



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTABILIDADE E ESTRUTURA DAS CADEIAS A E B DA
MOLÉCULA DE INSULINA**

Trabalho submetido por
Alexandre Mário Duarte do Rêgo
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Doutor Francisco Jorge Caldeira

Outubro de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia às pessoas mais importantes da minha vida e sem as quais não me teria sido possível concluir todo o percurso acadêmico.

Em memória da minha Mãe, Paula Rêgo, que fez muitos sacrifícios para que eu pudesse frequentar este curso, sempre me apoiou incondicionalmente, acreditou e fez-me acreditar nas minhas capacidades. Sem os seus conselhos e educação não seria a pessoa que sou hoje, razão pela qual lhe estou eternamente grato.

Esta dedicatória estende-se igualmente ao meu pai, Alexandre Rêgo, e avó, Maria Duarte, que sempre me incentivaram e transmitiram todo o seu orgulho, dizendo presente nos momentos mais difíceis, assim como aos restantes membros da minha família.

À minha colega, amiga e namorada, Kelly Frade, deixo uma dedicatória especial e um enorme sentimento de gratidão por ter sido o meu alicerce durante todo este trajeto e por toda a força que me deu desde que entrou na minha vida, pois sem o seu companheirismo e paciência teria sido tudo mais difícil.

AGRADECIMENTOS

A realização da presente monografia não teria sido possível sem a colaboração, direta ou indireta, de diversos intervenientes aos quais expresso o meu reconhecimento e os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar começaria por prestar um especial agradecimento ao Prof. Doutor Francisco Jorge Caldeira por ter tornado possível a realização da investigação levada a cabo, todo o seu empenho e dedicação assim como todo o tempo despendido para a realização da mesma. Enalteço ainda o seu profissionalismo e o facto de ser uma pessoa provida de bastantes ideias, as quais permitiram integrar na investigação uma panóplia de técnicas laboratoriais, possibilitando o desenvolvimento de inúmeras capacidades de génese técnica e profissional por parte do discente.

Presto também um especial agradecimento à minha colega Kelly Frade por todos os conhecimentos e sugestões que me transmitiu ao longo de todo o percurso académico, assim como toda a entajuda no decorrer de todos os trabalhos realizados.

Agradeço igualmente ao Departamento de Fisiologia da FCM-UNL pela colaboração realizada no presente projeto de investigação.

Presto ainda os devidos agradecimentos ao Departamento de Química (Requimte) da FCT-UNL por todos os recursos disponibilizados, assim como o apoio que me foi prestado por todos aqueles com quem trabalhei ao longo do presente projeto.

Por último, agradeço ao ISCSEM a oportunidade concedida para a realização de uma monografia de índole científica, os recursos disponibilizados, assim como todos os ensinamentos transmitidos ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

O presente trabalho de investigação baseia-se na hipótese das cadeias A e B de insulina apresentarem comportamentos e estabilidade diferentes quando expostas às mesmas condições como consequência das diferenças verificadas na sua sequência.

Assim, os objetivos estabelecidos foram em primeiro lugar a obtenção das duas cadeias com recurso à enzima responsável pela sua obtenção a nível biológico, a proteína dissulfito isomerase (PDI), seguida da determinação de possíveis produtos de interesse. Por fim, o último objetivo traçado foi a mimetização da reação que ocorre fisiologicamente e por conseguinte a obtenção das cadeias purificadas para avaliação da sua estabilidade.

A metodologia utilizada divide-se em três partes fundamentais. A primeira consiste na avaliação da atividade da PDI na presença de insulina, utilizando-se para o efeito o ensaio turbidimétrico e um ensaio enzimático. A segunda parte incide na análise dos produtos de degradação com recurso à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, de modo a identificar péptidos de interesse. Por fim, a última parte consiste na avaliação da estabilidade das cadeias A e B de insulina obtidas através de um método químico pela técnica de dispersão dinâmica da luz.

Os resultados obtidos permitiram constatar a hipótese estabelecida inicialmente, dado que as cadeias A e B de insulina apresentam comportamentos e estabilidade diferentes quando expostas às mesmas condições. Foi igualmente verificado que a agregação é uma característica inata à insulina e suas cadeias, sendo contudo necessários mais estudos relativamente à cadeia B para a compreensão deste comportamento.

Palavras-chave: Insulina; PDI; DLS; Estabilidade.

ABSTRACT

The present research work is based on the assumption that insulin A and B chains present different behavior and stability when exposed to the same conditions as a result of the differences in its sequence.

Therefore the objectives established were firstly the obtention of the two chains using the enzyme biologically responsible for this, the protein disulfide isomerase (PDI), followed by the determination of possible products of interest. Finally, the last defined objective was to mimic the physiologic reaction that takes place and, consequently obtaining the purified chains to evaluate their stability.

The methodology is divided into three main parts. The first consists in evaluating the activity of PDI in the presence of insulin, using for this purpose a turbidimetric assay and an enzymatic assay. The second part concerns the analysis of the degradation products using the high performance liquid chromatography technique, to identify peptides of interest. Finally, the last part consists of evaluating the stability of insulin A and B chains obtained through a chemical method with the dynamic light scattering technique.

The results revealed the hypothesis initially established, since insulin A and B chains have different behavior and stability when exposed to the same conditions. It was also observed that aggregation is an innate characteristic to insulin and its chains, needing however more studies on the B chain to understand this behavior.

Keywords: Insulin; PDI; DLS; Stability.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	11
1.1. Diabetes Mellitus	11
1.1.1. A patologia	11
1.1.2. Evolução histórica	11
1.2. Insulina	12
1.2.1. Descoberta e caracterização físico-química.....	12
1.2.2. Agregação.....	13
1.2.3. Métodos experimentais para avaliar a estabilidade.....	15
1.2.3.1. Técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)	16
1.2.3.1.1. Aplicações.....	16
1.2.3.1.2. Princípios e limitações da técnica	16
1.2.3.1.3. Análise dos dados.....	18
1.2.4. Síntese, armazenamento e secreção	20
1.2.5. Interação com o recetor	22
1.2.6. Efeitos fisiológicos.....	24
1.2.7. Papel biológico da degradação.....	24
1.3. Enzimas envolvidas na degradação da insulina	25
1.3.1. Proteína Dissulfito Isomerase (PDI)	26
1.3.1.1. Definição e propriedades físico-químicas	26
1.3.1.2. Localização.....	27
1.3.1.3. Funções	27
1.3.1.4. Determinação laboratorial da atividade da PDI.....	29

1.4. Hipótese e objetivos da investigação	30
2. Materiais e métodos	31
2.1. Enquadramento do projeto de investigação	31
2.2. Avaliação da atividade da PDI na presença de insulina	31
2.2.1. Ensaio turbidimétrico	31
2.2.2. Reação enzimática.....	32
2.3. Análise dos produtos de reação provenientes da reação enzimática	32
2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	32
2.4. Avaliação da estabilidade das cadeias A e B de insulina - Técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)	33
2.4.1. Redução das cadeias A e B da insulina por método químico	33
2.4.2. Purificação das cadeias A e B da insulina por HPLC	34
2.4.3. Avaliação da estabilidade das cadeias isoladas	34
3. Resultados e Discussão	36
3.1. Avaliação da atividade da PDI na presença de insulina	36
3.1.1. Ensaio turbidimétrico	37
3.1.2. Reação enzimática.....	38
3.2. Análise dos produtos de reação provenientes da reação enzimática	39
3.3. Avaliação da estabilidade das cadeias A e B de insulina - Técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)	44
4. Conclusões	53
5. Bibliografia	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da insulina.....	12
Figura 2 – Estados de agregação da molécula de insulina	13
Figura 3 – Hipotética dispersão dinâmica da luz de duas amostras	17
Figura 4 – Etapas do processo de síntese da insulina	21
Figura 5 – Mecanismo de libertação da insulina	21
Figura 6 – Organização dos domínios do recetor da insulina	23
Figura 7 – Estrutura do ectodomínio do recetor da insulina	23
Figura 8 – Esquematização dos domínios da PDI	26
Figura 9 – Estrutura tridimensional da PDI	27
Figura 10 – Reações de oxidação e isomerização catalisadas pela PDI	28
Figura 11 – Esquematização da técnica de turbidimetria	29
Figura 12 – Resultado obtido após catálise enzimática durante 72 horas.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Peso molecular e respetivo tempo de retenção de cada padrão analisado por HPLC 41

Tabela 2 – Tempos de retenção e pesos moleculares calculados para as amostras provenientes do ensaio de reação enzimática 42

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina Trifosfato

DLS – Dispersão Dinâmica de Luz

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

GIP – Péptido Insulinotrópico dependente de Glucose

GLP-1 – Glucagon-like Peptide-1

GLUT-2 – Transportador de Glucose-2

GSH – Glutatião na forma reduzida

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IDE – Enzima de Degradação da Insulina

PDI – Proteína Dissulfeto Isomerase

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. A patologia

O termo Diabetes Mellitus descreve um grupo de desordens crônicas e metabólicas caracterizadas por um aumento anormal dos níveis de glicémia, conduzindo a alterações do metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono (Lasker, McLachlan, Wang & Jelinek, 2010; ADA, 2013). O referido estado de hiperglicemia pode ter como etiologia a resistência das células alvo à ação da hormona, ou um processo auto-imune, traduzindo-se respetivamente na ausência relativa ou absoluta de insulina (Gallenberger, Castell, Hense & Kuttler, 2012).

Os indivíduos afetados pela patologia em causa estão sujeitos tanto a um conjunto de sintomas como de complicações a longo prazo, razão pela qual é necessária a instituição de um regime terapêutico. Contudo, a severidade da anomalia pode progredir, manter-se estável ou regredir, pelo que em última instância são os valores de hiperglicemia que ditam as ações a implementar em detrimento da natureza da patologia propriamente dita (American Diabetes Association, 2013).

1.1.2. Evolução histórica

Os dados disponíveis na literatura indicam que a prevalência de Diabetes Mellitus tem vindo a aumentar rapidamente ao longo dos últimos anos, tornando-a numa das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo. No ano de 2011 as estimativas apontavam para um total de 366 milhões de indivíduos afetados, prevendo-se um aumento para 552 milhões até ao ano de 2030 (Lasker et al., 2010; Whiting, Guariguata, Weil & Shaw, 2011).

Este aumento de incidência surge não só como consequência de alterações demográficas, tais como o envelhecimento, mas também devido ao facto de fatores de risco como o sedentarismo e obesidade serem mais comuns. Não obstante, é igualmente o resultado da prestação de melhores cuidados de saúde, os quais conduzem ao aumento da longevidade de indivíduos com a patologia em questão (Whiting et al., 2011).

1.2. Insulina

1.2.1. Descoberta e caracterização físico-química

A descoberta da insulina em 1921 por Banting e Best foi o grande marco histórico da Diabetes Mellitus, possibilitando não só o tratamento de doentes que sofriam da patologia em causa, como a compreensão de diversos aspetos inerentes à mesma (Nigro, Osman, Dart & Little, 2006; Pires & Chacra, 2008; Heile & Schneider, 2012; Hale & Coward, 2013).

Desde então e atendendo aos avanços tecnológicos ao longo dos últimos anos, têm ocorrido mudanças nos métodos de produção e nos modos de utilização, estando estes subjacentes à revolução assistida na insulinoterapia (Gabbay, 2008; Yaturu, 2013).

No que toca à sua caracterização físico-química, a insulina é uma proteína com massa molecular de 5,8KDa e ponto isoelétrico de 5,4, sendo a primeira proteína cuja sequência de aminoácidos foi identificada, mais precisamente em 1955 (Cohen, 2006; Fernandes, Denadai, Millán, Alves & Júnior, 2007; Zhang et al., 2009). Trata-se de uma hormona formada por duas cadeias de aminoácidos, a cadeia A e a cadeia B, as quais são constituídas por 21 e 30 aminoácidos respetivamente, encontrando-se interligadas por duas pontes dissulfito (A7-B7 e A20-B19). É ainda possível constatar que a cadeia A contém uma ponte dissulfito intracadeia, a qual liga o resíduo 6 ao resíduo 11, tal como ilustrado na figura 1 (Brems, Brown, Nakagawa & Tager, 1991; Keller, Clausen, Josefsen & Led, 2001; Santos et al., 2006; Ibrahim, 2010)

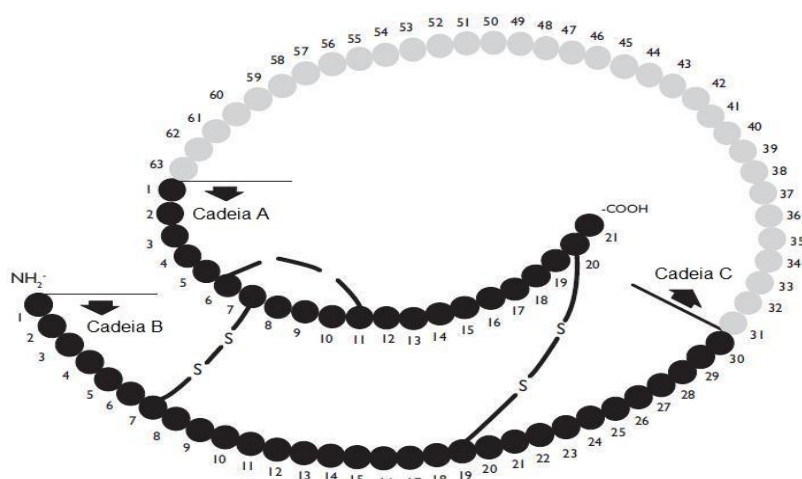


Figura 1 - Estrutura da insulina. Adaptado de Joshi, Parikh & Das, 2007.

A composição em aminoácidos é variável entre diferentes espécies de animais, apresentando no entanto 10 resíduos invariáveis em cada cadeia. Estes resíduos

invariáveis presentes nas cadeias A e B de insulina são responsáveis pela integridade estrutural da molécula, ajudando a definir a conformação da mesma. Por sua vez, os resíduos variáveis têm um papel importante no enrolamento da molécula, interagindo para formar uma estrutura tridimensional, a qual é determinada numa primeira instância pelas pontes dissulfeto, dependendo igualmente das forças de Van der Waals que se estabelecem (Yuan, Wang & Tang, 1999; Silva, Ribeiro, Ferreira & Veiga, 2003).

No que toca à sua estrutura secundária, a insulina contém três hélices α , encontrando-se duas delas localizadas na cadeia A, nas posições A2-A8 e A13-A20, e a terceira na cadeia B, na posição B9-B19. Esta estrutura é normalmente retida quando a molécula se encontra em solução, podendo no entanto ocorrer alterações conformacionais na porção terminal da cadeia B, assumindo-se duas conformações distintas, designadas por T e R, as quais podem convergir entre si e dizem respeito à conformação tensa ou relaxada respetivamente (Kaarsholm et al., 1993; Ciszak et al., 1995; Buijs et al., 1999).

1.2.2. Agregação

As moléculas de insulina existem sob a forma monomérica apenas em concentrações inferiores a 0,1mM, pelo que em condições fisiológicas, a insulina é normalmente mantida em concentrações inferiores a 10^{-3} mM, de forma a assegurar a sua circulação e que esta exerça a sua atividade biológica como monómero. Em concentrações superiores ocorre uma auto-associação reversível dos monómeros, tal como é possível observar na figura 2, levando à formação de dímeros, hexâmeros e em última instância de oligómeros. Este processo é mediado por ligações de hidrogénio intermoleculares não covalentes entre os grupos da cadeia lateral do péptido, mais precisamente nas posições B24 e B26 de cada monómero (Asada et al., 1994; Silva et al., 2003; Santos et al., 2006; Fernandes et al., 2007).

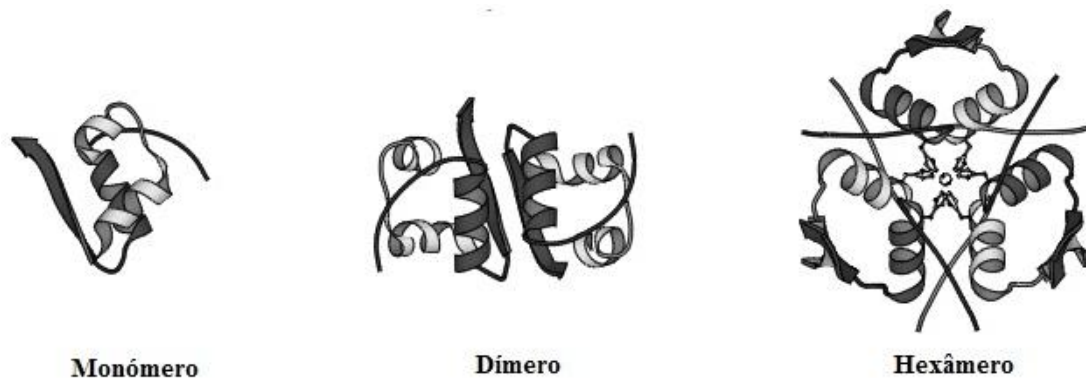


Figura 2 - Estados de agregação da molécula de insulina. Adaptado de Whittingham et al., 2002.

Além do referido, o C-terminal da cadeia B de insulina possui flexibilidade inata, uma característica essencial para o referido processo de auto-associação, que tem como unidade básica o dímero (Ciszak et al., 1995; Xu, Yan, Seeman, Sun & Dubin, 2011).

