrio e gestão da energia e nutrientes e como tal, desempenha um papel importante no metabolismo de todo o corpo. A glucose é uma fonte universal de energia para as células do organismo, e o fígado, em animais superiores, é responsável tanto pela sua produção durante estados de jejum, como pela sua eliminação e armazenamento em situações normais de alimentação ^[1].

O metabolismo da glucose é regulado, entre outros factores, pela insulina (hormona segregada pelo pâncreas). Quando a produção desta hormona e/ou a sua acção são deficientes, estamos perante uma perturbação metabólica designada diabetes *mellitus* (DM).

Os níveis de glucose sanguínea (glicémia) vão por sua vez condicionar o metabolismo interdependente de outros nutrientes – lípidos e proteínas. No centro da interligação entre estas diferentes vias metabólicas encontra-se uma molécula simples constituída por duas unidades de carbono, designada de acetil-CoA. Consequentemente, em estudos de marcação isotópica de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, a acetil-CoA pode ser marcada por precursores isotópicos de todas as três fontes de formação.

Assim, clinicamente é extremamente importante estabelecer um método de amostragem intracelular da acetil-CoA, a fim de determinar a sua actividade específica como precursor metabólico e os diferentes fluxos metabólicos onde se apresenta como composto central.

1.1. Diabetes *mellitus*

A Diabetes *mellitus* (DM) constitui uma perturbação metabólica que actualmente afecta cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo considerada um problema de saúde pública ^[2].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve a DM como uma “desordem metabólica de múltiplas etiologias, caracterizada por hiperglicémia crónica com distúrbios no metabolismo de hidratos de carbono, lípidos, gordura e proteínas, resultando em defeitos na secreção ou acção da insulina” ^[2].

A OMS prevê que em 2030 mais de 366 milhões de pessoas serão afectadas pela diabetes, estando o seu crescimento fortemente associado não só ao estilo de vida sedentário, mas também a dietas alimentares incorrectas e ainda à expressão genética da doença ^[2].

A classificação corrente da DM é baseada nos estados clínicos bem como na etiologia da doença. A diabetes tipo 1 (T1D) caracteriza-se por um défice de insulina, devido à destruição das células β do pâncreas por processos auto-imunes ou idiopáticos. Apenas cerca de 1 em 20 pessoas diabéticas têm T1D, a qual se apresenta mais frequentemente entre jovens e crianças e é conhecida como diabetes *mellitus* insulino-dependente ou diabetes infantil ^[2]. A diabetes tipo 2 (T2D) tem um mecanismo fisiopatológico complexo no qual há uma diminuição na resposta dos receptores de glucose presentes no tecido periférico à insulina, levando ao fenómeno de resistência à insulina. As células β do pâncreas aumentam a produção de insulina e, ao longo dos anos, a resistência à insulina acaba por levar as células beta à exaustão. A T2D é aquela que apresenta maior incidência, afectando 85-95% dos doentes diabéticos em todo o mundo ^[2].

Os tipos de diabetes *mellitus* apresentados constituem as formas básicas de diabetes, e enquanto existem numerosas terapêuticas para a T2D, o tratamento para a T1D baseia-se completamente na administração de insulina exógena. Com a administração de insulina (também em alguns casos de T2D) é prevenida a hiperglicémia, quando é obtido um controlo metabólico, adiando as complicações relacionadas com a diabetes e obtendo-se benefícios para a qualidade de vida dos pacientes ^[3].

O relatório da OMS a partir de 2006 recomenda como critérios de diagnóstico para a diabetes as concentrações de: glicémia de jejum $\geq 7,0$ mM (126 mg/dL) ou

glucose plasmática $\geq 11,1$ mM (200 mg/dL) após OGTT (teste oral de tolerância à glucose, onde é ingerida uma dose de 75g de glucose após jejum) ^[3].

A amostragem da acetil-CoA hepática e a sua quantificação permitirão obter informações que serão fundamentais para o controlo metabólico da DM.

1.2. Metabolismo

O metabolismo é o conjunto de todas as transformações químicas que ocorrem nos organismos vivos. É uma actividade contínua que ocorre através de uma série de reacções, catalisadas por enzimas, que constituem as diferentes vias metabólicas. Cada uma das etapas consecutivas de uma via metabólica produz uma alteração química específica, geralmente a remoção, transferência ou adição de um átomo ou grupo funcional, onde o produto de uma reacção é utilizado como reagente na reacção seguinte. O termo metabolismo intermediário é aplicado frequentemente para caracterizar as actividades combinadas de todas as vias metabólicas que relacionam precursores, metabolitos e produtos de baixo peso molecular ^[4,5].

As reacções metabólicas podem ser classificadas de acordo com o princípio de adição ou partição molecular em anabolismo e catabolismo respectivamente. O anabolismo é o conjunto de reacções metabólicas de síntese que utilizam a energia libertada pelo catabolismo, em seres heterotróficos, ou pela fotossíntese, em organismos autotróficos, para sintetizar moléculas de maiores dimensões e mais complexas a partir de moléculas mais simples ^[5].

O anabolismo (ou biossíntese) pode ser dividido em três etapas fundamentais: a síntese ou mobilização de precursores (ex: aminoácidos), a activação desses precursores a formas reactivas utilizando a energia resultante da hidrólise do ATP, e por último a formação de moléculas de maior complexidade, como proteínas, a partir destes precursores activados. Normalmente, as vias anabólicas consomem equivalentes redutores, geralmente na forma de NADH, o que leva a que o estado de oxidação médio do carbono do produto de anabolismo seja menor que o dos seus precursores ^[4].

As reacções do catabolismo (ou degradação) são responsáveis pela conversão de moléculas complexas em moléculas mais simples, produzindo grandes quantidades de energia livre (pela síntese de ATP) ^[5].

Uma das principais características do catabolismo é a capacidade de converter diversas substâncias tais como lípidos, proteínas e hidratos de carbono, em

intermediários comuns, que são depois metabolizados numa via oxidativa central. Quando o catabolismo supera, em actividade, o anabolismo, o organismo perde peso (períodos de jejum ou doença), mas quando o anabolismo supera o catabolismo, o organismo cresce ou ganha peso. Quando os dois processos se encontram em equilíbrio, diz-se que o organismo se encontra em equilíbrio dinâmico ^[5].

Na relação entre estas duas faces do metabolismo destacam-se vias metabólicas importantes como a glicólise (secção 1.1.1), na qual ocorre a oxidação incompleta da glucose e consequentemente a geração de ATP; a gluconeogénese, responsável pela síntese de glucose a partir de moléculas mais pequenas, para posterior utilização pelos vários órgãos; o ciclo de Krebs (ou do ácido cítrico) onde ocorre a oxidação da acetil-coenzima A (acetil-CoA) com vista à obtenção de energia; a fosforilação oxidativa onde se verifica a eliminação dos electrões libertados na oxidação da glucose e da acetil-CoA; a via das pentoses-fosfato, onde ocorre a síntese de pentoses e a obtenção de poder redutor (sob a forma de NADH) para algumas reacções anabólicas; o ciclo da ureia em que se dá a eliminação da amónia sob formas menos tóxicas; a β -oxidação de ácidos gordos, na qual os ácidos gordos são transformados em acetil-CoA, para posterior utilização no ciclo de Krebs; e a cetogénese que corresponde à formação de moléculas energéticas alternativas, designadas de corpos cetónicos. Grande parte da energia libertada neste processo pode ser armazenada na célula sob a forma de ATP ^[5,6].

A relação entre as várias vias depende da sua regulação enzimática (a enzima que catalisa uma etapa reguladora numa via metabólica é, em geral, o local de controlo de maior importância), do perfil metabólico característico de cada órgão e do controlo hormonal ^[7].

Diversos compostos, como a acetil-CoA, podem interligar várias vias metabólicas, de síntese ou de catabolismo, rotulando-se por isso de compostos anfibólicos, o que transcreve também a capacidade de coexistirem em simultâneo ou em alternância nas diferentes vias metabólicas ^[5].

As diferentes vias envolvidas no metabolismo estão bem distribuídas entre os diferentes compartimentos celulares e os diferentes órgãos do corpo, que possuem funções metabólicas e habilidades distintas ^[7]. Um dos órgãos de maior importância no organismo é o fígado, que é o centro de muitas das principais vias metabólicas ^[8]. A sua localização estratégica para receber os nutrientes do sangue, após terem sido absorvidos no trato intestinal, e a sua organização estrutural adaptada a todas as suas funções, permite-lhe ser responsável pela transformação de inúmeras substâncias, tais como

aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos e outras moléculas (como xenobióticos), tornando-se, desta forma, uma grande máquina para produzir moléculas energéticas e recursos de armazenamento ^[4].

Devido a todas as suas características o fígado pode ser adjectivado como o responsável pela manutenção de condições fisiológicas constantes (homeostase). Este órgão desempenha um papel singular no controlo do metabolismo dos hidratos de carbono, mantendo os níveis de concentração de glucose, e também na homeostase lipídica. Em situações de super produção simultânea de glucose e lípidos pelo fígado, é estimulada a secreção de insulina pelas células β do pâncreas, o que pode provocar um aumento da resistência à insulina ^[9].

1.2.1. Metabolismo dos Hidratos de Carbono: Glucose e Frutose

Os hidratos de carbono são a principal fonte de energia alimentar em todo o mundo. São ingeridos em alimentos como os cereais, raízes, tubérculos, leguminosas, vegetais, frutos e produtos lácteos ^[6,7].

Estes compostos orgânicos são constituídos por carbono, hidrogénio e oxigénio, que geralmente seguem a fórmula empírica $[C(H_2O)]_n$, sendo $n \geq 3$ ^[6,7].

Existem três classes de hidratos de carbono distintas. Os monossacarídeos, que possuem um reduzido número de átomos de carbono, sendo os mais importantes as pentoses ($C_5H_{10}O_5$) e as hexoses ($C_6H_{12}O_6$), são relativamente pequenos, solúveis em água e não sofrem hidrólise. Os dissacarídeos, que são hidratos de carbono resultantes da união entre duas moléculas de monossacarídeo, por meio de uma ligação glicosídica, formada pela perda de uma molécula de água, e os polissacarídeos, que são moléculas grandes, às vezes ramificadas, formadas pela união de mais de dez monossacarídeos ligados em cadeia, constituindo, assim, um polímero de monossacarídeos, geralmente de hexoses ^[7].

Os efeitos da utilização de frutose na dieta no metabolismo lipídico e da glucose têm sido áreas activas de pesquisa durante os últimos anos. Em estudos de alimentação controlada, a frutose tem sido utilizado para elevar os níveis de triglicéridos em indivíduos saudáveis e diabéticos. O potencial do consumo crónico de açúcares para aumentar a lipogénese também tem sido o foco em estudos de “over-feeding” documentando aumentos significativos na *de novo lipogénese* (DNL) ^[10].

Metabolismo da Glucose

O nível homeostático de glucose corporal é mantido pelo controlo dos ciclos diários de alimentação/jejum em coordenação com o consumo e produção de glucose corporal.

Após ingestão de hidratos de carbono, a glucose é absorvida e entra no fígado onde uma porção de aproximadamente 20% é directamente armazenada na forma de glicogénio, e a restante entra em circulação para consumo em tecidos periféricos ^[11].

O aumento do nível de glucose plasmática promove a secreção de insulina pelas células β do pâncreas, induzindo a captação de glucose periférica e, ao mesmo tempo, promovendo a síntese de glicogénio hepático (forma de armazenamento celular) e suprime a produção de glucose pelo fígado. Contrariamente, quando o nível de glucose plasmática desce promove a secreção de uma outra hormona, o glucagon, pelas células α pancreáticas, que possui função contrária à insulina, fazendo com que o fígado liberte glucose, armazenada na forma de glicogénio, através de um processo designado glicogenólise, ficando disponível para entrar em processos de oxidação e consequente extracção de ATP ^[11].

De uma forma geral podemos apontar três vias metabólicas principais para a glucose (Figura 1.1):

- Armazenamento (como polissacarídeo);
- Oxidação pela via das pentoses-fosfato, originando ribose-5-fosfato para a síntese de ácidos nucleicos, e de NADPH para processos de redução;
- Oxidação pela via da glicólise, originando piruvato e providenciando ATP e intermediários metabólicos de outras vias.

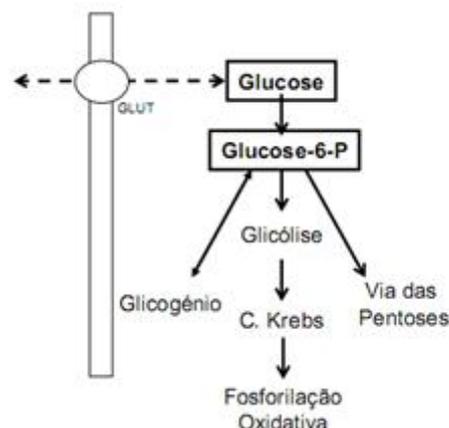
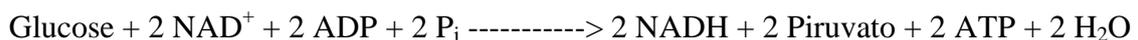


Figura 1.1. Esquema representativo das diversas vias metabólicas que a glucose pode seguir após entrada no fígado.

Após a absorção a glucose presente no sangue é rapidamente extraída pelo fígado, sendo a sua entrada nos hepatócitos mediada pelo transportador GLUT e dependente de estímulo pela insulina. Uma das vias que a glucose pode seguir, é a glicólise, que consiste numa série de dez reacções químicas, catalisadas por enzimas, nas quais uma molécula de glucose vai ser degradada em duas moléculas de um composto de três carbonos, o piruvato ^[4]. Durante a sequência de reacções, uma parte da energia livre, proveniente da degradação da glucose, vai gerar duas moléculas de ATP e duas de NADH por cada molécula de glucose. Este processo é o caminho central no catabolismo da glucose e é de uma importância vital para inúmeros organismos, alguns dos quais têm neste processo, a sua única fonte de energia metabólica.

É comum dividir a glicólise em duas fases distintas: a fase de preparação e a fase de oxi-redução, correspondendo cada uma delas a cinco reacções químicas. Na primeira fase gastam-se duas moléculas de ATP em duas fosforilações; esta fase acaba com a formação de duas trioses, duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, que resultam da clivagem da glucose. Na fase de oxi-redução ocorre um retorno do investimento de duas moléculas de ATP da fase anterior: vão ser formadas quatro moléculas de ATP (através da fosforilação de ADP), para além de duas moléculas de NADH, por cada molécula de glucose. Esta fase termina com a formação de piruvato ^[4,5].

A equação geral da glicólise é a seguinte:



Esta equação pode ser separada em dois processos distintos: por um lado a conversão de glucose a piruvato, uma reacção exergónica, e por outro a formação de ATP a partir de ADP e Pi, reacção endergónica.

Em condições aeróbias o piruvato é oxidado, por uma reacção de descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo piruvato-desidrogenase (PDH), originando o grupo acetil da acetil-CoA (libertando-se dióxido de carbono) que irá posteriormente entrar no ciclo de Krebs ou integrar o mecanismo de biossíntese de ácidos gordos ^[5,7].

O piruvato pode também sofrer carboxilação a oxaloacetato por acção da piruvato carboxilase – esta reacção introduz carbonos adicionais no ciclo de Krebs e é o primeiro passo para a conversão do piruvato em glucose pela via da gluconeogénese. A

actividade da piruvato carboxilase e da piruvato desidrogenase é altamente regulada pelos estados hormonal e nutricional ^[4].

Metabolismo da Frutose

Enquanto a glucose é o principal produto da digestão do amido e do glicogénio, duas outras hexoses são também proeminentes produtos da digestão, a galactose, obtida da hidrólise da lactose e a frutose, obtida a partir de frutas e da hidrólise da sacarose ^[12].

A frutose é um monossacarídeo ($C_6H_{12}O_6$) que pode ser obtido, na sua forma livre, pela ingestão de frutas, ou como constituinte da sacarose, a qual é hidrolisada pela enzima sacarase (obtendo-se uma molécula de frutose e outra de glucose). Este monossacarídeo difere da glucose pela presença de um grupo carbonilo na posição 2 da cadeia carbonada, ao contrário da glucose que apresenta um grupo carbonilo na posição 1 da cadeia carbonada (Figura 1.2) ^[12].

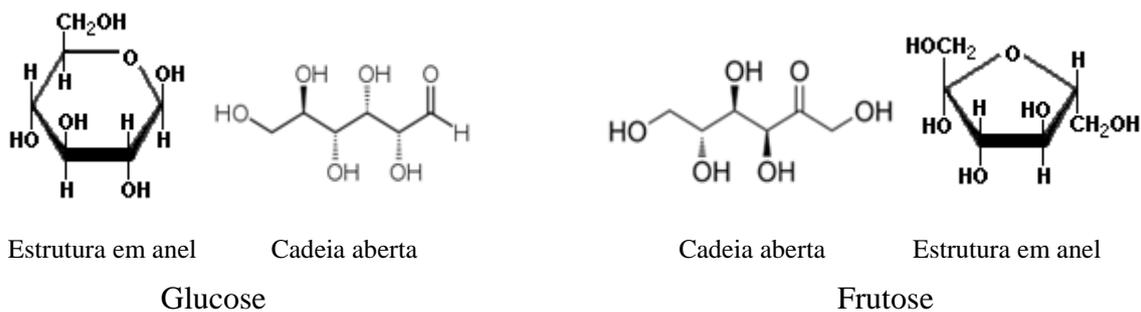


Figura 1.2. Formas de estrutura das moléculas de glucose e frutose, em cadeia aberta e em anel (> 99% das moléculas em solução). Adaptado da ref ^[7].

Tal como a glucose, a frutose é metabolizada pela via glicolítica, no entanto, as etapas iniciais do metabolismo da frutose são diferentes, utilizando um conjunto de enzimas específicas ^[13].