Fisiologicamente, esta propriedade de formação de agregados é explicada à luz da necessidade de armazenamento de grandes quantidades de insulina nas células β do pâncreas, tendo um papel preponderante não só ao nível da síntese da hormona, mas igualmente na sua proteção da degradação física e química. No entanto, em virtude das formas multiméricas não serem biologicamente ativas, visto não serem capazes de se ligar ao recetor específico da hormona, o estado de associação da insulina é o ponto-chave para o controlo da sua atividade. (Whittingham et al., 2002; Fernandes et al., 2007). Os multímeros referidos são definidos como entidades inter-proteicas termodinamicamente estáveis com uma estrutura definida, desempenhando o seu estado um papel essencial na interpretação dos dados de agregação proteica. Adicionalmente, esses mesmos dados devem indicar que no decorrer do processo de agregação da insulina é seguida uma cinética de segunda ordem e que a interação entre os dímeros em associação é uma reação de natureza isodésmica (Xu et al., 2011).

Este fenómeno de auto-associação da insulina é um processo complexo influenciado por diversos fatores, tais como o pH, concentração molar, temperatura, força iónica e presença de iões divalentes no meio, como é o caso do zinco pelo que o estudo das alterações provocadas por estes parâmetros, recorrendo a diversas técnicas laboratoriais, pode permitir inferir acerca do grau de agregação das moléculas de insulina, e em última instância, acerca da sua estabilidade (Matsuura, Powers, Manning & Shefter, 1993; Ciszak et al., 1995; Lovatt, Cooper & Camilleri, 1996; Fernandes et al., 2007).

Deste modo, relativamente ao efeito do pH é de referir que a insulina monomérica é a forma predominante a pH ácido (menor que 2) assim como em pH neutro e baixas concentrações da proteína. Na ausência de iões de zinco e a pH neutro, o dímero de insulina é a espécie mais prevalente, ao passo que na presença de zinco ou de concentrações superiores de insulina, na ordem dos mM, ocorre a hexamerização das moléculas, levando à formação de estruturas mais estáveis por comparação com os monómeros. Numa solução a pH neutro a insulina encontra-se em equilíbrio entre as formas monomérica, dimérica, tetramérica e hexâmérica. O aumento do pH leva a que os agregados formados gradualmente se dissociem, atingindo-se novamente o estado

monomérico quando o pH ultrapassa valores de 10 a 11 (Olsen, Ludvigsen, Niels & Kaarsholm, 1996; Ahmad, Uversky, Hong & Fink, 2005; Tantipolphan et al., 2010).

Relativamente à temperatura, no que à agregação da insulina diz respeito, os seus efeitos são mais difíceis de avaliar, uma vez que a temperaturas muito elevadas ocorre desnaturação térmica das proteínas e este fenómeno não é reversível. No entanto, o aumento da temperatura está normalmente associado à formação de agregados das moléculas de insulina, sendo inclusive possível verificar este processo à temperatura ambiente (Bohidar, 1989; Brange, Langkjær, Havelund & Vølund, 1992; Matsuura et al., 1993; Whittingham et al., 2002; McDonald et al., 2012).

Além dos fatores referidos, existem outros compostos que podem interferir no estado de agregação da insulina, tais como a arginina, que apesar de em concentrações elevadas induzir a desnaturação proteica, quando se encontra em concentrações baixas é capaz de suprimir os processos de agregação (Tantipolphan et al., 2010).

Contudo, apesar do que foi referido, a lista do que permanece por saber acerca das condições físicas e termodinâmicas que afetam o comportamento da insulina é extensa, o que reforça a necessidade da realização de mais estudos relativos à agregação desta hormona (Bohidar, 1998).

1.2.3. Métodos experimentais para avaliar a estabilidade

Segundo Taluja e Bae (2007) o termo estabilidade atrás referido é definido como a capacidade da insulina não sofrer transformação em produtos secundários, nomeadamente agregados covalentes. Deste modo os diferentes aspetos que influenciam a estabilidade física de proteínas podem levar a alterações sequenciais e estruturais das mesmas, resultando em alterações da atividade biológica e farmacológica ou ainda reações imunológicas não desejadas (Jørgensen, Vermehren, Bjerregaard & Froekjaer, 2003; Zoete & Meuwly, 2006).

A estabilidade da molécula de insulina deriva particularmente das suas pontes dissulfito, definidas como ligações covalentes formadas entre dois resíduos de cisteína, as quais são não só determinantes para que seja mantida a correta conformação da proteína, como desempenham um papel crítico no que diz respeito à sua atividade biológica. Entre as três pontes dissulfito da insulina, as que se apresentam intercadeia são mais facilmente reduzidas comparativamente com a ponte intracadeia A, o que permite inferir acerca da sua importância na estabilidade da molécula (Brange et al.,

1992; Yuan, Wang & Tang, 1999; Whittingham et al., 2002; Hatahet & Ruddock, 2007; Zhang et al., 2009).

Deste modo, o estudo das transformações estruturais da insulina, especialmente em condições que promovam processos de agregação mais extensivos, assume especial importância, não só do ponto de vista da estabilidade a longo termo de preparações farmacêuticas, mas pode igualmente fornecer informações importantes do processo de agregação proteica (Bumagina, Gurvits, Artemova, Muranov & Kurganov, 2010).

O fenómeno de agregação da insulina tem sido estudado por uma grande panóplia de técnicas, incluindo dispersão estática e dinâmica da luz, calorimetria, turbidimetria, microscopia de força atômica e espetrometria de massa entre outras, tendo interesse a este nível incidir na técnica de dispersão dinâmica da luz (Lyutova, Kasakov & Gurvits, 2007; Giger, Vanam, Seyrek & Dubin, 2008; Shimkunas et al., 2009; Attri, Fernández & Minton, 2010).

1.2.3.1. Técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)

1.2.3.1.1. Aplicações

A técnica de dispersão dinâmica da luz, adiante referida como DLS, tem demonstrado importância fundamental no estudo do tamanho e forma de partículas presentes numa grande variedade de sistemas, tendo sido aplicada com sucesso para a monitorização de alterações do tamanho molecular de proteínas aquando da sua desnaturação e renaturação. Um exemplo típico da aplicação da DLS é o estudo da auto-associação de moléculas de insulina, permitindo avaliar a distribuição relativa de monómeros, dímeros e hexâmeros nas “formulações”, estando descrita a sua utilização com este fim em inúmeros estudos (Gast, Damaschun, Misselwitz & Zirwer, 1992; Fernandes et al., 2007; Martell, Briones, Hurtado, López & Meneses, 2009; Xu et al., 2011; Pohl et al., 2012).

1.2.3.1.2. Princípios e limitações da técnica

A DLS é um método bem estabelecido para a medição do tamanho de partículas numa gama de comprimento de nanómetros a micrómetros, podendo ser descrito sucintamente do seguinte modo: quando um feixe de luz incide numa suspensão, cada partícula dessa suspensão dispersa a luz, sendo que a luz dispersada por apresenta flutuações. Ao colocar um detetor num determinado ângulo, e registando os valores de

intensidade da luz dispersa, é possível definir séries de tempo, as quais são proporcionais ao coeficiente de difusão, que por sua vez, depende do diâmetro hidrodinâmico das partículas, tal como ilustrado na figura 3 (Gast et al., 1992; Block & Scheffold, 2010; Chicea D., Chicea R. & Chicea L., 2010).

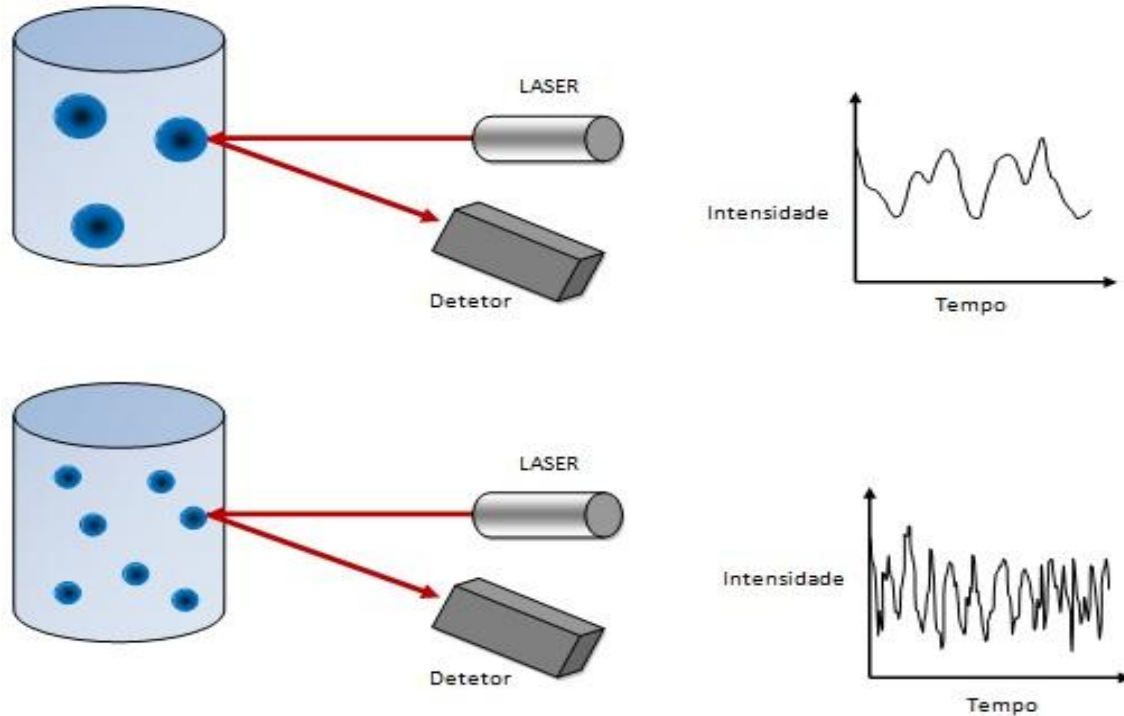


Figura 3 - Hipotética dispersão dinâmica da luz de duas amostras.

A técnica em análise baseia-se na medição de eventos de dispersão únicos, o que significa que cada fóton detetado foi dispersado apenas uma vez na amostra. Deste modo, a diluição é normalmente necessária para amostras muito concentradas ou que apresentem uma elevada dispersão, o que pode tornar o processo relativamente moroso e propício a erros. Por outro lado, para amostras cujo comportamento dependa diretamente da concentração a diluição não é uma opção, o que pode dificultar a obtenção de resultados (Block & Scheffold, 2010).

Atendendo ao método em causa é de realçar que a intensidade da luz dispersa é proporcional ao quadrado do diâmetro. Assim, uma partícula com um diâmetro de $1\mu\text{m}$ irá dispersar a luz com uma intensidade cem vezes superior comparativamente a uma partícula cujo diâmetro seja de $0,1\mu\text{m}$. Com isto em mente é compreensível que quando estão presentes partículas de elevadas dimensões em solução a dispersão de luz se deva sobretudo à existência destas, em detrimento de partículas inferiores, pelo que a técnica de DLS fornece informações acerca do diâmetro das partículas de maiores dimensões

em detrimento do desejável diâmetro médio da totalidade das partículas da amostra, sendo esta a grande limitação do método. Como tal, uma análise de elevada qualidade deveria ser sempre realizada a diversos ângulos de dispersão, havendo um ângulo de deteção ótimo para cada tamanho de partícula, facto que assume importância acrescida aquando da presença de uma amostra com distribuição de tamanhos de partículas desconhecidos (LSinstruments, s.d.; Block & Scheffold, 2010; Chicea et al., 2010).

Deste modo, conclui-se que a presença de partículas de diferentes dimensões pode ser associada ao diâmetro calculado utilizando o método em causa, pelo que é necessária especial precaução no que toca a contaminações, e não só, quando se faz uso desta técnica. Outra das limitações que pode ser apontada é o facto de partículas de dimensões muito reduzidas, não serem bons focos de dispersão de luz, pelo que não conseguirão ser quantificadas por este método. Não obstante esta técnica também possui diversas valências, sendo a mais evidente a obtenção rápida de resultados e a possibilidade de poder ser adaptada à amostra em estudo, o que justifica o seu elevado grau de utilização (Chicea et al., 2010).

Tendo em conta o referido anteriormente, existe a necessidade de ultrapassar as limitações subjacentes ao uso desta metodologia, surgindo nesse âmbito uma solução para a supressão do efeito de dispersão múltipla. Tal efeito pode ser alcançado utilizando dois lasers que operem a diferentes comprimentos de onda e dois detetores para captar a informação de dispersão de cada laser, numa técnica designada por dispersão dinâmica de luz de duas cores (two-color DLS). Apesar de altamente eficaz na obtenção de dados de dispersão de sistemas concentrados este método apresenta desafios em termos de obtenção de dados e manutenção da precisão do sistema, o que justifica o seu escasso uso (Block & Scheffold, 2010).

1.2.3.1.3. Análise dos dados

Para proceder à análise de dados é essencial entender os princípios que levam à obtenção dos mesmos. Como tal, deve-se ter em conta que pequenas partículas em suspensão sofrem um movimento térmico aleatório conhecido como movimento Browniano, o qual se rege pela equação de Stokes-Einstein abaixo apresentada.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

Onde:

- D simboliza o coeficiente de difusão;
- k_B é a constante de Boltzmann;
- T se trata da temperatura;
- η é a viscosidade dinâmica;
- R_h diz respeito ao raio hidrodinâmico (Horiba, s.d.; Frisken, 2001; Maia, Viletti, Vidal, Borsali & Balaban, 2011).

Apesar dos cálculos serem tratados pelo *software* do instrumento, a equação descrita relembra acerca da importância de determinados parâmetros. Em primeiro lugar é de destacar a temperatura, a qual além de aparecer diretamente na equação é um dos fatores críticos que influenciam a viscosidade, o qual é outro dos pontos a ter em conta na determinação do coeficiente de difusão de partículas. Contudo a temperatura é um dos parâmetros que pode ser controlado pelo operador, podendo ser adaptada à amostra em estudo (Horiba, s.d.; LSinstruments, s.d.).

Por outro lado a equação relembra-nos ainda que o fenómeno em estudo é na verdade o movimento das partículas, o qual se relaciona com o tamanho das mesmas, sendo esse o objetivo da análise. Não menos importante, é de ter em conta que o tamanho de partícula determinado pela presente técnica é o tamanho hidrodinâmico, isto é, o tamanho determinado é o tamanho de uma esfera que se difunde e assume o comportamento da partícula. Contudo, tal não corresponde inteiramente à realidade, visto que a totalidade das partículas não tem forma esférica (Horiba, s.d.).

O sinal ótico obtido ao fim de uma medição apresenta alterações aleatórias devido à alteração aleatória da posição das partículas, tal como demonstrado na figura 3, devendo-se estas variações do sinal ao movimento Browniano das partículas (Horiba, s.d.). Para obter o coeficiente de difusão indicado na equação de Stokes-Einstein o sinal pode ser interpretado através de uma função de auto-correlação, a partir da qual se consegue determinar a taxa de decaimento, que se relaciona diretamente com a variável pretendida, tal como se pode verificar na equação abaixo.

$$\Gamma = q^2 D$$

Onde:

- Γ é a taxa de decaimento;
- q^2 simboliza o vetor de dispersão;
- D é o coeficiente de difusão;

Por sua vez, q pode ser obtido através da expressão:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

Onde:

- n simboliza o índice de refração do líquido em análise;
- λ é o comprimento de onda do laser;
- θ se trata do ângulo de dispersão.

Deste modo, é possível calcular o coeficiente de difusão e por conseguinte alcançar o objetivo principal, a determinação da média do tamanho das partículas em análise (Horiba, s.d.; LSinstruments, s.d.; Frisken, 2001).

1.2.4. Síntese, armazenamento e secreção

Após a caracterização físico-química e descrição do método experimental de interesse que está na base do estudo da estabilidade da insulina, torna-se essencial abordar os processos que estão envolvidos na síntese, armazenamento e secreção desta proteína.

Assim, no que toca à sua síntese, a insulina é uma hormona sintetizada pelas células β nos ilhéus de Langerhans ao nível do pâncreas, na forma de proinsulina, como resposta a vários estímulos, nomeadamente o aumento dos níveis de glicémia (Haber, Curi, Carvalho & Carpinelli, 2001; Lipson et al., 2006; Joshi et al., 2007).

A proinsulina, molécula precursora da insulina, tem na sua composição um péptido sinalizador, o qual é responsável pelo direcionamento da cadeia péptidica para o interior do retículo endoplasmático rugoso. Este desempenha um papel crucial ao nível da síntese da hormona, sendo o responsável pela clivagem do péptido referido anteriormente e pela formação de pontes dissulfito, o que leva à formação de proinsulina. A proinsulina, constituída pelas cadeias A e B ligadas por intermédio do péptido C, dirige-se então para o complexo de Golgi, local onde é armazenada em vesículas, também conhecidas como grânulos secretórios. Após a maturação dos

grânulos secretórios ocorre clivagem do péptido C (tal como se pode observar na figura 4) o que conseqüentemente gera a insulina no seu estado final, a qual é armazenada na forma de hexâmeros contendo zinco até ao momento da sua secreção (Wilcox, 2005; Lipson et al., 2006; Skelin, Rupnik & Cencič, 2010).

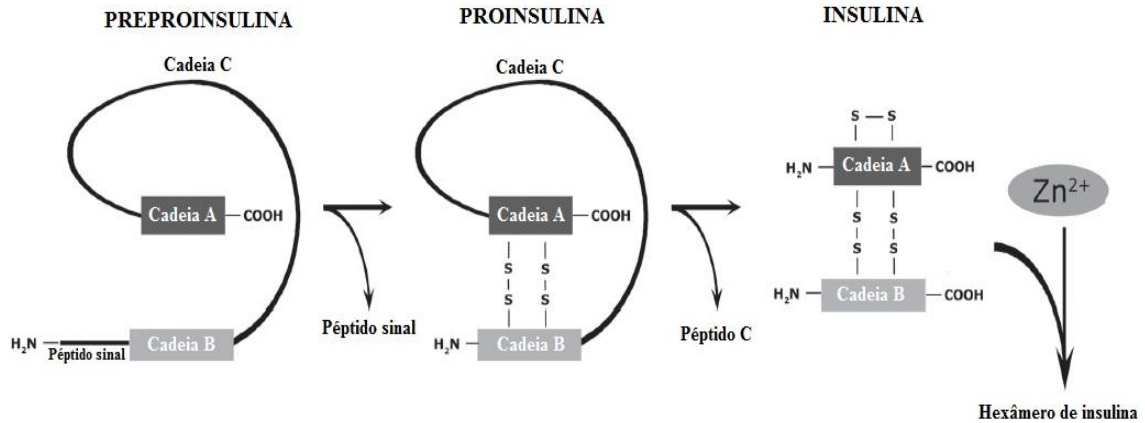


Figura 4 - Etapas do processo de síntese da insulina. Adaptado de Skelin et al., 2010.

Numa fase final, a insulina é secretada devido a uma variedade de estímulos, tais como o aumento dos níveis de glicémia, o que se traduz no influxo de glucose para as células β através dos recetores GLUT 2. O aumento da concentração plasmática de glucose irá ter como consequência um aumento do metabolismo da mesma, o que resulta na elevação das concentrações de ATP, o que por sua vez leva ao encerramento dos canais de potássio, à semelhança do que é possível observar na figura 5. Subjacente a este processo irá ocorrer a despolarização da membrana, resultando na abertura dos canais de cálcio com consequente entrada para o interior da célula, traduzindo-se na excitose dos grânulos de insulina (Machado, 1998; Joshi et al., 2007; Skelin et al., 2010).

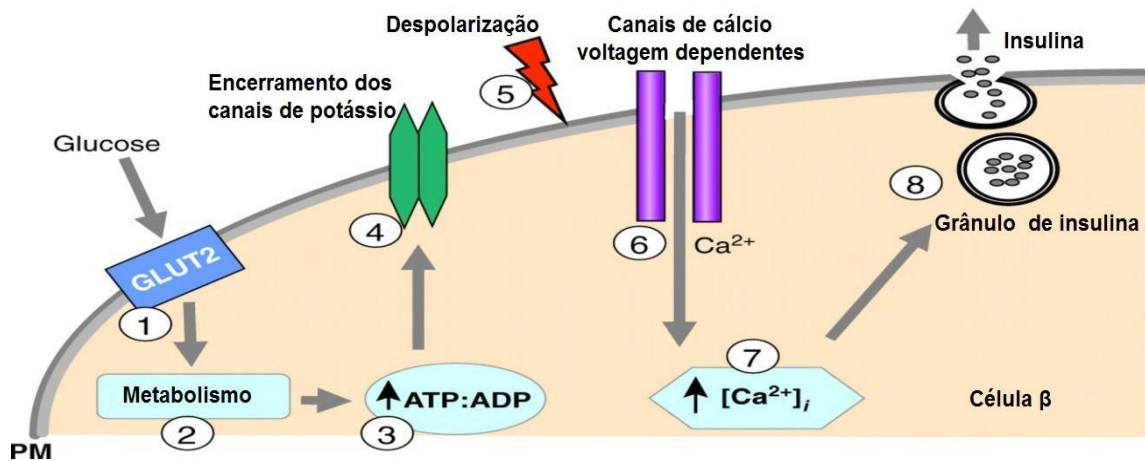


Figura 5 - Mecanismo de libertação da insulina. Adaptado de Wang & Thurmond, 2009.

Dada a importância da insulina no uso e metabolismo da glucose, não é surpreendente que esta tenha múltiplas influências ao nível da síntese e secreção da hormona em causa. Não obstante, existem outros fatores que também têm influência nestes processos, destacando-se o papel de aminoácidos como a arginina, a qual apresenta efeito insulínico e da leucina que é um potente estimulador da secreção da insulina. É de destacar ainda o papel do sistema nervoso, que através da transmissão colinérgica, nomeadamente por intermédio da estimulação do nervo vago, leva à secreção da insulina, ao passo que através da via adrenérgica é obtido o efeito oposto, isto é, a inibição da secreção da proteína. Outras hormonas como o GLP-1, GIP, as incretinas e hormona de crescimento são mediadores estimulatórios da secreção de insulina, enquanto a somatostatina, adrenalina e noradrenalina são mediadores inibitórios (Wilcox, 2005).

1.2.5. Interação com o recetor

A ligação da insulina ao seu recetor inicia uma cascata de reações nos tecidos-alvo, constituindo o primeiro passo na regulação da homeostase metabólica. Apesar de décadas de investigação, a estrutura tridimensional do complexo entre a insulina e o seu recetor foi elusiva, sobretudo devido à dificuldade em reproduzir o recetor da hormona (Smith et al., 2010; Menting et al., 2013). Contudo, esta situação foi retificada, sendo agora possível uma melhor compreensão da interação que se estabelece entre a insulina e o seu recetor (Menting et al., 2013).

O recetor da insulina pertence à superfamília de recetores celulares transmembranares tirosina-quinase e como tal é constituído por uma região extracelular, onde se liga o substrato proteico, e por uma região citoplasmática que contém o domínio tirosina-quinase. Trata-se de um homodímero no qual cada monómero é constituído por uma cadeia α e por uma cadeia β que se encontram interligadas por uma ponte dissulfito. A subunidade α é extracelular, ao passo que a subunidade β contém uma porção extracelular, uma sequência transmembranar e o domínio intracelular supracitado. (Yip & Ottensmeyer, 2003; Smith et al., 2010; Menting et al., 2013).

A porção extracelular de cada protómero $\alpha\beta$ contém seis domínios (L1, CR, L2, FnIII-1, FnIII-2 e FnIII-3) e um domínio de inserção (ID) dentro de FnIII-2, tal como é possível constatar através das figuras 6 e 7.

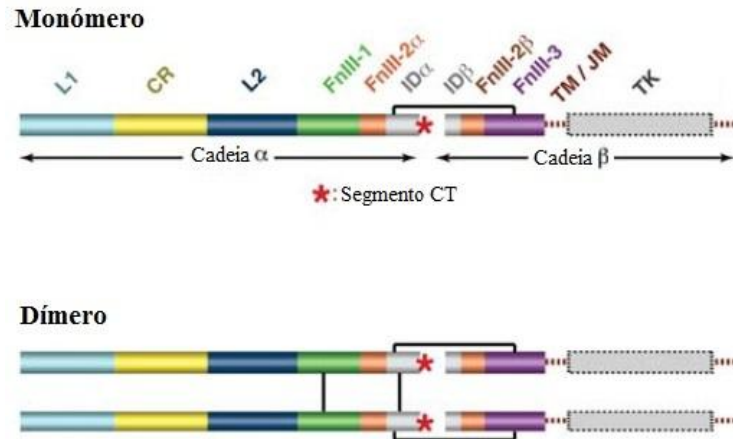


Figura 6 – Organização dos domínios do recetor da insulina. Adaptado de Smith et al., 2010.

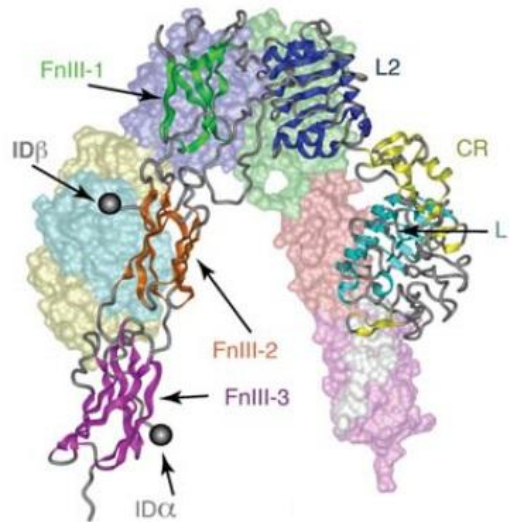


Figura 7 – Estrutura do ectodomínio do recetor da insulina. Adaptado de Smith et al., 2010.

A molécula de insulina liga-se ao seu recetor dimérico levando à sua ativação, constituindo duas interfaces distintas. A primeira interface compreende a região carboxi-terminal (α CT) de uma das cadeias α do recetor e o domínio L1 da outra metade do recetor, ao passo que a segunda interface consiste predominantemente nos resíduos responsáveis pela hexamerização da hormona os quais interagem com um local secundário do recetor, mais precisamente na junção de FnIII-1 e FnIII-2 da cadeia α oposta relativamente ao domínio L1 ligado. Aquando da ligação ocorrem alterações estruturais na insulina, nomeadamente ao nível dos resíduos B26-B30, o que vai ao encontro dos dados mais antigos descritos na literatura de que a insulina sofre transformações conformacionais quando se liga ao seu recetor. Contudo, ao contrário do

que seria de esperar, o recetor da insulina também sofre alterações, verificando-se que após a ligação da hormona ao segmento α CT, FnIII-1 e FnIII-2 sofrem um reposicionamento, o que altera a localização relativa dos domínios FnIII-3, potencialmente iniciando a transdução do sinal (Smith, Swenson, Dodson, Dodson & Reynolds, 1984; Ward & Lawrence, 2011; Menting et al., 2013).

1.2.6. Efeitos fisiológicos

A cascata de reações nos tecidos-alvo atrás descrita leva a que a insulina afete uma grande diversidade de processos fisiológicos, embora esta seja mais reconhecida pelo seu importante papel regulador na homeostase da glucose. Em resposta à elevação dos valores de glicémia, a secreção de insulina é aumentada e estimula a captação de glucose e síntese de glicogénio e inibe a glicogenólise e neoglicogénese, mantendo deste modo a normoglicémia. Em adição às ações referidas, a insulina exerce um vasto leque de efeitos metabólicos, estando envolvida no metabolismo de hidratos de carbono, metabolismo lipídico no músculo e tecido adiposo, assim como na síntese proteica numa variedade de tecidos (Rhodes & White, 2002; Wilcox, 2005).

Contudo, a regulação da glicémia não é só levada a cabo pela insulina, sendo que a sua hormona contra-regulatória, o *glucagon*, também desempenha um papel importante na manutenção dos referidos valores de normoglicémia (Wilcox, 2005).

1.2.7. Papel biológico da degradação

A degradação da insulina é um processo complexo e que atualmente ainda não se encontra totalmente esclarecido. No entanto, a remoção da insulina da circulação ajuda a controlar a resposta celular a esta hormona por diminuição da sua disponibilidade, pensando-se que este processo está envolvido da mediação de alguns aspetos das suas ações (Duckworth, Bennett & Hamel, 1998; Mora, Scarfone, Calvani, Greco & Mingrone, 2003).

A captação e degradação da insulina são características comuns a todos os tecidos sensíveis à ação da mesma, sendo estes processos dependentes da sua concentração fisiológica. É no entanto de destacar entre os órgãos envolvidos neste processo o papel do fígado, rins e músculo (Duckworth et al., 1998).

Relativamente ao fígado, este apresenta-se como local primário da remoção desta hormona da circulação, sendo responsável pela remoção de 50% da insulina que atinge a veia porta, através do denominado efeito de primeira passagem. No entanto esta

percentagem é variável, dependendo de diversas condições tanto a nível fisiológico como a nível fisiopatológico. Contudo, esta remoção da circulação não implica que a insulina seja imediatamente destruída, podendo uma parte significativa libertar-se dos seus recetores específicos e voltar a entrar em circulação (Duckworth et al., 1998; Mora et al., 2003).

No que toca ao rim, este é descrito como o principal responsável pela remoção da insulina da circulação sistémica, depurando aproximadamente 50% da insulina periférica e 50% da proinsulina circulante. No geral, a degradação da insulina pelas células renais é realizada pelos mesmos processos que ocorrem ao nível hepático, mais precisamente com recurso a endossomas. No entanto, ao contrário do que acontece no fígado, é importante referir que os lisossomas desempenham um papel crucial e mais precoce no que toca à degradação da insulina, sendo a este nível que o processo de degradação fica completo (Duckworth et al., 1998; Mora et al., 2003).

Em última instância, a insulina que não é removida pelo fígado e rins é removida por outros tecidos, pelo que depois dos órgãos referidos, o músculo é um dos principais responsáveis, podendo esta remoção ainda ocorrer ao nível dos fibroblastos, monócitos, linfócitos e células gastrointestinais entre outros (Duckworth et al., 1998; Mora et al., 2003).

Em suma, a remoção da circulação e degradação da insulina são processos regulados, desempenhando um papel crucial na ação desta hormona. Distúrbios a este nível estão presentes em diversas morbilidades, tais como Diabetes Mellitus tipo 2 e obesidade, podendo-se traduzir em problemas de vertente clínica a longo prazo (Mora et al., 2003; Wilcox, 2005).

1.3. Enzimas envolvidas na degradação da insulina

A metabolização da insulina é levada a cabo por um conjunto de enzimas, entre as quais a IDE, a PDI e ainda as proteases acídicas ao nível dos lisossomas, levando à produção de diferentes fragmentos de degradação, os quais podem apresentar atividade biológica, dependendo da enzima em causa. Contudo, apenas será dada ênfase à PDI, pois é a única que apresenta interesse ao nível das experiências laboratoriais realizadas (Duckworth et al., 1998; Mora et al., 2003).

1.3.1. Proteína Dissulfito Isomerase (PDI)

1.3.1.1. Definição e propriedades físico-químicas

A proteína dissulfito isomerase, comumente designada por PDI, foi a primeira enzima à qual se reconheceu atividade dissulfito isomerase, e apesar da grande quantidade de estudos realizados no âmbito da mesma, a lista do que ainda permanece inexplicado é extensa (Smith et al., 2004; Okada, Hashimoto & Imaoka, 2010; Rutkevich, Cohen-Doyle, Brockmeier & Williams, 2010).

Encontra-se definida na literatura como uma proteína homodimérica pertencente à família das oxiredutases, com um peso molecular de 57KDa, expressa em níveis elevados no retículo endoplasmático das células eucariotas, representando cerca de 1% do conteúdo proteico total das células (Nardai, Korcsmáros, Papp & Csermely, 2003; Root, Sliskovic & Mutus, 2004; Smith et al., 2004; Rajpal Schuiki, Liu, Volchuk & Arvan, 2012).

Esta enzima é constituída por cinco domínios, entre os quais dois são catalíticos (a e a') e apresentam a sequência Cys-Gly-His-Cys, a qual está envolvida nas reações de permuta tiol-dissulfito, dois não apresentam atividade catalítica, designados por b e b', estando igualmente presente o "ligando" x, o qual é responsável pela ligação entre o domínio b' e a', tal como esquematizado na figura 8 (Ellgaard & Ruddock, 2005; Okada et al., 2010; Galligan & Petersen, 2012; Walker, Soo, Levina, Talbo & Atkin, 2013).

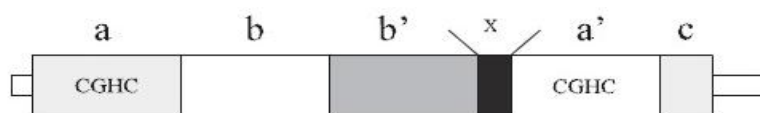


Figura 8- Esquematização dos domínios da PDI. Adaptado de Okada et al., 2010.

Os substratos da PDI são reconhecidos pelo domínio b', o qual contém uma região de ligação peptídica, sendo as reações catalisadas pelos resíduos de cisteína dos domínios a e a', à semelhança do que já foi referido anteriormente. Adicionalmente é possível a visualização do domínio c, o qual é uma região putativa de ligação de cálcio, que segundo a literatura desempenha um papel fundamental na estabilização da conformação funcional da PDI em condições extremas (Okada et al., 2010; Galligan & Petersen, 2012).

No que toca à sua estrutura tridimensional, a PDI adquire uma conformação em forma de U, tal como é possível observar através da figura 9, a qual pode apresentar

transformações conformacionais restringindo ou permitindo a acessibilidade e ligação dos substratos (Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008; Laurindo, Pescatore & Fernandes, 2012).

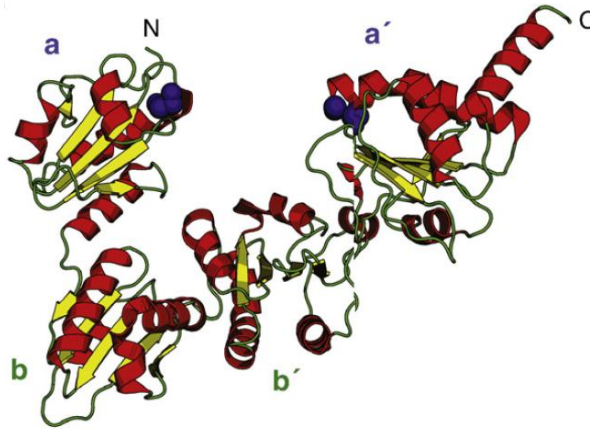


Figura 9 - Estrutura tridimensional da PDI. Adaptado de Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008.