Após a absorção a frutose presente no sangue é rapidamente extraída pelo fígado, onde a sua entrada no hepatócito é mediada pelo transportador GLUT 2, não havendo, ao contrário do que acontece no metabolismo da glucose, gasto de energia ou dependência de estímulo pela insulina. Nos hepatócitos, a frutose é rapidamente fosforilada no carbono 1, numa reacção mediada pela frutoquinase, enzima específica para degradação da frutose, ou no carbono 6, numa reacção mediada pela hexoquinase.

Uma deficiência hereditária na enzima frutoquinase leva a uma condição rara, benigna, designada frutossúria hereditária ^[14].

A frutose 1-fosfato sofre clivagem em gliceraldeído e di-hidroxiacetona-fosfato numa reacção mediada pela enzima frutose 1-fosfato aldolase. A di-hidroxiacetona-fosfato é transformada em gliceraldeído 3-fosfato pela triose-fosfato isomerase, e o gliceraldeído é fosforilado pela enzima triose cinase, formando gliceraldeído 3-fosfato. As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato obtidas são posteriormente incorporadas na via da glicólise (Figura 1.3), seguindo as etapas de reacções descritas acima para o metabolismo da glucose, tendo como produto final o piruvato, que por acção do complexo PHD é oxidado, originando o grupo acetil da acetil-CoA. ^[4,5].

De forma alternativa, as moléculas de gliceraldeído 3-fosfato podem ser convertidas em glucose e glicogénio pela via da gluconeogénese. Os factores que controlam a direcção do fluxo de carbono derivado da frutose para glucose/glicogénio ou acetil-CoA e lipogénese estão longe de serem totalmente compreendidos, mas envolvem uma complexa interacção entre hormonas (insulina e glucagon), níveis de metabolitos de energia (ATP, AMP) e factores de transcrição para enzimas de vias metabólicas ^[4,12].

A frutose é diferente da glucose na medida em que a sua fosforilação não é regulada pelos estados nutricionais e hormonais. Paradoxalmente, este facto resulta numa diminuição rápida e significativa do ATP após ingestão de uma dose de frutose ^[15].

Entre outras coisas, e em contraste directo com uma dose de glucose, a ingestão de frutose aumenta o apetite e promove a ingestão de alimentos, o que resulta em estados de superalimentação ^[16].

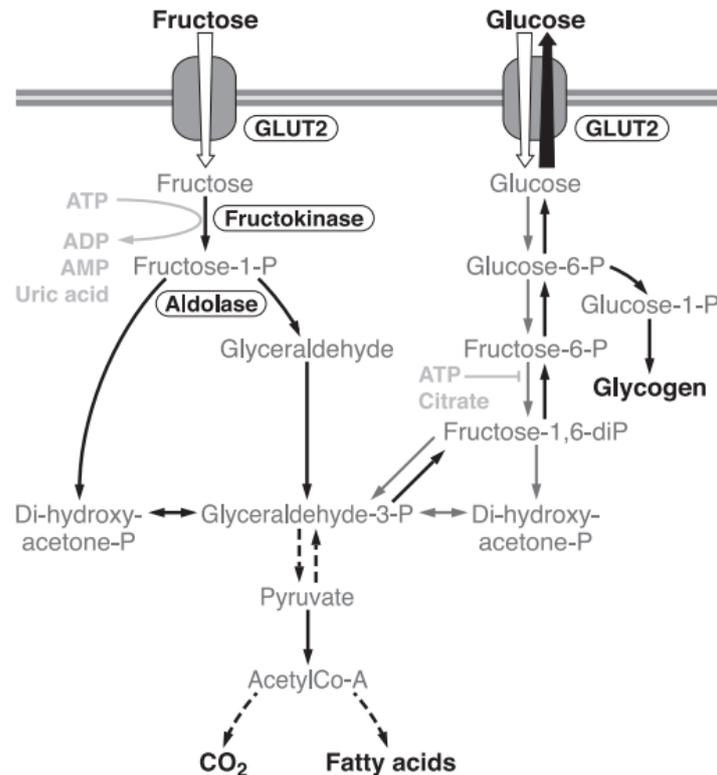


Figura 1.3. Esquema ilustrativo do metabolismo da frutose nas células hepáticas. Incorporação do metabolismo da frutose na via glicolítica ^[14].

Pelas considerações referidas pode afirmar-se que, um consumo excessivo de frutose leva a uma saturação da via glicolítica, potenciando a formação de elevadas quantidades de acetyl-CoA, o que aumenta a DNL, provocando acumulação de gorduras no tecido adiposo ^[7].

1.2.2. Metabolismo dos lípidos e a “*de novo lipogénese*”

Os lípidos definem um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário de outras classes de compostos não são caracterizadas por possuírem grupos funcionais comuns, mas sim pela sua baixa solubilidade em água e outros solventes polares. São vulgarmente conhecidos como gorduras e as suas propriedades físicas relacionam-se com a natureza hidrofóbica das suas estruturas ^[5]. Biologicamente os lípidos desempenham funções indispensáveis para a estrutura e metabolismo celular. Uma dieta rica em lípidos é essencialmente composta por triglicerídeos (TG), aproximadamente 90%, que são a principal fonte de armazenamento de energia metabólica em humanos.

Os TG são compostos por três cadeias de ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol ^[7].

A maior parte dos TG são armazenados em células específicas, os adipócitos, no entanto, fracções relativamente pequenas encontram-se noutros tecidos do corpo, como o músculo e as células hepáticas. Esta última, conhecida como gordura ectópica, pode interferir com a regulação dos metabolismos dos TG e da glucose ^[17].

O fígado, como já foi referido anteriormente, possui um papel importante na regulação dos TG e da glucose, mantendo o equilíbrio necessário entre eles. A oxidação dos TG e da glucose é realizada de forma inversa - quando os níveis de glucose são elevados a oxidação de gorduras é inibida e vice-versa ^[17].

Não existem dados que provem se é o metabolismo hepático dos TG que desencadeia alterações no metabolismo hepático da glucose ou vice-versa, mas a acumulação de TG no fígado tal como os níveis elevados no sangue está fortemente associada ao aumento da prevalência de doenças como a obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares ^[17].

Para que exista uma regulação dos níveis de lípidos no organismo deverá ocorrer um equilíbrio entre o conteúdo total da energia da dieta com a energia que os animais necessitam. Nas situações de ingestão de excesso de calorías esse excesso é convertido em reservas, que serão posteriormente utilizadas em casos de défice de energia. Em conclusão, existem lípidos que estão constantemente a ser oxidados para satisfazer necessidades energéticas, e outros a ser sintetizados e armazenados ^[4].

Numa situação pós-pandrial o fígado utiliza a glucose excedente da síntese de glicogénio para sintetizar os TG pelo mecanismo de “*de novo lipogénese*”. Na DNL os TG são sintetizados a partir de precursores como a glucose e aminoácidos, no citoplasma das células (essencialmente nos hepatócitos), numa reacção complexa na qual a cadeia de ácidos gordos é alongada pela adição sequencial de unidades de dois carbonos provenientes da acetil-CoA e ocorre a esterificação de três cadeias de ácidos gordos por adição de uma molécula de glicerol (Figura 1.4) ^[7].

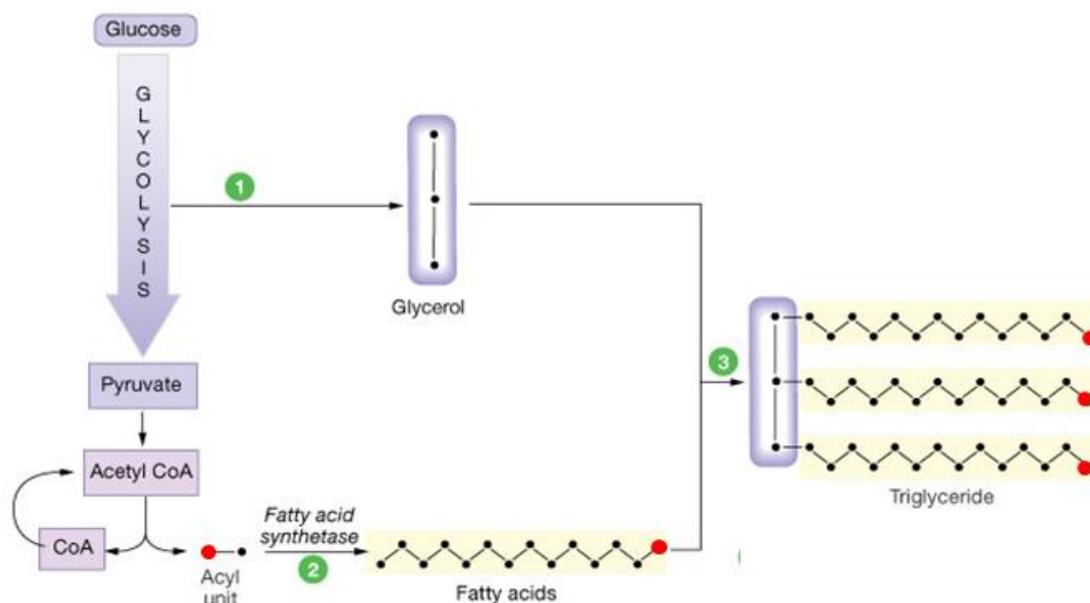


Figura 1.4. Esquema ilustrativo do mecanismo de biossíntese de triglicerídeos (DNL).

Nos TG formados, como pode ser observado na Figura 1.4, os grupos metilo terminais derivam directamente do grupo metilo terminal da molécula acetil-CoA.

O principal precursor da acetil-CoA é o piruvato, que apresenta trocas extensivas entre os seus hidrogénios e os hidrogénios da BW, e assume-se que sendo os hidrogénios do grupo metilo da acetil-CoA lábeis, trocarão extensivamente com os hidrogénios da BW. Com base nesta potencialidade, utilizando um marcador isotópico como a água deuterada, a percentagem de deutério na BW será equivalente à percentagem de deutério nos hidrogénios do grupo metilo da acetil-CoA hepática, que por sua vez será igual à percentagem de deutério dos hidrogénios do grupo metilo dos ácidos gordos formados na DNL^[18].

De modo a quantificar com rigor a DNL e a sua contribuição para o metabolismo hepático dos TG torna-se necessário determinar a percentagem de incorporação de deutério na acetil-CoA, pois caso não se comprove a troca extensiva entre os hidrogénios da BW e os hidrogénios metílicos da acetil-CoA a contribuição da DNL na formação de TG será sobrestimada^[18].

Em situações de deficiência energética, como em casos de jejum prolongado, a maioria dos tecidos é capaz de utilizar os ácidos gordos como fonte de energia^[7]. No período pós-absortivo (que tem seu início ao final da absorção intestinal e pode variar conforme a composição da refeição) a oxidação de ácidos gordos aumenta em resposta

às adaptações metabólicas/hormonais ocorridas, como diminuição da concentração sanguínea de glucose, redução da síntese e secreção de insulina, aumento da concentração plasmática de glucagon e aumento da actividade da enzima lipase ^[7].

Estas adaptações diminuem a captação e oxidação de glucose pelos tecidos periféricos (muscular e adiposo) e, em consequência, aumentam a oxidação de ácidos gordos nestes tecidos ^[5,7]. O aumento da oxidação de lipídios durante o período pós-absortivo é acompanhado pela inibição da síntese de ácidos gordos, através da diminuição da actividade da enzima acetil-CoA carboxilase no tecido adiposo e no fígado, responsável por converter acetil-CoA em malonil-CoA, intermediário da síntese de ácidos gordos ^[7].

Os ácidos gordos são degradados por oxidação numa sequência repetitiva de reacções que produzem moléculas de acetil-CoA e libertam energia, num mecanismo designado por β -oxidação. Este processo é contrário à DNL, uma vez que esta última sintetiza ácidos gordos que são armazenados ^[5,7].

Nas mitocôndrias, os ácidos gordos são degradados pela oxidação com a remoção sucessiva de fragmentos de dois carbonos na forma de acetil-CoA, posteriormente oxidada a CO₂ no ciclo do ácido cítrico. Em cada ciclo da β -oxidação, forma-se um mol de acetil-CoA, um de FADH₂ e um de NADH. No fígado, a energia liberada pela β -oxidação é utilizada para dirigir a gluconeogénese ^[5,7].

1.3. A Acetil-Coenzima A no metabolismo

Pelas considerações feitas até aqui entende-se que a acetil-CoA é um precursor metabólico localizado num ponto central estratégico, que realiza a ligação entre o metabolismo catabólico e anabólico.

Esta molécula é produzida pelo catabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e aminoácidos, sendo ao mesmo tempo o precursor para a síntese de lípidos incluído o colesterol, energia e corpos cetónicos (Figura 1.5) ^[17].

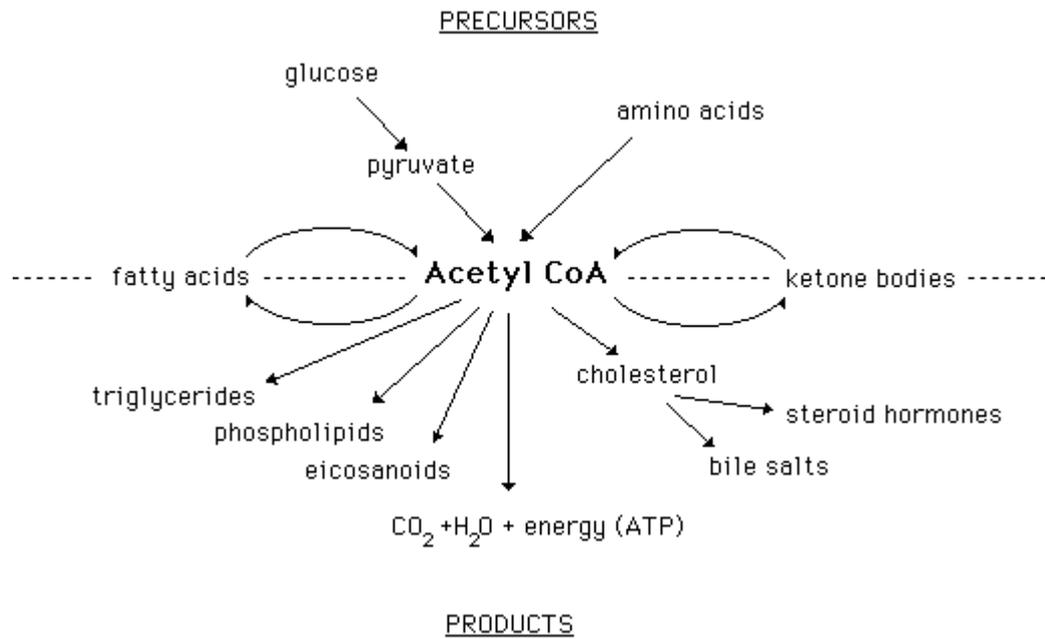


Figura 1.5. Esquema representativo da interação das várias vias metabólicas e da posição central da acetil-CoA no metabolismo, adaptado da ref ^[19].

A coenzima A (CoA) consiste num grupo β-mercaptoetilamina unido, por uma ligação amida, à vitamina ácido pantotênico, a qual por sua vez, está ligada à porção 3'-fosfoadenosina por uma ponte pirofosfato. O grupo acetilo junta-se à CoA, ligando-se como um tioester ao fragmento sulfidrilo do grupo β-mercaptoetilamina. A CoA funciona, portanto como um carregador de acetilo e outros grupos acilo ^[7].

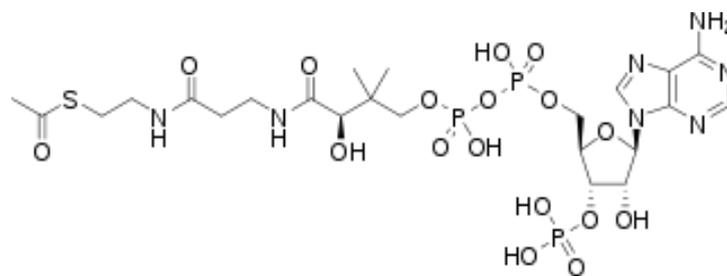


Figura 1.6. Estrutura química da molécula de acetil-CoA.

O precursor imediato para a acetil-CoA oriunda do metabolismo dos hidratos de carbono é o piruvato, produto da via da glicólise. Esta é formada a partir do piruvato por descarboxilação oxidativa, catalisada por um complexo multienzimático denominado piruvato-desidrogenase (PDH).

Uma outra via para formação da molécula é a β -oxidação de ácidos gordos, na qual o carbono β do ácido gordo é oxidado, formando acetil-CoA [7].

Devido às suas características e ao papel que desempenha na interligação de diversas vias metabólicas, seria de grande valor a existência de um método de amostragem intracelular da acetil-CoA, a fim de determinar a sua actividade específica como precursor metabólico e portanto os diferentes fluxos metabólicos onde se apresenta como composto central. No entanto a sua análise directa é inviável, devido a esta ser uma molécula de baixa concentração, muito instável e de grande estrutura, onde facilmente ocorrem quebras de ligações [4,20].

A existência desta molécula no fígado faz dela precursor intermediário para as reacções de acetilação de uma grande variedade de compostos, como drogas e xenobióticos [21].

1.4. Acetilação de Xenobióticos

O meio químico activo do fígado é reconhecido pela sua capacidade de desintoxicar e excretar compostos xenobióticos. As reacções de acetilação são das possíveis vias para a sua eliminação, ocupando uma posição de destaque nos mecanismos de acção de um grande grupo de compostos (inactivação de drogas e xenobióticos e a síntese de outros derivados).

A acetil-CoA presente nas células hepáticas serve de precursor intermediário para estas reacções de acetilação, permitindo através do estudo dos compostos acetilados obter, de uma forma não invasiva, conhecimento sobre a acetil-CoA [21].

O PABA, também conhecido como vitamina Bx, é conhecido pelo seu papel essencial na produção de ácido fólico e pela sua forte absorção de radiação na região do ultravioleta, devido ao qual foi utilizado durante muito tempo na composição de loções para protecção da radiação solar [22]. Este composto é geralmente considerado como não-tóxico e muitos complexos vitamínicos contendo PABA (geralmente 25-100 mg/comprimido) estão disponíveis no mercado como suplementos alimentares [23].

O metabolismo do PABA ocorre predominantemente por acetilação e conjugação com a glicina no fígado, para formar, respectivamente, os metabolitos N-Ac-PABA (aproximadamente 40%) e ácido para-aminohipúrico [24,25].

O processo de acetilação do PABA ocorre pela acção da enzima *N*-acetiltransferase, que catalisa a ligação do grupo metilo da acetil-CoA ao grupo amina

do PABA, formando o N-Ac-PABA (Figura 1.7). Este metabolito, na forma inactiva, é posteriormente eliminado na urina, sendo possível assim a sua detecção e análise [23].

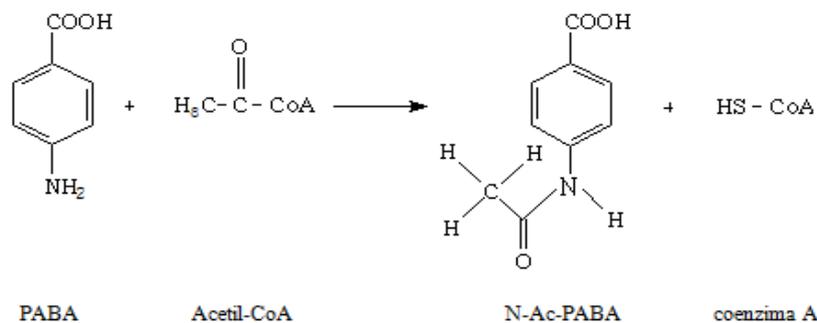


Figura 1.7. Reacção de acetilação do ácido p-aminobenzóico por acção da acetil-CoA hepática.

Uma vez que o grupo metilo do N-Ac-PABA deriva directamente da acetil-CoA presente no citoplasma das células hepáticas, utilizando, por exemplo, marcação isotópica ²H e ¹³C e análise por espectroscopia de RMN, é possível quantificar e caracterizar a acetil-CoA de uma forma não invasiva [21].

1.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é reconhecidamente das técnicas mais importantes para a investigação a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria [26]. Ocupa também um lugar de excelência no campo da análise qualitativa e quantitativa, desde componentes em produtos alimentares, a fluidos biológicos e metabolitos em tecidos e órgãos de seres vivos intactos, de um modo não invasivo e não destrutivo, podendo por isso ser utilizada em procedimentos *in vitro* e *in vivo* [27].

Tornou-se igualmente muito útil no estudo de questões conformacionais e configuracionais relativas às estruturas de moléculas biológicas (*e.g.* drogas, proteínas e DNA), e na obtenção de informações anatómicas e metabólicas de sistemas biológicos [28].

A técnica espectroscópica de RMN explora as propriedades magnéticas dos núcleos atómicos activos (*e.g.* ¹H, ²H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁵N, ¹⁹F, ³¹P). Estes núcleos podem ser vistos como pequenos piões com carga que rodopiam em torno do seu eixo, gerando o

seu próprio pequeno campo magnético, encontrando-se, normalmente, dispostos de forma aleatória ^[27]. Quando estes núcleos são sujeitos à influência de um forte campo magnético externo, são obrigados a alinharem-se com orientações específicas, que se caracterizam por possuírem diferentes níveis energéticos. Posteriormente, quando os núcleos são expostos a uma radiação electromagnética, na gama de rádio frequência, recebem energia, sendo obrigados a transitar para uma outra orientação, de nível energético superior ^[27].

Esta transição é detectada através da captação da energia emitida quando os núcleos regressam ao estado fundamental, tendo frequências específicas, que ocorrem a velocidades características, dependendo da natureza dos núcleos, da estrutura molecular e da composição da amostra ^[28].

Quando os núcleos retomam a sua orientação original, a radiação emitida gera um sinal eléctrico, que após tratamento matemático (transformada de Fourier simples), permite traçar um gráfico da intensidade desse sinal em função da frequência aplicada, um espectro de RMN, onde as características de maior importância são a posição, a intensidade e a forma das bandas (Figura 1.8) ^[28].

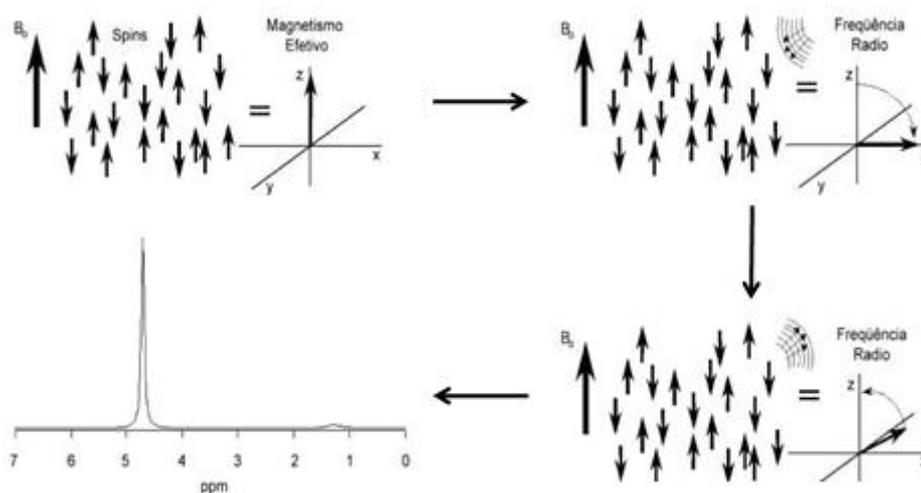


Figura 1.8. Representação do processo para obtenção de um espectro de RMN, desde a aplicação de um campo magnético forte (B_0) até à geração do sinal eléctrico, que permite a aquisição do respectivo espectro. Adaptado da ref ^[29].

A espectroscopia de RMN é uma técnica que detecta isótopos específicos em função dos seus spins nucleares característicos, permitindo determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto, e conseqüentemente a obtenção de informação acerca de estruturas moleculares ^[27]. A análise por espectroscopia de RMN permite medir alguns parâmetros espectrais fundamentais, que possibilitam a aquisição de informação útil acerca do que se pretende estudar (intensidade dos sinais, desvio químico (δ), efeito de acoplamento spin-spin e tempo de relaxação) ^[27].

Para este trabalho os efeitos dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) na exactidão e precisão da medição da intensidade do sinal de RMN são particularmente relevantes, razão pela qual serão discutidos mais detalhadamente.

Quando vários pulsos de RMN são somados em conjunto de forma a otimizar a razão sinal/ruído, deve ser permitido um intervalo de tempo suficiente entre cada pulso, de forma que a magnetização induzida pelo pulso anterior seja completamente deteriorada. O valor de T_1 representa a magnetização de meia-vida e para reduzir a magnetização nuclear para $< 1\%$ do valor inicial é necessário um intervalo de $5 \times T_1$. Os pulsos que se repetem em curtos intervalos de tempo resultam num sinal inferior ao valor teórico – processo conhecido como saturação ^[28].

Medições quantitativas de metabolitos e padrões internos em espectroscopia de ^2H RMN dependem do conhecimento dos valores de T_1 respectivos de cada sinal, de modo que a saturação seja evitada.

Os sinais obtidos em ^1H RMN com apenas um pulso, por definição não podem ser saturados. Para sinais obtidos por ^{13}C RMN existem outros factores, para além do tempo de relaxação T_1 , que determinam a intensidade do sinal (ver parágrafos abaixo).

A espectroscopia de RMN apresenta especial relevância quando associada a estudos de marcação isotópica de átomos específicos, que permitem que o percurso metabólico dos núcleos dos átomos marcados seja seguido por espectroscopia de RMN de protão (^1H RMN), de deutério (^2H RMN) e de carbono treze (^{13}C RMN).

No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, nomeadamente a sua baixa sensibilidade, devido às transições magnéticas nucleares serem pouco intensas, verificando-se nos últimos anos diversos avanços permitem contornar este problema, levando à sua expansão ^[24].

^1H RMN

A espectroscopia de ^1H RMN baseia-se na observação directa de núcleos de ^1H (spin=1/2), que é o segundo núcleo mais sensível para RMN, em termos de sensibilidade intrínseca para RMN (razão giromagnética alta) e possui elevada abundância natural (> 99,9%), o que irá possibilitar as medições de alta sensibilidade e baixo tempo de aquisição para este núcleo, levando a que esta técnica tenha um vasto número de aplicações ^[30].

Atendendo a que a maior parte dos metabolitos contêm hidrogénios e consequentemente uma grande quantidade de ^1H (dado que este é o isótopo mais abundante), a espectroscopia de ^1H RMN torna-se uma poderosa técnica para observar, identificar e quantificar um grande número de metabolitos biologicamente importantes. Devido à sua alta sensibilidade o núcleo de ^1H é apropriado para estudos *in vivo* por RMN ^[28].

^2H RMN

A espectroscopia de ^2H RMN, utiliza um outro isótopo importante em estudos metabólicos, o ^2H . Uma vez que a sua abundância natural é muito menor (~0.015%) do que a do ^1H (> 99.9%) ele é frequentemente negligenciado. O ^2H tem um núcleo com spin igual a 1 (I=1), que apresenta momento quadrupolar e, consequentemente, tempos de relaxação muito curtos ^[28].

Este fenómeno de relaxação rápida faz com que muitas vezes os sinais em RMN não apareçam tão bem resolvidos como seria desejado, dado que são intrinsecamente mais largos que os correspondentes em ^1H RMN. O núcleo de ^2H possui uma razão giromagnética baixa, comparativamente com o ^1H (~15% de ^1H), o que leva a que este entre em ressonância a 76,7 MHz, em vez de 500 MHz, num campo de 11.75T. Isto significa que uma diferença de 1ppm entre dois sinais de ^2H adjacentes será apenas 76,7 Hz, enquanto entre dois sinais de ^1H será 500 Hz, levando a que se verifique uma maior proximidade entre os sinais de ^2H , em termos de frequência absoluta, comparativamente com os sinais de ^1H . Ou seja, para campos magnéticos baixos, existem dificuldades acrescidas, dado que os sinais que se situam muito próximos não permitem uma boa distinção entre eles ^[28,30].

Após a administração de um marcador deuterado, como será descrito na secção 1.4.1.1, diferentes enriquecimentos posicionais em ^2H numa molécula de interesse

podem ser associados a diferentes fluxos nas vias metabólicas, semelhante ao que é observado com isotómeros de ^{13}C .

A espectroscopia de ^2H RMN permite a quantificação dos diferentes enriquecimentos posicionais em ^2H . Em termos relativos, o desvio químico apresentado por um elemento em ^2H RMN é idêntico ao apresentado em ^1H RMN, dado que o ambiente químico para um núcleo de ^1H ou ^2H num local particular da molécula é o mesmo. Assim, a identidade e a posição de um sinal em ^2H de uma amostra pode ser atribuído por sobreposição dos espectros de ^1H e ^2H RMN [26].

^{13}C RMN

O isótopo de carbono ^{13}C tem spin nuclear ($I=1/2$) e uma abundância natural de 1.1%. Este núcleo possui uma ampla gama de desvio químico (~ 200 partes por milhão (ppm)), o que permite uma boa separação das ressonâncias dos núcleos. Os sinais deste isótopo nos espectros de ^{13}C RMN exibem linhas estreitas, devido ao diminuto tempo de relaxação T_1 , permitindo uma melhor separação dos sinais [28].

A sensibilidade do núcleo de ^{13}C , relativamente ao ^1H RMN, para o mesmo campo magnético e o mesmo número de núcleos é 0.0159 [31].

A intensidade dos sinais de ^{13}C está relacionada tanto com a percentagem de enriquecimento em ^{13}C como com a quantidade de metabolitos presentes na mostra em estudo. Assim, a percentagem de enriquecimento em ^{13}C é expressa quantitativamente pela fracção ($^{13}\text{C}/^{13}\text{C}+^{12}\text{C}$), isto é pela relação entre os núcleos de ^{13}C na molécula entre o número total de núcleos de carbono [31].

Diminuições na intensidade dos sinais em ^{13}C RMN resultam do acoplamento entre spins de núcleos de ^{13}C e ^1H directamente ligados. Estes acoplamentos podem ser removidos por aplicação de um segundo campo magnético. Caso a frequência aplicada seja suficiente, ocorre um desacoplamento completo entre spins de ^1H e ^{13}C [28]. A aplicação de frequências para desacoplamento de próton origina alterações nas populações relativas nos níveis de energia para os spins nucleares de ^{13}C , eliminando a divisão de sinais causada por acoplamentos ^{13}C e ^1H e para além disso a magnetização dos ^1H é transferida para os núcleos de ^{13}C aos quais estão ligados, resultando num aumento da intensidade dos sinais de ^{13}C , a este efeito chama-se *Nuclear Overhauser Effect* (NOE). Este processo tem a vantagem de simplificar os espectros e concentrar

toda a intensidade de cada ressonância ^{13}C numa linha única, e ainda aumentar essa intensidade, resultando num aumento da relação sinal/ruído ^[28,30].

Sobre certas condições, um aumento no sinal do espectro de ^{13}C RMN corresponde a um aumento do enriquecimento de ^{13}C e, portanto, pode ser interpretado como uma incorporação do marcador na posição do carbono sob observação. Estes enriquecimentos em ^{13}C são referidos como enriquecimentos posicionais e são facilmente quantificados por espectroscopia de ^{13}C RMN ^[30].

Uma vez que a abundância natural de ^{13}C é apenas 1.1%, a probabilidade de um núcleo de ^{13}C numa molécula possuir um vizinho ^{13}C é $(0.011)^2$, ou cerca de 1 em 10^4 . Por isso, todos os sinais relativos à abundância natural de ^{13}C são essencialmente singletos e representam cerca de 1.1% do enriquecimento em ^{13}C . Por exemplo, o espectro de ^{13}C RMN do ácido acético apresenta dois sinais singletos que representam a abundância natural em ^{13}C de cada um dos dois carbonos da molécula. No entanto, para moléculas de acetato, com dois núcleos de carbono marcado, ou seja, $[1,2-^{13}\text{C}]$ acetato, cada sinal é dividido num dubleto por acoplamento ^{13}C - ^{13}C ($J_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}} = 54 \text{ Hz}$) e este dubleto apresenta-se bem resolvido a partir dos sinais singletos da abundância natural em ^{13}C .

Esta característica permite que múltiplos metabolitos marcados com ^{13}C , derivados de uma multiplicidade de precursores enriquecidos, tais como a $[U-^{13}\text{C}]$ glucose, possam ser resolvidos e quantificados.

1.5.1. Utilização de xenobióticos para análise e quantificação da acetil-CoA hepática a partir de marcadores isotópicos

O metabolismo do fígado possui uma elevada complexidade e caracteriza-se principalmente pela síntese e degradação de metabolitos hepáticos e a sua constante excreção e secreção para a circulação.

Até recentemente, a avaliação de glicose hepática e metabolismo lipídico era realizada com base em estudos mais invasivos, que incluem biópsias ao fígado, que permitem uma quantificação directa das de metabolitos hepáticos, e protocolos de cateterismo, que medem a libertação de substratos pelo fígado ^[32]. A introdução de marcadores metabólicos possui uma importância fundamental para o estabelecimento de intermediários metabólicos nas vias de glucose e metabolismo lipídico, bem como na determinação e conhecimento de fluxos metabólicos ^[32].

Um marcador metabólico é uma substância utilizada para seguir a transformação biológica de um substrato. Para tal este tem de ser metabolicamente indistinguível, e ao mesmo tempo possuir propriedades únicas que permitam a sua detecção e análise.

Geralmente, os marcadores consistem em moléculas de substrato sintético nas quais um ou mais átomos são substituídos por isótopos raros estáveis, tais como ^{13}C e ^2H , que podem ser detectados recorrendo a RMN e espectrometria de massa. Além de mais seguros, os métodos de análise destes isótopos estáveis têm uma vantagem importante sobre a detecção de marcadores radioactivos, na medida em que também fornecem informações posicionais relativas às moléculas em estudo ^[31,32].

No decorrer das reacções bioquímicas os marcadores isotópicos localizados em posições específicas de um qualquer substrato são transferidos para intermediários metabólicos e produtos de reacções de uma forma específica e rigorosa. Assim, o destino do precursor marcado é altamente previsível, dependendo da via metabólica que integra. Por análise em RMN do padrão de marcação isotópica dos produtos, é possível caracterizar e quantificar diferentes vias metabólicas.

Xenobióticos são compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico, que podem ser encontrados num organismo mas não são normalmente produzidos por ele ^[32]. Existe uma vasta gama de compostos xenobióticos, tais como o PABA (utilizado neste estudo), que podem ser ingeridos com segurança por animais e seres humanos e possuem capacidade de se conjugar com intermediários metabólicos no fígado (neutralização). Os compostos conjugados formados são removidos pelo organismo através do processo de excreção de xenobióticos, sendo as principais vias de excreção a urina, as fezes, a respiração e o suor. Este processo permite uma amostragem não invasiva de intermediários hepáticos como a molécula de acetil-CoA, que não pode ser analisada de forma directa ^[21].

A acetil-CoA hepática pode ser analisada *in vivo* através da administração de ácido para-aminobenzóico, que é metabolizado no fígado por acetilação, e no qual o grupo metilo (CH_3) do produto acetilado deriva directamente do grupo metilo terminal da molécula de acetil-CoA hepática.

1.5.1.1. Quantificação do enriquecimento em ^2H da acetil-CoA hepática administrando $^2\text{H}_2\text{O}$

Existem muitas referências bibliográficas que fundamentam a administração de $^2\text{H}_2\text{O}$, para o seguimento das vias metabólicas do fígado ^[33]. A utilização deste marcador metabólico apresenta diversas vantagens: é não-radioactivo, e consequentemente seguro, possui um custo no mercado relativamente baixo em relação a outros marcadores e mantém o enriquecimento do precursor com facilidade. Após a sua administração este distribui-se rapidamente pelos tecidos estabelecendo um total equilíbrio com a BW ^[34].