No geral, os domínios catalíticos a e a' situam-se no topo virados diretamente um para o outro, enquanto os domínios b e b' se encontram entre estes formando a base da estrutura. Esta zona do interior da enzima é mais hidrofóbica, particularmente ao nível dos domínios b e b' sendo o principal local de ligação para péptidos e regiões desnaturadas de substratos (Laurindo et al., 2012; Oka & Bulleid, 2013):

1.3.1.2. Localização

Apesar de ser primeiramente uma proteína do retículo endoplasmático, local onde se encontra em grande quantidade, a PDI também pode ser encontrada em outras localizações, tais como a mitocôndria e citosol. Ao ser secretada pelas células esta enzima associa-se electrostaticamente à superfície celular, podendo como tal ser igualmente encontrada à superfície de hepatócitos, plaquetas, linfócitos, células pancreáticas, células endoteliais, neutrófilos ou ainda de fibroblastos, entre outras, o que pode ser uma explicação para algumas das suas ações (Root et al., 2004; Smith et al., 2004; Sliskovic, Raturi & Mutus, 2005; Galligan & Petersen, 2012; Laurindo et al., 2012).

1.3.1.3. Funções

Caraterizada pelo termo de proteína multifuncional, a PDI desempenha uma grande variedade de funções, sendo a mais importante a formação de pontes dissulfito entre os resíduos de cisteína das proteínas, especialmente tendo em conta que este tipo

de ligações é essencial não só para que as proteínas mantenham a sua estrutura como também a sua função (Wang, Fast & Attie, 1997; Wilson, Lees & Bulleid, 1998; Aran et al., 2010).

Dependendo do potencial redox do meio celular, a PDI pode apresentar diferentes ações, estando envolvida não só ao nível da formação das ligações dissulfito (oxidação), mas também ao nível da quebra de ligações incorretas (redução) ou rearranjo das mesmas (isomerização) (Ellgaard & Ruddock, 2005; Okada et al., 2010; Oka & Bulleid, 2013).

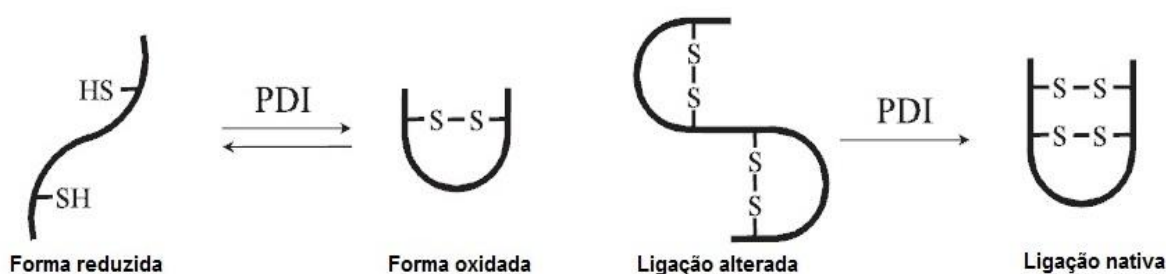


Figura 10 - Reações de oxidação e isomerização catalisadas pela PDI. Adaptado de Okada et al., 2010.

É no entanto importante ter em conta que aquando da oxidação, os domínios catalíticos da PDI ficam reduzidos, devendo ser reoxidados para subseqüentes reações de catálise, o que pode ser atingido com recurso a uma oxidase designada de Ero1, a qual é uma proteína que faz parte da membrana do retículo endoplasmático (Nardai et al., 2003; Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008; Rutkevich et al., 2010).

Porém, a atividade enzimática desta proteína depende da presença de compostos dissulfito de baixo peso molecular, como é o caso do GSH (glutatião na forma reduzida), DTT (ditiotreitól) e cisteína entre outros (Tang & Tsou, 1990; Sliskovic et al., 2005; Santos et al., 2006).

Assim, atendendo ao que foi referido anteriormente, entre as funções desempenhadas pela PDI estão igualmente descritas: a sua capacidade de funcionar como *chaperone* no decorrer do processo de *folding* proteico, o seu envolvimento no processamento e maturação de várias proteínas da superfície celular, na agregação plaquetar ou ainda na evolução de determinadas patologias, tanto por vírus como por bactérias e parasitas (Essex, Chen & Swiatkowska, 1995; Nardai et al., 2003; Root, Sliskovic & Mutus, 2004; Smith et al., 2004; Stolf et al., 2011).

1.3.1.4. Determinação laboratorial da atividade da PDI

Atualmente utilizam-se diversos ensaios para a determinação laboratorial da atividade da PDI, no entanto, atendendo ao trabalho realizado, apenas será focado o ensaio de turbidimetria (Root et al., 2004; Raturi, Vacratsis, Seslija, Lee & Mutus, 2005; Jasuja et al., 2012).

Como tal, é necessário ter em conta que a turbidez num líquido se deve à presença de partículas finamente divididas que se encontram suspensas. Assim, quando se incide um feixe de luz numa amostra que apresenta um determinado grau de turbidez, a sua intensidade é reduzida devido à dispersão, dependendo a quantidade de luz dispersa do tamanho e concentração das partículas em causa. Contudo, é ainda de realçar que a quantidade de luz dispersa através da amostra aumenta com a sexta potência do agregado formado. Não menos importante, deve-se ter em conta que o fenómeno em estudo é efetivamente a redução da intensidade da luz incidente na amostra e não a medição da dispersão da mesma, tal como demonstra a figura 11 (Hills & Tiffany, 1980; Morais, Tóth & Rangel, 2006).

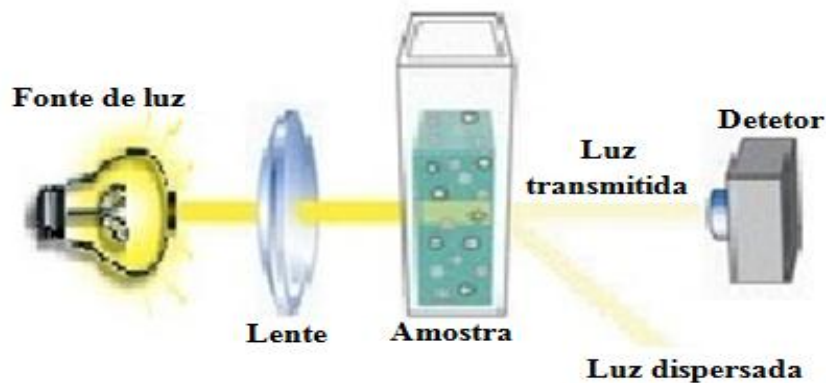


Figura 11- Esquemática da técnica de turbidimetria.

São vários os estudos que relatam o uso desta técnica para demonstrar as funções da PDI, recorrendo no entanto normalmente à insulina com a finalidade de obtenção de derivados com ação biológica, em especial devido a certas porções da cadeia B apresentarem atividade. Assim, é igualmente possível mimetizar enzimaticamente a reação que ocorre entre esta enzima e a insulina e estudar os produtos de reação com recurso a uma técnica como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), detetando deste modo compostos de interesse (Lundström & Holmgren, 1990; Tang & Tsou, 1990; Duckworth et al., 1998; Yuan et al., 1999; Root et al., 2004; Xiang, Manevich, Tew & Townsend, 2012).

1.4. Hipótese e objetivos da investigação

Atendendo à diferença da sequência e estrutura das cadeias A e B da molécula de insulina, o presente trabalho baseou-se na hipótese das referidas cadeias apresentarem comportamentos e estabilidade diferentes quando expostas às mesmas condições, pelo que foram realizados diversos ensaios com diferentes propósitos, os quais serão abordados posteriormente.

Assim, o primeiro objetivo estabelecido é a obtenção das duas cadeias de insulina separadas, em especial atendendo ao facto que a PDI reduz a molécula de insulina a nível biológico possibilitando a obtenção das duas cadeias separadas desta hormona.

O segundo objetivo proposto é avaliar se a reação anterior resulta em produtos de interesse a nível fisiológico, nomeadamente se é possível a obtenção das cadeias purificadas.

Por fim, o terceiro apontado é a mimetização da reação ocorrida a nível fisiológico, de forma a conseguir purificar as cadeias A e B de insulina e por conseguinte avaliar a estabilidade de cada um dos péptidos isoladamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Enquadramento do projeto de investigação

O presente trabalho de investigação está enquadrado num projeto de cooperação entre diversos investigadores e faculdades, dos quais fazem parte o Departamento de Fisiologia da FCM/UNL e o Departamento de Química (Requimte) da FCT/UNL. Os ensaios retratados neste capítulo da monografia foram realizados sob a orientação e supervisão do Prof. Doutor Francisco Jorge Caldeira, na Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa, encontrando-se a sua metodologia exposta de seguida.

2.2. Avaliação da atividade da PDI na presença de insulina

O primeiro grupo de experiências laboratoriais levadas a cabo diz respeito à avaliação da atividade da PDI na presença de insulina, tendo-se realizado para o efeito o ensaio turbidimétrico e uma reação enzimática, os quais se encontram abaixo explicados.

2.2.1. Ensaio turbidimétrico

A reação *in vitro* entre a PDI e a insulina foi inicialmente avaliada pela técnica de turbidimetria, utilizando-se para o efeito um espectrofotómetro (Shimadzu®) capaz de ler a um comprimento de onda no UV-visível. O ensaio consiste essencialmente na monitorização da quebra das pontes dissulfido da insulina com recurso à técnica descrita, tendo sido selecionado um comprimento de onda de 630 nm.

Assim, em primeiro lugar, procedeu-se à adição a uma cuvete de quartzo de PDI (0,4 mg/ml), insulina bovina (10 mg/ml), GSH (0,1 M), EDTA (0,1 M), tampão KH_2PO_4 (0,1 M; pH 7,4), albumina bovina (2,42 mg/ml) e ainda água milipore. Após a adição de todos os componentes a amostra foi suavemente homogeneizada, seguindo-se imediatamente a sua colocação no aparelho por forma a dar início ao ensaio.

A reação decorreu a uma temperatura de 37°C, de modo a tentar mimetizar *in vitro* as condições verificadas a nível fisiológico, durante um intervalo de tempo de 30 minutos. A respetiva amostragem foi efetuada em intervalos de 10 minutos a partir do instante inicial, sendo posteriormente as amostras congeladas para aplicação em HPLC.

Após o término do tempo de ensaio, os dados obtidos através do espectrofotómetro foram guardados para posterior tratamento e análise.

2.2.2. Reação enzimática

A metodologia do segundo ensaio realizado no âmbito da avaliação da cinética de reação entre a insulina e a PDI é semelhante ao primeiro ensaio descrito. Assim, tal como referido, em primeiro lugar procedeu-se à adição a uma cuvete de quartzo de PDI (0,4 mg/ml), insulina bovina (10 mg/ml), GSH (0,1 M), EDTA (0,1 M), tampão KH_2PO_4 (0,1 M; pH 7,4), albumina bovina (2,42 mg/ml) e ainda água milipore até perfazer um volume final de 1,2 ml. Contudo, após a preparação da mistura reacional, esta foi colocada num banho termostaticado (termostato Lauda[®] RE 104) a 37°C durante 72 horas.

No que toca à amostragem, esta foi realizada em dois momentos, correspondendo a primeira amostra ao instante inicial (0 minutos), ao passo que a segunda amostragem foi efetuada decorridas 72 horas de catálise enzimática. Finalizado o processo de amostragem as amostras foram igualmente congeladas para posterior avaliação por HPLC.

No entanto, importa realçar que ao contrário do ensaio anterior as amostras em estudo não foram sujeitas a análise turbidimétrica, tendo o presente ensaio o mero intuito de comparação visual e cromatográfica entre o instante inicial e final de uma mesma reação enzimática.

2.3. Análise dos produtos de reação provenientes da reação enzimática

A segunda classe de ensaios realizados diz respeito à análise dos produtos de reação provenientes da reação enzimática supracitada, tendo sido feito uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para obter os resultados em questão.

2.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Numa primeira fase, antes de se proceder à obtenção de resultados foi necessário preparar o equipamento a ser utilizado. Assim, o aparelho HPLC Merck L-7100 equipado com um detetor UV L-7400 e uma interface D-7000 foi inicialmente conectado à coluna cromatográfica selecionada (Superdex-75). De seguida ligou-se a interface e por fim o monitor que estava interligado com a mesma.

Posteriormente foi selecionada a bomba que seria responsável pela propulsão do tampão de eluição através da coluna, sendo utilizado um fluxo de 0,7 ml/min.

O passo seguinte foi eleger um comprimento de onda que fosse ideal à obtenção dos resultados, tendo-se optado pelo comprimento de onda de 280 nm.

Decorridos os passos anteriores era então importante ligar a bomba propulsora e esperar sensivelmente uma hora de forma a equilibrar a coluna cromatográfica. Após a estabilização da linha de base, foram injetadas as amostras desejadas, aguardando-se um período de tempo nunca inferior a quarenta minutos para obtenção do cromatograma relativo a cada uma.

Dado o extravio das amostras do primeiro ensaio, as amostras utilizadas foram apenas os produtos obtidos da reação enzimática, mais concretamente os referentes ao tempo 0 minutos e 72 horas, para as quais foi selecionado um tampão de eluição composto pela mistura de tampão fosfato 0,1 M + cloreto de sódio 0,5 M. É ainda importante referir que após a aplicação de uma determinada amostra e antes da injeção da amostra seguinte, era realizada a limpeza do equipamento com o auxílio de tampão de eluição de forma a evitar possíveis contaminações.

As moléculas utilizadas como padrão de comparação de pesos moleculares foram a albumina e o citocromo C, as quais estiveram sujeitas às mesmas condições cromatográficas que as amostras em estudo, tendo sido igualmente realizada a análise cromatográfica da PDI utilizada na reação enzimática para efeitos de avaliação da pureza da mesma. Após obtenção da reta de calibração, através dos padrões referidos, foi possível proceder ao cálculo das massas moleculares das amostras provenientes da reação enzimática.

2.4. Avaliação da estabilidade das cadeias A e B de insulina – Técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)

O último grupo de ensaios realizados tinha como objetivo a avaliação da estabilidade dos possíveis produtos de degradação originados pela reação enzimática entre a PDI e a insulina (cadeias A e B de insulina reduzidas), encontrando-se dividido em três etapas, as quais se encontram descritas de seguida.

2.4.1. Redução das cadeias A e B de insulina por método químico

Numa primeira fase, procedeu-se à mimetização da catálise enzimática desempenhada pela PDI na presença de insulina com recurso a um método químico. A necessidade de tal procedimento justifica-se pela maior facilidade de purificação destes compostos por esta via, dada a atmosfera redutora e antioxidante em que foram produzidos e dado que os reagentes utilizados para tal técnica contêm pesos moleculares bastante inferiores aos das cadeias A e B reduzidas.

Assim, a redução da insulina bovina (10 mg/ml) foi realizada com β -mercaptoetanol (14,3 M), na presença de ureia (16 M) e EDTA (0,1 M) e com uma atmosfera de argon de modo a permitir as condições pretendidas. Caso este último requisito não fosse cumprido, poderia existir oxigênio indesejado na atmosfera controlada, podendo afetar desde logo todo o processo.

A reação química ocorreu durante um período de tempo de 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, após o qual a mistura reacional era injetada no aparelho de HPLC.

2.4.2. Purificação das cadeias A e B de insulina por HPLC

No decorrer da reação química foram selecionadas as condições de ensaio da cromatografia líquida de alta eficiência, tendo sido escolhido um fluxo de 0,7 ml/min, um comprimento de onda de 280 nm e, por fim, um tampão de eluição que permitisse a amostra percorrer a coluna cromatográfica Superdex Peptide, nomeadamente o ácido fórmico a 20%.

Após a reação findar, injetou-se imediatamente a mistura reacional no aparelho de HPLC de modo a evitar, na medida do possível, a interferência do oxigênio, o qual poderia oxidar os produtos de interesse.

Com este procedimento pretendia-se a separação das duas cadeias de insulina reduzidas, visto que apresentam tempos de retenção diferentes, e a sua conseqüente recolha para dois recipientes distintos.

2.4.3. Avaliação da estabilidade das cadeias isoladas

Finalizada a separação das cadeias e com o objetivo de avaliar a sua estabilidade em solução, estas foram colocadas separadamente em duas cuvetes de quartzo, com um volume nominal de 1,2 ml, e as leituras realizadas pela técnica de dispersão dinâmica de luz no aparelho Nanopartica SZ-100.

A título de curiosidade foi igualmente avaliada a estabilidade da insulina, a qual foi diluída com água milipore até uma concentração final de 1 mg/ml, de modo a possibilitar as leituras com o maior grau de precisão possível.

As cadeias A e B de insulina isoladas obtidas a partir do ensaio anterior encontravam-se diluídas em ácido fórmico a 20%, não sendo no entanto possível apurar as concentrações das mesmas dadas as condições a que foram obtidas e devido à ausência de um termo comparativo.

Importa realçar que todos os gráficos de dispersão de tamanho de partículas obtidos foram expressos em nanómetros e as medições realizadas a uma temperatura de 37°C e a um ângulo de dispersão de 90° após incidência de um feixe de luz cujo comprimento de onda era de 532 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atendendo aos métodos descritos, o presente capítulo da monografia visa a apresentação e discussão dos resultados obtidos, encontrando-se estes estruturados pela mesma sequência que no capítulo dos métodos e materiais anteriormente abordado.