A água deuterada pode ser facilmente administrada a animais e a humanos, por adição na água de bebida, em quantidades controladas. Os níveis máximos recomendados para o enriquecimento em ^2H da BW são 1-5% nos animais e 0.3-0.5% para humanos. Normalmente nos animais a sua administração é efectuada por injeção i.p., o que facilita o processo pois é possível obter um nível constante do enriquecimento da BW em menos de 10 minutos ^[35]. Em protocolos experimentais prolongados, em que se torna necessário aceder a informações metabólicas repetidamente pode manter-se a administração de $^2\text{H}_2\text{O}$ (água bebida) por longo período de tempo ^[34].

Em muitos casos, o enriquecimento isotópico ocorre através de uma alteração metabólica específica, o que poderá fornecer informações acerca dessa mesma alteração.

Assumindo que os hidrogénios do grupo metilo terminal da acetil-CoA hepática são lábeis, e realizam trocas extensivas com os hidrogénios da BW, podemos inferir que quando a BW se encontra enriquecida com ^2H o enriquecimento em ^2H da acetil-CoA será equivalente ^[18].

Assim, baseando-nos no princípio de acetilação do ácido p-aminobenzóico, no qual o grupo metilo do produto acetilado (N-Ac-PABA) deriva directamente do grupo metilo terminal da acetil-CoA hepática e utilizando $^2\text{H}_2\text{O}$ como marcador isotópico é possível analisar a acetil-CoA hepática de uma forma não invasiva e quantificar o seu enriquecimento em ^2H por análise por espectroscopia de ^1H e de ^2H RMN do N-Ac-PABA eliminado na urina (Figura 1.9).

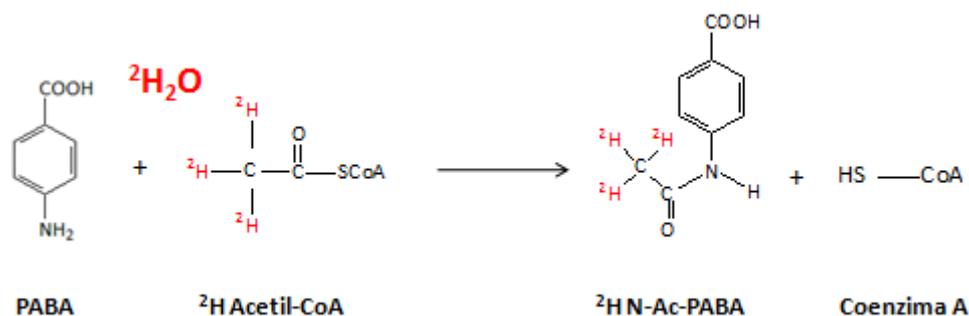


Figura 1.9. Reacção de acetilação do PABA a N-Ac-PABA, por acção na acetil-CoA hepática, na presença de $^2\text{H}_2\text{O}$ como marcador metabólico.

1.5.1.2. Quantificação da acetil-CoA hepática utilizando marcadores metabólicos de ^{13}C

O estudo do metabolismo de hidratos de carbono como a glucose e a frutose pode fornecer informações importantes sobre a formação da acetil-CoA hepática como agente precursor da DNL.

Após a incorporação destes compostos no metabolismo corporal, ambos sofrem metabolização no fígado, pela via da glicólise, formando duas moléculas de piruvato, que posteriormente por acção da piruvato desidrogenase (PDH) originam acetil-CoA [11,12].

A contribuição da glucose e da frutose para formação de acetil-CoA pode ser estudada administrando estes compostos enriquecidos com ^{13}C . Este enriquecimento é facilmente alcançado, adicionando os marcadores a uma refeição ou a uma solução, ou mesmo injectando-os directamente na corrente sanguínea, em procedimentos de infusão mais invasivos [13].

Administrando glucose e frutose com diferentes enriquecimentos posicionais em ^{13}C leva a que a acetil-CoA hepática formada, a partir de cada um destes marcadores, irá apresentar diferentes marcações em ^{13}C , o que se traduz em sinais distintos no espectro de ^{13}C RMN (Figura 1.10).

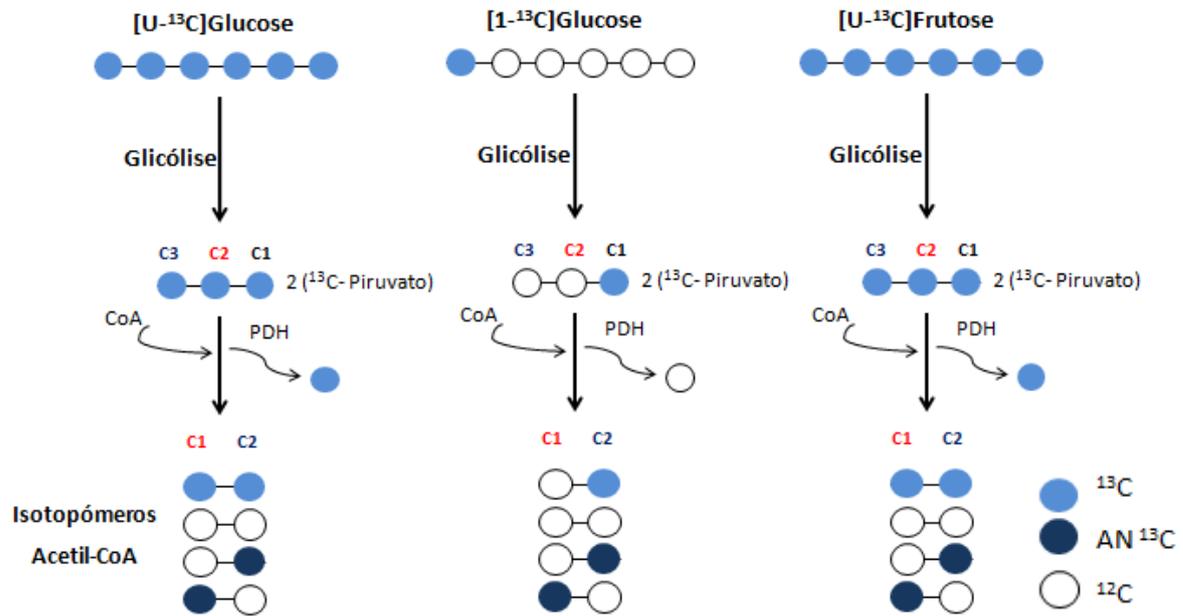


Figura 1.10. Esquema representativo dos diferentes enriquecimentos posicionais em ^{13}C da acetil-CoA hepática obtidos após a administração de [U- ^{13}C]glucose, [1- ^{13}C]glucose e [U- ^{13}C]frutose.

No esquema apresentado na Figura 1.10 pode verificar-se que administrando [U- ^{13}C]glucose, após a série de reacções anteriormente descritas, obtém-se a molécula de acetil-CoA com marcação em ^{13}C nos dois carbonos, o que se irá traduzir em dois sinais distintos no espectro de ^{13}C RMN. Injectando uma dose de [1- ^{13}C]glucose e [U- ^{13}C]frutose, obtém-se a molécula de acetil-CoA com diferentes marcações em ^{13}C de acordo com o açúcar que a origina, isto é, a [1- ^{13}C]glucose origina acetil-CoA marcada em ^{13}C no carbono 2, e a [U- ^{13}C]frutose origina acetil-CoA marcada nos dois carbonos, o que se reflecte em sinais distintos no espectro de ^{13}C RMN sendo possível calcular a contribuição de cada um dos açúcares para a formação de acetil-CoA.

Uma das problemáticas do método é a formação de vários isotopómeros da molécula de acetil-CoA (quatro no total), que resultam da abundância natural em ^{13}C (~1.1%). No entanto a sua análise é simplificada pela distinção entre os sinais espectrais originados por cada um deles.

1.6. Principais objectivos do estudo

O presente estudo, tem como objectivo principal o desenvolvimento de um método não invasivo para análise e quantificação da acetil-CoA hepática utilizando espectroscopia de RMN.

Após o desenvolvimento de protocolos para o tratamento dos animais e isolamento e purificação do N-Ac-PABA presente nas amostras de urina pretendeu-se, numa primeira fase do trabalho, determinar a reprodutibilidade do método elaborado para a quantificação da acetil-CoA, utilizando $^2\text{H}_2\text{O}$ como marcador isotópico, sob diferentes condições nutricionais e entre diferentes espécies de roedores.

Devido à posição central da acetil-CoA no metabolismo, como precursor de diversas vias metabólicas distintas, revela-se importante conhecer a contribuição de hidratos de carbono como a glucose e a frutose para a sua formação. Por administração destes açúcares marcados com ^{13}C em animais, e recorrendo a espectroscopia de ^{13}C RMN pretende-se a análise indirecta daquela molécula.

Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Os diferentes métodos descritos neste capítulo requerem a utilização de uma extensa lista de materiais e reagentes químicos específicos.

Para a preparação das soluções a injectar nos animais foram utilizados diversos reagentes, de acordo com os estudos efectuados. Utilizou-se ácido p-aminobenzóico (PABA) 99%, fornecido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.), água deuterada, 99.87%, fornecida pela CortecNet (Voisins-Le-Bretonneux, França) e uma solução salina de cloreto de sódio (NaCl), 99.5%, fornecido pela M&B (Dagenham, England). Também foram administradas glucose e frutose: [U-¹³C]glucose, [1-¹³C]glucose e [U-¹³C]frutose fornecidas por Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover Massachusetts, E.U.A.) e também frutose e frutose sem marcação isotópica fornecida por Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.).

O ajuste de pH foi efectuado utilizando uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃), fornecido pela Pronolab.

O isolamento do N-Ac-PABA foi realizado recorrendo a colunas cromatográficas, de referência DSC-18 2g, fornecidas pela Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.). Para o acondicionamento destas colunas e eluição dos diferentes compostos foram utilizadas soluções distintas compostas por metanol (CH₃OH) fornecido por José Manuel Maria dos Santos, Lda (Lisboa, Portugal) e uma solução de água destilada e ácido trifluoracético (TFA), 99,9%, fornecido pela Aldrich (St. Louis, E.U.A.).

A identificação por TLC da fracção onde o metabolito N-Ac-PABA é eluído da coluna cromatográfica foi efectuada utilizando uma solução de diclorometano (CH₂Cl₂) fornecido pela Pronolab e metanol (CH₃OH) fornecido por José Manuel Maria dos Santos, Lda (Lisboa, Portugal) e uma fase estacionária de sílica

Para análise das amostras de urina por HPLC foi utilizada uma coluna Atlantis[®] dC18 de fase reversa de sílica (4.6 mmØ e 250 mm de comprimento) e como fase móvel uma solução de metanol (CH₃OH, Chromasolv) fornecido por Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.) e água acidificada com ácido trifluoracético (TFA), 99,9%, fornecido pela Aldrich (St. Louis, E.U.A.).

A aquisição dos espectros de ¹H e ²H RMN do N-Ac-PABA foi efectuada utilizando como padrão interno uma solução de alanina parcialmente deuterada (ALA,

com 1.95% de enriquecimento em ^2H), fornecido pela Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover Massachusetts, E.U.A.), e a dissolução das fracções biológicas foi efectuada utilizando como solvente “água empobrecida em deutério” (^2H depleted water), fornecida por Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover Massachusetts, E.U.A.).

Os espectros de ^2H RMN das BW, foram obtidos utilizando como padrão interno, e simultaneamente como solvente, acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$), fornecida por José Manuel Maria dos Santos, Lda (Lisboa, Portugal).

Os espectros de ^{13}C RMN do N-Ac-PABA presente nas amostras de urina foram obtidos dissolvendo as amostras em água deuterada, 99.87%, fornecida pela CortecNet (Voisins-Le-Bretonneux, França).

2.2. Métodos

2.2.1. Tratamento dos animais

2.2.1.1 Condições de alojamento

No estudo desenvolvido foram utilizados diversos grupos de animais, provenientes do laboratório Charles-River (Barcelona, Espanha), pertencentes a duas espécies diferentes de muranos: ratos *Wistar*, cujos pesos se encontravam entre 180g e 230g e ratinhos da estirpe C57/B16 com peso aproximado de 20-25g, todos machos. Estes animais foram alojados em gaiolas individuais tendo sido mantidos num ambiente controlado: sala a uma temperatura constante de 22°C, com um ciclo de 12h de luz e 12h de escuridão (luz das 7h às 19h), com acesso *ad libitum* a água e comida (composição standard 60% hidratos de carbono, 16% proteínas, 3% lípidos).

Antes de serem realizadas intervenções nos animais estes foram mantidos no laboratório de experimentação durante pelo menos 5 dias para ambientação ao local.

2.1.1.2. Protocolos experimentais desenvolvidos

De acordo com experiências anteriormente desenvolvidas, a quantidade mínima necessária para análise do enriquecimento em ^2H do N-Ac-PABA por RMN, num intervalo de tempo razoável é 10 μmol . Assim, considerando o peso dos animais, a

frequência e volume da sua micção^[36] e o metabolismo de acetilação do composto para formar N-Ac-PABA (aproximadamente 40%)^[25] é possível calcular a quantidade de PABA a ser administrado a cada animal, de modo que no final do tratamento das amostras a quantidade de composto existente permita uma análise e quantificação por RMN.

Estudo 1: Quantificação do enriquecimento em ²H da acetil-CoA hepática

Um grupo de ratinhos C57/Bl6 (n=4) foi mantido durante dois dias com água para beber 3% enriquecida em deutério.

No primeiro dia os animais foram injectados na cavidade peritoneal (via i.p.), com um volume de 99.9% de água deuterada, contendo 0.9% de cloreto de sódio (NaCl), que corresponde a 3% do volume de água corporal (se 70% do peso do animal for água e a percentagem de enriquecimento em ²H da BW, que se pretende, for 3%, então o volume administrado via i.p. será calculado pela fórmula:

$$\text{Volume a injectar} = \text{peso} \times 0.70 \times 0.03 \quad (1)$$

No segundo dia os animais foram injectados via i.p. com uma solução de água 3% enriquecida em ²H, 0,9% NaCl e PABA com uma concentração de 25mg/mL. O volume a injectar é calculado pela fórmula mencionada anteriormente.

Após 6 horas as gaiolas são limpas e é recolhida a urina dos animais.

Estudo 2: Quantificação do enriquecimento em ²H da acetil-CoA hepática: efeito do estado nutricional e diferenças entre espécies

Dois grupos de animais, um de ratinhos C57/Bl6 (n=5) e outro de ratos *Wistar* (n=4), foram mantido durante três dias com água para beber 3% enriquecida em ²H. No primeiro dia os animais foram injectados via intra-peritoneal com um volume de 99.9% de água deuterada, contendo 0.9% de cloreto de sódio (NaCl), sendo o volume administrado calculado pela fórmula (1).

Após aproximadamente 12 horas é recolhida uma amostra de urina para posterior análise do enriquecimento em ²H da BW.

No segundo dia os animais foram injectados via i.p. com uma solução de água 3% enriquecida em ²H, 0,9% NaCl e PABA com uma concentração de 25mg/mL. O volume a injectar é calculado pela fórmula (1).

Após 6 horas a urina dos animais é removida das gaiolas e uma pequena fração da amostra de urina é também recolhida para posterior análise do enriquecimento em ^2H da BW por ^2H RMN.

No terceiro dia da experiência os animais foram mantidos em jejum durante toda a noite, e posteriormente injectados via i.p. com uma dose igual à administrada no segundo dia.

Após 6 horas a urina dos animais é recolhida e uma pequena fração da amostra é separada para posterior análise do enriquecimento em ^2H da BW por ^2H RMN.

Estudo 3: Quantificação da contribuição da [U- ^{13}C] glucose para a formação de acetil-CoA

Um grupo de ratinhos C57/B16 (n=4) foi injectado via i.p. com uma dose contendo H_2O , 0,9% NaCl, 25 mg/mL de PABA e 2mg/g (peso animal) de [U- ^{13}C] glucose (dose standard utilizada para realizar o teste de tolerância à glucose, GTT). O volume de solução injectado é calculado pela fórmula (1).

Após 6 horas as amostras de urina são recolhidas para análise dos metabolitos eliminados.

Estudo 4: Contribuição da Glucose vs Fructose para formação da acetil-CoA hepática

Um grupo de ratinhos C57/B16 (n=5) foi injectado via i.p. com uma dose contendo H_2O , 0,9% NaCl, 50% [1- ^{13}C]glucose e 50% [U- ^{13}C]fructose/fructose não marcada (50/50). A dosagem de ambos os açúcares injectados foi de 2mg/g do peso dos animais. O volume de solução injectado é calculado pela fórmula (1).

As amostras de urina dos animais injectados foram recolhidas em intervalos de 2 horas: 2h, 4h e 6h.

Em todos os estudos realizados as amostras de urina recolhidas foram posteriormente centrifugadas para remoção de impurezas provenientes das gaiolas e o pH ajustado a aproximadamente 7, com uma solução de carbonato de cálcio (1.0 M), para prevenir ocorrência de reacção de hidrólise do N-Ac-PABA.

Após a recolha das amostras de urina os animais são sacrificados. Previamente estes são anestesiados com *ketamina* (injecção via i.p. 100 $\mu\text{l/g}$), que é uma droga

dissociativa com efeito anestésico, sendo posteriormente colhida uma amostra de sangue (cerca de 1mL) directamente da veia aorta e removido o seu fígado, que é rapidamente colocado em azoto líquido (processo de *Freeze-Clamped*) e de seguida armazenado a uma temperatura de -80°C . A amostra de sangue é posteriormente centrifugada de forma a ocorrer separação do plasma e armazenada a baixas temperaturas, evitando contaminação e diluição do ^2H (que conduz a sobrestimação no enriquecimento em ^2H da BW).

O manuseamento dos animais foi realizado no laboratório de experimentação animal situado nas instalações do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, uma instituição com permissão para executar pesquisa animal, e todas as experiências foram efectuadas de acordo com os procedimentos éticos estabelecidos para o tratamento e uso de animais em laboratório descritos no “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado por US National Institutes of Health - NIH.

2.2.2. Isolamento e purificação do N-Ac-PABA eliminado na urina

A urina é uma matriz muito complexa, que contém inúmeros metabolitos que são eliminados pelo organismo, e possui por isso espectros de RMN muito complexos, com sinais que causam interferências na análise dos analitos em questão.

Quando se processam laboratorialmente amostras de material biológico como a urina é imprescindível considerar a natureza dos metabolitos que se pretende extrair, isolar e purificar. Obter previamente informação acerca do comportamento químico de cada molécula em solução é o ponto de partida essencial para a correcta definição da metodologia a aplicar, de forma a evitar perdas de amostra, reacções secundárias irreversíveis e contaminações a vários níveis, e a permitir uma eliminação de interferentes provenientes da urina e um melhor rendimento na extracção.

Após chegarem ao laboratório, as urinas recolhidas dos animais manipulados durante o procedimento experimental, foram sujeitas a um processo de tratamento que demora em média 3 dias/amostra, até poderem ser analisadas em RMN.

As amostras são concentradas e tratadas por procedimentos experimentais de SPE e TLC, para isolamento, purificação e identificação do N-Ac-PABA, e na fase final seguem para análise RMN.

Recorreu-se à técnica de SPE para a eliminação de interferentes, isolamento e purificação do N-Ac-PABA eliminado na urina.

A técnica de extracção em fase sólida (*Solid-Phase Extraction – SPE*) é um processo físico de separação através do qual os compostos contidos numa mistura líquida são separados de acordo com as suas propriedades físicas e químicas^[37].

A coluna escolhida para este processo foi uma coluna DSC-18 2mg, composta por octadecil polimericamente ligado, com 18% C, de fase reversa apolar, que devido às suas dimensões permite o tratamento de amostras com quantidades de analito reduzidas.

Para uma eficiente retenção dos analitos pela coluna de separação as amostras de urina devem ser concentradas para um volume de 2 mL e o pH deve ser ajustado, com HCl 2M, até aproximadamente 2.5. O procedimento de SPE envolve várias etapas, sendo a inicial a activação da coluna com metanol (3.4 mL), de forma a remover substâncias contaminantes contidas na coluna e posterior passagem com 6.6 mL de água acídica (pH≈4 ajustado com TFA) para eliminar o solvente de activação.

Após a activação da coluna a amostra de urina é introduzida e os analitos de interesse e interferentes ficam retidos. O processo de eluição foi efectuado utilizando quatro soluções de metanol/água acídica (pH≈4), todas com um volume total de 8 mL pela seguinte ordem: solução de água acídica, de forma a eliminar interferentes com elevada polaridade, solução 10% metanol/água acídica e terceira fracção com 50% metanol/água acídica. Como esperado, verificou-se que o primeiro eluente permitiu a recolha de uma fracção contendo PABA, uma vez que sendo um composto com maior polaridade, possui maior facilidade de ser eliminado da coluna com esta proporção de solventes. A fracção de 50% metanol/água acídica apresenta uma menor polaridade relativamente à primeira e, conseqüentemente, proporciona a eliminação do analito N-Ac-PABA da coluna, que é um composto menos polar relativamente ao PABA.

Uma vez recolhidos os analitos de interesse, procedeu-se à limpeza da coluna com uma solução 100% metanol.

Todas as fracções eluidas da coluna de separação foram recolhidas separadamente e o seu pH ajustado a 7 (com CaCO₃ 1M) de forma a prevenir reacções de hidrólise do N-Ac-PABA.

Para se proceder à identificação da fracção na qual o metabolito N-Ac-PABA é eliminado da coluna de SPE de uma forma rápida, recorreu-se à cromatografia por TLC, uma técnica simples, de baixo custo e com inúmeras potencialidades, tais como a capacidade de realizar análises qualitativas (pretendida neste trabalho) e quantitativas de pequenas quantidades de material.

Esta técnica baseia-se na existência de forças de interacção entre uma fase estacionária e os componentes da mistura a ser analisada, provocadas pelas diferenças de polaridade entre as diferentes moléculas ^[38]. A sua utilização foi possível devido à existência de grupos cromóforos nos analitos que se pretendem identificar (anel benzénico) e que podem ser detectados por incidência de radiação ultra-violeta ^[38].

Os elementos fundamentais neste processo são: uma fase estacionária, uma fase móvel e a matriz que se pretende analisar. A fase estacionária é composta por uma placa de sílica, fina e uniforme, com propriedades apolares e a fase móvel é constituída por um solvente ou uma mistura de solventes, de composição adequada ao composto que se estuda ^[38,39].

Neste processo foi utilizada uma mistura de diclorometano/metanol (85/15) (v/v) que demonstrou ser a mais eficiente para a separação dos compostos (PABA e N-Ac-PABA), devido à diferença de polaridade entre os dois solventes (apolar/polar respectivamente) que permite a geração de um equilíbrio de polaridade no eluente e a deslocação dos analitos na fase estacionária com diferentes factores de retenção que permitem a sua diferenciação ^[38].

De forma a correctamente identificar os compostos em questão nas diversas fracções por TLC preparam-se inicialmente soluções concentradas dos dois compostos comerciais e realizou-se o procedimento.

Na observação dos resultados obtidos por TLC a $\lambda=280 \text{ nm}$ verifica-se a presença de PABA na segunda fracção (10% metanol/água acídica) e de N-Ac-PABA na terceira fracção (50% metanol/ água acídica).

Analisando os factores de retenção de cada um dos analitos verifica-se que o *rf* do PABA (*rf* = 0.92) é superior ao do N-Ac-PABA (*rf* = 0.57). Este resultado deve-se à diferença de polaridade entre os compostos, pois a presença do grupo amina (primária) no PABA fornece-lhe uma polaridade ligeiramente superior. Apesar de reduzida esta diferença de polaridade é suficiente para o N-Ac-PABA ser mais fortemente retido na placa de sílica (componente apolar) e apresentar um *rf* menor.

Para análise das amostras eluidas da coluna de SPE o volume destas é reduzido para metade (aproximadamente 4 mL). De seguida colocam-se pequenas gotas de cada uma das fracções na placa de sílica e após secagem esta é introduzida num copo contendo a fase móvel. Observam-se as placas de sílica a um λ de 280 nm e a fracção onde se identifica a presença do analito N-Ac-PABA é evaporada e analisada por espectroscopia de RMN para quantificação.

2.2.2.1. Purificação das amostras de N-Ac-PABA por HPLC

Após análise de algumas amostras de N-Ac-PABA por espectroscopia de RMN verificou-se, em alguns casos, a existência de metabolitos interferentes. Assim, procedeu-se à purificação do N-Ac-PABA recorrendo á técnica de HPLC, que visa principalmente a purificação de compostos e a sua separação quando estes se encontram agregados a contaminantes, baseando-se no princípio de que cada composto possui taxas de migração únicas em virtude do retardamento selectivo exercido pela fase estacionária (devido a diferenças de polaridade), que os faz movimentarem-se ao longo da fase estacionária com diferentes velocidades ^[39].

Este protocolo foi desenvolvido num aparelho de HPLC analítico (Waters), equipado com uma coluna de separação cromatográfica apolar, de fase reversa de sílica, e um detector U.V. com comprimento de onda de 290 nm. Após a realização de diversos estudos de polaridade e solubilidade dos compostos (PABA e N-Ac-PABA), e tentativas de separação dos mesmos com diferentes composições para a fase móvel, foi possível determinar as condições óptimas para uma separação e purificação eficientes:

Composição da fase móvel = 65% MeOH / 35% (H₂O + TFA 0.0065 M)

Fluxo da fase móvel (mL/min) = 1 mL/min

Loop = 10 µL

Após o desenvolvimento do método de separação do aparelho de HPLC analítico este foi implementado num sistema de HPLC Preparativo, que permite a recolha dos analitos purificados para posterior análise por espectroscopia de RMN.

2.2.3. Análise e caracterização das amostras por espectroscopia de ¹H e ²H RMN

Todas as amostras a analisar por espectroscopia de RMN, foram introduzidas nos respectivos tubos de RMN, juntamente com os padrões internos adequados. Estes padrões são utilizados para efectuar as identificações e quantificações pretendidas.

Todos os espectros obtidos durante o trabalho experimental desenvolvido foram analisados utilizando um programa de análise espectral, o NUTSpro™ (Accorn Inc., Freemont, CA). As áreas dos sinais foram quantificadas utilizando as ferramentas de ajuste de curva (curve fitting) ou de integração (integration tool) e o lb (line broadening)

aplicado foi 0.5 Hz para espectros de ^1H RMN, 1 Hz para espectros de ^2H RMN e 0.2 Hz para espectros de ^{13}C RMN.

2.2.3.1. Análise das BW por espectroscopia de ^2H RMN

As BW (obtidas a partir do plasma ou da urina) são analisadas para determinar a percentagem de ^2H que foi incorporado (enriquecimento em ^2H). O procedimento de análise por ^2H RMN das BW foi adaptado da referência ^[40] e consiste, resumidamente, em adicionar 990 μL de acetona a 10 μL de plasma ou urina, misturando no vortex e centrifugar (análises em triplicado para cada amostra). Após centrifugação 600 μL do sobrenadante são transferidos para um tubo de RMN de 5mm. A acetona (que apresenta um desvio químico de $\delta=2.05$ ppm relativamente ao TMS) desempenha duas funções fundamentais, é simultaneamente solvente e padrão interno. Os valores do enriquecimento em ^2H , obtidos para cada uma das amostras, serão posteriormente relacionados com os enriquecimentos em ^2H do N-Ac-PABA marcado eliminado na urina.

Os espectros foram obtidos utilizando um espectrómetro Varian, modelo Unity-500 (Varian, Palo Alto, CA), que se encontra na unidade de investigação de ressonância magnética nuclear do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), equipado com uma sonda de banda larga de 5.0 mm, e a uma temperatura de 50°C. Estes espectros foram adquiridos com desacoplamento de próton, usando um pulso, *pw* a 25°, um tempo de aquisição (*at*) de 2.69 s, um intervalo entre pulsos (*delay*) de 8.0 s, uma largura espectral (*sw*) de 761 Hz e um número de transientes igual a 18 (*nt=40*). Os espectros de ^2H RMN obtidos para as BW são tipicamente iguais ao apresentado (Figura 2.1).

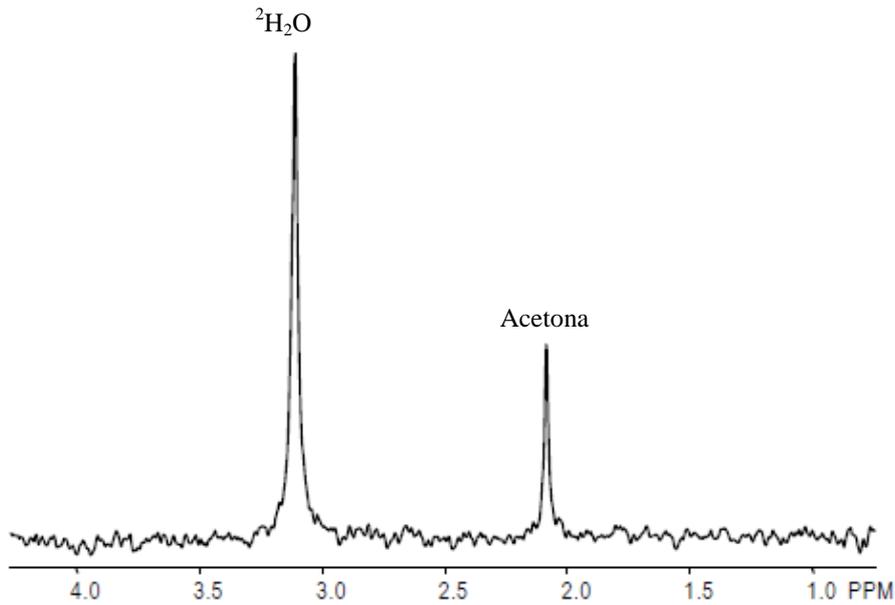


Figura 2.1 Espectro de ^2H RMN de uma das soluções padrão utilizadas para elaborar a curva de calibração da acetona, onde são visíveis os sinais da acetona e da água. A amostra de água foi enriquecida a 3.5% com $^2\text{H}_2\text{O}$.

A quantificação do sinal de ^2H para cada BW, efectua-se pela relação deste com o sinal de ^2H da acetona e utilizando, simultaneamente, a curva de calibração feita para este solvente (Figura 2.2), elaborada através da análise por espectroscopia de ^2H RMN de várias soluções padrão contendo $^2\text{H}_2\text{O}$, com enriquecimentos conhecidos em ^2H .

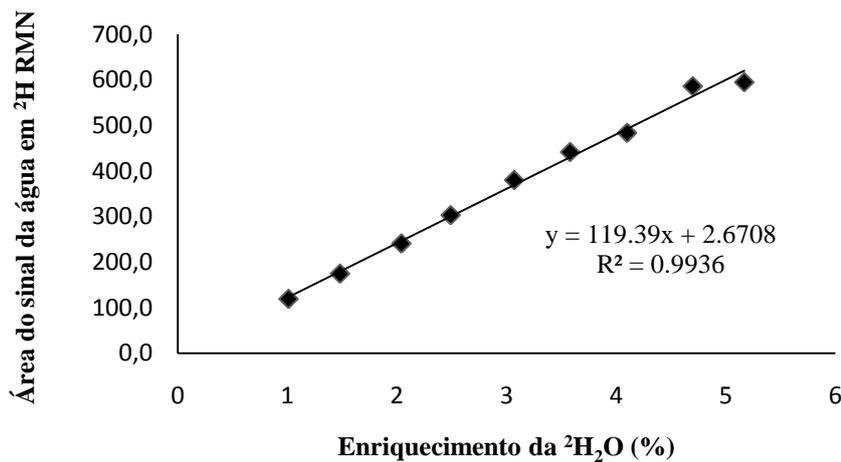


Figura 2.2 Curva de calibração da acetona elaborada a partir da análise por ^2H RMN de várias soluções padrão de $^2\text{H}_2\text{O}$, com enriquecimentos em ^2H entre 1.0-5.0%. Indicação da equação da regressão linear utilizada para determinar o enriquecimento em ^2H das BW.

A regressão linear obtida indicará a relação que existe entre as áreas dos sinais ^2H de cada BW, obtidos por comparação com a área do sinal ^2H da acetona e com a percentagem de enriquecimento de cada solução padrão.

2.2.3.2. Análise do N-Ac-PABA por espectroscopia de ^1H e ^2H RMN

As amostras de N-Ac-PABA, anteriormente purificadas, foram dissolvidas em 600 μL de ^2H *depleted water* e em 20 μL de Alanina 1.95% deuterada (desvio químico de 1.48 ppm e 3.75 ppm relativamente ao TMS), utilizado como padrão interno de referência. O pH das amostras foi ajustado a aproximadamente 6.5. Os espectros de ^1H e ^2H RMN foram obtidos, utilizando um espectrómetro Varian, modelo Unity-600 (Varian, Palo Alto, CA), que também se encontra na unidade de investigação de ressonância magnética nuclear do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), equipado com uma sonda de banda larga de 5.0 mm e utilizando uma temperatura de 50°C.

Para a obtenção dos espectros de ^1H RMN, foi utilizado um pulso (*pw* 90°) de 10.0 s, um tempo de aquisição (*at*) de 3.0 s, um intervalo entre pulsos (*delay*) de 25.0 s, uma largura espectral (*sw*) de 5074 Hz e um número de transientes igual a 1 (*nt*=1).

No caso dos espectros de ^2H RMN, estes foram obtidos com desacoplamento de próton, usando um pulso (*pw* a 90°) de 15.5 s, um tempo de aquisição (*at*) de 1.97 s, um intervalo entre pulsos (*delay*) de 0.4 s, uma largura espectral (*sw*) de 1069 Hz e um número de transientes igual a 125 (*nt*=125).

CÁLCULO DO ENRIQUECIMENTO EM ^2H DO N-AC-PABA

A análise dos espectros de ^2H RMN do N-Ac-PABA permite calcular a percentagem de enriquecimento em ^2H do grupo metilo da molécula, que deriva directamente da molécula de acetil-CoA hepática. Atendendo ao valor do enriquecimento em ^2H do padrão de ALA utilizado (1.95%), pode obter-se o valor do enriquecimento dos hidrogénios do grupo metilo do N-Ac-PABA, efectuando a multiplicação do enriquecimento em ^2H da ALA, pela razão entre as intensidades dos sinais de ^2H da ALA e do N-Ac-PABA. No entanto, dado que as amostras não apresentam exactamente a mesma quantidade de solução padrão de ALA e de N-Ac-

PABA, é necessário ter em consideração as suas quantidades relativas. Estas quantidades podem ser calculadas pela razão entre a intensidade do sinal em ^1H da ALA e do N-Ac-PABA.

Assim, o enriquecimento em ^2H do N-Ac-PABA eliminado na urina pode ser calculado através da equação (2):

$$\% \text{ enriquecimento } ^2\text{H}_{\text{CH}_3} = 1.95\% \times \frac{(A_{\text{sinal}} ^2\text{H}_{\text{CH}_3})}{A_{\text{sinal}} ^2\text{H}_{\text{Alanina}}} \times \frac{(A_{\text{sinal}} ^1\text{H}_{\text{Alanina}})}{A_{\text{sinal}} ^1\text{H}_{\text{CH}_3}} \quad (2)$$

2.2.3.3. Análise do N-Ac-PABA por espectroscopia de ^1H e ^{13}C RMN

As amostras de N-Ac-PABA foram dissolvidas em 600 μL de $^2\text{H}_2\text{O}$, sem necessidade de utilização de padrão interno de referência. Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN foram obtidos utilizando o espectrómetro Varian, modelo Unity-600, equipado com uma sonda de banda larga de 5.0 mm e utilizando uma temperatura de 25°C.