3.1. Avaliação da atividade da PDI na presença de insulina

Antes de analisar os resultados obtidos na presente seção é essencial ter em conta certos princípios teóricos, uma vez que para a avaliação da cinética de reação *in vitro* foi necessário recorrer a diversos compostos, nomeadamente o EDTA, GSH, tampão KH_2PO_4 , albumina, insulina bovina e por fim a PDI, importando neste âmbito ter em conta o papel de cada um.

No que toca ao EDTA, são de realçar as suas funções como agente quelante, tendo a capacidade de interagir com diversos compostos, entre os quais metais de transição, levando à formação de complexos de elevada estabilidade, o que por sua vez impede que este tipo de substâncias interaja em reações como a que ocorre entre a insulina e a PDI.

Relativamente ao GSH, é importante referir que se trata de um composto existente a nível fisiológico com um papel importante ao nível da redução das ligações dissulfito entre as cadeias da insulina, sendo ainda um dos substratos da PDI.

Quanto ao tampão utilizado, o selecionado foi o tampão fosfato de potássio, o qual é um dos tampões fisiológicos mais importantes dadas as suas funções ao nível do equilíbrio ácido/base, sendo relevante no presente estudo para a manutenção dos valores de pH próximos dos valores fisiológicos.

Outro dos compostos utilizados foi a albumina, a qual se encontra descrita na literatura como a proteína plasmática mais abundante, representando cerca de 50% do conteúdo proteico total. É sintetizada ao nível do fígado, desempenhando um papel de relevo em diversas funções fisiológicas, tal como o transporte de diversas moléculas.

Por fim, no que toca aos últimos compostos utilizados e tal como referido anteriormente, a PDI é uma enzima capaz de catalisar não só a formação como também a quebra de ligações dissulfito entre os resíduos de cisteína de diversas moléculas, como é o exemplo da insulina, a proteína responsável pelo presente projeto de investigação e que desempenhou um papel basilar nos diversos ensaios abordados ao longo da monografia.

3.1.1. Ensaio turbidimétrico

No que toca à primeira experiência realizada, o ensaio de turbidimetria, este incidia na demonstração da função redutora da PDI na presença de insulina numa matriz não biológica, tendo sempre em atenção as condições apresentadas a nível fisiológico, tal como já foi referido.

Assim, a experiência *in vitro* originou o resultado demonstrado no gráfico 1.

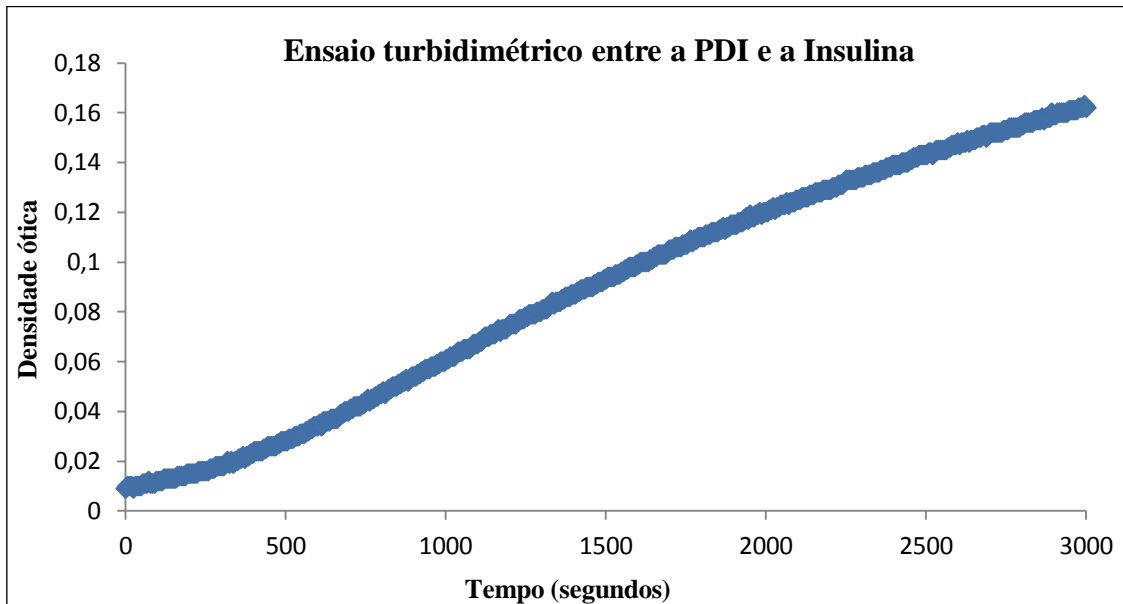


Gráfico 1 - Resultado da catálise enzimática *in vitro* entre a PDI e a insulina.

Através da análise dos resultados obtidos é possível verificar que no decorrer da experiência ocorre um aumento constante dos valores de densidade ótica até a um certo ponto, a partir do qual é possível verificar uma certa estabilização. Tal pode ser explicado à luz das características do ensaio de turbidimetria, o qual é um método analítico para determinação da turbidez de uma solução baseado na medição da transmissão de um feixe de luz que atravessa a amostra em estudo, à semelhança do que foi referido no capítulo da introdução.

A turbidez num líquido deve-se à presença de partículas finamente divididas que se encontram suspensas. Assim, quando se incide um feixe de luz numa amostra que apresenta um determinado grau de turbidez, a sua intensidade é reduzida devido a um fenómeno de dispersão, dependendo a quantidade de luz dispersa do tamanho e concentração das partículas em causa. Contudo, é importante ter em conta que a

quantidade de luz dispersa através da amostra aumenta com a sexta potência do raio do agregado formado (Hills & Tiffany, 1980).

Como tal, o resultado alcançado é explicado com base no seguinte: na presença de PDI e GSH ocorre a clivagem das ligações dissulfeto da molécula de insulina, acontecimento que origina as cadeias A e B de insulina separadas. O aumento da quantidade das cadeias separadas origina agregados, visto que estas apresentam elevada afinidade para si mesmas, aumentando deste modo a turbidez da amostra por aumento do raio do agregado formado, tornando possível a sua deteção pela técnica de turbidimetria. Este facto é sobretudo visível ao nível da cadeia B, a qual apresenta um elevado grau de hidrofobicidade, tendo por isso maior tendência para a auto-associação (Tang & Tsou, 1990).

Em adição, é de referir a possibilidade de ocorrer a ligação entre as cadeias A e B de insulina isoladas com a albumina, sendo este um importante ponto a ter em conta a nível fisiológico.

3.1.2. Reação enzimática

O segundo ensaio realizado foi a reação enzimática entre a insulina e a PDI, sendo o seu intuito a avaliação comparativa tanto a nível visual como cromatográfico, entre a catálise no instante inicial e decorridas 72 horas. O objetivo primário deste ensaio é averiguar se a referida reação resulta em produtos de interesse a nível biológico, contudo os dados cromatográficos só serão abordados na seguinte seção da monografia.

Assim, decorrida a reação enzimática durante o tempo previsto foi possível visualizar alterações significativas na amostra, sendo de realçar a formação de precipitados, os quais não eram visíveis no instante inicial, mas que podem ser observados através da figura 12.



Figura 12 - Resultado obtido após catálise enzimática durante 72 horas.

Este resultado vai ao encontro do esperado, comprovando efetivamente a ocorrência de uma reação aquando da junção PDI à proteína de interesse, ocorrendo a quebra das pontes dissulfido da insulina referida no ensaio anterior, a qual a longo prazo se traduz em alterações possíveis de identificar visualmente.

Finalizada a reação, procedeu-se à recolha e congelamento do sobrenadante, cuja determinação dos produtos de degradação por análise cromatográfica é seguidamente abordada.

3.2. Análise dos produtos de reação provenientes da reação enzimática

No que toca à segunda classe de ensaios realizados, procedeu-se à aplicação das diversas amostras de interesse no aparelho de HPLC, sendo obtidos os resultados retratados na presente seção. No entanto, antes de proceder à explicação dos mesmos é necessário entender as razões que levaram ao uso do tampão de eluição escolhido.

Assim, em primeiro lugar, é importante referir que a mistura do tampão fosfato com cloreto de sódio é a mais adequada quando são pretendidas condições mais fisiológicas comparativamente a outros tampões, tais como o ácido fórmico a 20%, razão que esteve na base da sua escolha. Não obstante, o ácido fórmico a 20% é um ácido de baixa concentração regularmente usado como fase móvel de métodos de análise como HPLC, dado ser um composto volátil e compatível com outros métodos de análise. É ainda de realçar a sua influência ao nível da coluna cromatográfica, minimizando a interação da mesma com as amostras, melhorando ainda a resolução dos picos obtidos no cromatograma. Deste modo, dadas as razões que o tornam num tampão tão útil, não é de estranhar o seu uso em ensaios como a separação das cadeias A e B de insulina e análise de produtos de turbidimetria.

Ambos os tampões mencionados foram utilizados para a realização do presente ensaio, contudo apenas serão abordados os resultados relativos à mistura do tampão fosfato com cloreto de sódio referida inicialmente visto ter sido esta que apresentou os melhores resultados e se aproxima mais das condições fisiológicas.

Relativamente aos resultados propriamente ditos, antes de se poder analisar os produtos de reação provenientes da reação enzimática era necessária a construção de uma reta de calibração, razão pela qual foram injetadas no aparelho de HPLC as amostras de albumina e citocromo C. A este nível importa realçar que apesar de serem necessários um mínimo de três pontos para a obtenção da reta de calibração, dado que o

padrão de albumina utilizado apresentava uma impureza bem definida foi possível nomeá-lo como o terceiro ponto.

Como tal, os gráficos dos dois padrões encontram-se ilustrados nas figuras seguintes.

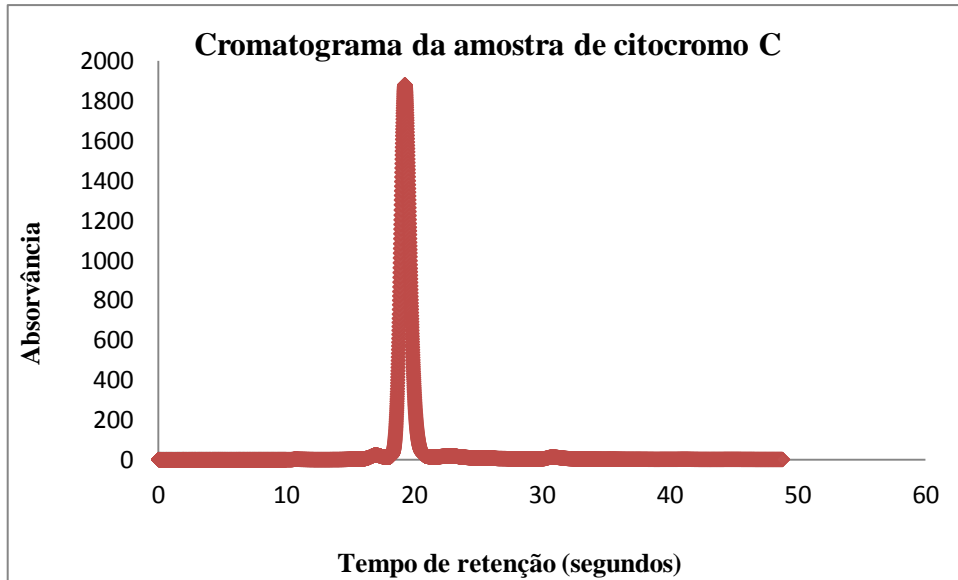


Gráfico 2 - Cromatograma correspondente à amostra padrão de citocromo C.

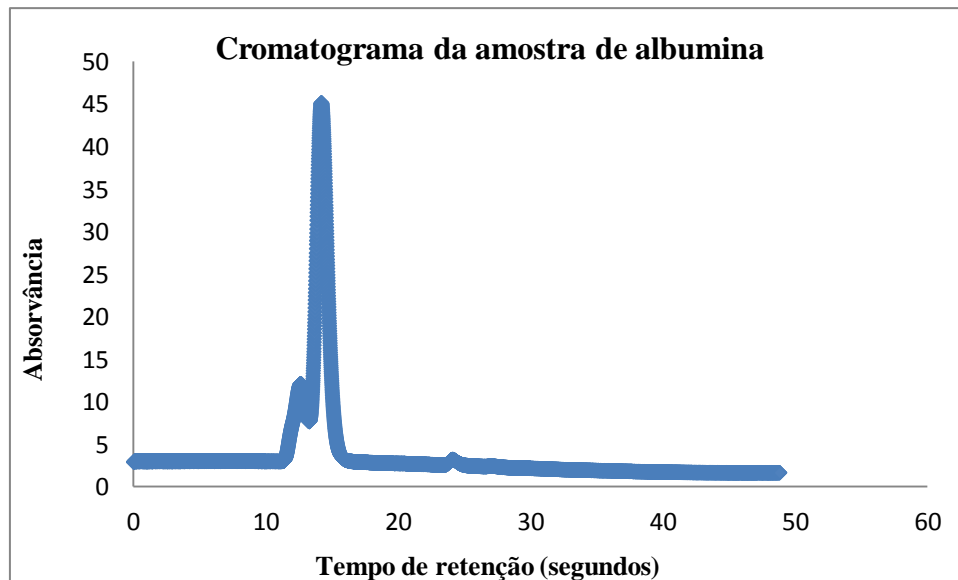


Gráfico 3 - Cromatograma correspondente à amostra padrão de albumina.

Tal como seria de esperar, a análise dos resultados indica que o padrão de citocromo C utilizado se encontrava puro, dado que apenas foi possível a visualização de um pico bem definido, ao passo que na amostra de albumina foi visível a presença de

dois picos cromatográficos, correspondendo o primeiro à impureza do padrão e o segundo à proteína propriamente dita.

Os respectivos pesos moleculares e tempos de retenção de cada um dos picos cromatográficos identificados encontram-se discriminados na tabela 1.

Tabela 1 - Peso molecular e respetivo tempo de retenção de cada padrão analisado por HPLC.

Proteína padrão	Peso molecular (Kda)	log ₁₀ Peso molecular	Tempo de retenção (min)
Impureza da albumina	80,01	1,90314427	12,61
Albumina	66,41	1,82223348	14,19
Citocromo C	12	1,079181246	19,27

Com recurso aos tempos de retenção indicados na tabela 1 e atendendo ao logaritmo de base dez do peso molecular de cada amostra foi possível calcular uma reta de calibração, a qual se encontra apresentada no gráfico seguinte.

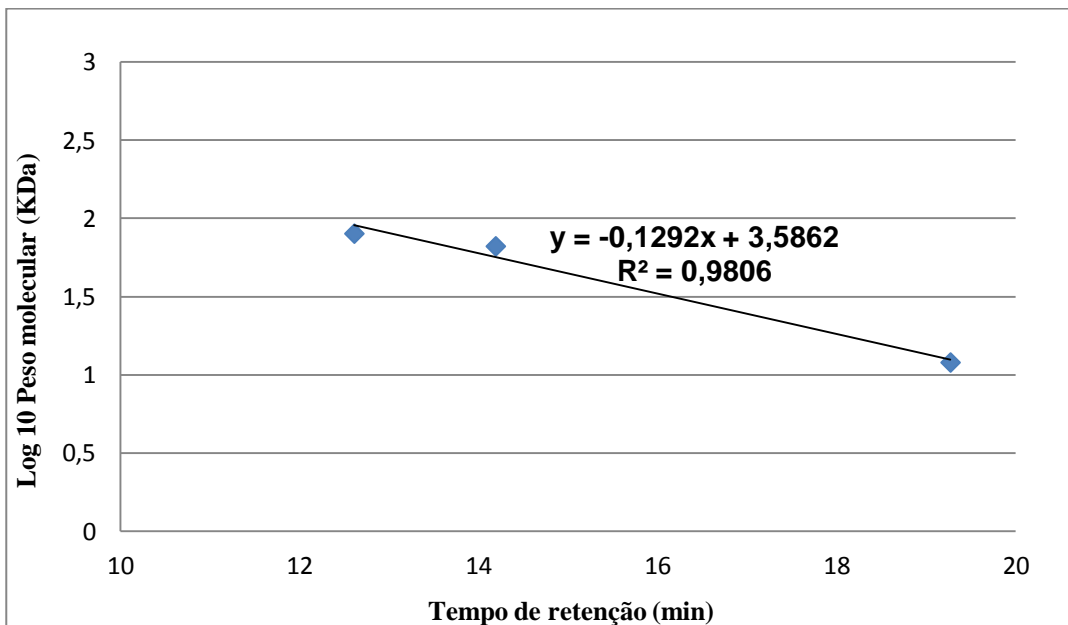


Gráfico 4 - Representação gráfica da reta de calibração calculada com base nos padrões utilizados.

As duas amostras provenientes do ensaio de reação enzimática são relativas ao instante inicial e após setenta e duas horas de catálise enzimática, tal como referido anteriormente, encontrando-se o respetivo resultado no gráfico 5.