Para a obtenção dos espectros de ^1H RMN, foi utilizado um pulso (pw 90°) de 11.0 s, um tempo de aquisição (at) de 3.0 s, um intervalo entre pulsos ($delay$) de 25.0 s, uma largura espectral (sw) de 5074 Hz e um número de transientes igual a 1 ($nt=100$).

Os espectros de ^{13}C RMN, foram obtidos com desacoplamento de próton, utilizando um pulso (pw 90°) de 8.0 s, um tempo de aquisição (at) de 2.13 s, intervalo entre pulsos ($delay$) de 0.87 s, largura espectral (sw) de 30007 Hz e um número de transientes igual a 1 ($nt=1$).

CÁLCULO DO ENRIQUECIMENTO EM ^{13}C DO N-AC-PABA

A análise dos espectros de ^{13}C RMN do N-Ac-PABA permite calcular a percentagem de enriquecimento em ^{13}C do carbono metílico da molécula, que deriva directamente da molécula de acetil-CoA hepática. Desta forma é possível analisar a contribuição dos hidratos de carbonos injectados nos animais, para formação da acetil-CoA hepática.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e Discussão

A realização do presente trabalho permitiu a obtenção de alguns resultados, que servirão como informação a um estudo mais vasto, que pretende entender e analisar o modo como o organismo responde quando sujeito a determinadas alterações metabólicas, de uma forma específica os resultados obtidos terão grande importância para o estudo do distúrbio metabólico da diabetes *mellitus*.

3.1. Estudo de várias soluções padrão para quantificação do enriquecimento em ^2H do N-Ac-PABA

Tabela 3.1 Valores obtidos por espectroscopia de RMN para o tempo de relaxação longitudinal (T_1) de dois compostos padrão e do N-acetil-PABA.

	Desvio Químico (ppm)	T_1 (seg)	Tempo repetição mínimo (seg) ($5 \times T_1$)
N-acetil-PABA	2.18	0.15	0.75
DMSO- d_6	2.75	1.00	5.00
Alanina- d_4	1.48	0.10	0.50

Um padrão para quantificação necessita de ser solúvel e estável na amostra de RMN em estudo e possuir sinais bem resolvidos em ^1H e ^2H RMN para quantificação.

O tempo de relaxação longitudinal (T_1) deve ser igual ou menor que o T_1 do N-acetil-PABA, de forma que o pulso mínimo de repetição para análise quantitativa do N-acetil-PABA seja igualmente aplicado ao padrão.

De forma a posteriormente realizar uma análise correcta e num menor intervalo de tempo do N-Ac-PABA presente nas amostras de urina recolhidas dos animais forma estudados dois compostos padrão: DMSO- d_6 e Alanina- d_4 .

Ambos os padrões de quantificação estudados apresentam sinais bem resolvidos e quantificáveis em RMN, no entanto por análise da Tabela 3.1 a alanina demonstra-se mais adequada que o DMSO para análise do enriquecimento em ^2H do N-acetil-PABA, dado que possui um tempo de relaxação T_1 menor que o do N-acetil-PABA, permitindo uma taxa de repetição mais rápida.

3.2. Recolha do N-Ac-PABA presente em urina de ratos *Wistar* e ratinhos C57/Bl6: rendimento da reacção e períodos de recolha das amostras

O estudo realizado baseia-se na administração de um xenobiótico, o PABA, a animais modelo e na posterior análise do derivado acetilado eliminado na urina.

O conhecimento da fracção de PABA que é convertido em N-Ac-PABA e da cinética de metabolização e eliminação deste metabolito torna-se fundamental para o desenvolvimento do método de análise. Assim, de forma a estudar estes factores foram analisadas amostras de N-Ac-PABA recolhidas em intervalos de tempo de 3 horas e 6 horas após administração de PABA em ratos *Wistar* (n=5) e ratinhos C57/Bl6 (n=5). Os valores médios obtidos para a quantidade de N-Ac-PABA eliminado nestes períodos e o rendimento da reacção encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Valores médios obtidos para a quantidade de N-Ac-PABA eliminado, em função da dosagem de PABA administrada, em diferentes períodos de tempo e rendimento da reacção de acetilação.

	Ratos <i>Wistar</i> (n=5)	Ratinhos C57/Bl6 (n=5)
PABA administrado (média)	1392.01 μmol	121.04 μmol
Intervalo de Recolha	N-Ac-PABA recolhido (μmol)	
3h	274.31	24.63
6h	176.19	10.27
Rendimento (%)	33.54	29.86

Na análise das amostras de urina contendo N-Ac-PABA por espectroscopia de RMN verifica-se que a cinética de metabolização do PABA e eliminação do derivado acetilado é rápida. Analisando a Tabela 3.2 verifica-se que durante o período de três horas é eliminada a maior quantidade de N-Ac-PABA, em ambas as espécies de animais, e no período de três a seis horas diminui a quantidade de composto eliminado. Após este intervalo de tempo não é detectado N-Ac-PABA na urina.

Tal como esperado a conversão de PABA em N-Ac-PABA não é completa, sendo o rendimento da reacção aproximadamente 30%.

3.3. Purificação do N-Ac-PABA presente nas amostras de urina por HPLC

Após a análise por RMN das amostras de N-Ac-PABA sintetizado pelos animais, foi possível verificar em alguns espectros de RMN a existência de metabolitos interferentes, com sinais próximos dos que pretendemos utilizar na quantificação do N-Ac-PABA e também a presença de PABA que não terá sido completamente metabolizado e separado pelo processo de SPE.

No espectro de ^1H RMN de uma amostra de urina de um animal, Figura 3.1 é possível observar a sobreposição de um sinal desconhecido com o singlete relativo ao grupo CH_3 do N-Ac-PABA, e também a presença de PABA pela existência de sinais correspondentes aos hidrogénios aromáticos da molécula (7.55 e 7.8 ppm) próximos dos sinais correspondentes aos hidrogénios aromáticos no N-Ac-PABA.

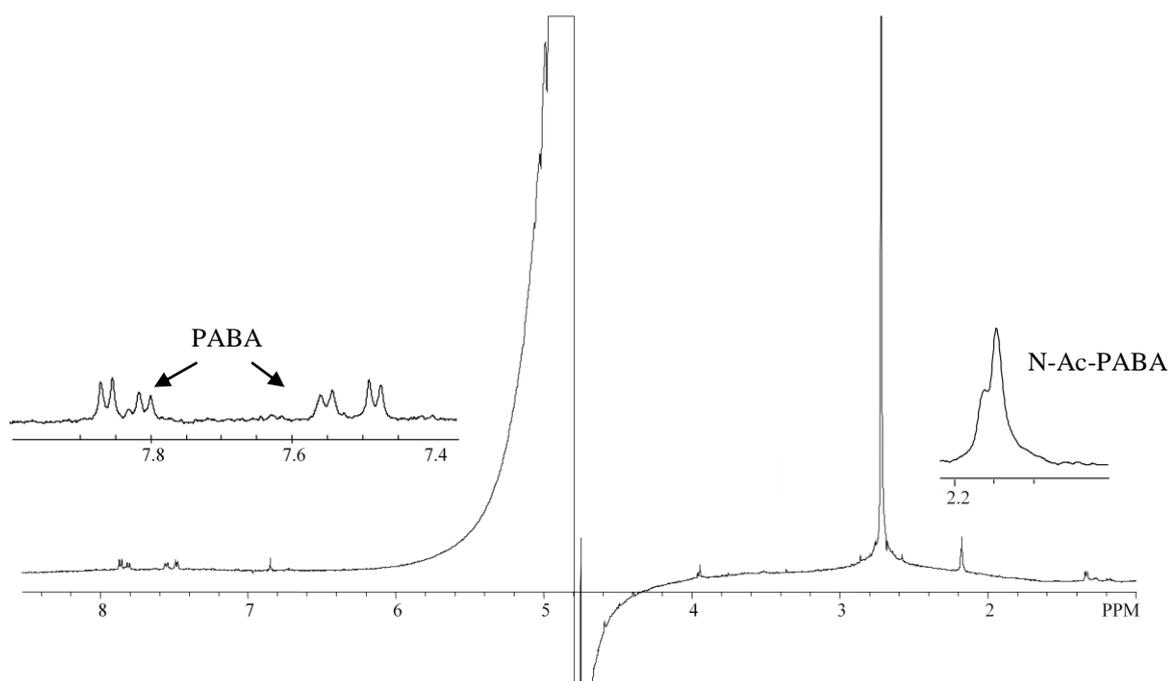


Figura 3.1. Espectro ^1H RMN de uma amostra de urina, onde é possível observar os sinais respectivos a metabolitos interferentes.

Com o objectivo de purificar o composto de interesse recorreu-se à técnica de HPLC, e realizaram-se diversas experiências utilizando previamente os compostos PABA e N-Ac-PABA comerciais, de forma a otimizar as condições da fase móvel para a separação dos compostos e a identificar os seus tempos de retenção.

A separação por cromatografia é baseada nas diferenças de polaridade entre as fases utilizadas (fase estacionária e fase móvel) e dos compostos a separar.

Neste caso utilizou-se uma fase estacionária apolar e a fase móvel uma solução polar. Assim, apesar de os dois compostos terem polaridade semelhante, o que dificulta a sua separação, a presença de um grupo acetilo no N-Ac-PABA torna-o ligeiramente menos polar que o PABA apresentando maior afinidade com a coluna de retenção e por consequência será de esperar que apresente maior tempo de retenção.

Utilizando uma fase móvel de composição MeOH/H₂O (65/35)%, observaram-se dois sinais no cromatograma, o primeiro com tempo de retenção de 9 min e o segundo a 10 min, que atribuíram ao PABA e ao N-Ac-PABA respectivamente, devido às características referidas anteriormente.

Após optimização do processo de separação analisaram-se as amostras de urina onde se havia verificado por espectroscopia de RMN a existência de interferentes.

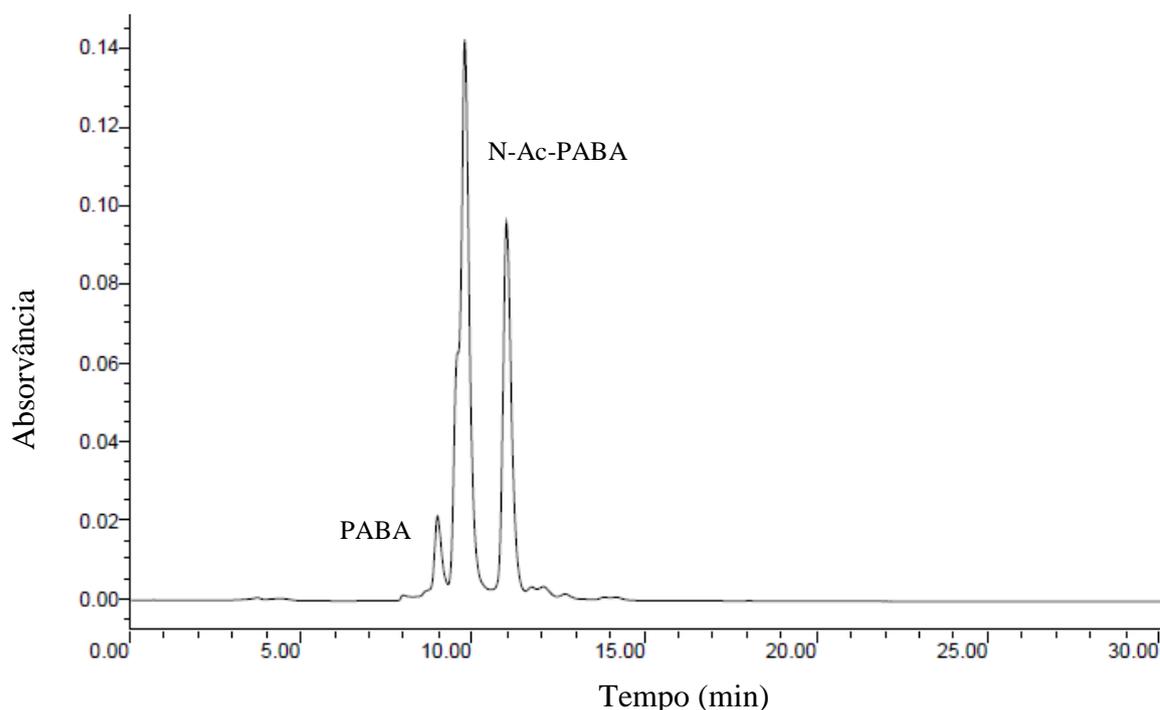


Figura 3.2. Cromatograma obtido por análise em HPLC de uma amostra de urina de um ratinho injectado com PABA & H₂O, após purificação por SPE, utilizando uma fase móvel de MeOH/H₂O (65/35) %.

No cromatograma da Figura 3.2 observam-se os sinais correspondentes aos compostos PABA e N-Ac-PABA, o que comprova a permanência de PABA que não terá sido metabolizado e separado pelo processo de SPE, e um sinal para um tempo de retenção de 11 minutos que poderá corresponder ao que aparece sobreposto ao N-Ac-PABA no espectro ^1H RMN (Figura 3.1), que devido á sua posição será um composto com menor polaridade que o N-Ac-PABA.

3.4. Análise e quantificação do enriquecimento em ^2H e ^{13}C do N-Ac-PABA presente nas amostras de urina

O trabalho realizado foi dividido em quatro estudos experimentais, de acordo com os objectivos pretendidos. Nos dois primeiros estudos o principal objectivo foi estudar a acetil-CoA como precursor metabólico para a DNL hepática, utilizando $^2\text{H}_2\text{O}$ como marcador metabólico. Numa segunda fase do trabalho pretendeu-se o estudo das fontes metabólicas para formação da acetil-CoA, utilizando marcadores metabólicos enriquecidos com ^{13}C . Todas as amostras de urina foram analisadas por espectroscopia de ^2H ou ^{13}C RMN e os resultados obtidos na quantificação das amostras serão apresentados de seguida.

Estudo 1: Quantificação do enriquecimento em ^2H da acetil-CoA hepática

Numa primeira fase do trabalho pretendeu-se elaborar e otimizar um método que permitisse a análise da acetil-CoA hepática e a sua quantificação por espectroscopia de RMN. Para tal procedeu-se à análise das amostras de N-Ac-PABA eliminado na urina dos animais por espectroscopia de RMN, bem como as de BW.

Na Tabela 3.3 encontram-se os resultados obtidos para os enriquecimentos em ^2H da BW e do N-Ac-PABA.

Os valores dos enriquecimentos em ^2H das BW foram obtidos por espectroscopia de ^2H RMN (Figura 3.3). A quantificação do sinal de ^2H de cada BW é feita através da relação com o sinal de ^2H da acetona, tendo como base a sua curva de calibração, tal como referido anteriormente.

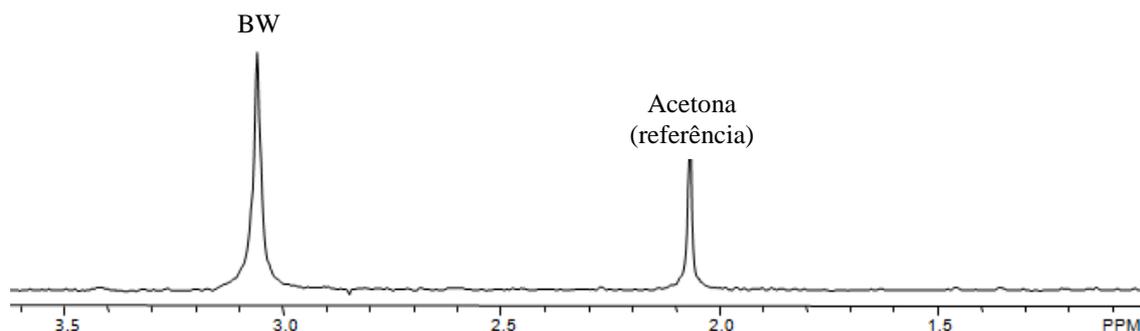


Figura 3.3. Espectro ^2H RMN da BW de um ratinho C57/Bl6 obtido a partir da análise de uma mostra de urina.

Analisando a Tabela 3.3 verifica-se que todas as BW apresentam um enriquecimento em ^2H de cerca de 2%, o que permite deduzir que o procedimento efectuado no tratamento dos animais foi eficaz, uma vez que o enriquecimento em ^2H pretendido era de 3%. No entanto, este desvio poderá ser justificado por os animais permanecerem apenas algumas horas com água enriquecida, e este período não ser suficiente para uma estabilização na incorporação em ^2H pela BW.

Tabela 3.3 Valores dos enriquecimentos em ^2H do N-acetil-PABA e das BW obtidos por ^2H RMN, presentes em amostras de urina de ratinhos C57/Bl6, e respectivo valor da razão entre os enriquecimentos.

Ratinhos C57/Bl6	Enriquecimento em ^2H (%)		Razão
	N-acetil-PABA	BW	
1	1.99	2.45	81.2
2	2.04	2.21	92.2
3	2.46	2.65	92.8
4	1.59	1.43	111.0
Média	2.02	2.18	94.3
SEM*	0.36	0.53	12.29

* standard error of mean (erro padrão da média)

Após todo o procedimento de isolamento e purificação do N-Ac-PABA, é possível analisar o enriquecimento posicional em ^2H dos hidrogénios do grupo metilo deste composto, por espectroscopia de ^1H e ^2H RMN. A utilização desta técnica permite

a obtenção de espectros de ^1H e ^2H RMN, para cada amostra, onde se poderá identificar todos os sinais pertencentes aos hidrogénios do N-Ac-PABA, bem como o sinal do padrão interno, a alanina. A Figura 3.4 apresenta um espectro de ^1H RMN (A) e um espectro de ^2H RMN (B), obtidos a partir da análise do N-Ac-PABA hepático presente numa das amostras de urina utilizadas.

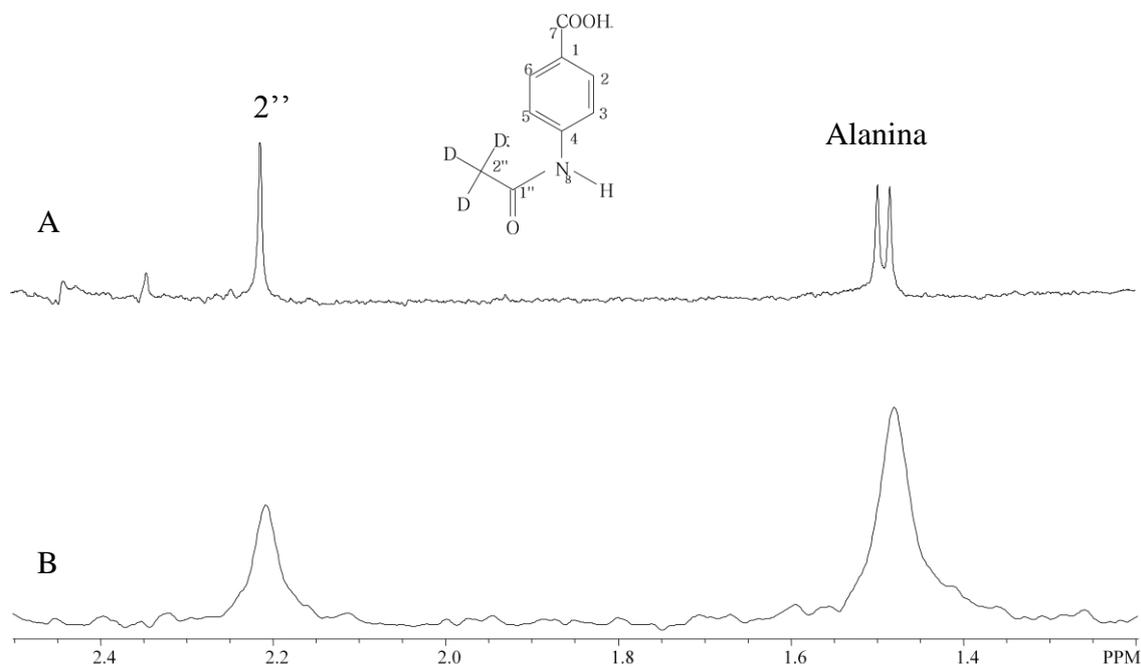


Figura 3.4 Espectros de ^1H (A) e ^2H RMN (B) obtidos para o N-Ac-PABA, presente numa amostra de urina de um ratinho C57/Bl6, utilizando uma solução padrão de alanina.

Os espectros de ^1H e ^2H RMN das amostras de N-Ac-PABA revelam que o processo de purificação das amostras é adequado, resultando em espectros limpos e sinais bem resolvidos.

Analisando o espectro de ^2H RMN verifica-se apenas um sinal relativo ao N-Ac-PABA, o sinal do grupo CH_3 que se encontra a 2.20 ppm, o que mostra que a marcação isotópica por administração de $^2\text{H}_2\text{O}$ apenas se realizou no local de interesse.

Os espectros obtidos para cada uma das amostras e a boa resolução do sinal do padrão de alanina, permitiram fazer a quantificação do enriquecimento posicional do N-Ac-PABA presente em cada amostra.

Analisando a Tabela 3.3 verifica-se que o enriquecimento em ^2H obtido para o N-Ac-PABA ($2.02 \pm 0.36\%$), é bastante próximo do obtido para a BW ($2.18 \pm 0.53\%$), apresentando uma relação entre eles de cerca de $94.37 \pm 12.29\%$ (ver Figura 3.5).

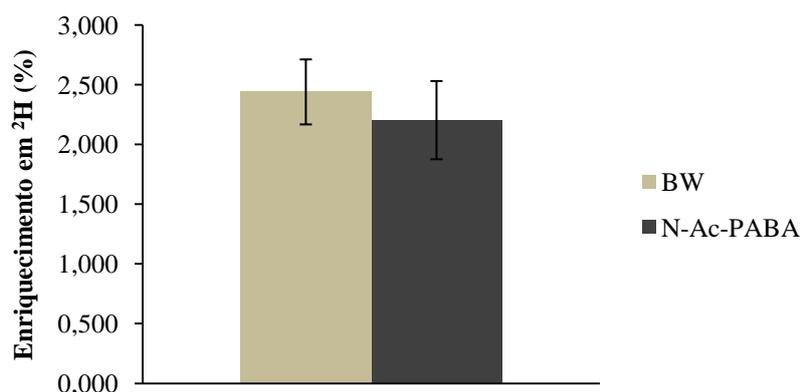


Figura 3.5 Representação gráfica das médias dos enriquecimentos em ^2H obtidos por análise em ^2H RMN, das BW e do N-Ac-PABA presente em amostras de urina de ratinhos injectados com PABA & $^2\text{H}_2\text{O}$.

Este resultado prova, tal como se tem vindo a assumir, a existência de trocas extensivas entre os hidrogénios metílicos da acetil-CoA com os hidrogénios da água corporal, e que o método de marcação isotópica a partir da administração de $^2\text{H}_2\text{O}$ funciona.

Posteriormente estes resultados irão permitir, num estudo paralelo, a comparação entre o enriquecimento em ^2H da acetil-CoA com o enriquecimento em ^2H dos grupos metílicos do triglicerídeos formados pelo mecanismo da DNL.

Estudo 2: Quantificação do enriquecimento em ^2H da acetil-CoA hepática: efeito do estado nutricional e diferenças entre espécies

Numa segunda fase do estudo pretendeu-se avaliar a reprodutibilidade do método de análise da acetil-CoA desenvolvido, em diferentes situações nutricionais e também implementando-o em diferentes espécies de animais.

A Figura 3.6 apresenta um espectro ^2H RMN da amostra de urina de um ratinho C57/Bl6 mantido sob jejum durante a noite. Comparando este espectro com o apresentado anteriormente para situação normal de alimentação (Figura 3.5) não se verificam quaisquer diferenças, o sinal relativo ao N-Ac-PABA é bem resolvido e de possível quantificação.

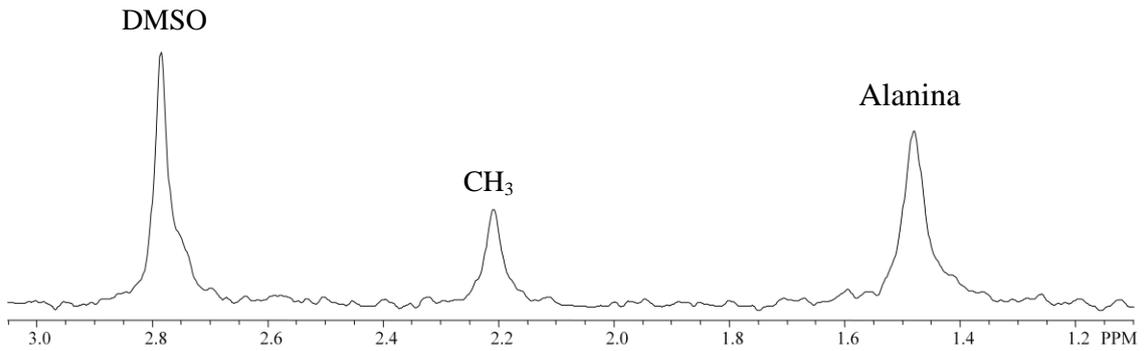


Figura 3.6 Espectro ^2H RMN do N-Ac-PABA presente na urina de um ratinho C57/B16 mantido sob condição de jejum.

Nas Tabelas 3.4 e 3.5 estão apresentados os resultados obtidos para os enriquecimentos em ^2H das BW e do N-Ac-PABA em situações normais de alimentação e de jejum, obtidos por ^2H RMN, para o grupo de ratinhos C57/B16 e para o grupo de ratos *Wistar*, respectivamente.

Tabela 3.4 Valores dos enriquecimentos em ^2H do N-acetil-PABA e das BW obtidos por ^2H RMN, presentes em amostras de ratinhos C57/B16, em condições de *ad libitum* e jejum.

Ratinhos C57/B16	Enriquecimento em ^2H (%)				
	N-Acetil-PABA		BW		
	Alimentados	Jejum	Dia 0	Alimentados	Jejum
1	1,27	1,41	1,82	1,58	1,73
2	--	0,88	1,80	1,70	1,56
3	--	1,12	1,45	1,81	1,89
4	--	3,23	2,17	1,75	1,98
5	1,32	1,56	1,87	1,63	1,71
Média	1,30	1,64	1,82	1,69	1,77
SEM*	0,03	0,63	0,16	0,07	0,13

* standard error of mean (erro padrão da média)

Tabela 3.5 Valores dos enriquecimentos em ^2H do N-acetil-PABA e das BW obtidos por ^2H RMN, presentes em amostras de ratos *Wistar*, em condições de *ad libitum* e jejum.

Ratos <i>Wistar</i>	Enriquecimento em ^2H (%)				
	N-Acetil-PABA		Dia 0	BW	
	Alimentados	Jejum		Alimentados	Jejum
1	0.57	0.41	1.92	1.86	1.44
2	1.17	0.88	1.80	1.43	1.69
3	1.67	1.12	-	1.79	1.94
4	3.86	3.23	2.13	1.85	2.02
Média	1.82	1.41	1.95	1.73	1.77
SEM*	1.43	1.25	0.17	0.21	0.26

* standard error of mean (erro padrão da média)

Tal como esperando, não existem diferenças significativas entre os enriquecimentos em ^2H das BW e do N-Ac-PABA, comprovando mais uma vez a existência de trocas extensivas entre os hidrogénios lábeis da acetil-CoA e os hidrogénios da BW.

Este resultado, associado também aos resultados do estudo 1, mostra que após a administração de $^2\text{H}_2\text{O}$ a acetil-CoA hepática e hidrogénios da água corporal são enriquecidos com os mesmos níveis, portanto o enriquecimento de água corporal pode ser utilizado como um substituto para o precursor acetil-CoA.

EFEITO DO ESTADO NUTRICIONAL

Comparando os resultados obtidos para o enriquecimento em ^2H do N-Ac-PABA em estado de alimentação normal e em jejum (Tabelas 3.2 e 3.3) nos dois grupos de animais não se observam diferenças significativas, apresentando uma razão de aproximadamente 80%.

Os valores obtidos para a situação de alimentação normal foram anteriormente justificados, pela troca extensiva entre hidrogénios lábeis da acetil-CoA com os da BW. Os resultados observados para a situação jejum devem-se ao mecanismo de formação de acetil-CoA que decorre nesse período.

Em situações de carência energética, como no jejum prolongado, a maioria dos tecidos é capaz de utilizar os ácidos gordos como fonte de energia. Em resposta às adaptações metabólicas/hormonais ocorridas, a oxidação de ácidos gordos aumenta, numa sequência repetitiva de reacções que produzem moléculas de acetil-CoA e libertam energia, num mecanismo designado por β -oxidação (Figura 3.7)

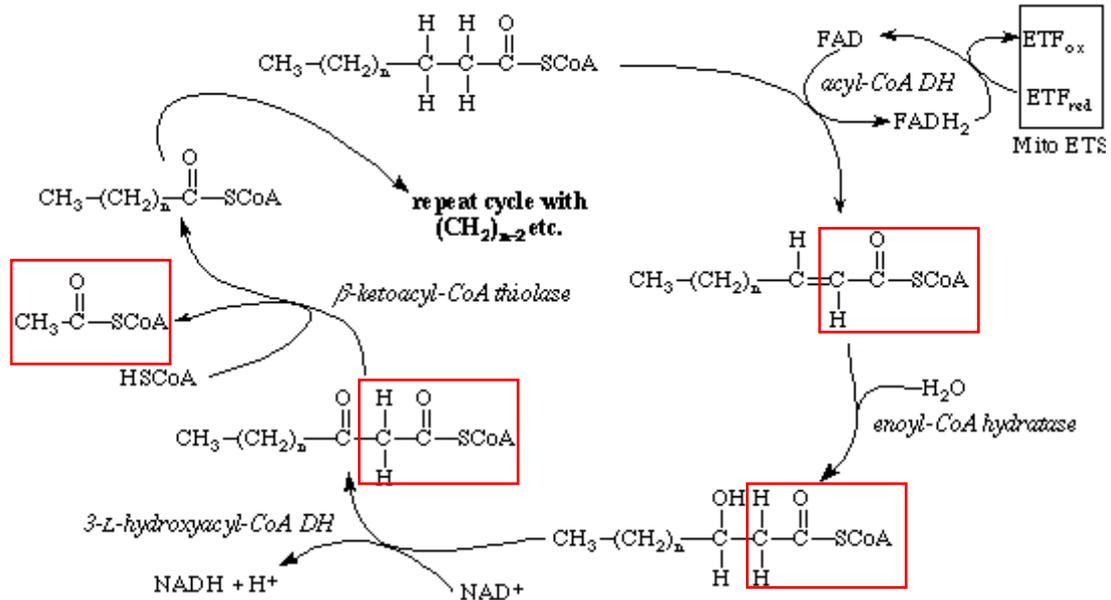


Figura 3.7 Esquema geral do mecanismo de β -oxidação de ácidos gordos.

Nesta via metabólica os ácidos gordos são previamente activados por conversão a acil-CoA, por acção da acil-CoA sintetase, presente na membrana externa da mitocôndria, formando-se uma ligação tioéster entre o grupo carboxilo do ácido graxo e o grupo SH da coenzima-A, produzindo uma acil-CoA, que posteriormente é transportado para a matriz mitocondrial.

A acil-CoA presente na matriz mitocondrial é oxidada por β -oxidação, numa série cíclica de quatro reacções, ao final das quais a acil-CoA é encurtada em dois carbonos, que são liberados sob a forma de acetil-CoA. As quatro reacções são:

1. Formação de uma ligação dupla trans- α,β por meio da desidrogenação pela flavoenzima acil-CoA-desidrogenase (AD);
2. Hidratação da ligação dupla, formando o isómero 3-L-hidroxiacil-CoA;

3. Desidrogenação dependente de NAD⁺ da β -hidroxiacil-CoA formando a β -acetoacil-CoA correspondente;
4. Quebra da β -cetoacil-CoA por uma molécula de CoA, com formação de acetil-CoA e uma acil-CoA com dois carbonos a menos; esta acil-CoA refaz o ciclo várias vezes, até ser totalmente convertida a acetil-CoA (ver Figura 3.5) ^[7].

Como se pode observar pela Figura 3.7 durante a hidratação da molécula, os hidrogénios da água corporal vão realizar substituição no carbono que posteriormente faz parte da molécula de acetil-CoA. Assim dois dos três hidrogénios do grupo CH₃ terminal da acetil-CoA irão apresentar a mesma percentagem de enriquecimento em ²H que a BW.

O outro hidrogénio irá realizar trocas extensivas com os hidrogénios da BW, pelo que também apresenta marcação em ²H paralela à BW.

Desta forma, no período de jejum, a acetil-CoA formada deriva principalmente do mecanismo de β -oxidação, e a percentagem de enriquecimento em ²H pela acetil-CoA hepática será equivalente à da BW.

EFEITO DAS DIFERENÇAS ENTRE ESPÉCIES

Analisando os gráficos da Figura 3.8 pode afirmar-se que não existem diferenças significativas na análise da acetil-CoA em espécies diferentes de roedores.

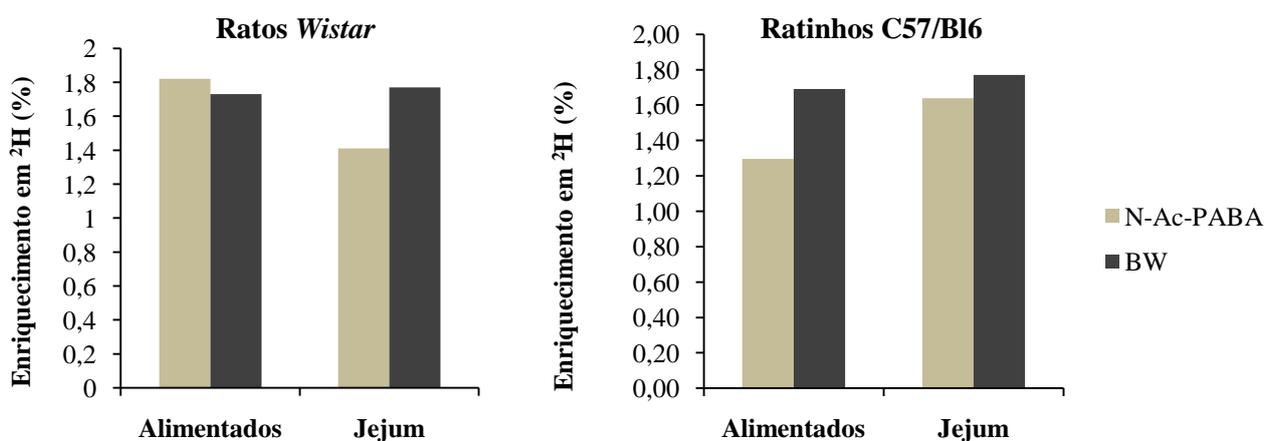


Figura 3.8 Representação gráfica dos resultados obtidos para os dois grupos de animais de espécies diferentes, em situação de alimentação normal e em jejum.

Todos os seres vivos, consoante a sua espécie, apresentam diferenças metabólicas, ainda que por vezes pouco significativas. No entanto, o método elaborado para análise não invasiva da acetil-CoA hepática utilizando PABA mostra-se reprodutível tanto em ratos como em ratinhos, sendo possível a análise do N-Ac-PABA eliminado por espectroscopia de ^2H RMN.

Estudo 3: Quantificação da contribuição da $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose para a formação de acetil-CoA

Numa segunda fase do estudo pretendeu-se avaliar a reprodutibilidade do método desenvolvido para análise da acetil-CoA por espectroscopia de ^{13}C RMN, de forma a determinar a contribuição de hidratos de carbono injectados para a formação de acetil-CoA.