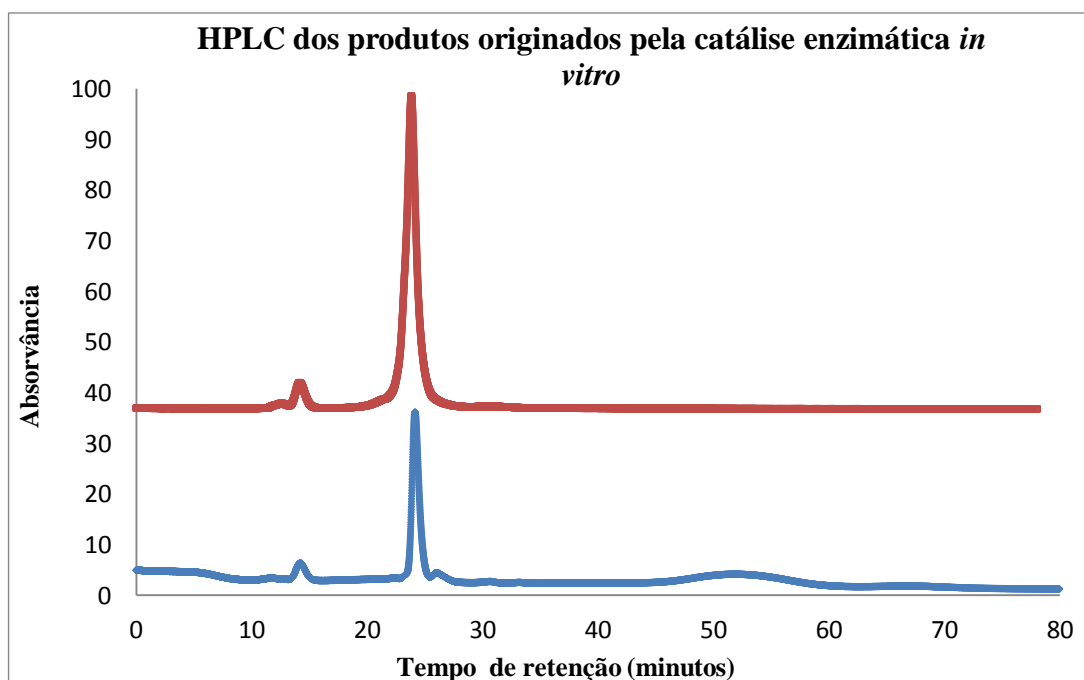


Gráfico 5 - Resultado cromatográfico das amostras provenientes da reação enzimática após 72 horas (a vermelho) e 0 minutos (a azul) respetivamente.

Os respetivos tempos de retenção de cada pico cromatográfico e peso molecular calculado com base na reta de calibração encontram-se demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Tempos de retenção e pesos moleculares calculados para as amostras provenientes do ensaio de reação enzimática.

Amostra	Tempo de retenção (min)	Log 10 Peso molecular	Peso molecular calculado (KDa)
Reação enzimática 0h	14,17	1,76	56,94
	23,84	0,51	3,21
Reação enzimática 72h	14,20	1,75	56,44
	24,15	0,47	2,92

Atendendo ao resultado obtido é possível verificar que ocorreu um incremento do pico registado aproximadamente aos vinte e quatro minutos após setenta e duas horas de catálise enzimática, o que se deve muito provavelmente à ação da PDI. Assim, no instante inicial, não foi permitido à PDI exercer a sua atividade devido ao congelamento imediato da mistura enzimática, contudo, dado que a amostra foi descongelada e deixada à temperatura ambiente durante um tempo considerável, é provável que tenha ocorrido um certo grau de reação. Tal facto realça não só a importância da temperatura para a reação enzimática ocorrida, mas também justifica o incremento do tempo de retenção verificado após setenta e duas horas. A este nível é importante relembrar que

foi possível a visualização de um precipitado após o tempo de reação referido, e que a amostra em estudo era efetivamente o sobrenadante. Tais dados suportam a afirmação de que as pontes dissulfeto da insulina foram quebradas e que os produtos em análise eram as suas cadeias separadas, daí o menor peso molecular verificado comparativamente com o instante inicial.

O pico referente aos 14 minutos nos dois cromatogramas deve-se aos constituintes presentes na mistura enzimática, mais precisamente à albumina, ao passo que o segundo pico pode ter diversas explicações. Deste modo, e tendo em conta que foi calculado um peso molecular próximo do da cadeia A (2,5 KDa), e dado que a cadeia B é insolúvel no tampão de eluição utilizado, é verosímil que o incremento de absorvância presenciado se deva a um aumento da cadeia A separada, dado que esta apresenta um peso molecular com ordem de grandeza próxima do resultado obtido.

Para finalizar, foi igualmente efetuada a análise cromatográfica da PDI utilizada, encontrando-se o respetivo resultado no gráfico 6.

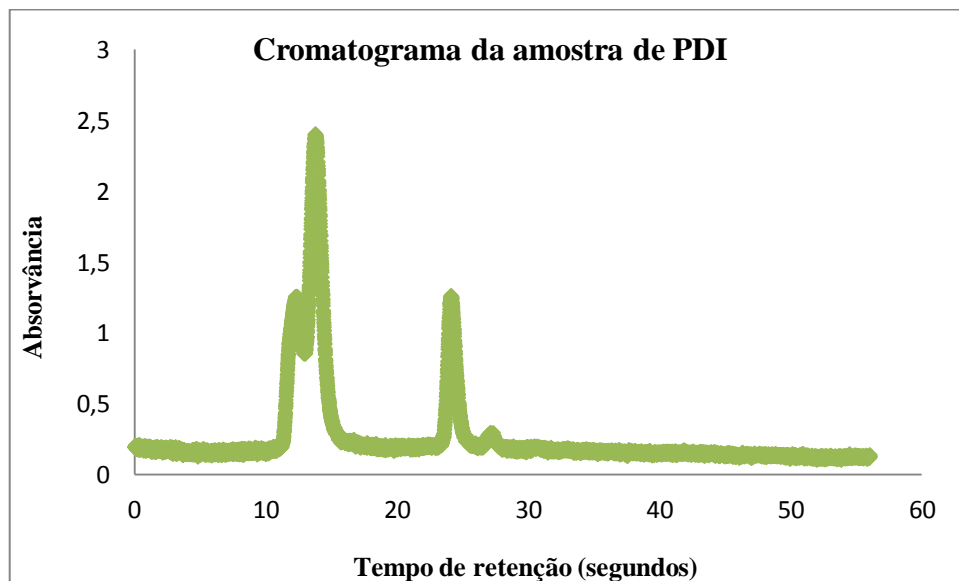


Gráfico 6 - Cromatograma correspondente à amostra de PDI utilizada no ensaio enzimático.

O resultado obtido não foi ao encontro do esperado tendo sido possível verificar mais que um pico cromatográfico na amostra de PDI utilizada. Teoricamente o padrão de enzima utilizado era puro, pelo que deveria ser apenas visível um pico após análise do cromatograma obtido. Este resultado pode significar a presença de impurezas indesejadas ao nível do composto utilizado, não pondo no entanto em causa os restantes

resultados obtidos, dado que estes foram ao encontro do esperado e visto que a mesma enzima foi utilizada no âmbito de outros ensaios realizados no âmbito da cooperação de investigação estabelecida, podendo tal dever-se a um erro esporádico ao nível da análise cromatográfica.

3.3. Avaliação da estabilidade das cadeias A e B de insulina – Técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)

Tal como referido anteriormente, o objetivo da última atividade laboratorial realizada era a avaliação do grau de agregação, e por conseguinte a estabilidade das cadeias A e B de insulina.

Assim, de forma a poder atingir a meta estabelecida para o presente ensaio era necessário em primeiro lugar proceder à separação das cadeias A e B de insulina, de modo a tornar possível a posterior avaliação pela técnica de dispersão dinâmica da luz. Para tal, foi necessário quebrar as pontes dissulfito que unem as duas cadeias da proteína, tendo-se recorrido a diversos reagentes, nomeadamente: árgon; EDTA; ureia; insulina bovina e, por fim, β -mercaptoetanol.

Posto isto, relativamente ao árgon, é importante referir que se trata de um gás inerte, sendo o responsável pela prevenção da ocorrência de reações de oxidação, as quais poderiam influenciar os produtos da reação em causa, pelo que desde o instante inicial, aquando da adição dos reagentes ao frasco, este foi o gás usado para obter a atmosfera pretendida.

O segundo reagente utilizado foi o EDTA, que à semelhança do referido anteriormente, é um agente quelante capaz de interagir com diversas substâncias, tais como os metais de transição, levando à formação de complexos de elevada estabilidade, impedindo que estas substâncias interajam com as cadeias de insulina e levem à formação de precipitados.

Relativamente à ureia, trata-se de um solvente orgânico, cuja função na mistura reacional em estudo era levar à quebra das ligações hidrofóbicas da insulina, e por conseguinte destabilizar a sua estrutura, levando deste modo à desnaturação da proteína em causa.

No que toca à insulina, esta foi o substrato proteico que esteve na base da reação química ocorrida, pretendendo-se com o uso da mesma a quebra das ligações dissulfito desta hormona com consequente produção das cadeias A e B separadas.

Por fim, o último reagente utilizado foi o β -mercaptoetanol, o qual é um composto químico capaz de quebrar as pontes dissulfeto presentes numa grande variedade de proteínas, tais como a insulina, permitindo deste modo atingir o primeiro objetivo estabelecido para a presente atividade laboratorial.

Com o intuito de recolher individualmente as cadeias A e B de insulina, após atingir os 30 minutos de reação, procedeu-se rapidamente à injeção no aparelho de HPLC da mistura reacional de forma a evitar a possível interferência do oxigénio, encontrando-se a separação obtida representada no gráfico 7.

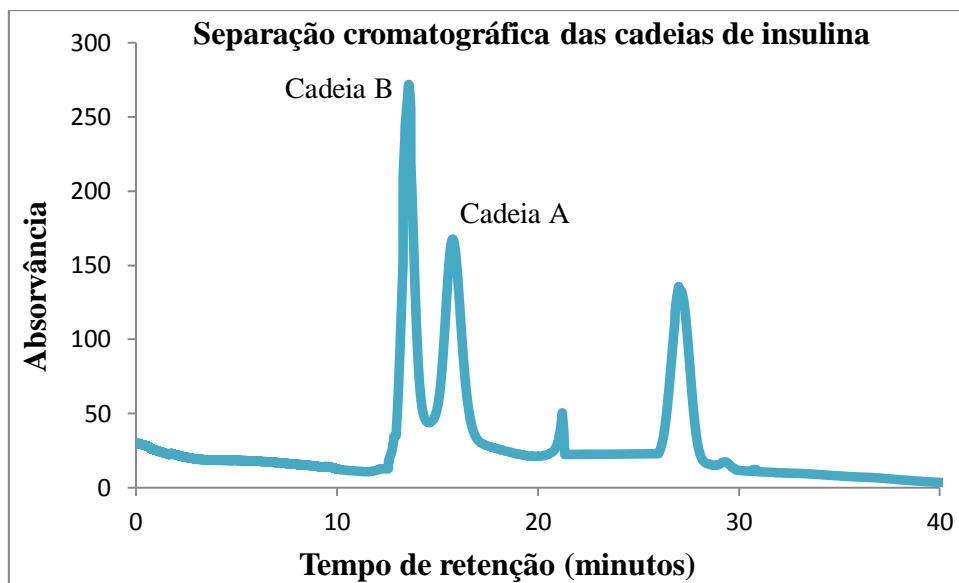


Gráfico 7 - Separação cromatográfica das cadeias A e B da molécula de insulina.

Através da análise do gráfico, é possível constatar que as cadeias A e B de insulina apresentam tempos de retenção distintos entre si e divergentes dos restantes compostos da mistura reacional. Tal ocorrência deve-se às suas características físico-químicas, nomeadamente a sua massa molecular, apresentando a cadeia B uma massa de aproximadamente 3300Da, ao passo que a cadeia A apresenta uma massa de 2500Da.

Assim, atendendo ao facto de que proteínas com uma massa molecular superior são as primeiras a ser eluídas da coluna cromatográfica, numa primeira instância será possível recolher a cadeia B e posteriormente a cadeia A da insulina, estando a este nível a sua separação dada como concluída.

Finalizada a redução e purificação das cadeias A e B de insulina, era então possível proceder à terceira etapa do ensaio, mais precisamente a avaliação do grau de estabilidade das cadeias obtidas.

A título de interesse foi igualmente utilizada a técnica de dispersão dinâmica da luz para avaliar a insulina, de forma a tornar possível de algum modo, a existência de um termo comparativo para com as suas cadeias isoladas.

Deste modo, antes de passar à avaliação dos resultados obtidos é de extrema importância compreender os princípios subjacentes ao método utilizado, assim como as suas aplicações.

Neste âmbito, o aparelho Nanopartica SZ-100 é uma potente ferramenta no que ao estudo das propriedades físicas das partículas diz respeito, pelo que a técnica de DLS tem sido aplicada com sucesso para a monitorização de alterações do tamanho molecular de proteínas aquando dos processos de desnaturação. A aplicação mais importante deste tipo de técnica no âmbito do trabalho realizado é a avaliação do grau de agregação das partículas, sendo esta uma das finalidades com que foi usada (Gast et al., 1992; Chicea et al., 2010; Pohl et al., 2012).

Contudo, este método contém algumas limitações, sendo uma delas o facto de apenas medir numa gama de valores que varia entre os 0,3nm e 8µm, o que pode influenciar a análise dos resultados e as ilações que daí advém. É ainda de apontar que as medições efetuadas são afetadas por determinados fatores tais como a não desejável presença de partículas grandes e a densidade das partículas em estudo, tendo a sua influência relativamente ao método em causa sido descrita no capítulo da introdução (Chicea et al., 2010).

Não menos importante é de mencionar a necessidade de otimização do binómio tempo-temperatura. A primeira variável está diretamente relacionada com a viabilidade dos péptidos obtidos, continuando por desvendar a estabilidade das cadeias de insulina quando sujeitas ao congelamento assim como o entendimento de possíveis alterações estruturais que ocorram. Relativamente à segunda variável, a temperatura, a sua importância foi já abordada na referida seção do método descrito ao nível da introdução, sendo parte integrante da equação de Stockes-Einstein que é essencial para a obtenção do diâmetro hidrodinâmico das partículas (Horiba, s.d.; LSinstruments, s.d.).

Concluída esta breve abordagem à técnica utilizada é então possível passar à apresentação e discussão dos resultados propriamente ditos, sendo a primeira amostra a

merecer atenção a insulina bovina, cujos resultados se encontram representados nos gráficos 8, 9 e 10.

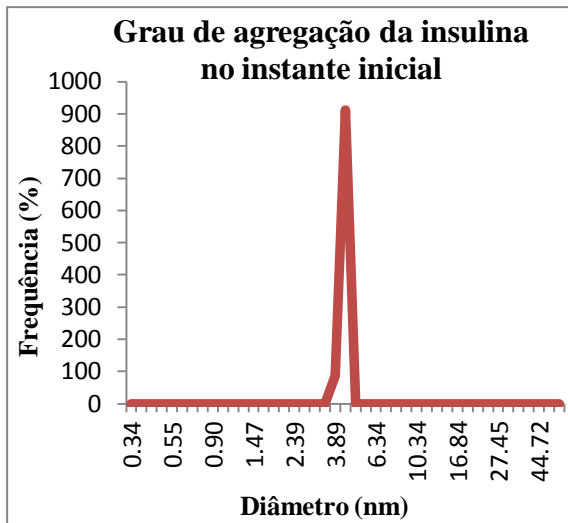


Gráfico 8 - Resultado de DLS obtido para a amostra de insulina no instante inicial.

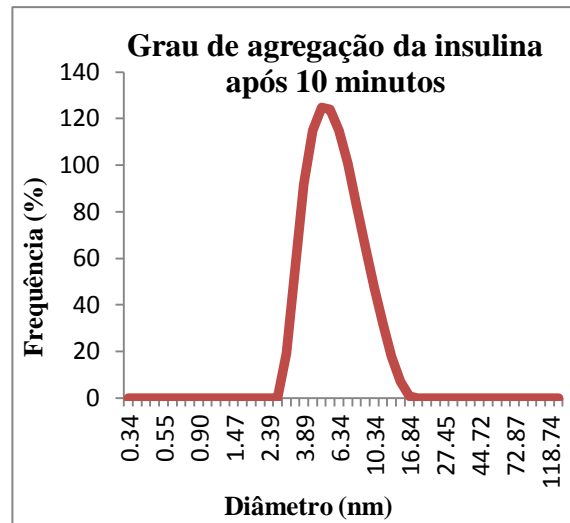


Gráfico 9 - Resultado de DLS obtido para a amostra de insulina após 10 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

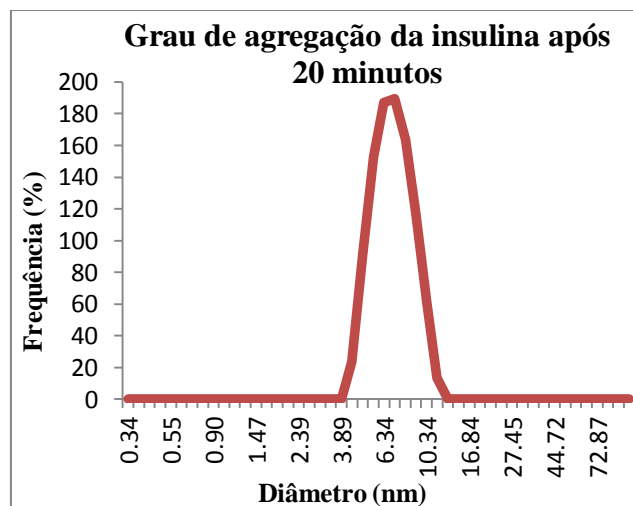


Gráfico 10 - Resultado de DLS obtido para a amostra de insulina após 20 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

Após a análise dos resultados obtidos é possível constatar que no instante inicial a amostra de insulina bovina apresentava um diâmetro médio de partículas de 4.40nm, após 10 minutos a 37°C um diâmetro médio de 5.60nm e de aproximadamente 7.15nm decorridos 20 minutos. Tal facto permite concluir que ocorreu uma reação durante o período de tempo em que a insulina esteve em contato com uma temperatura superior à temperatura ambiente, mais precisamente uma reação de auto-associação, sendo a evolução deste fenómeno visível através do gráfico 11.