Inicialmente, injectou-se um grupo de animais com $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose de forma a verificar a possibilidade de analisar o N-Ac-PABA marcado em ^{13}C por espectroscopia de ^{13}C RMN e quantificar a contribuição da glucose administrada para formação de acetil-CoA.

Na Figura 3.9 apresenta-se o espectro de ^{13}C RMN do fragmento acetil do N-Ac-PABA presente na urina de um animal após IPGTT.

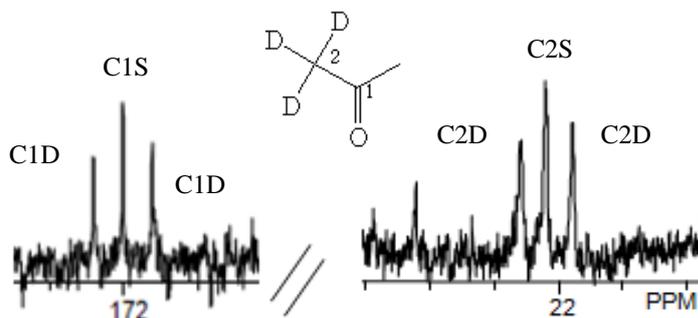


Figura 3.9 Espectro ^{13}C RMN do N-Ac-PABA presente na urina de ratinho C57/Bl6 injectado com $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose.

Verifica-se que por espectroscopia ^{13}C RMN é possível analisar a marcação em ^{13}C do N-Ac-PABA, resultante da injeção de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose, obtendo-se um espectro sem interferências, onde é possível observar os sinais relativos aos dois carbonos enriquecidos em ^{13}C (C1 e C2) do N-Ac-PABA.

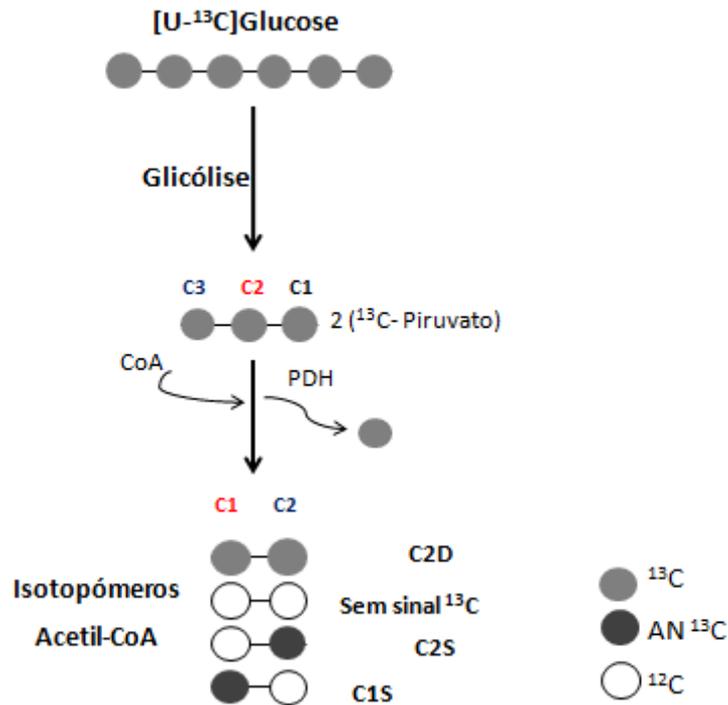


Figura 3.10 Esquema representativo da marcação em ¹³C observada na acetil-CoA após injeção de [U-¹³C]glucose e atribuições dos sinais espectrais esperados.

Após entrada no fígado cada molécula de glucose injectada irá produzir duas moléculas de piruvato pela via da glicólise. Por acção da enzima PDH cada molécula de piruvato perde um carbono e combinadas com a coenzima A formam uma molécula de acetil-CoA. Assim iremos ter quatro isotopómeros da molécula de acetil-CoA, sendo de interesse o primeiro, que possui os dois carbonos marcados com ¹³C, que provém da glucose injectada, originando um sinal dubleto no espectro ¹³C RMN. A marcação das outras moléculas é devida à abundância natural de ¹³C e originam sinais singletos no espectro de RMN (Figura 3.10).

Pela diferença entre as áreas dos sinais relativos ao carbono 1 (C1), C1S e C1D, ou relativos ao carbono 2 (C2) é possível quantificar a contribuição da glucose injectada para a formação da acetil-CoA.

Tabela 3.6 Valores dos enriquecimentos em ^{13}C do N-acetil-PABA, presente em amostras de urina de ratinhos C57/B16, obtidos por espectroscopia de ^{13}C RMN.

Amostra de urina	Contribuição da [U- ^{13}C]glucose para formação de acetil-CoA (%)
1	1.42
2	1.72
3	1.83
4	1.76
Média	1.68

Analisando a Tabela 3.6 verifica-se que ao longo do estudo apenas 1.68% do total de acetil-CoA formada provém da glucose injectada, possuindo este açúcar uma contribuição muito baixa para formação da molécula.

Estudo 4: Contribuição da Glucose vs Frutose para formação da acetil-CoA hepática

Os efeitos da utilização de frutose e da glucose na dieta no metabolismo lipídico têm sido áreas de pesquisa activas durante os últimos anos, e tem sido assumido que a frutose possui maior contribuição para a DNL que a glucose, sendo metabolizada mais rapidamente. O objectivo deste estudo seria determinar qual dos açúcares injectados é a principal fonte para formação de acetil-CoA hepática.

Após análise das amostras de urina contendo N-Ac-PABA por ^{13}C RMN não foram observados os sinais espectrais relativos à [U- ^{13}C]frutose injectada. Dado que os animais se encontravam em jejum prolongado seria de esperar que durante as 6 horas ambos os açúcares fossem metabolizados.

Este resultado pode ser explicado com base no mecanismo de metabolização da frutose, que nos passos iniciais difere do da glucose por acção de uma enzima específica, a frutoquinase. Esta enzima cataliza a fosforilação da frutose pelo ATP no carbono C1 para formar frutose-1-fosfato^[7].

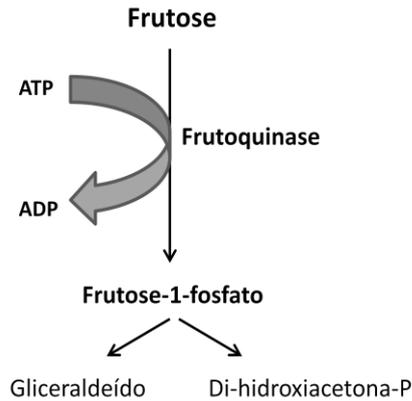


Figura 3.11 Esquema representativo da acção da enzima frutoquinase no metabolismo hepático da frutose.

Como se pode observar na Figura 3.11, para actuar esta enzima necessita de ATP. No entanto, em situações de deficiência energética, como o caso do jejum, a que os animais foram sujeitos, existe um défice de energia e portanto de ATP disponível, e portanto não se estabelecem as condições necessárias à actuação da enzima.

Durante o processo de metabolização da frutose existem outras reacções dependentes de ATP, tais como a reacção de formação de gliceraldeído-3-fosfato a partir do gliceraldeído, e que pelos mesmos motivos não são realizadas.

Uma alternativa para esta situação seria a administração de duas doses de açúcares aos animais, uma com os compostos não marcados e após 6 horas uma segunda dose com $[1-^{13}\text{C}]$ glucose e $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ frutose. Desta forma, após as 6 horas existiria ATP disponível como resultado do metabolismo da glucose, reunindo-se todas as condições para que ocorra metabolização da frutose.

Capítulo 4

CONCLUSÃO

4. Conclusão

Com base no mecanismo de transformação do xenobiótico ácido p-aminobenzóico (PABA), desenvolveu-se um método de amostragem não invasivo da acetil-CoA hepática utilizando animais modelo, que envolve a análise e quantificação do metabolito N-Ac-PABA eliminado na urina por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^2H e ^{13}C .

Desenvolveram-se protocolos para administração do xenobiótico a animais modelo, bem como para recolha e purificação do N-Ac-PABA sintetizado e eliminado na urina. Os métodos de isolamento e purificação deste metabolito pelas técnicas cromatográficas de SPE e HPLC revelaram-se adequadas e essenciais para obtenção de espectros sem interferentes e sobreposição de sinais.

Utilizando $^2\text{H}_2\text{O}$ como marcador isotópico foi possível analisar a acetil-CoA de forma indirecta por ^2H RMN. Este método mostrou-se adequado e reprodutível. Obteve-se uma quantidade de N-Ac-PABA, eliminado na urina de animais, possível de analisar pela técnica de RMN num intervalo de tempo razoável. Analisando os espectros de ^2H RMN obtidos nos vários procedimentos experimentais foi possível concluir o enriquecimento em ^2H da acetil-CoA é equivalente ao da BW (~94.37%) e que paralelamente é possível a sua utilização como agente precursor da DNL. Administrando $^2\text{H}_2\text{O}$ a roedores mantidos em jejum ou em condições normais de alimentação e pela análise do N-Ac-PABA eliminado na urina por ^2H RMN demonstrou-se que o enriquecimento da acetil-CoA é aproximadamente igual ao da *body water* e que em diferentes estados nutricionais é constante.

Utilizando marcação isotópica em ^{13}C , pretendeu-se analisar a contribuição da glucose e da frutose para a formação de acetil-CoA hepática. Este método mostrou-se eficaz, na medida em que foi possível a análise por ^{13}C RMN do N-Ac-PABA. Ao longo do estudo a contribuição da $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose para formação de acetil-CoA é de apenas ~2%, sendo este um valor surpreendentemente baixo, podendo este resultado estar relacionado com a fraca indução na via glicolítica hepática provocada por uma única dose de glucose em animais em jejum.

Relativamente à contribuição da frutose, não foi possível determinar qual dos açúcares é preferido para síntese de acetil-CoA, glucose ou frutose. Uma possível justificação é que em situações de carência de ATP a enzima responsável pelo início da metabolização da molécula de frutose, frutoquinase, não actua.

As experiências realizadas com marcadores de ^{13}C mostram também que doses únicas dos substratos marcados não são eficientemente metabolizadas a acetil-CoA, tendo no futuro de se adoptar outras vias para administração destes substratos.

Em termos globais, pode afirmar-se que o método desenvolvido para análise não invasiva da acetil-CoA hepática é adequado e reprodutível, tornando possível obter dados importantes relativos ao fluxo metabólico hepático. Mais concretamente do metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos, e assim com potencialidade para ser utilizado no estudo de doenças metabólicas como a obesidade e diabetes *mellitus*.

Trabalho Futuro

O trabalho desenvolvido demonstra grandes potencialidades, pelo que se pretende a sua continuação, com desenvolvimento de novos protocolos.

Num futuro próximo pretende-se a alteração dos protocolos experimentais, de forma que os substratos marcados com ^{13}C e o PABA sejam incorporados nos animais de uma forma menos invasiva e contínua, por exemplo sendo introduzidos na água de bebida durante a noite. Todo o procedimento experimental utilizado neste trabalho será também aplicado a um maior número de amostras, a fim de se obter uma maior variabilidade de resultados, que levarão a conclusões mais precisas.

Numa perspectiva a longo prazo pretende-se aplicar este estudo a humanos, dado que existem fortes indícios de que os resultados finais sejam similares e seria uma mais-valia para o estudo de diversas doenças metabólicas.

Capítulo 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Referências Bibliográficas

- [1] Friedman, M.; “*Control of energy intake by energy metabolism*”. Am. J. Clin Nutr; 62, 1995
- [2] WHO; “*Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*”; Geneva, World Health Organization, 1999
- [3] WHO; “*Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation*”; Geneva, World Health Organization, 2006
- [4] Nelson, D., Cox, M.; “*Lenhinger, Principles of Biochemistry*” (3ª edição); Worth Publishers, 2000
- [5] Stryer, L.; “*Bioquímica*” (4ª edição); Guanabara Koogan; 1996
- [6] Zubay, G.; “*Biochemistry*” (4ª edição); Wm. C. Brown Publishers; 1998
- [7] Voet D.; Voet, J. G.; “*Bioquímica*” (3ª edição); Artmed Editora S.A.; 2006
- [8] Campos, L.; “*Entender a Bioquímica*” (3ª edição); Escolar Editora; 2002
- [9] Postic, C., Dentin, R.; “*Role of liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis*”; Diabetes & Metabolism, 30, 398-408, 2004
- [10] Parks, E., Skokan, L., Timlin, M., Dingfelder, C.; “*Dietary Sugars Stimulate Fatty Acid Synthesis in Adults*”; The Journal of Nutrition, 2008
- [11] Cherrington, A.; “*Control of Glucose Uptake and Release by the Liver In Vivo*”; Diabetes, 48, 1999
- [12] Barreiros, R., Bossolan, G.; “*Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors*”; Rev. Nutr., Campinas, 18, 377-389, 2005

- [13] Cha, S., Wolfgang, M., Tokutake, Y.; “*Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake*”; PNAS, 105, 16871-16875, 2008
- [14] Tappy, L., Lê, K.; “*Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity*”; *Physiol Rev* 90: 23–46, 2010
- [15] Masson, S., et al; “*Hepatic Metabolism During Constant Infusion of Fructose – Comparative Studies with ³¹P-Magnetic Resonance Spectroscopy in Man and Rats*”; *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1199, 166-174, 1994
- [16] Cha, S. H., et al; “*Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake*”; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 16871-16875, 2008
- [17] Postic, C., Girard, J.; “*The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis*”; *Diabetes & Metabolism*, 34, 643-648, 2008
- [18] Delgado, TC, D Pinheiro, M Caldeira, MMCA Castro, CFGC Geraldes, P LópezCLarrubia, S Cerdán and JG Jones; “*Sources of hepatic triglyceride accumulation during highCfat feeding in the healthy rat*”; *NMR Biomed* 22, 310-317, 2009
- [19] <http://facweb.northseattle.edu>
- [20] Oliver, D., Nikolau, B., Wurtele, E.; “*Acetyl-CoA—Life at the metabolic nexus*”; *Plant Science*; 176: 597–60; 2009
- [21] Hellerstein, Marc K., Wu, Kenneth, Kaempfer, Suzanne, “*Sampling the Lipogenic Acethyl-CoA Pool in Vivo in the Rat*”; *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, 10912-10919, 1991
- [22] Wang, Lai-Hao, Huang, Wen-Shiuan, Tai, Huo-Hu; “*Simultaneous determination of p-aminobenzoic acid and its metabolites in the urine of volunteers, treated with p-aminobenzoic acid sunscreen formulation*”; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 1430-1436, 2007

- [23] Chang, Te-Yang, Hu, Miao-Lin; “*Concentrations and lipid peroxidation in tissues and toxicity of para-aminobenzoic acid fed to rats in drinking water*”; Nutritional Biochemistry 7: 408-413, 1996
- [24] Kitamura, M., Nakao, M., Yanagisawa, I.; “*Metabolism of Para-aminobenzoic Acid*”; The Journal of Biochemistry, 47, 1960
- [25] Moiseenok, G., Dorofeev, B.; “*Role of acetylation in the mechanisms of pharmacological activity of derivatives of pantothenic and 7-aminobutyric acid*”
- [26] Gonçalves, A.; Melo, T.; “*Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*”; Imprensa da Universidade de Coimbra; 2007
- [27] Luzyanin, K.; Abrantes, M.; “*Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta versátil em Química Farmacêutica e Imagiologia Médica*”; Boletim da SPQ; 117; 25-30; 2010
- [28] Gil, V., Geraldes, C.; “*Ressonância Magnética Nuclear – Fundamentos, métodos e aplicações*” (2ª edição); Fundação Calouste Gulbenkian, 2000
- [29] Mason, G. et al; “*Aplicações da ressonância magnética para medidas espectroscópicas da neurotransmissão*”; Rev. Bras. Psiquiatria; 23; 6-10; 2001
- [30] Friebolin, H.; “*Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*”; VCH, (2nd edition), 1993
- [31] Egan, W., Shindo, H. and Cohen, J.; “*¹³C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Proteins*”; Annual Review of Biophysics and Bioengineering 1977;6:383*417.
- [32] Landau BR. “*Noninvasive approaches to tracing pathways in carbohydrate metabolism*”. J Parenter Enteral Nutr, 15(3), 74S-777, 1991
- [33] Perdigoto, R. et al.; “*Integration of [U-¹³C] glucose and ²H₂O for quantification of hepatic glucose production and gluconeogenesis*”; NMR Biomed.; 16; 189-198; 2003
- [34] Murphy, E.; “*Stable isotope methods for the in vivo measurement of lipogenesis and triglyceride metabolism*”; J. Anim Sci 84, 2006

- [35] Turner, SM, EJ Murphy, RA Neese, F Antelo, T Thomas, A Agarwal, C Go and MK Hellerstein; “*Measurement of TG synthesis and turnover in vivo by $^2\text{H}_2\text{O}$ incorporation into the glycerol moiety and application of MIDA*”; Am. J. Physiol. Endoc. Metabol.; 285, 790-803, 2003
- [36] Schmidt, F., Yoshimura, Y., Ni, R., Kneesel, S., Constantinou, C.; “*Influence of Gender on the Diurnal Variation of Urine Production and Micturition Characteristics of the Rat*”; Neurourology and Urodynamics; 20: 287-295; 2001
- [37] Musshoff, F.; “*Drugs of abuse: solid-phase extraction*”; Academic Press, 2580-2581, 2000
- [38] Meyers, C., Meyers, D.; “*Thin Layer Chromatography*”; Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 2008
- [39] Jeffery, G. H., Basset, J., Mendham, J., Denney, R.; “*Vogel's – Quantitative Chemical Analysis*” (5th edition); Longman Scientific & Technical, 1989
- [40] Jones, J., Merritt, M., and Malloy, C.; “*Quantifying tracer levels of $^2\text{H}_2\text{O}$ enrichment from microliter amounts of plasma and urine by ^2H NMR*”; Magnetic Resonance Medicine 45, 156-158, 2001