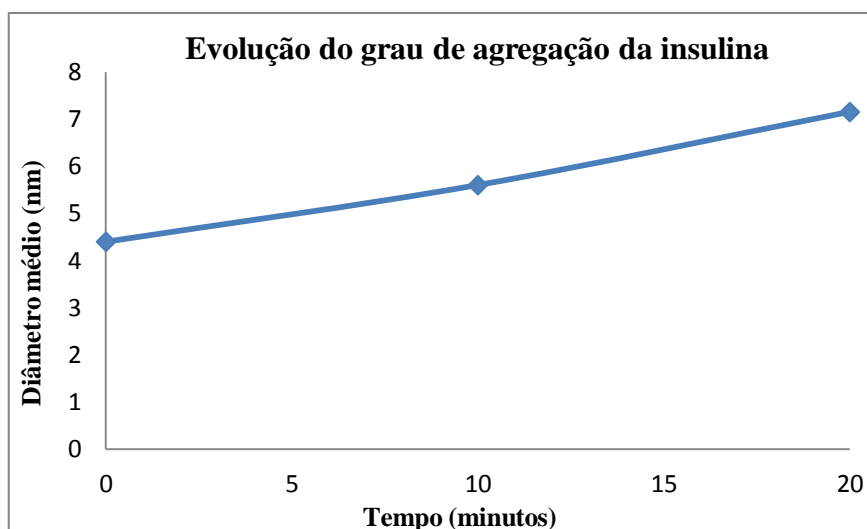


Gráfico 11 - Evolução do grau de agregação da insulina determinado por DLS.

Segundo diversos estudos a insulina é uma proteína com elevada tendência para sofrer fenômenos de auto-associação, os quais apesar de não estarem totalmente esclarecidos estão intimamente associados a determinadas condições, tais como a alteração de pH ou aumento de temperatura (Bohidar, 1989; Bohidar, 1998). Adicionalmente, existem dados científicos que apontam para que o monômero de insulina apresente um diâmetro médio de aproximadamente 2.6nm, ao passo que o seu hexâmero apresenta um diâmetro médio de sensivelmente 5.6nm (Silva et al., 2003). Tais dados corroboram a hipótese de que aquando da sujeição da insulina a temperaturas na ordem dos 37°C, esta apresenta uma tendência inata a formar agregados.

Deste modo, ao analisar os resultados obtidos, em particular os do gráfico 8, é possível inferir que mesmo se encontrando à temperatura ambiente a insulina forma agregados, estando o aumento da temperatura associado ao aumento dos agregados formados por analogia ao aumento do diâmetro registado.

Contudo, para fazer uma análise mais pormenorizada do efeito da temperatura, esta deveria ter sido avaliada numa gama mais abrangente de valores, viabilizando deste modo a determinação dos valores ótimos e críticos para a estabilidade tanto da insulina como das suas cadeias separadas.

A segunda amostra analisada segundo a técnica em foco foi a cadeia A de insulina, encontrando-se os respetivos resultados nos gráficos 12 a 15.

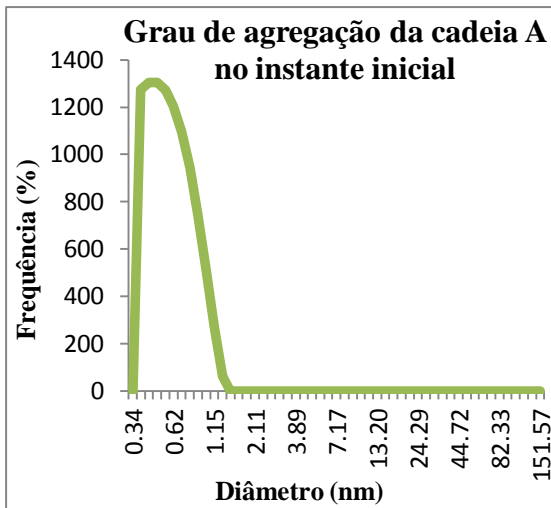


Gráfico 12 - Resultado de DLS obtido para a amostra de cadeia A de insulina no instante inicial.

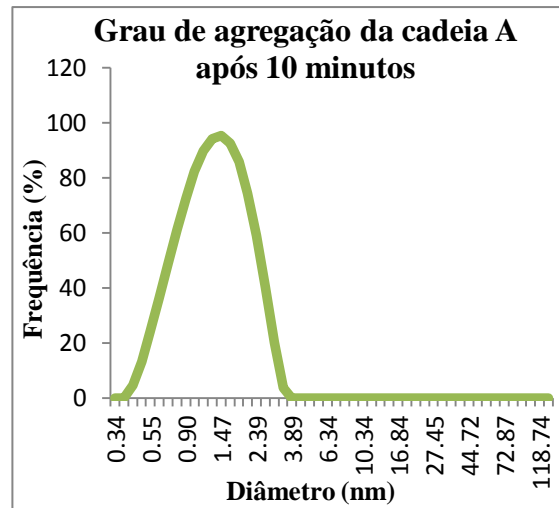


Gráfico 13 - Resultado de DLS obtido para a cadeia A de insulina após 10 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

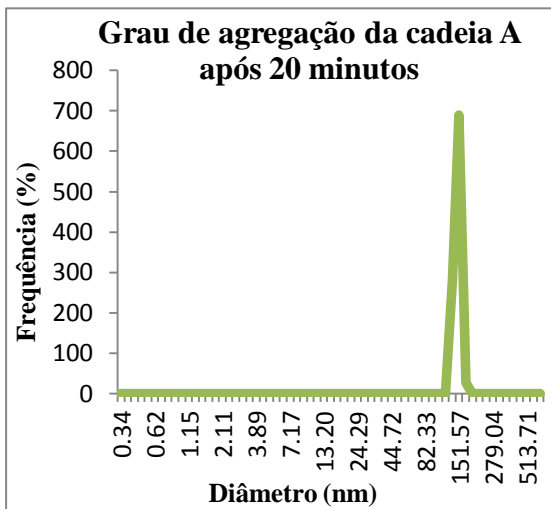


Gráfico 14 - Resultado de DLS obtido para a cadeia A de insulina após 20 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

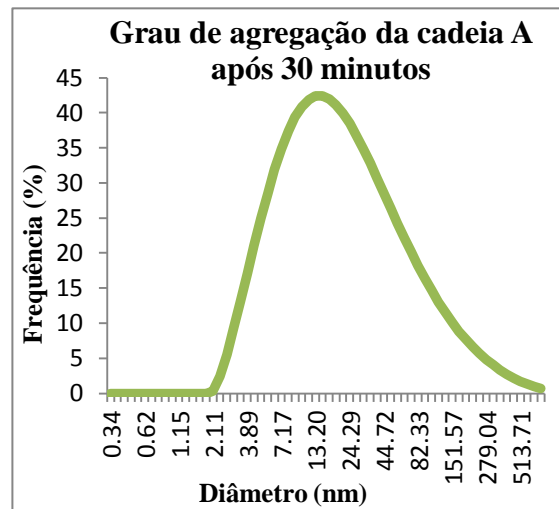


Gráfico 15 - Resultado de DLS obtido para a cadeia A de insulina após 30 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

Os pressupostos descritos para a insulina verificam-se igualmente para a sua cadeia A, tal como é possível constatar através dos respetivos gráficos.

Deste modo, constata-se que no gráfico 12 o diâmetro médio das partículas é de aproximadamente 0,60 nm, passados 10 minutos apresenta um valor de 1,47 nm, ao fim de 20 minutos 151,57 nm, e ao final de 30 minutos um valor médio de 19,30 nm, estando igualmente presentes partículas de diâmetro superior a 300 nm. Os resultados obtidos encontram-se dentro do esperado, pois tal como referido para a insulina o aumento da temperatura está associado ao aumento do fenómeno de auto-associação, o

que numa instância final se traduz no aumento do diâmetro verificado. A respetiva evolução do grau de agregação da cadeia A verificada experimentalmente encontra-se representada no gráfico 16.

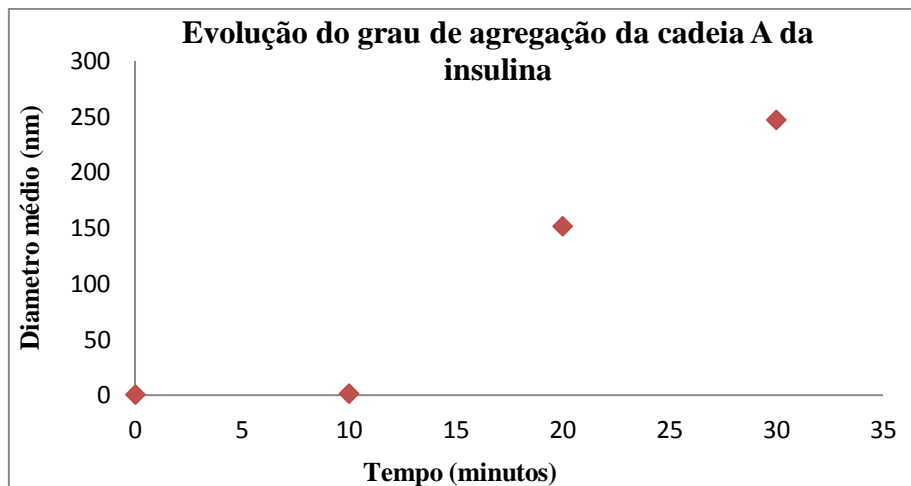


Gráfico 16 - Evolução do grau de agregação da cadeia A de insulina determinado por DLS.

Para finalizar, a última amostra sujeita ao ensaio de dispersão dinâmica de luz foi a cadeia B de insulina, cujos resultados se encontram expressos nos gráficos 17 a 22.

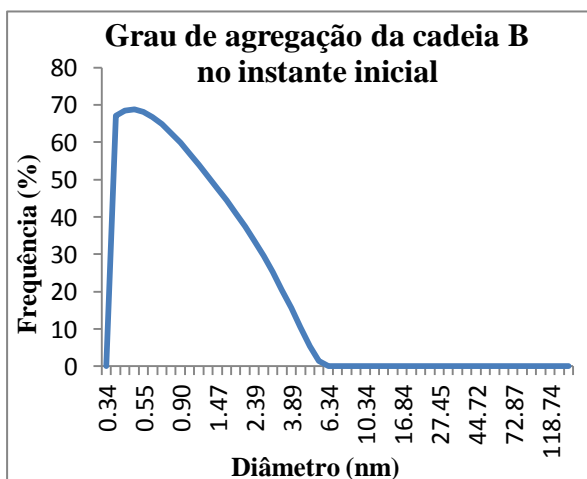


Gráfico 17 - Resultado de DLS obtido para a amostra de cadeia B de insulina no instante inicial.

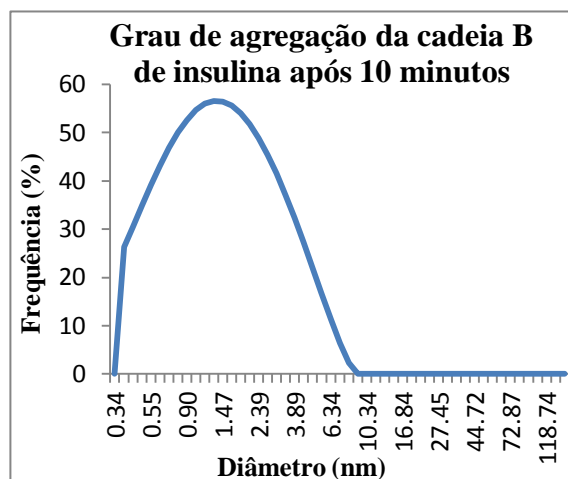


Gráfico 18 - Resultado de DLS obtido para a amostra de cadeia B de insulina após 10 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

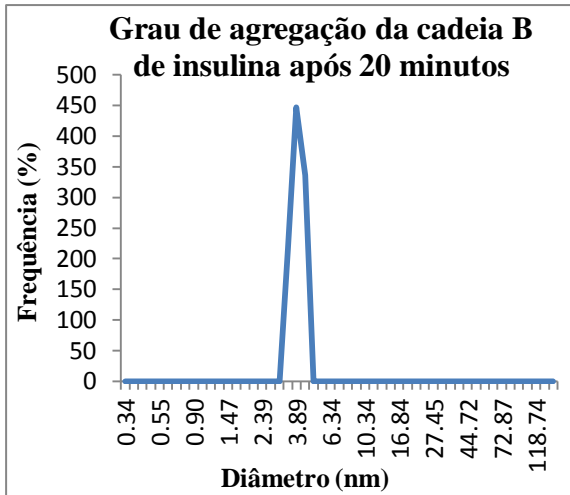


Gráfico 19 - Resultado de DLS obtido para a amostra de cadeia B de insulina após 20 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

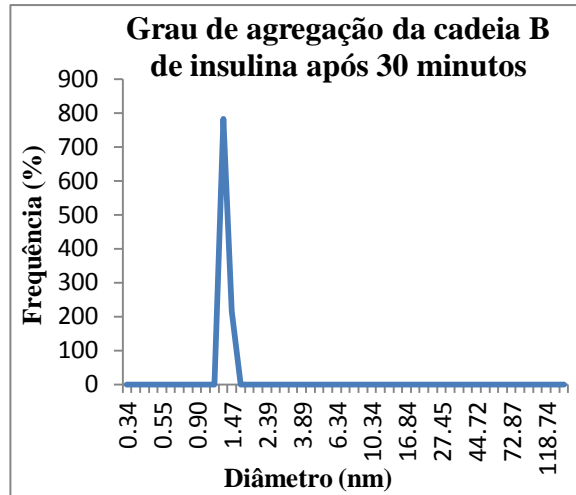


Gráfico 20 - Resultado de DLS obtido para a amostra de cadeia B de insulina após 30 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

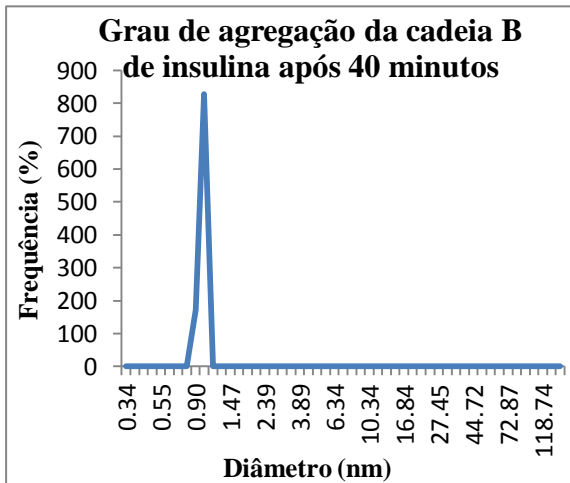


Gráfico 21 - Resultado de DLS obtido para a amostra de cadeia B de insulina após 40 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

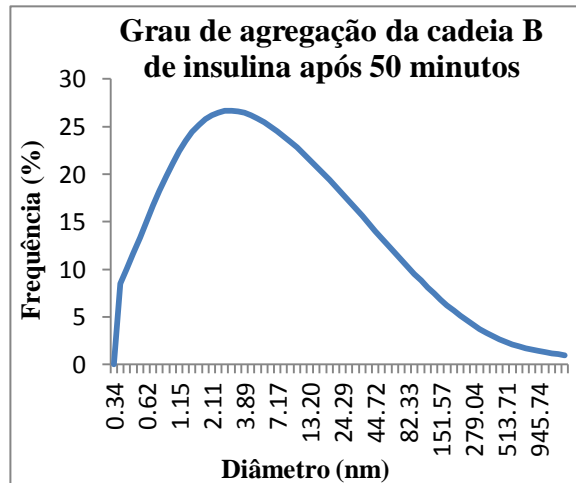


Gráfico 22 - Resultado de DLS obtido para a amostra de cadeia B de insulina após 50 minutos no aparelho de DLS a 37°C.

Os resultados de dispersão dinâmica da luz da amostra de cadeia B de insulina não foram ao encontro do esperado, visto não ter sido possível observar o caráter comportamental descrito teoricamente para esta proteína.

Aquando da obtenção dos resultados, o *software* notificou um problema que só mais tarde foi detetado, mais precisamente um erro de aquisição de dados. A explicação para tal problema, prende-se no facto de as cadeias de insulina terem elevada tendência de se agregar, em especial a cadeia B, comumente caracterizada físico-quimicamente pela sua hidrofobicidade (Tang & Tsou, 1990). Assim, dado que a cadeia B apresenta

uma maior tendência para a auto-associação comparativamente com a cadeia A de insulina, é possível que os agregados formados tenham ultrapassado o limite máximo de detecção do aparelho, levando por conseguinte a resultados erróneos, pelo que é inevitável a repetição do presente ensaio para que se possam apresentar conclusões concretas e fundamentadas. Contudo deve ser equacionada a realização de uma diluição da amostra em estudo aquando da repetição do ensaio, de modo a evitar que volte a ocorrer o mesmo problema.

4. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido permitiu alcançar os objetivos estabelecidos numa fase inicial do projeto de investigação, dado que com recurso aos diversos ensaios desenvolvidos *in vitro* permitiu constatar a hipótese inicial de que as cadeias A e B da molécula de insulina apresentam comportamentos e estabilidade diferentes quando expostas às mesmas condições.

Não obstante, as experiências realizadas permitiram igualmente confirmar o facto de que a PDI catalisa a redução de ligações dissulfito em diversos compostos, nomeadamente a insulina, possibilitando o isolamento de péptidos de interesse.

Para além do referido, a mimetização da reação descrita entre a enzima supracitada e a hormona em causa facultou a obtenção das cadeias A e B de insulina puras, através das quais foi possível avaliar o fenómeno de agregação e por conseguinte a estabilidade das mesmas. Os resultados obtidos neste âmbito foram ao encontro do esperado, permitindo afirmar que a agregação é uma característica inata não só à insulina como às suas cadeias, em particular a cadeia B, sendo contudo necessários mais estudos para a compreensão deste comportamento.

Assim, como perspetivas futuras, é de salientar a necessidade de ensaios que visem a otimização do binómio tempo-temperatura já referido, de modo a permitir tirar ilações mais concretas e ao encontro da realidade no que à estabilidade da insulina e suas cadeias diz respeito. Adicionalmente, o fenómeno de estabilidade deve ser futuramente avaliado tendo não só em conta os péptidos isolados, mas também na presença de uma *pool* proteica densa, à semelhança do que acontece a nível fisiológico.

5. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, A., Uversky, V. N., Hong, D. e Fink, A. L. (2005). Early events in the fibrillation of monomeric insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42669-42675.
- American Diabetes Association (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36(1), S67-74.
- Appenzeller-Herzog, C. e Ellgaard, L. (2008). The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(4), 535-548.
- Aran, A., Weiner, K., Lin, L., Finn, L. A., Greco, M. A., Peppard, P., ... Mignot, E. (2010). Post-streptococcal auto-antibodies inhibit protein disulfide isomerase and are associated with insulin resistance. *Plos One*, 5(9), e12875.
- Asada, H., Douen, T., Mizokoshi, Y., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. e Muranishi, S. (1994). Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution. *Pharmaceutical Research*, 11(8), 1115-1120.
- Attri, A. K., Fernández, C. e Minton, A. P. (2010). Self-association of Zn-insulin at neutral pH: Investigation by concentration gradient-static and dynamic light scattering. *Biophysical Chemistry*, 148(1), 23-27.
- Block, I. D. e Scheffold, F. (2010). Modulated 3D cross-correlation light scattering: Improving turbid sample characterization. *Review of Scientific Instruments*, 81(12), 123107.
- Bohidar, H. B. (1989). Dynamic light scattering study of heat aggregation of insulin. *Colloid and Polymer Science*, 267(2), 159-166.
- Bohidar, H. B. (1998). Light scattering and viscosity study of heat aggregation of insulin. *Biopolymers*, 45(1), 1-8.
- Brange, J., Langkjær, L., Havelund, S. e Vølund, A. (1992). Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations. *Pharmaceutical Research*, 9(6), 715-726.
- Brems, D. N., Brown, P. L., Nakagawa, S. H. e Tager, H. S. (1991). The conformational stability and flexibility of insulin with an additional intramolecular cross-link. *Journal of Biological Chemistry*, 266(3), 1611-1615.

- Buijs, J., Vera, C. C., Ayala, E., Steensma, E., Håkansson, P. e Oscarsson, S. (1999). Conformational stability of adsorbed insulin studied with mass spectrometry and hydrogen exchange. *Analytical Chemistry*, 71(15), 3219-3225.
- Bumagina, Z., Gurvits, B., Artemova, N., Muranov, K. e Kurganov, B. (2010). Paradoxical acceleration of dithiothreitol-induced aggregation of insulin in the presence of a chaperone. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4556-4579.
- Chicea, D., Chicea, R. e Chicea L. M. (2010). Using dynamic light scattering particle sizing as a fast screening procedure for urine sample analysis. *Romanian J. Biophys.*, 20(3), 257-267.
- Ciszak, E., Beals, J. M., Frank, B. H., Baker, J. C., Carter, N. D. e Smith, G. D. (1995). Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin. *Structure*, 3(6), 615-622.
- Cohen, P. (2006). The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 867-873.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G. e Hamel, F. G. (1998). Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine Reviews*, 19(5), 608-624.
- Ellgaard, L. e Ruddock, L. W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *Embo Reports*, 6(1), 28-32.
- Essex, D. W., Chen, K. e Swiatkowska, M. (1995). Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood*, 86(6), 2168-2173.
- Fernandes, V. C., Denadai, Â. M. L., Millán, R. D. S., Alves, R. J. e Júnior, A. S. C. (2007). Caracterização físico-química de complexos de insulina: dimetil- β -ciclodextrina e insulina: hidroxipropil- β -ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(4), 543-553.
- Friskén, B. J. (2001). Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics*, 40(24), 4087-4091.
- Gabbay, M. A. L. (2008). Adjuvantes no tratamento da hiperglicemia do diabetes melito tipo 1. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*, 52(2), 279-287.
- Gallenberger, M., Castell, W., Hense, B. A. e Kuttler, C. (2012). Dynamics of glucose and insulin concentration connected to the β -cell cycle: model development and analysis. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 9(1), 46.

- Galligan, J. J. e Petersen, D. R. (2012). The human protein disulfide isomerase gene family. *Human Genomics*, 6(1), 6.
- Gast, K., Damaschun, G., Misselwitz, R. e Zirwer, D. (1992). Application of dynamic light scattering to studies of protein folding kinetics. *European Biophysics Journal*, 21(5), 357-362.
- Giger, K., Vanam, R. P., Seyrek, E. e Dubin, P. L. (2008). Suppression of insulin aggregation by heparin. *Biomacromolecules*, 9(9), 2338-2344.
- Haber, E. P., Curi, R., Carvalho, C. R. O. e Carpinelli, A. R. (2001). Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 45(3), 219-227.
- Hale, L. J. e Coward, R. J. M. (2013). Insulin signalling to the kidney in health and disease. *Clinical Science*, 124(6), 351-370.
- Hatahet, F. e Ruddock, L. W. (2007). Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *Febs Journal*, 274(20), 5223-5234.
- Heile, M. e Schneider, D. (2012). The evolution of insulin therapy in diabetes mellitus. *Supplement to The Journal of Family Practice*, 61(5), S6-12.
- Hills, L. P. e Tiffany, T. O. (1980). Comparison of turbidimetric and light-scattering measurements of immunoglobulins by use of a centrifugal analyzer with absorbance and fluorescence/light scattering optics. *Clin. Chem.*, 26(10), 1459-1466.
- Horiba. (s.d.). *Dynamic light scattering technology*. Disponível em: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/>.
- Ibrahim, M. A. (2010). Assessment of insulin stability inside diblock copolymer PEG-PLA microspheres. *Scientia Pharmaceutica*, 78(3), 493-505.
- Jasuja, R., Passam, F. H., Kennedy, D. R., Kim, S. H., Hessem, L. V., Lin, L., ... Flaumenhaft, R. (2012). Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2104-2113.
- Jørgensen, L., Vermehren, C., Bjerregaard, S. e Froekjaer, S. (2003). Secondary structure alterations in insulin and growth hormone water-in-oil emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 254(1), 7-10.
- Joshi, S. R., Parikh, R. M. e Das, A. K. (2007). Insulin - history, biochemistry, physiology and pharmacology. *Journal of the Association of Physicians of India*, 55, 19-25.

- Kaarsholm, N. C., Norris, K., Jørgensen, R. J., Mikkelsen, J., Ludvigsen, S., Olsen, O. H., ... Havelund, S. (1993). Engineering stability of the insulin monomer fold with application to the structure-activity relationships. *Biochemistry*, 32(40), 10773-10778.
- Keller, D., Clausen, R., Josefsen, K. e Led, J. J. (2001). Flexibility and bioactivity of insulin: an NMR investigation of the solution structure and folding of an unusually flexible human insulin mutant with increased biological activity. *Biochemistry*, 40(35), 10732-10740.
- Lasker, S. P., McLachlan, C. S., Wang, L., Ali, S. M. K. e Jelinek, H. F. (2010). Discovery, treatment and management of diabetes. *Journal of Diabetology*, 1, 1.
- Laurindo, F. R. M., Pescatore, L. A. e Fernandes, D. C. (2012). Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 1954-1969.
- Lipson, K. L., Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Nguyen, L. X., Foss, E., Bortell, R., ... Urano, F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metabolism*, 4(3), 245-254.
- Lovatt, M., Cooper, A. e Camilleri, P. (1996). Energetics of cyclodextrin-induced dissociation of insulin. *European Biophysics Journal*, 24(5), 354-357.
- LSinstruments. (s.d.). *Dynamic light scattering: Measuring the particle size distribution*. Disponível em: http://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/.
- Lundström, J. e Holmgren, A. (1990). Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9114-9120.
- Lyutova, E. M., Kasakov, A. S. e Gurvits, B. Y. (2007). Effects of arginine on kinetics of protein aggregation studied by dynamic laser light scattering and turbidimetry techniques. *Biotechnology Progress*, 23(6), 1411-1416.
- Machado, U. F. (1998). Transportadores de glicose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 42(6), 413-421.
- Maia, A. M. S., Villetti, M. A., Vidal, R. R. L., Borsali, R. e Balaban, R. C. (2011). Solution properties of a hydrophobically associating polyacrylamide and its polyelectrolyte derivatives determined by light scattering, small angle x-ray

- scattering and viscometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(3), 489-500.
- Martell, D. R. D., Briones, J. R., Hurtado, M. G., López, A. R. e Meneses, V. M. C. (2009). Effect of solvents on the morphological characterization of enteric nanoparticles. *Materials Research*, 12(4), 405-410.
- Matsuura, J., Powers, M., Manning, M. C. e Shefter, E. (1993). Structure and stability of insulin dissolved in 1-octanol. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 1261-1264.
- McDonald, T. J., Perry, M. H., Peake, R. W., Pullan, N. J., O'Connor, J., Shields, B. M., ... Hattersley, A. T. (2012). EDTA improves stability of whole blood C-peptide and insulin to over 24 hours at room temperature. *Plos One*, 7(7), e42084.
- Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., ... Lawrence, M. C. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*, 493(7431), 241-245.
- Mora, M. E. V., Scarfone, A., Calvani, M., Greco, A. V. e Mingrone, G. (2003). Insulin clearance in obesity. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(6), 487-493.
- Morais, I. P. A., Tóth, I. V. e Rangel, A. O. S. S. (2006). Turbidimetric and nephelometric flow analysis: concepts and applications. *Spectroscopy Letters*, 39(6), 547-579.
- Nardai, G., Korcsmáros, T., Papp, E. e Csermely, P. (2003). Reduction of the endoplasmic reticulum accompanies the oxidative damage of diabetes mellitus. *Biofactors*, 17(1), 259-267.
- Nigro, J., Osman, N., Dart, A. M. e Little, P. J. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocrine Reviews*, 27(3), 242-259.
- Oka, O. B. V. e Bulleid, N. J. (2013). Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(11), 2425-2429.
- Okada, K., Hashimoto, S. e Imaoka, S. (2010). Biological functions of protein disulfide isomerase as a target of phenolic endocrine-disrupting chemicals. *Journal of Health Science*, 56(1), 1-13.
- Olsen, H. B., Ludvigsen, S. e Kaarsholm, N. C. (1996). Solution structure of an engineered insulin monomer at neutral pH. *Biochemistry*, 35(27), 8836-8845.
- Pires, A. C. e Chacra, A. R. (2008). A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*, 52(2), 268-278.

- Pohl, R., Hauser, R., Li, M., Souza, E., Feldstein, R., Seibert, R., ... Steiner, S. (2012). Ultra-rapid absorption of recombinant human insulin induced by zinc chelation and surface charge masking. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 6(4), 755-763.
- Rajpal, G., Schuiki, I., Liu, M., Volchuk, A. e Arvan, P. (2012). Action of protein disulfide isomerase on proinsulin exit from endoplasmic reticulum of pancreatic β -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 43-47.
- Raturi, A., Vacratsis, P. O., Seslija, D., Lee, L. e Mutus, B. (2005). A direct, continuous, sensitive assay for protein disulphide-isomerase based on fluorescence self-quenching. *Biochem. J.*, 391, 351-357.
- Rhodes, C. J. e White, M. F. (2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(3), 3-13.
- Root, P., Sliskovic, I. e Mutus, B. (2004). Platelet cell-surface protein disulphide-isomerase mediated S-nitrosoglutathione consumption. *Biochem. J.*, 382, 575-580.
- Rutkevich, L. A., Cohen-Doyle, M. F., Brockmeier, U. e Williams, D. B. (2010). Functional relationship between protein disulfide isomerase family members during the oxidative folding of human secretory proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 21(18), 3093-3105.
- Santos, C., Afonso, R. A., Guarino, M. P., Patarrao, R. S., Fernandes, A., Noronha, J. P., ... Caldeira, J. (2006). In vitro nitrosation of insulin A-and B-chains. *European Journal of Mass Spectrometry*, 12(5), 331-338.
- Shimkunas, R. A., Robinson, E., Lam, R., Lu, S., Xu, X., Zhang, X. Q., ... Ho, D. (2009). Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles. *Biomaterials*, 30(29), 5720-5728.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D. e Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: III. Aplicação à insulina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(1), 21-40.
- Skelin, M., Rupnik, M. e Cencič, A. (2010). Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *Altex*, 27(2), 105-113.
- Sliskovic, I., Raturi, A. e Mutus, B. (2005). Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 8733-8741.
- Smith, A. M., Chan, J., Oksenberg, D., Urfer, R., Wexler, D. S., Ow, A., ... Huang, S. G. (2004). A high-throughput turbidometric assay for screening inhibitors of protein disulfide isomerase activity. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(7), 614-620.

- Smith, B. J., Huang, K., Kong, G., Chan, S. J., Nakagawa, S., Menting, J. G., ... Lawrence, M. C. (2010). Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6771-6776.
- Smith, G. D., Swenson, D. C., Dodson, E. J., Dodson, G. G. e Reynolds, C. D. (1984). Structural stability in the 4-zinc human insulin hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(22), 7093-7097.
- Stolf, B. S., Smyrniak, I., Lopes, L. R., Vendramin, A., Goto, H., Laurindo, F. R. M., ... Santos, C. X. C. (2011). Protein disulfide isomerase and host-pathogen interaction. *The Scientific World Journal*, 11, 1749-1761.
- Taluja, A. e Bae, Y. H. (2007). Role of a novel excipient poly (ethylene glycol)-b-poly (L-histidine) in retention of physical stability of insulin at aqueous/organic interface. *Molecular Pharmaceutics*, 4(4), 561-570.
- Tang, J. G. e Tsou, C. L. (1990). The insulin A and B chains contain structural information for the formation of the native molecule. Studies with protein disulphide-isomerase. *Biochem. J.*, 268(2), 429-435.
- Tantipolphan, R., Romeijn, S., Engelsman, J. D., Torosantucci, R., Rasmussen, T. e Jiskoot, W. (2010). Elution behavior of insulin on high-performance size exclusion chromatography at neutral pH. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(2), 195-202.
- Walker, A. K., Soo, K. Y., Levina, V., Talbo, G. H. e Atkin, J. D. (2013). N-linked glycosylation modulates dimerization of protein disulfide isomerase family A member 2 (PDIA2). *Febs Journal*, 280(1), 233-243.
- Wang, L., Fast, D. G. e Attie, A. D. (1997). The enzymatic and non-enzymatic roles of protein-disulfide isomerase in apolipoprotein B secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27644-27651.
- Wang, Z. e Thurmond, D. C. (2009). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *Journal of Cell Science*, 122(7), 893-903.
- Ward, C. W. e Lawrence, M. C. (2011). Landmarks in insulin research. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 76.
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C. e Shaw, J. (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(3), 311-321.

- Whittingham, J. L., Scott, D. J., Chance, K., Wilson, A., Finch, J., Brange, J. e Guy Dodson, G. (2002). Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *Journal of Molecular Biology*, 318(2), 479-490.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clinical Biochemist Reviews*, 26(2), 19-39.
- Wilson, R., Lees, J. F. e Bulleid, N. J. (1998). Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9637-9643.
- Xiong, Y., Manevich, Y., Tew, K. D. e Townsend, D. M. (2012). S-glutathionylation of protein disulfide isomerase regulates estrogen receptor α stability and function. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 273549.
- Xu, Y., Yan, Y., Seeman, D., Sun, L. e Dubin, P. L. (2011). Multimerization and aggregation of native-state insulin: effect of zinc. *Langmuir*, 28(1), 579-586.
- Yaturu, S. (2013). Insulin therapies: Current and future trends at dawn. *World Journal of Diabetes*, 4(1), 1-7.
- Yip, C. C. e Ottensmeyer, P. (2003). Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27329-27332.
- Yuan, Y., Wang, Z. e Tang, J. (1999). Intra-A chain disulphide bond forms first during insulin precursor folding. *Biochem. J.*, 343, 139-144.
- Zhang, L., Zhu, W., Song, L., Wang, Y., Jiang, H., Xian, S. e Ren, Y. (2009). Effects of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on in vitro insulin stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(5), 2031-2040.
- Zoete, V. e Meuwly, M. (2006). Importance of individual side chains for the stability of a protein fold: computational alanine scanning of the insulin monomer. *Journal of Computational Chemistry*, 27(15), 1843-1857.